

**EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL PROCESO FOTO-FENTON
HOMOGENEO A ESCALA PILOTO EN LA INACTIVACION DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS UTILIZANDO BAJAS
CONCENTRACIONES DE HIERRO Y pH CERCANO AL NEUTRO**

DAISSY MABEL GOMEZ FAJARDO



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2012**

**EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL PROCESO FOTO-FENTON
HOMOGENEO A ESCALA PILOTO EN LA INACTIVACION DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS UTILIZANDO BAJAS
CONCENTRACIONES DE HIERRO Y pH CERCANO AL NEUTRO**

DAISSY MABEL GOMEZ FAJARDO

**Proyecto de Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar
el titulo de Químico.**

Director

Norberto Benítez Dr. Sci.

Codirector

Sandra Faisuler Potosí., Química

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2012

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

DAISSY MABEL GOMEZ FAJARDO, 01/21/1988

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL PROCESO FOTO-FENTON
HOMOGENEO A ESCALA PILOTO EN LA INACTIVACION DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN AGUAS UTILIZANDO BAJAS
CONCENTRACIONES DE HIERRO Y pH CERCANO AL NEUTRO

PALABRAS CLAVES:

Desinfección solar de aguas

Procesos avanzados de oxidación.

Reacción foto-Fenton

Fotocatálisis homogénea.

Tratamiento de aguas

Degradación de ácidos húmicos.

A la memoria de mi padre...

***Sólo en la agonía de despedirnos somos capaces
de comprender la profundidad de nuestro amor.***

George Eliot

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

1. INTRODUCCION.....	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 GENERAL.....	14
2.2 ESPECIFICOS	14
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	15
3.1 CALIDAD MICROBIOLOGICA DEL AGUA.....	15
3.2 BACTERIAS	17
3.2.1 <i>Salmonella</i>	18
3.2.2 <i>Shiguella</i>	19
3.2.3 <i>Escherichia coli</i>	20
3.3 METODOLOGÍAS CLÁSICAS DE DESINFECCIÓN DE AGUA.....	21
3.3.1 Subproductos de la desinfección	22
3.4 PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACION.....	25
3.4.1 Desinfección de aguas por fotocátalisis	26
3.4.2 Proceso foto-Fenton	27
3.5 RADIACION SOLAR.....	30
3.6 REACTOR SOLAR CPC	32
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1 REACTIVOS.....	35
4.2 EQUIPOS Y CONDICIONES DE TRABAJO.....	35
4.3 PROCEDIMIENTOS FOTOCATALÍTICOS	37
5. RESULTADOS Y DISCUSION	39
5.1 EFECTO DEL PROCESO FOTO-FENTON EN LA INACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS: <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i>	39
5.2 APOORTE EN LA DESINFECCIÓN DE LA LUZ Y LUZ-H ₂ O ₂ EN AGUA DESTILADA.....	42

5.3	EFFECTO DEL PROCESO FENTON EN LA INACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS: <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> .	47
5.4	RECRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS DESPUÉS DE 48 HORAS EN AGUA DESTILADA.	50
5.5	INACTIVACIÓN BACTERIAL MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON EN PRESENCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS.	50
5.6	INACTIVACIÓN DE LA MEZCLA DE LAS BACTERIAS <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON.	53
6.	CONCLUSIONES	59
7.	REFERENCIAS	61
8.	ANEXO	72
8.1	CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura hipotética del ácido húmico	23
Figura 2.	Estructura hipotética del ácido fúlvico.....	23
Figura 3.	Esquema del ciclo foto-catalítico del proceso foto-Fenton.....	29
Figura 4.	Espectro de la irradiancia solar comparado con los espectros de absorción de una solución de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0.25mM Fe que equivale a 28 ppm de Fe^{3+}) y una suspensión de TiO_2 (50mg/L) O.D.: densidad óptica de muestras de 1 cm de espesor [56].	31
Figura 5.	Esquema de un CPC, y como refleja la radiación solar que llega en diferentes ángulos de incidencia [59].	33
Figura 6.	Reactor CPC.....	36
Figura 7.	Siembra de bacterias por medio del método de filtración por membrana.	37
Figura 8.	Inactivación de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> mediante el proceso foto-Fenton en ausencia de ácidos húmicos.	39
Figura 9.	Irradiación solar UV en Cali Colombia durante un experimento. Tiempo real: A partir de las 10:00 am hasta las 16:00 pm.	40
Figura 10.	Inactivación de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> en presencia de luz y luz- H_2O_2	43
Figura 11.	Estructura química del citocromo y de la flavina.....	45
Figura 12.	Estructura química del cluster de sulfuro de hierro y del complejo de coordinación Enterobactina- Fe^{3+}	46
Figura 13.	Inactivación de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> mediante el proceso Fenton en ausencia de ácidos húmicos	47
Figura 14.	Posibles reacciones que se llevan a cabo en la peroxidación lipídica de la membrana celular.	49
Figura 15.	Inactivación de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> en presencia y ausencia de ácidos húmicos (AH)	51

Figura 16.	Efecto de la presencia de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> en el seguimiento de la absorbancia en la degradación de ácidos húmicos (AH) a 254 nm.	51
Figura 17.	Efecto de la luz en presencia y ausencia de ácidos húmicos (AH) para las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i>	52
Figura 18.	Inactivación de la mezcla de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> en presencia de ácidos húmicos (AH) en comparación con cada bacteria individualmente	53
Figura 19.	Efecto de la presencia de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> , <i>E.coli</i> y la mezcla de las tres en el seguimiento de la absorbancia en la degradación de ácidos húmicos (AH) a 254 nm	55
Figura 20.	Inactivación de la mezcla de las bacterias <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> y <i>E.coli</i> en presencia de diferentes concentraciones de ácidos húmicos (AH) por medio del proceso foto-Fenton y de Luz	55
Figura 21.	Seguimiento de la absorbancia en la degradación de los ácidos húmicos (AH) a 254 nm en presencia como en ausencia de las bacterias: <i>S.typhimurium</i> , <i>S.sonnei</i> , y <i>E.coli</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

DBPs	Sub-Productos de desinfección
THMs	Trihalometanos
PAOs	Procesos Avanzados de Oxidación
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S.sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
UFC/100mL	Unidades Formadoras de Colonias por cada 100mL de Muestra
OMS	Organización Mundial de la Salud
MON	Materia Orgánica Natural
CPC	Colector Parabólico Compuesto
$Q_{UV,n}$	Energía acumulada que incide sobre el reactor
RC	Relación de Concentración
TOC	Carbono Orgánico Total
NPOC	Carbono Orgánico no Purgable
AH	Ácidos húmicos
UV	Ultravioleta
A	Absorbancia en un determinado tiempo.
A_0	Absorbancia inicial

RESUMEN

La desinfección del agua en la actualidad es uno de los temas de mayor, importancia, debido a que con procesos de desinfección adecuados se podría disminuir las infecciones intestinales y las numerosas muertes que son atribuidas al funcionamiento inadecuado de los sistemas de abastecimiento de agua. Para evitar estas consecuencias se ha venido investigando procesos adecuados para el tratamiento del agua potable, entre los cuales se ha encontrado la cloración, la cual a pesar de sus grandes ventajas, en presencia de materia orgánica hay la formación de productos de desinfección (DBPs) como los trihalometanos, los cuales han sido reportados por la OMS como sustancias potencialmente cancerígenas y mutagénicas. Por estas razones, se han buscado nuevas alternativas o procesos complementarios para el tratamiento del agua encontrando en los procesos de oxidación avanzada una alternativa eficiente en la remoción de materia orgánica y a su vez en la inactivación de microorganismos.

En este trabajo se evalúa la eficiencia del proceso foto- Fenton para la inactivación de las bacterias: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* a escala piloto en reactores CPC, tanto en agua destilada como en agua dopada con ácidos húmicos utilizando bajas concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno a pH cercano a la neutralidad. Además bajo estas mismas condiciones se evalúa el proceso de desinfección de las tres bacterias al estar mezcladas en solución utilizando dos concentraciones diferentes de ácidos húmicos. Los resultados muestran que utilizando el proceso foto-Fenton se obtiene una disminución considerable en la concentración inicial de las bacterias, en donde la *Salmonella typhimurium* presentó una mayor resistencia. Cuando el agua fue dopada con ácidos húmicos se pudo observar un retardo en el proceso de inactivación de las bacterias y la capacidad del proceso foto-Fenton para degradar los ácidos húmicos en presencia de las bacterias se ve disminuida.

1. INTRODUCCION

El agua es uno de los elementos naturales indispensables para el desarrollo de la vida y de las actividades humanas, debido a que es prácticamente imposible llevar a cabo las actividades diarias sin que esta esté presente. Según informes del World Resources Institute se conoce que muy poca agua es utilizada para el consumo del hombre, ya que el 97% es agua de mar, el 2% es hielo y está en los polos y solo el 1% del agua de todo el planeta es dulce y se encuentra en lagos, ríos y mantos subterráneos. Además solo el 0.4% está disponible y puede ser tratada para ser consumida sin riesgo en la salud por los seres humanos [1].

Sin embargo, debido al crecimiento de la población a nivel mundial y al aumento del uso del agua para diferentes actividades se ha incrementado el nivel de contaminación, lo cual está relacionado con los desechos de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. Estos microorganismos son causantes de enfermedades de origen hídrico, que generan altos porcentajes de morbi-mortalidad en la población. Las dolencias relacionadas con el agua afectan principalmente a las personas de escasos recursos en los países en vía de desarrollo [2]. Por tanto se estima que a nivel mundial el 90% de las enfermedades asociadas al suministro de agua domestica se relacionan con agentes microbianos y solo cerca del 10% con agentes químicos [3].

Debido a que el agua se encuentra distribuida no equitativamente en la población, el porcentaje más alto de esta que vive sin el suministro de agua con el tratamiento básico se encuentra en zonas rurales de países en vía de desarrollo. En las regiones del tercer mundo y en los países en vías de desarrollo como Colombia, esta problemática se ha visto agravada en los últimos 10 años, ya que

la disponibilidad de agua potable ha decrecido en un 35% por el tratamiento insuficiente del agua residual [4].

Para lograr la eliminación total o parcial de microorganismos patógenos y de desechos químicos de las aguas de consumo se han venido utilizando diferentes tecnologías tales como plantas de tratamiento biológico, por adsorción con carbón activado u otros adsorbentes, o por tratamientos químicos convencionales (oxidación térmica, cloración, ozonización, permanganato de potasio, etc.). El desinfectante más común en el tratamiento de agua potable es la cloración, ya que la adición de cloro genera compuestos como el ácido hipocloroso que son fuertemente oxidantes y logran la desinfección total. No obstante, en presencia de materia orgánica, el ácido hipocloroso reacciona para formar los conocidos subproductos de la desinfección (DBPs), entre ellos los trihalometanos (THMs), los cuales han sido reportados por la OMS como sustancias tóxicas para la salud humana, debido a que ocasionan mutaciones, desórdenes hormonales y cáncer [5,6].

Se ha demostrado que 1 ppm de materia orgánica es suficiente para producir una concentración mayor a 80 ppb de DBPs, la cual corresponde a la concentración límite permitida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) [7]. Los métodos convencionales para reducir materia orgánica en las plantas de tratamiento, no logran producir aguas con concentraciones menores de esta.

Por esta razón, con el propósito de reducir la materia orgánica y por ende los subproductos de desinfección se han estado investigando en los últimos años nuevas metodologías, para reemplazar o complementar los procesos convencionales de potabilización de agua que permitan obtener un agua potable más segura y sin efectos perjudiciales para la salud [8]. De esta forma se han planteado nuevas alternativas para el tratamiento de agua tales como los procesos

avanzados de oxidación (PAOs), los cuales han demostrado una gran eficiencia, debido a su viabilidad termodinámica y a una velocidad de reacción incrementada por la generación y uso de especies químicas transitorias altamente oxidantes [9,10].

Entre los PAOs más utilizados se encuentra el proceso foto-Fenton, el cual en presencia de radiación UV-visible y un catalizador genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), los cuales por su gran potencial de oxidación ($E=2.8\text{V}$ vs ENH), son capaces de degradar y oxidar sustancias orgánicas como también de eliminar bacterias patógenas presentes en el agua. No obstante, este método tiene la desventaja de que se debe mantener condiciones ácidas para evitar la precipitación de los iones Fe y estos se deben recuperar para cumplir con las normas medioambientales [11].

Para solucionar estos inconvenientes se han realizado estudios donde la reacción foto-Fenton es llevada a cabo utilizando concentraciones menores a 1 ppm de hierro y pH cercanos al neutro, evitando de esta manera la precipitación del hierro y la remoción de éste de la solución al finalizar el proceso [12].

Este sistema ha mostrado una excelente actividad fotocatalítica y por tanto se puede considerar como una metodología eficaz para la inactivación de bacterias y por ende para la desinfección de agua para consumo humano. Por esta razón en este trabajo se determinó la eficiencia del proceso foto-Fenton en la inactivación de los microorganismos: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*, a escala piloto en agua destilada tanto en ausencia como en presencia de ácidos húmicos utilizando bajas concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Evaluar la eficiencia del proceso foto-Fenton homogéneo a escala piloto en la inactivación de bacterias presentes en aguas utilizando bajas concentraciones de Fe y pH cercano a la neutralidad.

2.2 ESPECIFICOS

- Determinar la eficiencia del proceso foto-Fenton en la inactivación de los microorganismos: *Salmonella typhimurim*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*, en agua destilada utilizando bajas concentraciones de hierro y peróxido de hidrogeno a pH cercano a la neutralidad.
- Evaluar la degradación de ácidos húmicos y el efecto de la presencia de éstos en la inactivación de las bacterias por medio del proceso foto-Fenton homogéneo a escala piloto.
- Estimar la eficiencia del proceso foto-Fenton a escala piloto en la inactivación de la mezcla de las tres bacterias en agua destilada tanto en ausencia como en presencia de diferentes concentraciones de ácidos húmicos.

3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 CALIDAD MICROBIOLOGICA DEL AGUA

El agua es esencial para la vida y todos los seres humanos deben disponer de un suministro satisfactorio (suficiente, inocuo y accesible), debido a que el mejoramiento del acceso al agua potable puede proporcionar beneficios tangibles para la salud. En el mundo sólo el 1% es agua dulce superficial aprovechable, la cual primordialmente se encuentra en los lagos y ríos, a poca profundidad en el suelo, de donde puede extraerse sin mayor costo. Lo anterior indica, que a pesar de las enormes cantidades de agua en el mundo, ésta en su mayoría no se encuentra disponible [13].

La calidad de las fuentes naturales de agua ha tenido un deterioro progresivo, debido a que el acceso inadecuado al agua ha generado un problema de contaminación tanto a nivel microbiológico como a nivel químico, es decir, la mala gestión de muchos seres humanos ha creado desperdicios, contaminación y degradación del medio ambiente. Así mismo, por el crecimiento de la población, el éxodo hacia las ciudades y la industrialización ha incrementado la demanda de agua para la producción de alimentos, usos domésticos; además, para generación de energía eléctrica, acuicultura, pesca, recreación, turismo, navegación, entre otros.

De esta manera, los desechos arrojados a diversas fuentes de agua contienen gran diversidad de organismos patógenos, además de propiciar un medio apto para el desarrollo de estos. Dentro de estos microorganismos se encuentran: virus, bacterias, protozoos, hongos y huevos de helmintos; los cuales son responsables de transmitir enfermedades como Salmonelosis (*Salmonella*), Shigellosis (*Shigella*), Colera (*Vibrio Cholerae*), alteraciones gastrointestinales

(*Aeromonas*, *Mesofilas*, entre otros). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1.100 millones de personas en el mundo carecen de acceso a un agua segura y 2.400 millones de personas no tienen acceso a instalaciones sanitarias básicas. En consecuencia, cada año alrededor de cuatro millones de personas, la mayoría de ellos niños, mueren por enfermedades de origen hídrico, ya que el 80% de las enfermedades en los países en desarrollo están relacionadas con el agua [14].

Por tanto determinar el tipo de microorganismos presentes en el agua y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad de la misma. Sin embargo, existe una gran dificultad para determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental, debido a que dicha determinación conlleva a costos elevados, mayor tiempo, y la necesidad de laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con determinados grupos indicadores. Los microorganismos indicadores tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar. Una vez se ha demostrado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador [15].

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana, ya que los coliformes son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección. La

presencia de coliformes también constituye una alerta de la posible contaminación con microorganismos más patógenos como *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y especies de *Shigella* que son transmitidas por el agua. El grupo de los coliformes se encuentra integrado por las enterobacterias siendo la bacteria *Escherichia coli* el indicador universal de contaminación fecal. Sin embargo, tiene limitaciones, pues los virus y protozoos entéricos son más resistentes a la desinfección; por tanto, la ausencia de *E.coli* no garantiza la ausencia de estos organismos [16].

3.2 BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. No poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, el ADN es circular y cerrado, no poseen citoesqueleto y presentan orgánulos internos de locomoción.

Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglucano y se pueden dividir en dos grupos: Gram positivas (+) y Gram negativas (-). Esta división se basa en la capacidad de reacción de las bacterias frente al método de coloración, desarrollado por Christian Gram en 1884. Las bacterias Gram (+) toman un color violeta y las bacterias Gram (-) toman un color rosado. El fundamento de la técnica se basa en las diferencias existentes entre las paredes celulares de las bacterias. En el caso de las bacterias Gram-positivas la pared celular posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos. Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram-negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas. Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen debido a estas diferencias constitutivas de su pared [17]. En el proceso de

coloración las bacterias se tiñen con soluciones de cristal violeta y de yodo-yoduro potásico formando un complejo insoluble en agua entre el yodo y el cristal violeta. Posteriormente, se realiza un proceso de decoloración donde los organismos Gram (+) no se decoloran, mientras que los Gram (-) lo hacen. Para poner de manifiesto las células Gram (-) se utiliza una coloración de contraste de color rojo como la safranina o la fucsina básica.

El tamaño de las bacterias oscila entre 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico o microscopio electrónico. La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral).

Dentro de los diversos géneros de bacterias se destacan las enterobacterias, las cuales están conformadas por bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados que se encuentran en la flora normal del tracto digestivo del hombre y animales. Son bacterias poco exigentes, sobreviven al ambiente, contaminan el agua y alimentos y crecen en medios de cultivo comunes. Dentro de este género de bacterias se encuentran la *E.coli*, *Shigella* y *Salmonella* [18].

3.2.1 *Salmonella*

El género *Salmonella* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella gallinarum*, siempre inmóvil. La *salmonella*, es un género de bacterias patógenas descubiertas por el veterinario estadounidense Daniel Elmer

Salmon en 1885. Existen tres especies: *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*. Esta última presenta más de 1400 variedades antigénicas distintas [19].

El género *Salmonella* está ampliamente distribuido en el medio ambiente, pero algunas especies o serotipos presentan especificidad de hospedador. En concreto, *S. typhimurium* y, por lo general, *S. paratyphi* están restringidas al ser humano, aunque *S. Paratyphi* puede infectar ocasionalmente al ganado. Muchos serotipos, incluidos *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, infectan a las personas y a múltiples especies de animales, como aves de corral, vacas, cerdos, ovejas, otras aves e incluso reptiles. Los agentes patógenos típicamente acceden a los sistemas de distribución de agua mediante su contaminación fecal por descargas de aguas residuales, o por el ganado y los animales silvestres. Se ha detectado contaminación en una gran variedad de alimentos, incluida la leche [20].

Es uno de los géneros bacterianos que se encuentra asociado a brotes de enfermedades de origen hídrico, ya que son aislados de agua fresca, aguas servidas, agua dulce y agua salada, además de ciertos alimentos. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo y en el agua, así como en salmuera con 20% de sal. Esto es debido a que en condiciones de estrés sufre cambios en la expresión de sus genes, pudiendo además ocurrir recombinaciones homólogas que resulten en reacomodos de fragmentos de ADN causando la formación de duplicaciones, deleciones, transposiciones e inversiones, que producen nuevos tipos en *Salmonella* más resistentes y por ende más patógenos [21].

3.2.2 Shigella

El género *Shigella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, está formado por bacilos gran-negativos, no esporulantes e inmóviles que son aerobios

facultativos. Las especies de este género tienen un patrón antigénico complejo y su clasificación se basa en sus antígenos O somáticos, muchos de los cuales son comunes a otros bacilos entéricos, como *E.coli*. Hay cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*.

Los únicos hospedadores naturales de las shiguellas son las personas y otros primates superiores. Las bacterias permanecen contenidas en las células epiteliales de sus hospedadores. Las epidemias de shigelosis se producen en núcleos con alta densidad de población y en lugares con higiene deficiente. Muchos casos de shigelosis están asociados con guarderías, cárceles y hospitales psiquiátricos [22].

La *Shigella* puede ocasionar enfermedades intestinales graves, incluida la disentería bacilar. Cada año se producen más de dos millones de infecciones que ocasionan unas 600000 muertes, sobre todo en países en desarrollo. La mayoría de las infecciones por *shigella* se producen en niños menores de diez años. El periodo de incubación de la shigelosis suele ser de 24 a 72 h. La ingestión de tan solo 10 a 100 microorganismos puede producir una infección, una dosis infectiva sustancialmente más baja que la de la mayoría de las demás bacterias entéricas.

Respecto a la transmisión a través de alimentos, existen reportes que vinculan esta enfermedad a una gran diversidad de ellos (leche, frutas, verduras crudas, alimentos preparados y luego manipulados por personas infectadas) así como al consumo de aguas contaminadas [23].

3.2.3 *Escherichia coli*

La *E.coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa

índole. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Está integrada por bacilos Gram-negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales [24].

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. Está presente en grandes concentraciones en la microflora intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo *E.coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Un número reducido de cepas enteropatógenas pueden causar diarrea aguda. Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo 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".

Se han determinado varios tipos de *E.coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *E.coli* enterohemorrágica (ECEH), *E.coli* enterotoxígena (ECET), *E.coli* enteropatógena (ECEP), *E.coli* enteroinvasiva (ECEI), *E.coli* enteroagregativa (ECEA) y *E.coli* de adherencia difusa (ECAD) [25].

3.3 METODOLOGÍAS CLÁSICAS DE DESINFECCIÓN DE AGUA

Entre los agentes químicos de desinfección más utilizados, se destacan el cloro elemental gaseoso (Cl_2), el hipoclorito (ClO^-), la mezcla de cloro con amoníaco (Cl_2/NH_3) que forman cloramina, el dióxido de cloro (ClO_2), el ozono (O_3) y el

permanganato de potasio (KMnO_4). También se utiliza extensamente la luz ultravioleta. Se han desarrollado también métodos modernos que se basan en la generación de oxígeno singlete por absorción de radiación por un colorante, la irradiación con rayos γ y la fotocatálisis heterogénea UV/ TiO_2 [26].

De los procesos mencionados anteriormente el más usado ha sido el cloro porque tiene varios aspectos atractivos: logra la inactivación efectiva de una gran gama de patógenos comúnmente encontrados en las aguas, su costo es bajo, y tiene un efecto residual fácilmente controlado y monitorizado que protege al agua de una reinfección. Sin embargo, una de las desventajas de la utilización del cloro es su limitada eficacia frente a protozoos patógenos y algunos virus. También, su acción puede disminuir si las bacterias patógenas están presentes en flóculos o partículas que las protegen del desinfectante [27]. Por otra parte, con la presencia de materia orgánica natural, principalmente ácidos húmicos y fúlvicos, genera subproductos tóxicos en el agua denominados DBPs potencialmente dañinos para la salud humana, pues ocasionan mutaciones, cáncer, disfunción hormonal, etc [28].

3.3.1 Subproductos de la desinfección

La MON es una mezcla compleja de sustancias químicas orgánicas como los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, ácidos hidrofílicos, proteínas, lípidos, hidrocarburos y aminoácidos que se forman a partir de los desechos y descomposición de las plantas y animales presentes en el agua. La composición de la MON es variable según la temporada llevando a variaciones en la reactividad de esta con los desinfectantes químicos como el cloro [29].

Los ácidos húmicos y fúlvicos son dentro de este amplio espectro de sustancias, los considerados de mayor cantidad en la MON en aguas. Estos ácidos son complejas agrupaciones macromoleculares en las que las unidades fundamentales son compuestos aromáticos de carácter fenólico procedentes de la

descomposición de la materia orgánica y compuestos nitrogenados, tanto cíclicos como alifáticos sintetizados por ciertos microorganismos presentes en el suelo. Sus estructuras no han sido elucidadas totalmente pero se han propuesto algunas estructuras como las que se observan en las figuras 1 y 2.

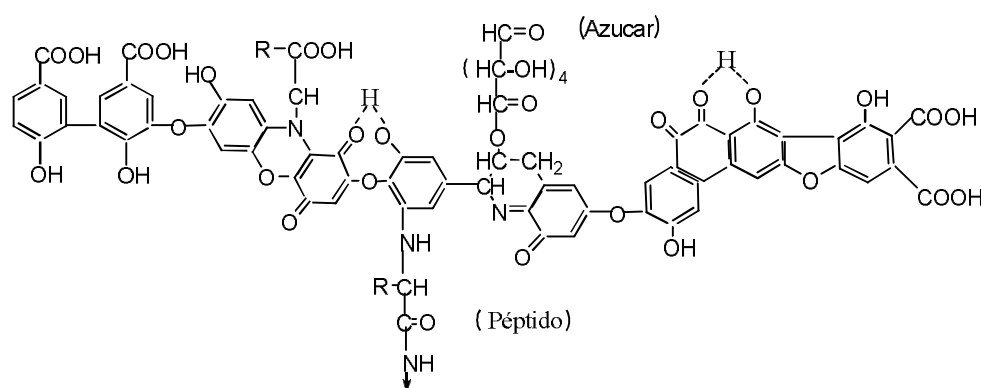


Figura 1. Estructura hipotética del ácido húmico

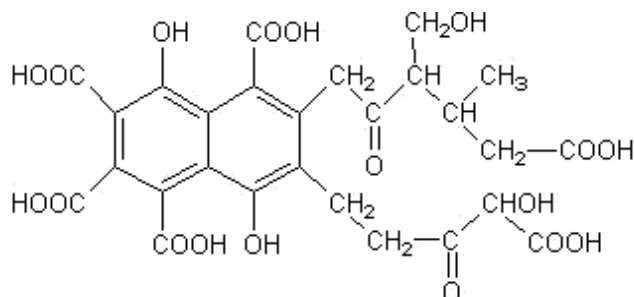


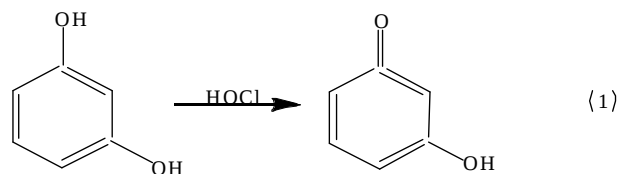
Figura 2. Estructura hipotética del ácido fúlvico

Las sustancias húmicas, presentes en agua para potabilización y bajo acción de la cloración, forman compuestos halogenados mutagénicos y cancerígenos. Numerosos reportes han demostrado la formación de trihalometanos (THMs), policlorobifenilos (PCBs) y clorofenoles tomando un gran interés la eliminación o degradación de sus precursores [30,31].

La naturaleza y concentración de estos compuestos son dependientes de variables tales como la concentración utilizada del cloro, la temperatura, la fuerza

iónica, el tiempo de contacto con el agente desinfectante, el pH y principalmente de la cantidad de materia orgánica en el agua natural (esencialmente ácidos húmicos y fúlvicos).

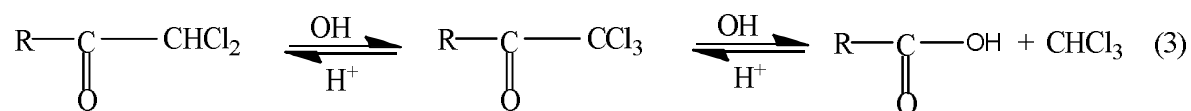
En el proceso de desinfección los ácidos húmicos solubles en agua reaccionan con el ácido hipocloroso HClO formado a partir de la hidrólisis del cloro Cl₂ para dar como producto el cloroformo [32]. Esto se puede ilustrar con los ácidos húmicos que contienen anillos 1,3-dihidroxibencénicos en su estructura como se observa en las ecuaciones 1-3:



Posteriormente el anillo se rompe entre el C-2 y el C-3 para obtener una cadena carbonada como se muestra a continuación:



En la presencia de HOCl, el carbono terminal llega a ser triclorado, y el grupo CCl₃ es desplazado por OH⁻ en agua para obtener el cloroformo (ecuación 3).



Secuencias análogas de reacciones se llevan a cabo para la producción de bromoformo, CHBr₃ y una mezcla de trihalometanos [33].

3.4 PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACION

Hace aproximadamente 10 años han surgido nuevas propuestas de tecnología de desinfección, más eficientes, saludables y económicas. Una de estas propuestas se basa en la utilización de tecnologías o procesos avanzados de oxidación, los cuales son comúnmente denominados PAOs. Estos han provocado gran interés en los últimos años, debido a que se encuentran incluidos dentro de los procesos de oxidación química más efectivos para el tratamiento de agua [34], ya que se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes [34,35], debido a que implican la generación de especies fuertemente oxidantes en especial de radicales hidroxilo en cantidades suficientes para interactuar con los compuestos orgánicos del medio.

En otras palabras los PAOs se refieren a una familia de métodos que utilizan la elevada capacidad oxidante de los radicales $\text{HO}\cdot$ y que se diferencian entre sí en la forma en la que los generan. Los más comunes utilizan combinaciones de ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación ultravioleta y fotocatálisis [36], es decir, este radical también puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica y para la inactivación de microorganismos. Algunas tecnologías avanzadas de oxidación, como la fotocatálisis heterogénea, la radiólisis y otras técnicas avanzadas, recurren además a reductores químicos que permiten realizar transformaciones en contaminantes tóxicos poco susceptibles a la oxidación, como iones metálicos o compuestos halogenados [37,38].

La eficiencia de los PAOs se debe a que estos involucran procesos que poseen una mayor factibilidad termodinámica y una velocidad muy incrementada por la participación de radicales, principalmente el hidroxilo. Esta especie posee propiedades adecuadas para atacar virtualmente a todos los compuestos

orgánicos y reaccionar 10^6 - 10^{12} veces más rápido que oxidantes alternativos como el O_3 [39]. Además los radicales $HO\bullet$ son especies muy reactivas y de vida muy corta ($10\mu s$ en una concentración de $10^{-4}M$) que reaccionan directamente sobre la especie objetivo de manera no selectiva con potencial redox $-2.8 V$ vs. ENH) [40].

Los procesos avanzados de oxidación sirven para tratar contaminantes a muy baja concentración (ppb) y no forman subproductos de reacción. Son ideales para disminuir la concentración de compuestos formados por pretratamientos alternativos como la desinfección y eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro [41].

Sin embargo, estos procesos presentan algunos inconvenientes que no le han permitido su potencial desarrollo a nivel mundial, tales como su elevado costo por el uso de reactivos químicos (H_2O_2) y el elevado consumo energético (lámparas para generar radiación UV), por lo cual actualmente los procesos más utilizados y estudiados como productores de radicales hidroxilo ($HO\bullet$) son la fotocátalisis heterogénea y la homogénea (Proceso foto-Fenton), ya que proveen una tecnología económicamente viable en lugares con alta disponibilidad de luz solar.

3.4.1 Desinfección de aguas por fotocátalisis

Como se mencionó anteriormente en países en vía de desarrollo como Colombia el método más utilizado para la desinfección de aguas para consumo es la cloración, sin embargo, el cloro al tener contacto con la materia orgánica natural, forma compuestos órgano-clorados, los cuales son cancerígenos y mutagénicos para el hombre. Investigaciones recientes han demostrado el potencial de los PAOs en la desinfección de aguas [42].

Algunos PAOs tienen como medio de activación procesos fotocatalíticos los cuales se basan en una reacción fotoquímica que involucra la absorción de luz por parte

de un catalizador o una especie fotosensible que acelera el proceso. La fotocátalisis es una tecnología que podría aportar soluciones innovadoras para la desinfección del agua. Así, por ejemplo, la aplicación de un sistema fotocatalítico después de un tratamiento físico como la filtración, representa un acople con gran potencial para eliminar tanto los microorganismos como la MON presentes en el agua. La degradación de una parte de la MON por fotocátalisis limitará la formación de THM, en el caso de aplicar una cloración después del proceso fotocatalítico, para mantener la calidad del agua durante su almacenamiento.

Dentro de los procesos fotocatalíticos se encuentran la fotocátalisis homogénea en donde el proceso foto-Fenton es el más destacado [11]. Una ventaja de la fotocátalisis homogénea es que actúa de forma instantánea sin ser necesario métodos de depósitos de contacto permitiendo instalaciones sencillas. Cabe aclarar que los PAOs mediados por luz no son adecuados para procesar mezclas con altas cantidades de sólidos en suspensión o alta turbidez, pues la eficiencia cuántica se disminuye por la pérdida de luz debido a la dispersión [42].

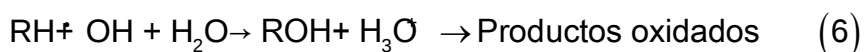
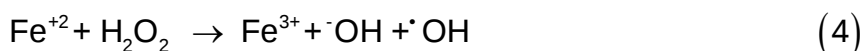
3.4.2 Proceso foto-Fenton

El proceso foto-Fenton descubierto en 1894 por H.J.H. Fenton, ha sido uno de los procesos de oxidación avanzada más estudiados en la actualidad por su gran potencial para el tratamiento de aguas [34]. El proceso consiste en la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a sales metálicas de Fe^{2+} en solución acuosa para promover la descomposición catalítica del H_2O_2 , en radicales hidroxilo $\cdot OH$ (ecuación 4), los cuales por su gran potencial de oxidación son capaces de mineralizar por completo la materia orgánica llevándola hasta la formación de agua y dióxido de carbono (CO_2).

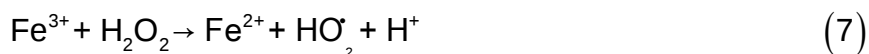
Se ha observado que la velocidad de degradación de contaminantes orgánicos con la reacción Fenton, se incrementa cuando el sistema es irradiado con luz UV-

Visible [43]. Este factor adicional en la reacción aprovecha el espectro de luz en el intervalo de longitudes de onda entre 180 y 580 nm. El proceso permite la fotólisis de hidroxicomplejos férricos generando Fe^{2+} y originando un ciclo con la ecuación 4, que permite la producción de radicales ($\cdot\text{OH}$) adicionales, a este proceso se le denomina foto-Fenton (Figura 3). El esquema de reacción es el siguiente [8]:

Reacción Fenton:



Posibles reacciones :



Reacción foto-Fenton:



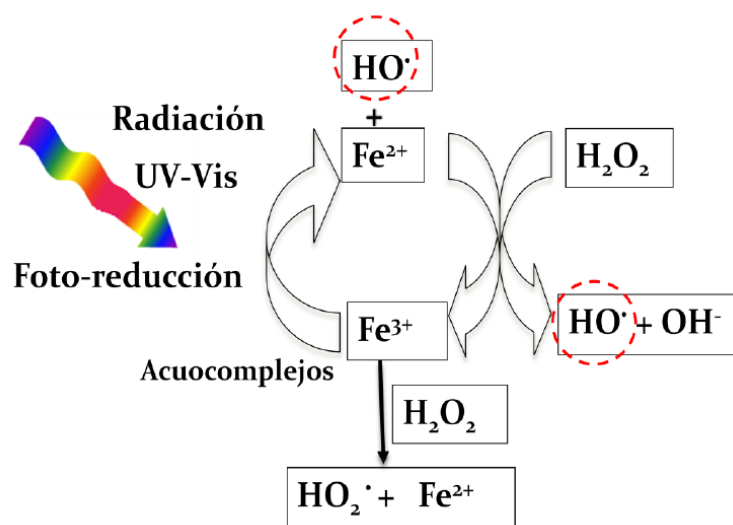


Figura 3. Esquema del ciclo foto-catalítico del proceso foto-Fenton

El proceso se lleva a cabo comúnmente con concentraciones relativamente altas del catalizador y pH ácido ($\text{pH} \approx 3$), para evitar la precipitación de hidróxidos de hierro y favorecer la formación de acu-complejos activos en el rango UV-Vis del espectro solar. No obstante, en los últimos años se han reportado estudios donde el proceso foto-Fenton se realiza utilizando bajas concentraciones del catalizador y pH cercano a la neutralidad [44,45].

La velocidad de degradación de materia orgánica con el proceso Fenton depende de la concentración de Fe^{2+} y de la naturaleza de los compuestos orgánicos presentes en el medio, mientras que la mineralización depende, de otro tipo de factores como los son: la temperatura, el pH, la concentración de catalizador y del H_2O_2 [44].

Los procesos Fenton y foto-Fenton han sido usados con gran éxito para tratar una gran variedad de contaminantes, entre ellos compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCBs, nitroaromáticos, colorantes azo y plaguicidas disueltos en agua. Es un buen oxidante de herbicidas y otros contaminantes de suelos tales como hexadecano o Dieldrin [46,47,48,49]. Puede descomponer solventes para limpieza

y decolorar aguas residuales con distintos tipos de colorantes y otros residuos industriales, reduciendo su DQO [50,51,52]. También se ha aplicado exitosamente en la reducción de DQO de aguas municipales y subterráneas y en el tratamiento de lixiviados [53]. Es útil como pre-tratamiento de compuestos no biodegradables.

Además, el proceso foto-Fenton ha resultado de gran interés, debido a la gran sensibilidad a la luz solar que posee, ya que es activo en un rango amplio del espectro visible (hasta 580 nm), que corresponde a un 35 % de la radiación solar. Propiedad que le brinda una potencial aplicación en reactores a escala piloto, utilizando el sol como fuente lumínica para la activación del proceso. Además al tratarse de un sistema fotocatalítico homogéneo, presenta la ventaja de permitir una interacción amplia entre el oxidante y el contaminante [54].

Algunos estudios demuestran que el proceso también tiene la capacidad de inactivar bacterias patógenas que se encuentran en fuentes de agua utilizadas para la potabilización [7]. Un ejemplo de esto es la inactivación de *E.coli* y la eliminación de MON de fuentes superficiales de agua, utilizando concentraciones bajas de Fe^{3+} (0,6 mg/L) y H_2O_2 (10 mg/L) en reactores CPC. Obteniéndose una disminución simultánea de TOC del 55% y la inactivación total de la bacteria sin recrecimiento después de 24 horas de oscuridad [55].

3.5 RADIACION SOLAR

El sol emite radiación en toda la gama del espectro electromagnético, desde los rayos gamma, hasta las ondas de radio. Sin embargo, para los fines del aprovechamiento de su energía, solo es importante la llamada radiación térmica que incluye solo el ultravioleta (UV), la radiación visible (VIS) y la infrarroja (IR).

La radiación solar global recibida en la superficie terrestre se puede dividir en la suma de tres componentes, directa, difusa y albedo. La componente directa es la

que se recibe directamente desde el sol en línea recta, sin que se desvíe en su paso por la atmósfera, la difusa es la que llega al nivel del suelo con una desviación en su dirección, debido a los procesos de absorción y dispersión que sufre a su paso por la atmósfera, y albedo es la radiación directa y difusa que se recibe por reflexión en el suelo u otras superficies próximas [56]. De toda la radiación que incide sobre la superficie terrestre, aproximadamente el 7.8% corresponde a longitudes de onda en el ultravioleta ($\lambda \leq 400$ nm), un 47.3% en el visible (λ de 400-700 nm) y un 44.9% en el infrarrojo ($\lambda \geq 700$ nm).

La componente de ultravioleta que generalmente es la energía procedente del espectro solar empleada en los procesos fotocatalíticos solares (por Ej: la fotocatálisis heterogénea con TiO_2) es muy pequeña comparada con la total, como se observa en la figura 4, el proceso foto-Fenton puede absorber luz con longitudes de onda hasta 580 nm, que corresponde a un 35% de la radiación solar, lo que constituye la principal ventaja de este proceso comparado con el heterogéneo [53].

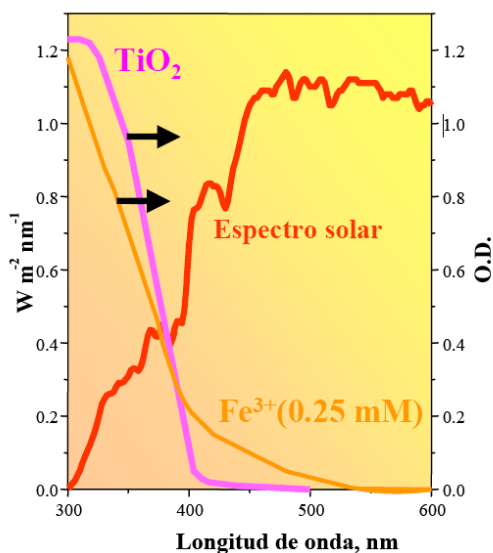


Figura 4. Espectro de la irradiancia solar comparado con los espectros de absorción de una solución de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0.25mM Fe que equivale a 28 ppm de Fe^{3+}) y una suspensión de TiO_2 (50mg/L) O.D.: densidad óptica de muestras de 1 cm de espesor [57].

La intensidad de la radiación, incidente sobre un sistema fotocatalítico solar debe ser medida, para obtener una estimación de la energía que alcanza el sistema y poder comparar resultados de diferentes días, dicha energía se calcula por medio de la ecuación 12 [53]:

$$Q_{UV,n} \equiv Q_{UV,n-1} + \Delta t_n UV_{G,n} \left[\frac{A_{CPC}}{V_R} \right], \quad \Delta t_n \equiv t_n - t_{n-1} \quad (12)$$

Donde t_n es el tiempo experimental de cada muestra, V_R es el volumen del reactor, A_{CPC} la superficie iluminada del colector, $UV_{G,n}$ el promedio de UV_G (radiación UV global) durante el tiempo Δt_n y $Q_{UV,n}$ es la energía acumulada (por unidad de volumen, kJ/L) que incide sobre el reactor.

3.6 REACTOR SOLAR CPC

Un colector solar es una especie de intercambiador de calor que transforma la energía radiante en calor. La transferencia de energía se hace desde una fuente radiante (sol), hacia un fluido (agua o aire generalmente) que circula por los tubos o ductos del colector. El flujo de energía radiante que finalmente intercepta el colector, proviene básicamente del rango visible del espectro solar y es por naturaleza variable con el tiempo. En condiciones óptimas se puede esperar como máximo, flujos de 1100 W/m^2 .

Los colectores solares son herramientas que permiten un mejor aprovechamiento de la radiación solar, dependiendo del grado de concentración alcanzado con ellos. La relación de concentración (RC) se define como la relación entre el área de superficie de captación de radiación y el área del reactor que es la que recibe la radiación solar concentrada. Los reactores fotocatalíticos deben tener la capacidad de concentrar la radiación solar eficientemente, de contener el catalizador y el fluido de trabajo, el cual debe desplazarse con la mínima presión a través del

sistema y tener buena transferencia de masa desde la corriente de fluido a la superficie iluminada del catalizador.

Entre los diversos tipos de colectores solares que existen, se encuentran los CPC (colector parabólico compuesto), el cual es un concentrador de irradiación solar de amplio ángulo de aceptación, captador de radiación directa y también de radiación difusa, por lo que consigue un elevado rendimiento óptico con un coeficiente reducido de pérdidas térmicas. Además, esta tecnología parece ser la más adecuada por su elevada relación eficiencia-costos y también por su simplicidad de construcción y de uso [57].

Los Captadores Parabólicos Compuestos (CPCs) son captadores estáticos con una superficie formada por dos espejos parabólicos conectados, con un tubo absorbente en el foco (Figura 5) [58]. Estos pueden ser diseñados con un relación de concentración próximo a uno ($RC = 1$), presentando así las ventajas tanto de los captadores cilindro parabólicos (estructura con una superficie altamente reflectante y concentradora de la luz UV con forma de parábola y seguimiento solar en uno o dos ejes), como de los sistemas estáticos [59].

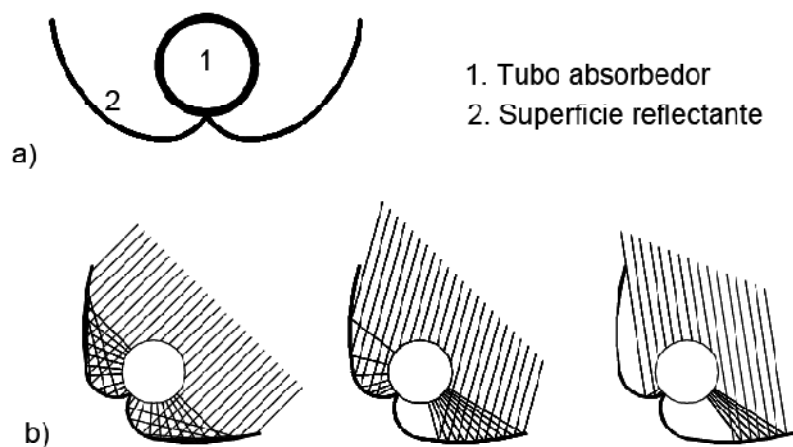


Figura 5. Esquema de un CPC, y como refleja la radiación solar que llega en diferentes ángulos de incidencia [60].

Existe una amplia variedad de trabajos de investigación reportando estudios sobre la aplicación de energía solar en procesos fotocatalíticos [61], debido a que han sido considerados como metodologías de bajo costo, altamente eficientes y ambientalmente amigables.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REACTIVOS

La reacción foto-Fenton se llevó a cabo utilizando Peróxido de Hidrógeno (Riedel-de Haën al 30%) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën). La reacción se detuvo, haciendo reaccionar el exceso de H_2O_2 con una solución de Catalasa (Sigma-Bovine from liver. 3809 Unidades / mg solido) preparada en un buffer de KH_2PO_4 (Riedel-de Haën) y K_2HPO_4 (Mol Labs) que proporcionaba un pH de 7.0.

Para la evaluación del efecto de la materia orgánica sobre la inactivación bacteriana se utilizó una sal sódica de ácidos húmicos (Aldrich). Las soluciones fueron preparadas en agua destilada y el pH ajustado con NaOH 0.1 M.

Se utilizaron las bacterias *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. sonnei* ATCC 25931 y *E. coli* ATCC 8739, las cuales fueron activadas en Plate Count Agar (Scharlau). La preservación de éstas cepas se realizó a una temperatura de -20°C en una solución de caldo CASO Bouillon (Merck) y glicerol (Mol Labs) al 30%.

Para realizar los ensayos fotocatalíticos, el crecimiento de las bacterias se hizo en caldo CASO Bouillon (Merck). Posteriormente el pellet bacterial se resuspendió en una solución de NaCl (J.T. Baker) al 0.85%. Las muestras fueron sembradas después de cada experimento en Plate Count Agar (Scharlau).

4.2 EQUIPOS Y CONDICIONES DE TRABAJO

Los ensayos fotocatalíticos se llevaron a cabo en un reactor solar CPC que consta de dos tubos Pyrex (1.5 m de longitud, 3.2 cm de diámetro interno y 3.6 cm de diámetro externo) colocados sobre una superficie reflectiva de aluminio anodizado.

El colector se encuentra inclinado 3 grados que corresponde a la latitud de Cali (figura 6), los experimentos se realizaron por duplicado. Para la medición de la radiación solar se uso un radiómetro marca Desin Instruments con un control modular FMC-3000 montado en el mismo ángulo del reactor.



Figura 6. Reactor CPC

La concentración de hierro, se midió en un equipo de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100 utilizando una lámpara de cátodo hueco y la técnica de atomización de llama. El peróxido se siguió con cintas Merckoquant (Merck) de 0-25 ppm de H_2O_2 . El seguimiento del pH se realizó en un pH-metro thermo scientific.

La degradación de los ácidos húmicos se evaluó en un equipo UV-Visible UV 1700 pharma Spec Shimadzu adaptado al software UV probe 2.33. La evolución de la mineralización de la materia orgánica se determinó mediante la cuantificación del carbono orgánico total (COT), realizada en un equipo TOC Shimadzu TOC-VCPH/CPN con automuestreador ASI-V y aire de alta pureza (20% O_2 en N_2) como gas de arrastre. Se cuantificó el Carbono Orgánico No Purgable (NPOC) donde las muestras fueron tratadas con HCl 2 M y burbujeadas con aire durante 1.5 minutos para garantizar la medición solo del carbono orgánico.

Para los procedimientos microbiológicos todos los materiales fueron esterilizados en una autoclave Eastern EA-620. Los inóculos para cada bacteria fueron colocados en una incubadora (Binder) a 35 °C y agitados a 320 rpm con un agitador mecánico Thomas Scientific. Las células bacterianas fueron concentradas por centrifugación en una centrifuga Universal 32 R (Heltich Zentrifugen) a 3000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron sembradas por el método de filtración por membrana utilizando filtros de nitrato de celulosa Sartorius Stedim con tamaño de poro de 0.45 µm en una cabina de flujo vertical Airco. Las bacterias fueron contadas mediante el método de recuento en placa (Figura 7).



Figura 7. Siembra de bacterias por medio del método de filtración por membrana.

4.3 PROCEDIMIENTOS FOTOCATALÍTICOS

Para los ensayos que no involucraron materia orgánica, los experimentos se llevaron a cabo en un tanque de recirculación con 10 L de agua destilada fresca, a la cual previamente se le ajustó el pH a 6.0. Posteriormente se adicionó 7 mL de una solución de 1000 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, luego de esto se adicionó 100 mL de solución bacteriana, la reacción se inició adicionando a cada reactor 6.67 mL de H_2O_2 3×10^4 ppm, para obtener concentraciones de Fe^{2+} y de H_2O_2 de 0.7 y 20

mg/L respectivamente. Para estos ensayos se realizó una etapa previa con el fin de optimizar el flujo, llevando a cabo diversos ensayos obteniendo un flujo de 16.7 L/min en cada CPC.

Una vez iniciado el proceso las muestras se tomaron del reactor en diferentes intervalos, correspondientes a una energía acumulada (Q_{UV}) de 12.4, 24.8, 37.2, 55.8, 74.4, 99.2 y 124W/m^2 , se detuvo la reacción adicionando 1.2 mL de catalasa 1120 Unit / mL a cada muestra.

Para los ensayos que involucraron la presencia de materia orgánica se adicionó la masa necesaria en forma sólida de la sal sódica de ácido húmico al tanque de recirculación para que quedara en la concentración de 10 o 20 mg/L. Seguidamente el pH inicial de las soluciones de ácidos húmicos fue ajustado adicionando hidróxido de sodio 0.1 M, empezando en valores alrededor de 6. Luego de esto, el procedimiento fotocatalítico se realizó de igual forma que el descrito anteriormente. A las muestras que se tomaron del reactor en diferentes intervalos de tiempo se le midió pH, TOC y la absorbancia UV a 254 nm.

El procedimiento para la preparación y esterilización de cada una de las soluciones bacterianas se encuentra descrito en el anexo 1.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 EFECTO DEL PROCESO FOTO-FENTON EN LA INACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS: *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli*.

La figura 8 muestra el efecto del proceso foto-Fenton sobre las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en agua destilada usando 0.7 ppm de hierro a partir de sulfato ferroso y 20 ppm de peróxido de hidrógeno a pH 6.0. Bajo estas condiciones se observa que las bacterias no son totalmente eliminadas después de aproximadamente 37 KJ/L de la energía incidente por unidad de volumen. La concentración de bacterias activas disminuyó hasta un valor mínimo, obtenido a una energía solar equivalente entre 12-15 KJ/L, manteniéndose constante. Este tipo de tendencias ya han sido encontradas en sistemas que involucran solo luz (SODIS) [62].

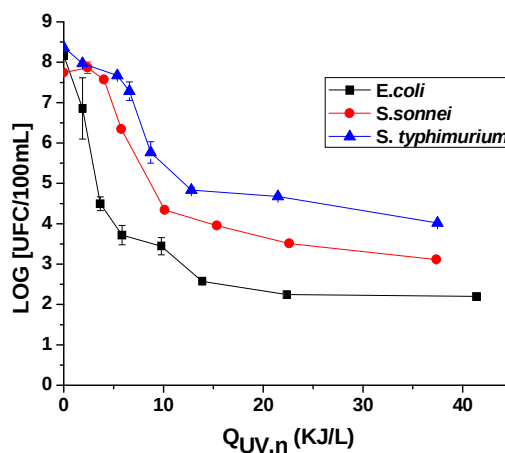


Figura 8. Inactivación de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* mediante el proceso foto-Fenton. Concentración inicial de los compuestos: $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ inicial: 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración inicial de bacterias: 10^7 - 10^8 UFC/100 mL.

Varias razones podrían explicar estas tendencias (figura 8). a). La cantidad de H_2O_2 al final del experimento es menor (10 mg/L) en comparación con la inicial (20 mg/L), lo cual afecta el proceso por la menor disponibilidad para la producción de

radicales $\cdot\text{OH}$ y otras especies reactivas de oxígeno, b). Las condiciones climáticas no permitieron que la irradiación fuera constante, ya que en algunas ocasiones hubo presencia de nubes, lo cual provoca que la intensidad de la radiación sea variable permitiendo en este tiempo la reparación de las bacterias que han sido dañadas, c). Una posible replicación de las células cultivables restantes, d). La disminución de la acción bactericida del sol tanto por la disminución de la intensidad UV y la modificación de la parte visible del espectro a lo largo del día (Figura 9). La acción combinada de estos factores que se oponen a la desinfección solar resulta en un equilibrio entre la inactivación de bacterias, la reactivación y el crecimiento, lo cual conduce a un estado cuasi-estacionario donde el nivel indetectable de bacteria no se logra alcanzar [55].

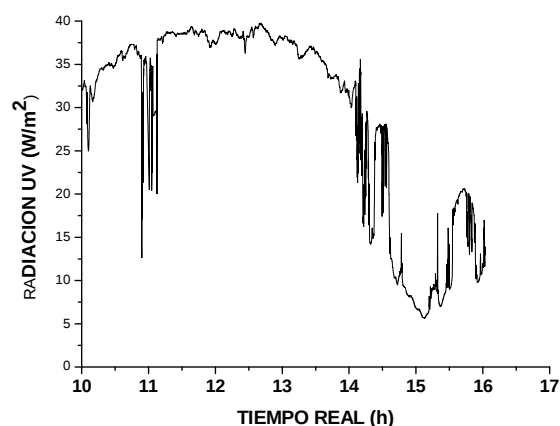


Figura 9. Irradiación solar UV en Cali Colombia durante un experimento. Tiempo real: A partir de las 10:00 am hasta las 16:00 pm.

Es común en casi todos los microorganismos de la naturaleza que se exponen a la radiación UV con regularidad, la necesidad de recuperarse de un daño generado por este tipo de radiación. Así, las bacterias y otros microorganismos pueden reparar su ADN tras haber sido dañados por la radiación UV mediante procesos conocidos como reactivación. De esta forma, algunos microorganismos necesitan luz visible para emprender la reparación (fotorreactivación), mientras que otros pueden reparar su ADN sin luz (reparación a oscuras). La capacidad de reactivación depende, en gran medida, del tipo de daño UV provocado y del nivel

de organización biológica del microorganismo. El mecanismo de reparación no es universal y no existen características bien definidas que determinen qué especies pueden repararse a sí mismas y cuáles no.

En la fotorreactivación, la reparación se lleva a cabo por una enzima denominada fotoliasa, que revierte el daño provocado por el UV, mientras que en el caso de la reparación a oscuras, se produce mediante una compleja combinación de más de una docena de enzimas. Para comenzar la reactivación (tanto a la luz como a oscuras), estas enzimas primero deben ser activadas por una fuente de energía, en la fotorreactivación esta energía es suministrada por luz visible (300-500 nm) y en la reparación a oscuras, proviene de nutrientes dentro de la célula. En ambos casos, la reactivación se logra mediante enzimas que reparan el ADN dañado y que permiten que el proceso de replicación vuelva a comenzar. Las cepas más comunes de *E.coli* contienen alrededor de 20 enzimas de fotoliasa, capaces de reparar hasta cinco dímeros de timina por minuto cada una, esto significa que, en una sola célula, pueden repararse hasta 100 dímeros por minuto [63].

Igualmente, cabe resaltar que las bacterias no solo cuentan con mecanismos de reparación para daños producidos por luz UV sino también con sistemas de defensa antioxidante celular, los cuales son adecuados a la vida media muy corta de los radicales libres provenientes tanto del metabolismo celular y de las reacciones de oxido-reducción naturales en las células como por medio del proceso foto-Fenton. Estos mecanismos comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, con capacidad antioxidante, también enzimas antioxidantes y enzimas asociadas. La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Entre estos se comprenden la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2 , la glutatión-peroxidasa y la glutatióntransferasa, que reducen hidroperóxidos a alcoholes, y la catalasa, que reduce H_2O_2 a H_2O [64].

De esta manera, a pesar de que no se logró obtener una inactivación completa de las bacterias con este sistema hubo una reducción de las poblaciones bacterianas de aproximadamente cuatro y seis órdenes de magnitud para *S.typhimurium*, y *E.coli* respectivamente, presentando mayor resistencia al proceso *S.typhimurium*, con respecto a *S.sonnei* y esta a su vez con *E.coli*. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que en el sistema foto-Fenton, la reducción de las poblaciones bacterianas implica una acción sinérgica de las especies reactivas de oxígeno formadas durante el proceso, es decir, del efecto oxidativo del peróxido de hidrógeno, de las reacciones dependientes de la luz, de la intensidad luminosa empleada y del grado de estrés generado por la leve reducción del pH en la solución.

De esta forma, en el proceso foto-Fenton se considera que el aporte de cada componente individual (H_2O_2 , luz, intensidad luminosa y pH) para la generación de radicales $\cdot OH$ y ROS ocurren simultáneamente, tanto en el interior como en el exterior de la célula bacteriana. Además la presencia extracelular de H_2O_2 puede incrementar la permeabilidad de la membrana bacteriana permitiendo la difusión de Fe^{2+} y la generación de radicales $\cdot OH$ vía reacción Fenton intracelular o el peróxido y el hierro junto con la acción de la luz pueden generar radicales $\cdot OH$ en el exterior de las células bacterianas, los cuales pueden iniciar la peroxidación lipídica a la membrana celular [65].

5.2 APOORTE EN LA DESINFECCIÓN DE LA LUZ Y LUZ- H_2O_2 EN AGUA DESTILADA.

En la figura 10 se observan los ensayos de control que se llevaron a cabo para evaluar el aporte en la desinfección de la luz, luz- H_2O_2 y el Fenton para cada bacteria. De éstos, el aporte más importante sobre la desinfección lo proporcionó los sistemas luz y luz- H_2O_2 , en los cuales hubo una reducción de las poblaciones

bacterianas de tres y cuatro órdenes de magnitud para luz y luz-H₂O₂ respectivamente.

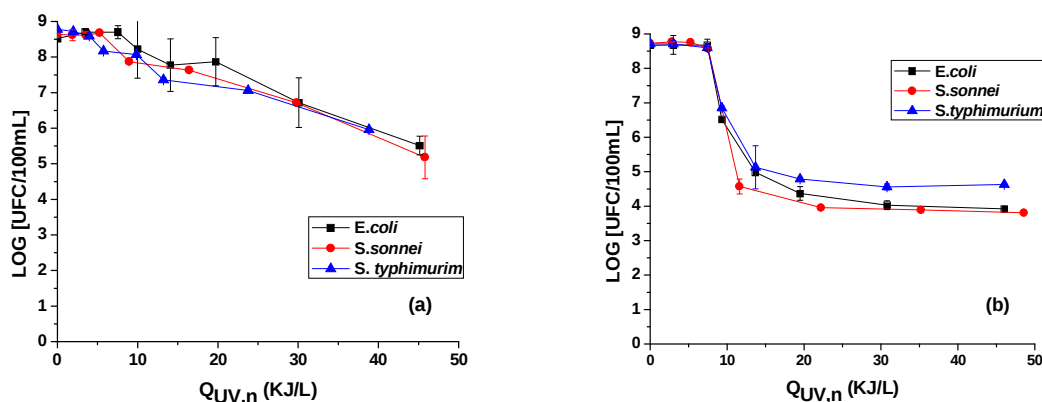


Figura 10. Inactivación de las bacterias *S. typhimurium*, *S. sonnei* y *E. coli* en presencia de (a) luz. (b) luz- H₂O₂. Concentración inicial de los compuestos: [H₂O₂] inicial: 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración inicial de bacterias: 10⁸ UFC/100 mL.

Respecto a los ensayos realizados en presencia de luz la temperatura del sistema nunca excedió los 42 °C por lo que la inactivación térmica de las bacterias fue excluida, ya que ésta tiene un aporte significativo cuando sobrepasa los 45 °C [66].

En general no es fácil determinar las diferencias en la resistencia de las bacterias a los procesos fotocatalíticos. Sin embargo, se sabe que las bacterias *S. typhimurium*, *S. sonnei* y la *E. coli* son genéticamente similares, ya que pertenecen a la misma familia de las enterobacterias, y presumiblemente su sistema de defensa es similar. Los resultados obtenidos para este sistema coinciden con los reportados en la literatura, donde se ha encontrado que la *S. typhimurium* es más resistente a la exposición de luz UV-A (320-400 nm) en agua que la *E. coli* y que ésta última a su vez es más resistente que la *S. sonnei* [67].

Para conocer el efecto que tiene la luz sobre las bacterias mencionadas se debe tener en cuenta el tipo de radiación que llega normalmente en un día soleado a la atmosfera, el cual es aproximadamente 49% de radiación infrarroja, 42% de luz visible y 9% de radiación ultravioleta. De estas radiaciones las que afectan principalmente las bacterias son las dos últimas, siendo la radiación ultravioleta la que tiene un efecto letal y mutagénico, lo cual depende de su longitud de onda, pues la absorción selectiva afecta diversas moléculas biológicas. Los rayos UV provocan cambios químicos en las moléculas absorbentes, de modo que aparecen moléculas alteradas denominadas genéricamente fotoproductos. Estos originan la inactivación de macromoléculas, las más comunes que resultan del daño causado por la radiación UV son los dímeros de timina, que se forman cuando dos moléculas de timina adyacentes se fusionan. La formación de estos dímeros y otros fotoproductos evita que el ADN pueda replicarse y mata la célula de manera efectiva, aunque, en otros casos como ya se mencionó, el ADN dispone de mecanismos para paliar o eliminar estas modificaciones potencialmente lesivas.

A diferencia de la UV, la luz visible es de baja energía, y además, sus cuantos no tienen efectos selectivos sobre el ADN, por lo que no sería de esperar, en principio, que este tipo de radiación tuviera efectos negativos sobre las bacterias. Sin embargo, la luz visible puede ejercer un efecto negativo indirecto, en el fenómeno de sensibilización fotodinámica [68].

De esta forma, cuando las bacterias están en contacto con la luz, esta puede penetrar al interior celular, lo cual se puede explicar teniendo en cuenta la morfología de las bacterias, pues el citoplasma que es el componente en mayor proporción en la célula es incoloro y su índice de refracción (1.35-1.38) no difiere mucho al del agua (1.33), es decir, que gran parte de la radiación entra a la célula bacteriana lo que probablemente pueda generar su foto-inactivación.

En la figura 10.a se observa foto-inactivación probablemente debido a la excitación de fotosensibilizadores endógenos tales como el citocromo (figura 11.a), flavina (figura 11.b), tryptofano y otros aminoácidos aromáticos, al ataque de los componentes celulares por ROS y al daño del DNA por el radical hidroxilo. Un fotosensibilizador endógeno excitado puede reaccionar directamente con biomoléculas celulares, las cuales incluyen el ataque de proteínas y de los componentes de la membrana celular o más comúnmente con el O_2 circundante llevando a la generación de ROS tales como $\cdot OH$, 1O_2 , $O_2^{\square-}$ y H_2O_2 [69,70].

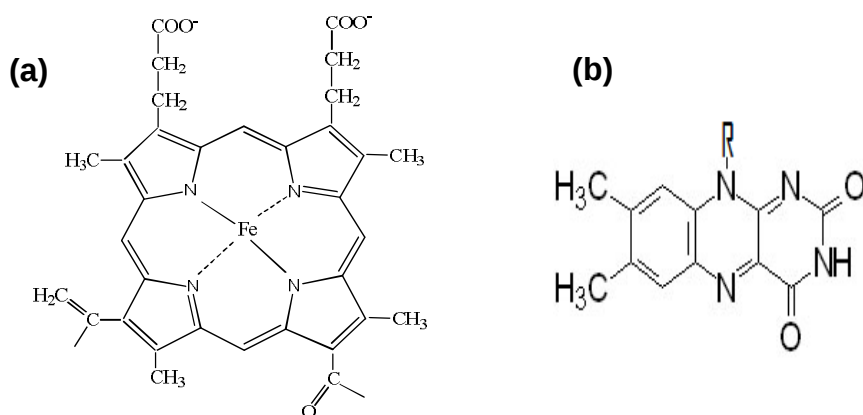
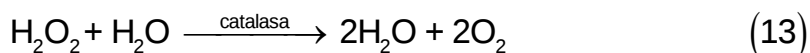


Figura 11. Estructura química de: (a) Citocromo. (b) Flavina

Igualmente, también es posible que se presente la foto-degradación de la catalasa intracelular, la cual bajo condiciones normales elimina el exceso intracelular de H_2O_2 (ecuación 13). Por tanto al foto-degradarse permite la generación de radicales $\cdot OH$ altamente reactivos mediante reacciones Fenton intracelular entre el H_2O_2 que está en exceso y el hierro ferroso intracelular libre, dando lugar al daño directo del ADN de las bacterias [71].



De esta manera cuando la concentración de especies reactivas de oxígeno (o ROS) se incrementa hasta un nivel que supera la capacidad de defensa de las células, se genera lo que se conoce como estrés oxidativo [72].

En la figura 10.b se observa que la tasa de foto-inactivación en presencia de luz- H_2O_2 mejora con respecto a la de luz, lo que es congruente con otros estudios encontrados en la literatura. El origen de esta inactivación mejorada se podría explicar si se tiene en cuenta que el H_2O_2 se mantiene relativamente estable (a diferencia del $\cdot\text{OH}$) y sin carga (a diferencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$), por lo tanto cuando el H_2O_2 está presente en el hábitat extracelular penetra en las membranas y se difunde en las células. Una sobrecarga intracelular de H_2O_2 aumenta la posibilidad de generación de $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton intracelular. No obstante, si los iones de hierro no están disponibles, el H_2O_2 puede causar la oxidación del cluster de sulfuro de hierro ($[\text{4Fe-4S}]$) (figura 12.a), permitiendo la liberación de Fe^{3+} , el cual si se reduce a Fe^{2+} contribuye a las reacciones de Fenton intracelular [73]. Por otra parte, Fe^{2+} puede ser directamente liberado cuando los rayos UV-A (320-400 nm) dañan algunas proteínas que contienen hierro como la enterobactina (figura 12.b) o ferritina [74, 75].

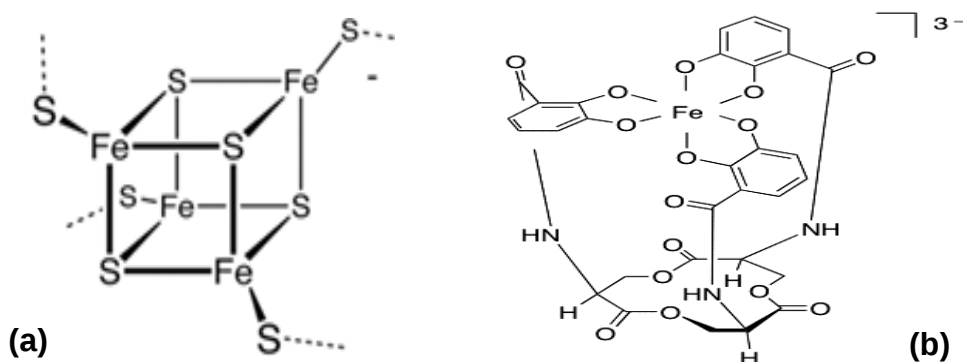


Figura 12. Estructura química de: (a) Cluster de sulfuro de hierro. (b) Complejo de coordinación Enterobactina- Fe^{3+} .

El efecto sinérgico bactericida del H_2O_2 y la luz se ha informado anteriormente [65, 76, 77]. Esta sinergia surge de la capacidad de la radiación UV-A para dañar la enzima catalasa, que es importante para la defensa celular contra el estrés oxidativo [65,78], pues como se mencionó anteriormente, la catalasa transforma el

H₂O₂ intracelular y controla su concentración. De esta forma, cuando se descompone la catalasa, el H₂O₂ intracelular aumenta a concentraciones tóxicas, especialmente en presencia de H₂O₂ extracelular, que se difunde dentro de las células.

Sin embargo, el uso del sistema luz-H₂O₂ para aplicaciones a escala real en procesos de desinfección de aguas no es adecuado, debido a que se requeriría de cantidades considerables de peróxido lo que generaría mayores costos para la aplicación del proceso. Además, los efectos a largo plazo del H₂O₂ sobre la salud humana son poco conocidos.

5.3 EFECTO DEL PROCESO FENTON EN LA INACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS: *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli*.

En la figura 13 se observa el efecto del proceso Fenton sobre las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en agua destilada utilizando 0.7 ppm de hierro a partir de sulfato ferroso heptahidratado y 20 ppm de peróxido de hidrógeno a pH 6. Este proceso se realizó cubriendo los reactores CPC con el fin de evitar el paso de la radiación al sistema.

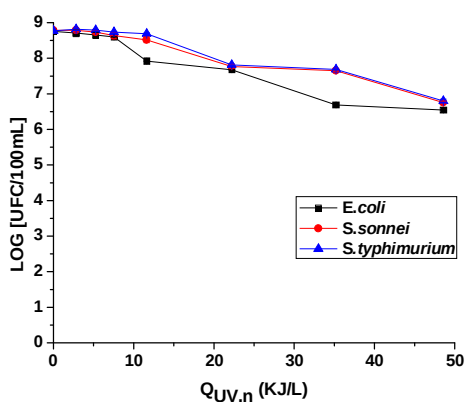
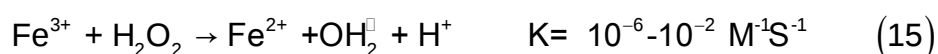
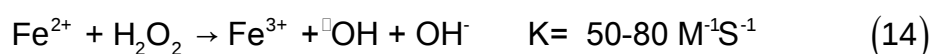


Figura 13. Inactivación de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* mediante el proceso Fenton. Concentración inicial de los compuestos: [Fe²⁺]: 0.7 mg/L, [H₂O₂] inicial: 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración inicial de bacterias: 10⁸ UFC/100 mL.

Bajo estas condiciones no se obtuvo desinfección con ninguna de las bacterias, debido a que el proceso no es catalítico, pues a pesar de que es posible que suceda la reducción del Fe^{3+} con el H_2O_2 para generar nuevamente Fe^{2+} (ecuación 15), la constante de velocidad de la reacción es muy baja (aproximadamente 10^{-6} a $10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) comparada con la de la ecuación 14 lo que lleva a que el proceso sea lento [81,82].



Sin embargo, a pesar de que no hay desinfección con este sistema hay una reducción de las poblaciones bacterianas de dos órdenes de magnitud. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que en la reacción Fenton (ecuación 14) hay formación de radicales $\cdot\text{OH}$ en el exterior de las células bacterianas, lo cual puede generar la peroxidación lipídica de la membrana celular, es decir, se inicia un ataque a la estructura de la membrana y más específicamente a los ácidos grasos poliinsaturados que la conforman, conllevando a una alteración de la permeabilidad de la membrana y por ende a la muerte celular por el desequilibrio intracelular. El proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena de los ROS en la pared celular [83]. La figura 14 muestra un esquema de las posibles reacciones que se pueden llevar a cabo durante el proceso [84].

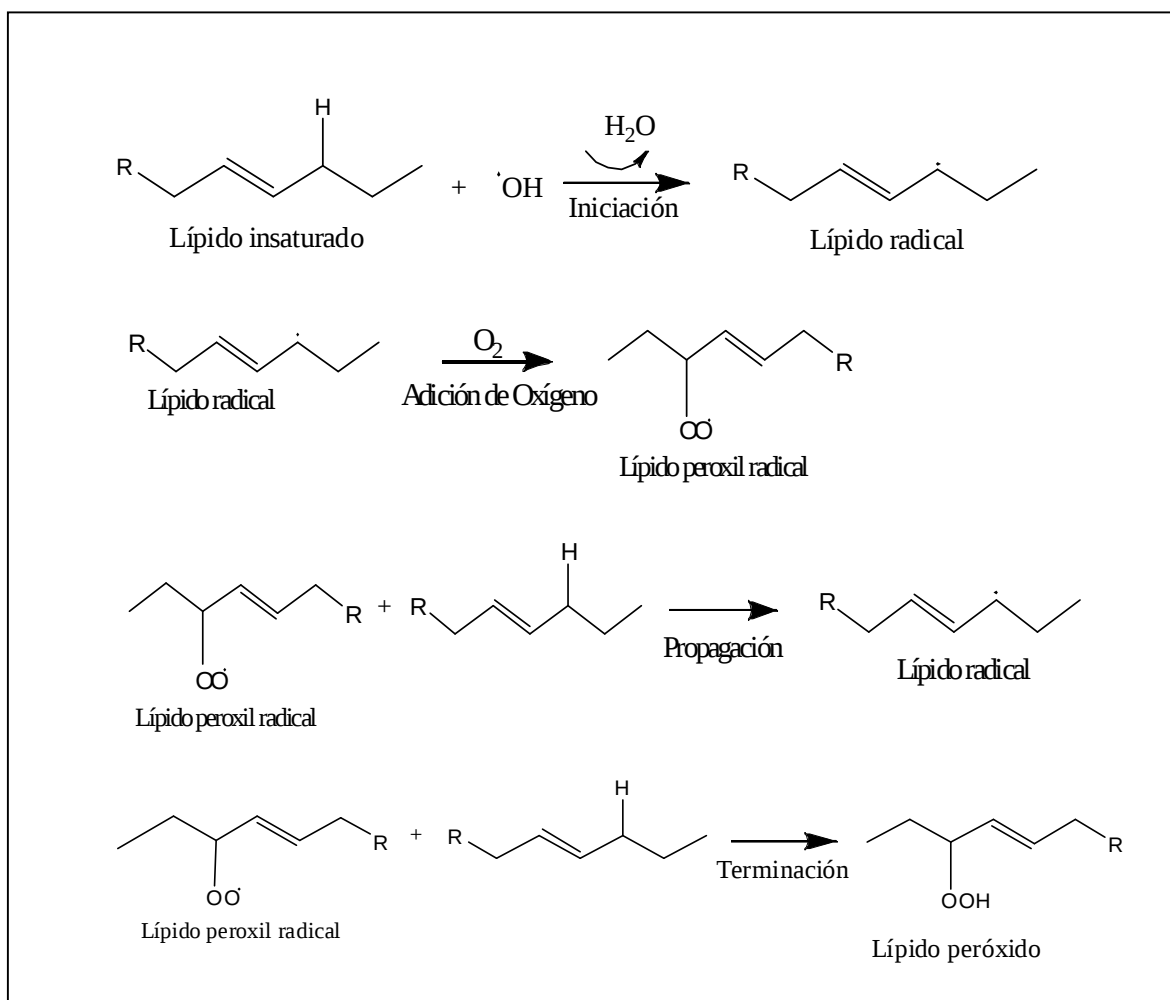


Figura 14. Posibles reacciones que se llevan a cabo en la peroxidación lipídica de la membrana celular.

De igual manera, para explicar estos resultados también se puede tener en cuenta el efecto bactericida del $\cdot\text{OH}$, obtenido por reacciones Fenton intracelulares. El Fe^{2+} tiene capacidad para difundirse en las células, debido a que posee una baja densidad de carga, el cual reacciona con el H_2O_2 que proviene del metabolismo respiratorio de la bacteria o con el que llega del exterior de la célula, pues como se mencionó anteriormente el H_2O_2 extracelular puede penetrar y difundirse dentro de la célula bacteriana [65, 73].

5.4 RECRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS DESPUÉS DE 48 HORAS EN AGUA DESTILADA.

En cada ensayo realizado se evaluó el recrecimiento después de guardar las muestras en la oscuridad durante 48 horas. En todos los sistemas (foto-Fenton, luz, luz-H₂O₂ y Fenton) se obtuvo un incremento en las colonias. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que en todos los procesos realizados las bacterias *S. typhimurium*, *S. sonnei* y *E. coli* sufren un estrés oxidativo, peroxidación lipídica y/o foto-inactivación durante el desarrollo de los mismos, permitiendo que los microorganismos entren en un estado viable pero pierdan parcialmente su cultivabilidad, sin embargo luego de que el estrés oxidativo termina, debido a que no hay radiación, la concentración de las bacterias se recupera [53].

5.5 INACTIVACIÓN BACTERIAL MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON EN PRESENCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS.

Se evaluó el efecto de la materia orgánica (ácidos húmicos) en la inactivación de las bacterias *S. typhimurium*, *S. sonnei* y *E. coli* mediante el proceso foto-Fenton (figura 15). Los resultados obtenidos muestran que en general el tiempo de inactivación para cada bacteria se incrementa cuando están presentes estos compuestos orgánicos. Sin embargo, esta diferencia es mayor para la *E. coli* que para las otras bacterias estudiadas.

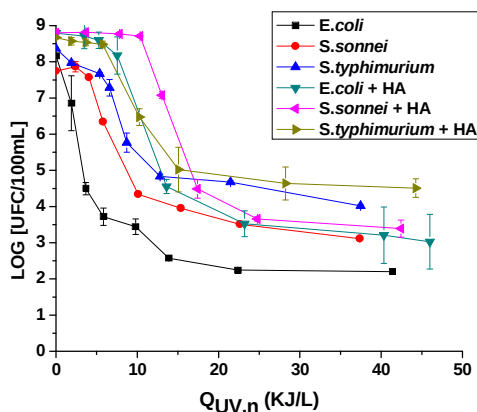


Figura 15. Inactivación de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en presencia y ausencia de ácidos húmicos (AH). Concentración inicial de los compuestos: AH: 20 mg/L, $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

El incremento en el tiempo de inactivación para cada una de las bacterias se explica teniendo en cuenta que la presencia de materia orgánica (ácidos húmicos) genera una competencia entre los compuestos orgánicos y los microorganismos por los radicales $\cdot\text{OH}$ generados en el proceso fotocatalítico. Esta competencia se pudo confirmar al evaluar la degradación de los ácidos húmicos en ausencia de las bacterias (figura 16), donde se observa que estos compuestos sufren una degradación del 25%, lo cual es disminuido aproximadamente a un 17% con la presencia de las bacterias.

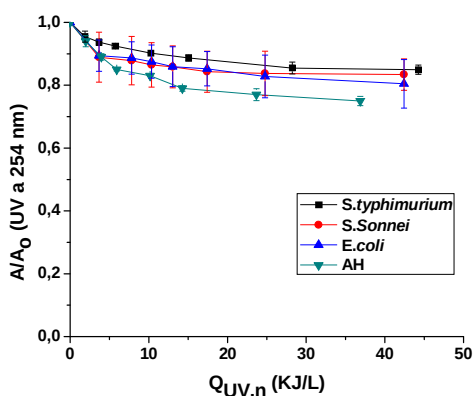


Figura 16. Efecto de la presencia de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en el seguimiento de la absorbancia en la degradación de ácidos húmicos (AH) a 254 nm. Concentración inicial de los compuestos: AH: 20 mg/L, $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 20mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

Otro factor que disminuye la eficiencia del proceso foto-Fenton para la inactivación de cada una de las bacterias con la presencia de los ácidos húmicos es la capacidad que estos compuestos tienen de absorber luz en la región visible del espectro electromagnético, por lo cual se reduce la intensidad de la radiación que llega a las bacterias disminuyendo de esta manera la foto-inactivación (figura 17), pues estarían menos expuestas a la luz, lo que impide que se dé la fotosensibilización de componentes intracelulares como citocromos, flavinas, triptofano y aminoácidos aromáticos, los cuales como se mencionó anteriormente (sección 5.2) son algunos de los compuestos de la célula bacteriana que probablemente causen la inactivación de las bacterias en presencia de luz. Todo esto conlleva a que haya una disminución del efecto sinérgico entre la luz y el proceso Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) [85].

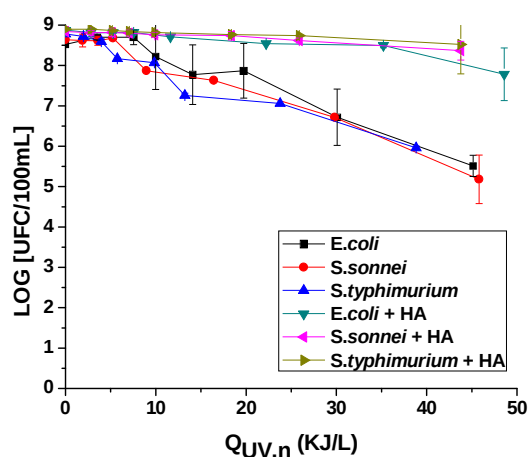


Figura 17. Efecto de la luz en presencia y ausencia de ácidos húmicos (AH) para las bacterias *S. typhimurium*, *S. sonnei* y *E. coli*. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

Sin embargo, a pesar de que la eficiencia del proceso foto-Fenton es disminuida por la presencia de estos compuestos orgánicos, también se observa un proceso de inactivación que comprende entre 4 y 5 órdenes de magnitud para *S. typhimurium* y *E. coli* respectivamente. Esto se explica, si se tiene en cuenta que la materia orgánica en presencia de luz puede actuar como un fotosensibilizador bajo la radiación UV-Visible y generar procesos fotoquímicos para la producción

de ROS tales como el oxígeno singlete ^1O , el radical hidroperoxilo/superóxido $\text{HO}_2^\bullet / ^\bullet\text{O}_2^-$ y el radical hidróxilo $^\bullet\text{OH}$. Estudios acerca del efecto de la materia orgánica como fotosensibilizadores exógenos ya se han realizado y se han reportado en la literatura [41,86].

De esta forma, es posible que en presencia de los ácidos húmicos se den estos procesos, es decir, que a pesar de que haya una menor fotosensibilización de componentes celulares de las bacterias puede haber fotosensibilización de los ácidos húmicos, lo cual favorece la desinfección y por esto se presenta una disminución de las concentraciones bacterianas.

5.6 INACTIVACIÓN DE LA MEZCLA DE LAS BACTERIAS *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* MEDIANTE EL PROCESO FOTO-FENTON.

Se evaluó la eficiencia del proceso foto-Fenton en la inactivación de la mezcla de las bacterias utilizando 0.7 ppm de Fe^{2+} , 20 ppm de H_2O_2 y 20 ppm de ácidos húmicos a pH 6 (figura 18).

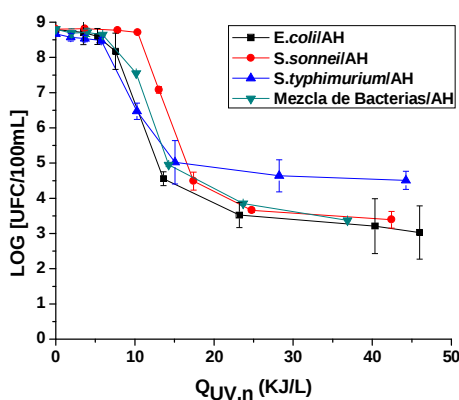


Figura 18. Inactivación de la mezcla de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en presencia de ácidos húmicos (AH) en comparación con cada bacteria individualmente. Concentración inicial de los compuestos: AH: 20 mg/L, $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 20mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

Los resultados mostraron que el proceso foto-Fenton llevado a cabo con una concentración de hierro de 0.7 ppm permite obtener una tendencia similar en el proceso de inactivación de la mezcla con respecto a cada bacteria individualmente a pesar de que en el seno de la solución existe una mayor carga microbiana, pues aunque no se llega a obtener la desinfección total, el comportamiento de la mezcla oscila en los límites en los que se encontraron *S. sonnei* y *E. coli*. Sin embargo, el proceso de inactivación para *S. typhimurium* fue menor en comparación con las otras dos bacterias y con la mezcla. Esto no es fácil de explicar, debido a que con la información suministrada no es posible determinar exactamente porque esta bacteria es más resistente individualmente que en una mezcla al proceso de desinfección cuando hay presencia de materia orgánica, así que se podría pensar que esta bacteria particularmente puede tener mecanismos de defensa contra la acción oxidante de los ROS formados durante el proceso y por tanto se ve de alguna manera más favorecida con la presencia de ácidos húmicos.

Al realizar el proceso foto-Fenton con la mezcla se logra reducir las poblaciones bacterias aproximadamente en cinco órdenes de magnitud. En este proceso existe un efecto sinérgico por parte de los sistemas luz, luz-H₂O₂ y Fenton que proporcionan un aporte en la generación intracelular de ROS, las cuales afectan negativamente a las células bacterianas, es decir, que a pesar de que existe una mayor competencia por los radicales $\cdot\text{OH}$ generados en el seno de la solución, también se debe tener en cuenta que existen otros sistemas que aportan especies reactivas de oxígeno que dañan el interior de las células bacterianas, lo cual ayuda a que el tiempo de desinfección de la mezcla no sea más largo que el obtenido individualmente para las bacterias bajo las mismas condiciones.

Al evaluar el efecto de la mezcla de bacterias en la degradación de ácidos húmicos (figura 19) se puede observar una menor disminución al final del proceso en la degradación de los ácidos húmicos con respecto a la obtenida con cada bacteria individualmente, lo que sugiere que al haber una mayor cantidad de

bacterias en la solución se genera una mayor competencia por los radicales $\text{OH}\cdot$ en el seno de la solución que favorece al proceso de desinfección antes que al proceso de degradación de ácidos húmicos.

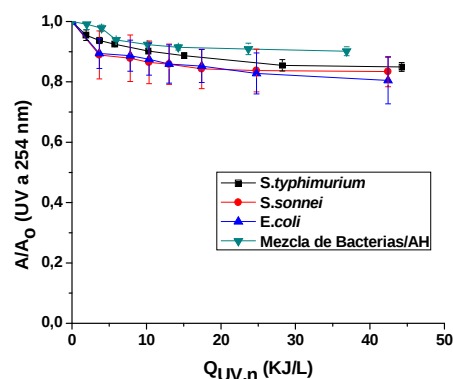


Figura 19. Efecto de la presencia de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei*, *E.coli* y la mezcla de las tres en el seguimiento de la absorbancia en la degradación de ácidos húmicos (AH) a 254 nm. Concentración inicial de los compuestos: AH: 20 mg/L, $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 20mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

Por otra parte al disminuir la concentración de ácidos húmicos a 10 ppm (figura 20.a) se puede observar un incremento en la velocidad de desinfección de la mezcla de las bacterias con respecto al obtenido al utilizar 20 ppm de ácidos húmicos. Sin embargo, el tiempo en que se llega a una cantidad constante de bacterias en ambos procesos es equivalente.

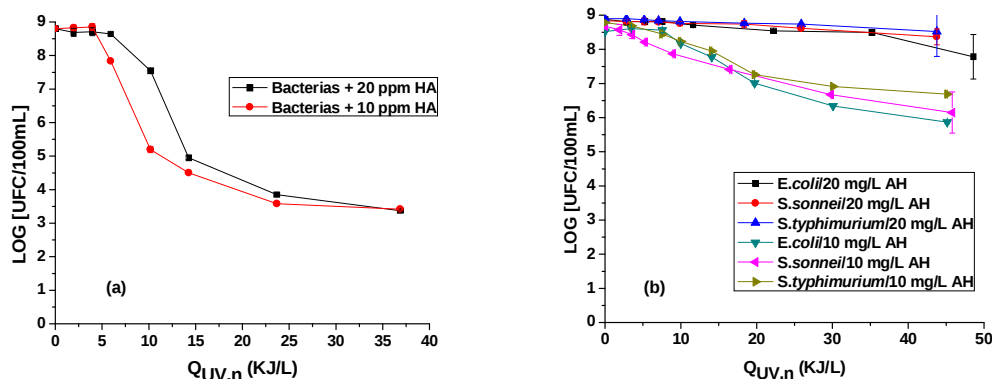


Figura 20. Inactivación de la mezcla de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei* y *E.coli* en presencia de diferentes concentraciones de ácidos húmicos (AH) por medio de (a) Proceso foto-Fenton, $[\text{Fe}^{2+}]$: 0.7 mg/L, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 20mg/L, (b) Luz. Concentración inicial de los compuestos: AH: 10 mg/L o 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

El incremento en la velocidad de la desinfección con 10 ppm de AH manteniendo constante la concentración de Fe^{2+} y H_2O_2 se debe principalmente a los procesos de fotosensibilización que se presenta en cada sistema, debido a que cuando se tiene 20 ppm de AH la fotosensibilización que se presenta es mayormente de los ácidos húmicos, los cuales como ya se mencionaron anteriormente en presencia de luz pueden actuar como fotosensibilizadores bajo la radiación UV-Visible y por ende generar procesos fotoquímicos para la producción de ROS, ya que el aporte por fotosensibilización de componentes celulares es insignificante como se muestra en la figura 20.b.

Por el contrario, si se analiza la velocidad de la inactivación con 10 ppm de AH el incremento de la misma se puede explicar teniendo en cuenta que para este sistema se presenta fotosensibilización tanto de los componentes celulares (citocromo, flavina, tryptofano y otros aminoácidos aromáticos), como de los ácidos húmicos. Esto se evidencia en la grafica 20.b, donde al aporte en la inactivación bacteriana es mayor en presencia de luz para el proceso que se lleva cabo con 10 ppm que con 20 ppm de AH en cada bacteria.

Igualmente, cabe mencionar que estos radicales atacan primero a las bacterias antes que a las moléculas orgánicas, lo cual se puede deducir al comparar la degradación de los ácidos húmicos tanto en presencia como en ausencia de la mezcla de bacterias (figura 21) para los dos procesos con 10 y 20 ppm de AH.

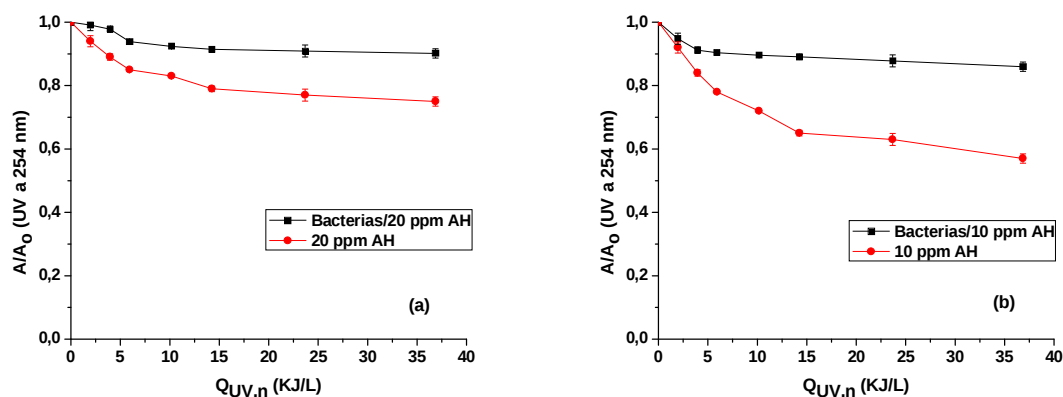


Figura 21. Seguimiento de la absorbancia en la degradación de los ácidos húmicos (AH) a 254 nm en presencia como en ausencia de las bacterias: *S.typhimurium*, *S.sonnei*, y *E.coli*. (a) Proceso con [AH]: 20 mg/L. (b) Proceso con [AH]: 10 mg/L. Concentración inicial de los compuestos: ácidos húmicos [Fe^{2+}]: 0.7 mg/L, [H_2O_2]: 20 mg/L, pH = 6.0. Concentración de las bacterias: 10^8 UFC/100 mL.

Como se observa en la figura 21 la degradación de los ácidos húmicos con 10 y 20 ppm de AH en presencia de la mezcla bacteriana es aproximadamente equivalente. Sin embargo, al comparar cada proceso en ausencia de las bacterias se puede observar que hay una inhibición de la degradación de los ácidos húmicos del 15 % para el proceso con 20 y del 29 % para el de 10 ppm de AH.

Esto permite pensar que al realizar el proceso foto-Fenton los radicales $\cdot OH$ interaccionan primero con las bacterias incrementando su velocidad de desinfección, lo cual hace que la degradación de los ácidos húmicos en ambos procesos sea muy similar en presencia de la mezcla bacteriana. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que la bacteria es sensible no solo al ataque del radical $\cdot OH$ y de otras especies de ROS, sino que también se ve afectada por la presencia de luz, es decir, en las bacterias hay un efecto sinérgico de la luz, luz- H_2O_2 , Fenton y foto-Fenton, los cuales como ya se han mencionado desencadenan una serie de procesos o reacciones que afectan la vida de las bacterias. Además, este comportamiento posiblemente también esté relacionado con la diferencia en tamaño de las bacterias (0.5 - 1.0 μm) con respecto al tamaño

molecular de los ácidos húmicos, pues éstas al ser mucho más grandes incrementan la posibilidad del ataque hacia ellas de los radicales $\cdot\text{OH}$ generados en el seno de la solución [86].

Por otra parte se midió el TOC en los ensayos realizados con ácidos húmicos con cada bacteria, con el fin de determinar los porcentajes de mineralización de éstos, de acuerdo a los resultados se evidencia que no hay una mineralización de los ácidos húmicos significativa (entre 4 y 13%). Esta diferencia en la velocidad de degradación de los ácidos húmicos con respecto a su mineralización se debe a que para lograr una concentración baja del TOC es necesario la oxidación de todos los intermediarios generados en la degradación hasta CO_2 , mientras que la sola oxidación de las moléculas de ácidos húmicos es suficiente para la disminución de su concentración en el sistema [87].

La tabla 1 resume todos los procesos realizados mostrando los resultados de inactivación bacterial máxima frente a las distintas condiciones estudiadas incluyendo los controles de luz, luz- H_2O_2 y fenton.

Tabla 1. Porcentaje de inactivación bacterial máximo para cada proceso realizado.

SISTEMA	PORCENTAJE DE INACTIVACIÓN BACTERIAL MÁXIMA (%)			
	<i>S.typhimurium</i>	<i>S.sonnei</i>	<i>E.coli</i>	Mezcla de Bacterias
FOTO FENTON	51,9	59,8	73,1	---
LUZ	32,1	40,0	35,3	---
LUZ- H_2O_2	46,8	56,4	54,8	---
FENTON	22,5	23,1	25,2	---
FOTO FENTON + 20 ppm AH	48,0	61,5	65,6	61,7
FOTO FENTON + 10 ppm AH	---	---	---	61,2
LUZ + 20 ppm AH	4,27	5,43	12,4	---
LUZ + 10 ppm AH	23,8	29,1	31,1	---

6. CONCLUSIONES

Se demostró que el proceso foto-Fenton utilizando 0.7 ppm de Fe^{2+} , 20 ppm de H_2O_2 y pH 6 permite obtener una disminución considerable en la concentración inicial de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei*, y *E.coli* ya sea de manera individual o cuando las tres se encuentran presentes en la solución. No obstante, no se logra una desinfección completa, por lo que este método solo podría plantearse como una alternativa complementaria a procesos de potabilización de agua.

Se observó que en el proceso foto-Fenton llevado a cabo con la presencia de ácidos húmicos se disminuye considerablemente el proceso de inactivación bacteriana, ya que se crea un ambiente competitivo por los radicales libres, porque estos tienen la propiedad de atacar tanto a las bacterias para su inactivación como a los ácidos húmicos para su degradación. Por tanto cuando el agua fue dopada con estos la capacidad del proceso foto-Fenton para degradar los ácidos húmicos en presencia de las bacterias también se vio disminuido.

Se demostró que el proceso foto-Fenton llevado a cabo con diferentes concentraciones de ácidos húmicos (10 y 20 ppm), 0,7 ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2 permite también una disminución considerable de las bacterias *S.typhimurium*, *S.sonnei*, y *E.coli*. No obstante, el proceso llevado a cabo utilizando 10 ppm de AH permitió obtener una mayor velocidad en el proceso de desinfección de la mezcla de bacterias.

Es necesario realizar estudios complementarios a este trabajo que permitan evaluar la desinfección mediante el proceso foto-Fenton al llevarse a cabo con la

presencia de materia orgánica e inorgánica tanto a escala de laboratorio como a escala piloto. Además de buscar una mejora en el proceso que permita obtener un incremento en la degradación de materia orgánica conservando la efectividad del proceso en la desinfección.

Se debe realizar estudios a escala piloto para evaluar la desinfección mediante el proceso foto-Fenton con matrices de agua real que involucren diversas fuentes de materia orgánica y así poder conocer cómo afecta más detalladamente este tipo de compuestos el proceso de desinfección.

7. REFERENCIAS

1. World Resources Institute 1994-95, N.Y.O., 1994.
2. UNESCO. Water for People, Water for Life. Paris. 2003
3. Theron, J., Cloete, T. 2003. Emerging waterborne infections: Contributing factors, agents and detection tolos. *Critical Reviews in microbiology* 28 (1): 1-26.
4. Económico. M.d.D, 1998. Ed. Inventario Nacional del sector de agua potable y saneamiento básico. Vol. 1-133.
5. Maïga Y., Denyigba K., Wethe J., and Sidiki A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 94 (2009) 113–119.
6. Wang G.S, Deng Y.C, Lin T.F., Cancer risk assessment from trihalomethanes in drinking wáter, *Science of the Total Environment* (2007). 387, 86–95.
7. Moncayo-Lasso, A.; Pulgarin, C.; Benitez, N., Degradation of DBPs' precursors in river water before and after slow sand filtration by photo-Fenton process at pH 5 in a solar CPC reactor. *Water Research* 2008, 42 (15), 4125-4132.
8. Malato S, Blanco J, Alarcon D, Maldonado M, Fernandez-Ibanez P, Gernjak W., Photocatalytic decontamination and disinfection of wáter with solar collectors, *Catalysis Today* (2007). 122, 137–149.
9. Andreozzi, R.; Caprio, V.; Insola, A., Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today* 1999, 53, 51-59.
10. Moncayo-Lasso, A.; Torres-Palma, R. A.; Kiwi, J.; Benitez, N.; Pulgarin, C., Bacterial inactivation and organic oxidation via immobilized photo-Fenton reagent

- on structured silica surfaces. *Applied Catalysis B-Environmental* 2008, **84** (3-4), 577-583.
- 11.** Bauer, R.; Fallmann, H., The photo-Fenton oxidation - A cheap and efficient wastewater treatment method. *Res. Chem. Intermed* 1997, **23** (4), 341-354.
- 12.** Moncayo-Lasso, A.; Sanabria, J.; Pulgarin, C.; Benitez, N., Simultaneous E-coli inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor. A new way for enhancing solar disinfection of natural water. *Chemosphere* 2009, **77** (2), 296-300.
- 13.** Lean, G; Hinrichsen, D. Problemática del agua en el mundo. [En línea]. <http://www.pnuma.org/reccat/esp/documentos/cap1.pdf>. [Visitado el 8 de Noviembre de 2011]
- 14.** INVEMAR .Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la protección y conservación de la calidad de las aguas marinas y costeras [en línea] http://www.siac.gov.co/contenido/contenido_imprimir.aspx?conID=378&catID=3. [Visitado el 8 de Noviembre de 2011]
- 15.** Campos, C. Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de aguas residuales para riego agrícola. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 1999. 250 p.
- 16.** Stoddard, C.; Coyne, J., Fecal bacteria survival and infiltration through a shallow agricultural soil: Timing and tillage effects. *J. Environ Qual* 1998, **2**, 1516-1523.
- 17.** Apella, M; Araujo, P. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua Argentina. Editorial Escuela de Postgrado UNSAM, A. 2005, p 27-28.

18. Prescott, Harley, Klein. Microbiología. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4ª ed. 1999, p 23-25.
19. Uribe, C; Suarez, M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. CM 2006; 37 (2): 151-158.
20. Angulo FJ *et al.*, 1997: A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. *American Journal of Public Health*, 87:580–584.
21. Know, Y.; Ricke, S., Induction of Acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol* 1998, 9, 3458-3463.
22. Alamanos Y *et al.*, 2000: A community waterborne outbreak of gastro-enteritis attributed to *Shigella sonnei*. *Epidemiology and Infection*, 125:499–503.
23. Rivera.; Matos, I.; Cleary, T., Foodborne and Waterborne Illness in Children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1996, 1,106-112.
24. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington, 1999.
25. Nataro JP y Kaper JB, 1998: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11:142–201.
26. Blanco, J.; Malato, S., Solar Detoxificación. *UNESCO Publishing, France* 2003, (6-4), 190.
27. Blesa, M.A.; Blanco, J. 2005. (Eds). Solar Safe Water: Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. Escuela de Posgrados UNSAM, San Martín. 294p.
28. World Health Organization. 2006. Guidelines for Drinking-water Quality first addendum to third edition volume 1 Recommendations. Geneva, WHO Press.

- 29.** Goslan, E.H., Fearing, D.A., Banks, J., Wilson, D., Hillis, P., Campbell, A.T., Parsons, S.A., 2003. Seasonal variations in the disinfection by-product precursor profile of a reservoir water. *Journal of water Supply: Research and Technology-AQUA* 51, 475-482.
- 30.** Murray, C. and Parsons, S. *Chemosphere* 54 (2004) 1017-1023.
- 31.** Giraldo, Juliana. Degradación de ácidos húmicos en aguas mediante fotocátalisis homogénea y heterogénea. Santiago de Cali 2007, 41p. Tesis de grado (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.
- 32.** Lievano, David. Degradación fotocatalítica de resorcinol e hidroquinona en aguas. Aplicación en un proceso de obtención de agua potable. Santiago de Cali 2006, 40 p. Tesis de grado (Químico). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.
- 33.** Ríos, Danilo .Riesgos biológicos y subproductos de la desinfección en el agua de bebida. Montevideo 2006, 201p. Tesis de grado (Magíster en Ingeniería Ambiental). Universidad de la República Oriental de Uruguay Facultad de Ingeniería.
- 34.** Legrini, O., Oliveros, E., Braun, A.M., 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.*, 93(2):671- 698.
- 35.** US/EPA Handbook of Advanced Photochemical Oxidation Processes, EPA/625/R-98/004 (1998).
- 36.** Rodríguez, Antonio. Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales Industriales, Informe de Vigilancia Tecnológica , Universidad de Alcalá del Círculo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME), España, 2006.
- 37.** W.H. Glaze, *Environ. Sci. Technol.*, 21, 224-230 (1987).

- 38.** W.H. Glaze, J.W. Kang y D.H. Chapin, *Ozone Sci. & Technol.*, 9, 335-352 (1987).
- 39.** Domenech X., Jardim W.F., Litter M.I. 2004. Procesos avanzados de oxidación para la remoción de contaminantes. En: Blesa M.A., Sánchez B. (Eds.) *Remoción de contaminantes por fotocatálisis heterogénea*. Editorial CIEMAT, Madrid, España.
- 40.** Aristizabal, D. Degradación de precursores de DBPs por reacción foto-Fenton en un colector solar CPC. Santiago de Cali. 2005. 77. Trabajo de grado para optar el título de Químico. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias.
- 41.** J.P. Scott y D.F. Ollis, *Environ. Progress*, 14, 88-103 (1995).
- 42.** Domènech X, Jardim W, Litter M., *Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes*. En: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*, Capítulo 1, Blesa M.A, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Digital Grafic, La Plata, Argentina. ISBN 987-43-3809-1, 2001.
- 43.** Morales Villegas Diego. Degradación de materia orgánica en aguas mediante el proceso foto-Fenton a pH cercano de la neutralidad y bajas concentraciones del catalizador. Santiago de Cali, 2010, 40p. Tesis de grado (Químico). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.
- 44.** Li, Q.; Page, M.A.; Marinas, B.J.; Shang, N.K., Treatment of coliphage MS2 with palladium-modified nitrogen-doped titanium oxide photocatalyst illuminated by visible light. *Environmental Science & Technology* 2008, 42, 6148-6153.
- 45.** Bozzi, A.; Yuranova, T.; Lais, P.; Kiwi, J., Degradation of industrial waste waters on Fe/ Cfabrics. Optimization of the solution parameters during reactor operation, *Water Research* 2005, 39, 1441–1450.

- 46.** Mendoza Marín C, Osorio P, Benítez N., Decontamination of industrial wastewater from sugarcane crops by combining solar photo-Fenton and biological treatments, *Journal of Hazardous Materials* (2010). 177, 851–855.
- 47.** Abdessalem A, Bellakhal N, Oturan N, Dachraoui M, Oturan M., Treatment of a mixture of three pesticides by photo- and electro-Fenton processes, *Desalination* (2010). 250, 450–455.
- 48.** Kitsiou V, Filippidis N, Mantzavinos D, Poulios I., Heterogeneous and homogeneous photocatalytic degradation of the insecticide imidacloprid in aqueous solutions, *Applied Catalysis B: Environmental* (2009). 86, 27–35.
- 49.** Farre M, Maldonado M, Gernjak W, Oller I, Malato S, Domenech X, Peral J., Coupled solar photo-Fenton and biological treatment for the degradation of diuron and linuron herbicides at pilot scale, *Chemosphere* (2008). 72, 622–629.
- 50.** Emami F, Tehrani-Bagha A, Gharanjig K, Menger., Kinetic study of the factors controlling Fenton-promoted destruction of a non-biodegradable dye, *Desalination* (2010). 257, 124–128.
- 51.** Rodrigues C, Madeirab L, Boaventura R., Treatment of textile effluent by chemical (Fenton's Reagent) and biological (sequencing batch reactor) oxidation, *Journal of Hazardous Materials* (2009). 172, 1551–1559.
- 52.** Papic S, Vujevic D, Koprivanac N, Sinko D., Decolourization and mineralization of commercial reactive dyes by using homogeneous and heterogeneous Fenton and UV/Fenton processes, *Journal of Hazardous Materials* (2009). 164, 1137–1145.
- 53.** Hermosilla D, Cortijo M, Huang C., Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes, *Science of the Total Environment* (2009). 407, 3473–3481.

- 54.** Moncayo Lasso Alejandro. Estudio de la Viabilidad del uso de Procesos Heliofotocatalíticos en la Desinfección y la Eliminación de Sustancias Orgánicas para la Obtención de Agua Potable. Santiago de Cali, 2008, 129p. Tesis de grado (Doctorado en Ciencias Químicas). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.
- 55.** Rincón, A.; Pulgarin, C., Absence of *E. coli* regrowth after Fe^{3+} and TiO_2 solar photoassisted disinfection of water in CPC solar photoreactor, *Catalysis Today* 2007, 124, 204–214.
- 56.** Oller, I., 2008. Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, Departamento de Ingeniería Química.
- 57.** Cáceres, J., 2002. Evaluación analítica y optimización de procesos de oxidación avanzada en planta piloto solar. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, Departamento de Hidrogeología y Química Analítica.
- 58.** Muschaweck, J., Spirk, W., Timinger, A., Benz, N., Dörfler, M., Gut, M., Kose, E., 2000 Optimized reflectors for non-tracking solar collectors with tubular absorbers. *Solar Energy*. 68, 151.
- 59.** Giménez, J., Curcó, D., Queral, M.A., 1999. Photocatalytic treatment of phenol and 2,4-dichlorophenol in a solar plant in the way to scaling-up. *Catalysis Today*. 54 (2-3), 229-243.
- 60.** Perez, L.A., 2008. Degradación fotoquímica de contaminantes emergentes mediante procesos solares. evaluación analítica. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, Departamento de Hidrogeología y Química Analítica.
- 61.** Bolton, J.R., 2001. Ultraviolet applications handbook. Bolton Photosciences Inc. Ontario, Canada

- 62.** A.G. Rincón, C. Pulgarin, *Solar Energy* 77 (2004) 635–648.
- 63.** Thompson, C. L, Sancar, A (2002), Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* 21, 9043-9056.
- 64.** Gamaley, I.A., Kluybin, I.V. (1999). Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int.Review Cytology* 188, 203-255.
- 65.** Imlay J., Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annu. Rev. Biochem* 2008, 77 (1), 755–776
- 66.** McGuigan, T.; Joyce, R.; Conroy, J.; Gillespie, M.; Elmore-Meegan., Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles—characterizing the bacterial inactivation process. *J. Appl. Microbiol* 1998, 84, 1138–1148.
- 67.** Berney,; M., Weilenmann, H-U.; Simonetti, A.; Egli, T., Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerea*. *Journal of Applied Microbiology* 2006, 101, 828-836.
- 68.** Fisher, M. Speeding up solar disinfection: Effects of hydrogen peroxide, temperature, and copper plus ascorbate on the photoinactivation of *E.coli* Charles river water. 2004, 136p. Tesis de grado (Maestría en Ciencias en Ingeniería civil y del medio ambiente). Instituto Tecnológico de Massachusetts. Departamento de ingeniera civil y del medio ambiente.
- 69.** Acra, M.; Jurdi, H.; Mu’allem, Y.; Karahagopian, Z., *Water Disinfection by Solar Radiation: Assessment and Application*, International Development Research Centre (IDRC – Canada), PO Box 8500, Ottawa, Ont., Canada K1G 3H9, 1990.

70. Liang, X.; Liu, A.; Limb, C.; Ayi, T.; Yap, P., Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip. *Sensors and Actuators A* 2007, 133, 349–354
71. Gourmelon, M.; Cillard, J.; Pommepuy, M., Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis, *J. Appl. Microbiol* 1994, 77 (1) 105–112.
72. Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 23-247.
73. Imlay, J., Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol* 2003, 57 (1) 395–418.
74. J, Hoerter.; A, Pierce.; C, Troupe.; J, Epperson.; A, Eisenstark., Role of enterobactin and intracellular iron in cell lethality during near-UV irradiation in *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol* 1996, 64 (3) 537–541.
75. R, Tyrrell.; C, Pourzand.; J, Brown.; V., Hejmadi.; E. Kvam.; S, Ryter.; R, Watkin., Cellular studies with UVA radiation: a role for iron, *Radiat. Prot. Dosim* 2000, 91 (1–3), 37–39.
76. Hartman, P.; A, Eisenstark., Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiation and hydrogen peroxide: distinction between recA-repairable and recA nonrepairable damage. *J. Bacteriol* 1978, 133 (2) 769–774.
77. Sichel, C; Fernandez, P; Tello, J. Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *fusarium solani* spores in distilled and natural well water, *Water Res.* 43 (7) (2009) 1841-1850.
78. Eisenstark, A. Bacterial gene products in response to near-ultraviolet radiation. *Mutat. Res.* 422 (1998) 85-95.

- 79.** Spuhler, D.; Rengifo-Herrera, J. A.; Pulgarin, C., The effect of Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Applied Catalysis B Environmental* 2010, 96 (1-2), 126-141.
- 80.** Sciacca, F.; Rengifo, J.; Wethe, J.; Pulgarin, C., Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild *Salmonella* sp. In PET bottles by H_2O_2 addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron. *Chemosphere* 2010, 78, 1186–1191
- 81.** F. Haber, J. Weiss, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proc. R. Soc. Lond* 1934, 147 (861) 332–351.
- 82.** A. Sychev, V. Isak, Iron compounds and the mechanisms of the homogeneous catalysis of the activation of O_2 and H_2O_2 and of the oxidation of organic substrates, *Russian Chem. Rev* 1995. 65, 1105–1129.
- 83.** E.S. Henle, S. Linn, Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem* 1997. 272 (31), 19095–19098.
- 84.** K.G. McGuigan, T.M. Joyce, R.M. Conroy, Solar disinfection: use of sunlight to decontaminate drinking water in developing countries, *J. Photochem. Photobiol A* 1999. 64 (2) 785–787.
- 85.** Oquendo José Jonathan. Inactivación de bacterias presentes en aguas empleando el proceso foto-Fenton homogéneo a escala de laboratorio. Santiago de Cali, 2011, 54p. Tesis de grado (Químico). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
- 86.** Chengchun, J.; Suyan, P.; Feng, O.; Jun, M.; Jin, J., A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment. *Journal of Hazardous Materials* 2010, 174, 813–817.

- 87.**Devlin H.R., Harris I.J. Mechanism of the oxidation of aqueous phenol with dissolved oxygen. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 1984, 23, 387-392.

8. ANEXO

8.1 CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *E. coli* (ATCC 8739), *S. typhimurium* (ATCC 14028) y *S. sonnei* (ATCC 25931) las cuales fueron suministradas por Microbiologics. Las bacterias fueron activadas en agar PCA (Plate Count Agar - Scharlau). A cada una de las cepas se le realizó su curva de crecimiento estimando el número de células por cámara de Neubauer cada hora hasta la fase estacionaria. La *Escherichia coli* alcanzó el mayor número de bacterias ($1,93 \times 10^9$) a las seis horas y la fase estacionaria en cinco horas. La *Salmonella typhimurium* alcanzó la fase estacionaria en cinco horas y el mayor número de bacterias ($1,54 \times 10^9$) en nueve horas. La *Shigella sonnei* llegó a la fase estacionaria en cuatro horas y alcanzó el mayor número de células ($4,27 \times 10^8$) a las ocho horas. Posteriormente se realizó la preservación de éstas cepas a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una solución de caldo CASO Bouillon (Merck) y glicerol (Mol Labs) al 30%.

Estas cepas, almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se reactivaron inoculando en caldo Caso Bouillon (Merck) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación constante hasta el tiempo en que la cepa bacteriana se encontrara en la fase estacionaria. Luego de esto las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y lavadas tres veces con solución de NaCl al 0.85% (P/V). El "pellet" bacterial fue re-suspendido en solución de NaCl al 0.85% para obtener 10^9 - 10^{10} unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros (UFC/100 mL). De esta solución se repartió 100 mL para cada reactor CPC, el cual contenía previamente 10 L de agua destilada o agua destilada dopada con ácidos húmicos (según el sistema a estudiar) para obtener una concentración entre 10^7 - 10^8 UFC/100 mL en cada

reactor. Posteriormente, la suspensión bacterial se expuso a la radiación solar durante 4-5 horas aproximadamente.

Las muestras fueron tomadas en diferentes periodos de iluminación y sembradas por duplicado en PCA previamente servido en cajas de petri mediante el método de filtración por membrana. El recuento de las unidades formadoras de colonia se hizo después de 24 horas de incubación a 35 °C.

Para evaluar el recrecimiento bacteriano las muestras fueron colocadas en recipientes estériles y tapadas con aluminio bajo incubación a 35 °C durante 48 h en la oscuridad. Después de este tiempo las muestras fueron sembradas en agar PCA y su recuento se hizo como fue descrito anteriormente.