

***EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SOLARES ASISTIDAS POR CATALIZADORES
HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS EN LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS
INDICADORES EN AGUAS DE FUENTES SUPERFICIALES***

LUIS ENRIQUE MORA ARISMENDI

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2011

***EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SOLARES ASISTIDAS POR CATALIZADORES
HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS EN LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS
INDICADORES EN AGUAS DE FUENTES SUPERFICIALES***

LUIS ENRIQUE MORA ARISMENDI

Tesis de investigación para optar
al título de Magíster en Ingeniería

Irma Janeth Sanabria Gómez Lic. Ph.D.
Director

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2011

Nuestro conocimiento es necesariamente finito, mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita.

Karl Popper

CONTENIDO

pág.

1.	INTRODUCCIÓN	7
2.	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GENERAL	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3.	MARCO REFERENCIAL	10
3.1	MARCO CONTEXTUAL	10
3.1.1	ACCESO Y CALIDAD DEL AGUA POTABLE	11
3.1.2	EL ESTADO DE LA DESINFECCIÓN EN COLOMBIA	13
3.2	MARCO TEÓRICO	16
3.2.1	Enfermedades transmitidas por agua	16
3.2.2	Evaluación microbiológica de la calidad del agua	18
3.2.3	Tecnologías de desinfección de agua	20
3.2.4	Fundamentos de tecnologías solares y fotocatalíticas	23
3.2.5	Reactores fotocatalíticos	25
3.2.6	Desinfección de agua con tecnologías solares	29
4	METODOLOGÍA	32
4.1	ENSAYOS A ESCALA LABORATORIO	32
4.1.1	Ensayos exploratorios	34
4.1.2	Ensayos confirmativos	35
4.2	ENSAYOS A ESCALA PILOTO	36
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1	ESCALA LABORATORIO: ENSAYOS EXPLORATORIOS	38
5.1.1	Catalizador 1. Ensayos con dióxido de titanio	38
5.1.2	Catalizador 2. Ensayos foto-Fenton	40
5.1.3	Catalizador 3. Ensayos $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$	42
5.2	ESCALA LABORATORIO: ENSAYOS CONFIRMATORIOS	44
5.3	ESCALA PILOTO: ENSAYOS CPC Y SODIS	51
5	CONCLUSIONES	59
6	BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Comparación de sistemas de desinfección aplicados en aguas	22
Tabla 2. Reactores fotocatalíticos empleados en desinfección de agua.....	28
Tabla 3. Matriz de ensayos exploratorios.....	34
Tabla 4. Diseño experimental generado por el software Minitab 14® para el sistema luz+Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	35
Tabla 5. Diseño experimental generado por el software Minitab 14® para el sistema luz+TiO ₂ /Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	35
Tabla 6. Matriz de ensayos reacciones tipo Fenton	36

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Simulador solar SunTest y reactores batch empleados en los ensayos exploratorios	33
Figura 2. Esquema del montaje y detalle del reactor Colector Parabólico Compuesto	37
Figura 3. Inactivación del bacteriófago Φ X174 en un simulador solar para los sistemas luz, oscuridad/ TiO_2 , luz+ TiO_2 . pH inicial = 6.5.....	39
Figura 4. Datos medios para la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} para el sistema luz+ Fe^{2+} / H_2O_2 en un diseño factorial 2^2 con puntos centrales. Punto central Fe^{2+} :1.1 mg L^{-1} ; H_2O_2 :10.25 mg L^{-1} . Concentración inicial $\cong 5.5$ Log_{10} PFU mL^{-1} .Tiempo de irradiación: 15 min.....	41
Figura 5. Datos medios para la interacciones de los factores Fe^{2+} y H_2O_2 (mg L^{-1}) en la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} en un diseño factorial 2^2 con puntos centrales.....	42
Figura 6. Datos medios para la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} para la reacción Luz+ TiO_2 / Fe^{2+} / H_2O_2 en agua ultrapura.....	43
Figura 7. Datos medios para la interacción de los factores TiO_2 / Fe^{2+} / H_2O_2 en la reducción del bacteriófago Φ X174 expresados como $\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{N}_0)$ [PFU mL^{-1}] de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1}	44
Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de Fe^{2+} y H_2O_2 en la reducción del bacteriófago Φ X174 en agua ultrapura (Condiciones de oscuridad)	45
Figura 9. Efecto de la luz y la concentración de H_2O_2 en la reducción del bacteriófago Φ X174 en agua ultrapura (Energía total: 800 W m^{-2} ; Uv: 14 W m^{-2}) pH inicial 6.0	46
Figura 10. Comparación de los sistemas luz+ Fe^{2+} : H_2O_2 y Fe^{2+} : H_2O_2 (mg L^{-1}) en la inactivación del bacteriófago Φ X174 en agua ultrapura	47
Figura 11. Efecto del sistema luz+ Fe^{2+} : H_2O_2 (mg L^{-1}) en la tasa de inactivación del bacteriófago Φ X174 en agua ultrapura en un simulador solar	48
Figura 12. Efecto de los sistemas luz, luz+ H_2O_2 , Fe^{2+} : H_2O_2 y luz+ Fe^{2+} : H_2O_2 en la tasa de inactivación del bacteriófago Φ X174 en agua cruda del río Pance. pH inicial =6.9. Las concentraciones se expresan en mg L^{-1}	49
Figura 13. Efecto de los sistemas luz+ H_2O_2 y luz+ Fe^{2+} : H_2O_2 en la inactivación del bacteriófago Φ X174 en un reactor CPC con agua cruda del río Pance. pH inicial=6.3	51
Figura 14. Inactivación del bacteriófago Φ X174 en agua cruda del río Pance a pH natural en un reactor CPC vs. la tecnología SODIS. Las concentraciones se expresan como la relación Fe^{2+} : H_2O_2 (mg L^{-1}) para el reactor CPC, los valores de hierro para SODIS corresponden a la concentración de hierro total naturalmente presente en el agua cruda expresados en mg L^{-1} y en ningún caso se adicionó H_2O_2	52
Figura 15. Inactivación de <i>E. coli</i> K-12 en agua cruda del río Pance a pH natural en un reactor CPC vs. la tecnología SODIS. Las concentraciones se expresan como la relación Fe^{2+} : H_2O_2 (mg L^{-1}) para el reactor CPC, el valor de hierro para SODIS corresponde con la concentración de hierro total naturalmente presente en el agua cruda en mg L^{-1} y en ningún caso se adicionó H_2O_2	55

1. INTRODUCCIÓN

La dificultad en el acceso a agua potable continúa siendo uno de los problemas que más afecta a la población humana, y como consecuencia del detrimento de la calidad del agua de las fuentes superficiales, de la intervención y la falta de protección en cuencas hidrográficas, su disponibilidad se verá seriamente limitada en un futuro cercano, aún en regiones consideradas actualmente como de gran riqueza hídrica. Los trabajos de investigación deben estar encaminados a dar respuesta a estos retos, mediante la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para la purificación del agua a un bajo costo, sin excesivo consumo energético, minimizando tanto el uso de químicos como el impacto ambiental y a su vez, incorporando la importante tarea de la educación en higiene y el uso eficiente de los recursos hídricos.

El uso de sistemas de tratamiento para potabilizar agua ha permitido disminuir el impacto de las enfermedades diarreicas agudas; en los países desarrollados la incidencia de infecciones como el cólera y la fiebre tifoidea se disminuyó drásticamente en tan solo un siglo de aplicación de estos sistemas; sin embargo, actualmente en estos países, la incidencia de enfermedades transmisibles por agua continua teniendo un impacto negativo que se refleja en el tiempo perdido por discapacidad, debido a que los perfiles epidemiológicos han cambiado y los microorganismos denominados emergentes como calicivirus, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* han incrementado su incidencia. Los países en vías de desarrollo aún presentan una brecha abrupta entre zonas urbanas, rurales y comunidades dispersas en cuanto al acceso sostenible a agua potable y saneamiento; la prevalencia de gastroenteritis virales, en grupos susceptibles como niños menores de 5 años es un asunto de suma importancia en salud pública, a esto debe sumarse la vulnerabilidad de los sistemas de salud, prevención y control, que se hace evidente en eventos catastróficos como el reciente terremoto en Haití.

Con la aparición de brotes por microorganismos resistentes a los procesos de tratamiento convencional, los procesos de desinfección continúan siendo un reto para la salud pública y un desafío para la Ingeniería en la búsqueda de soluciones sostenibles que minimicen los sub-productos de desinfección, y que además sean fácilmente asimilables por las diferentes comunidades. La implementación de sistemas de análisis de riesgos y del manejo integrado del recurso hídrico requiere disponer de alternativas tecnológicas de demostrada capacidad para ser aplicadas acorde con las necesidades locales en términos de inversión, mantenimiento, complejidad de operación y eficiencia en la eliminación de patógenos.

Los procesos avanzados de oxidación como alternativa o complemento de los procesos de potabilización del agua y de tratamiento de aguas residuales, se vienen explorando desde hace algunas décadas; no obstante, las aplicaciones de tecnologías solares en condiciones de campo aún tienen muchos aspectos por elucidar para garantizar la

inocuidad de sus efluentes. El presente trabajo de investigación, realizado en el marco del proyecto “BioSolarDetox” financiado por el programa de cooperación norte-sur entre la Escuela Politécnica Federal de Laussane y la Universidad del Valle, está encaminado a ahondar en la aplicación de tecnologías solares asistidas por catalizadores (dióxido de titanio y reacciones tipo Fenton), para evaluar su desempeño en la inactivación de microorganismos indicadores de patógenos virales y bacterianos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de tecnologías solares asistidas por catalizadores homogéneos y heterogéneos en la inactivación de microorganismos indicadores en agua de fuentes superficiales

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar a escala laboratorio entre procesos fotocatalíticos homogéneos y heterogéneos aquel con la mayor tasa de reducción de bacteriófagos somáticos.
- Evaluar a escala piloto, en un colector parabólico compuesto, el proceso con el mejor desempeño en la reducción de bacteriófagos somáticos contrastándolo con la inactivación de un indicador convencional como *Escherichia coli*
- Comparar los resultados obtenidos en el colector parabólico compuesto con la tecnología SODIS en términos de la reducción de los microorganismos evaluados

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 MARCO CONTEXTUAL

Colombia dispone de una oferta hídrica importante en comparación con otros países, sin embargo, la calidad del agua representa una seria limitante para su uso. Las corrientes superficiales captan gran cantidad de sedimentos provenientes de procesos erosivos naturales o antropogénicos, así como aguas domésticas e industriales, generadas por el asentamiento de poblaciones, principalmente en la zona andina donde los corredores industriales ejercen mucha presión sobre las cuencas del Magdalena y del Cauca. Solamente una franja muy pequeña ubicada entre el 5 y el 10 % de las cabeceras municipales efectúa algún tipo de tratamiento de aguas residuales y sin embargo sólo un porcentaje menor de estos tratamientos es aceptable. A esto debe sumarse la inadecuada disposición de residuos sólidos en botaderos a cielo abierto que genera lixiviados que afectan los acuíferos (Ojeda & Uribe, 2000).

Los procesos de intervención sobre cuencas, microcuencas, páramos y bosques alto andinos, agravan la situación incrementando la vulnerabilidad de los sistemas hidrográficos que abastecen las cabeceras municipales, donde las proyecciones para el 2025 implican problemas de abastecimiento para más del 50 % de la población en un año medio y para un 80 % en año de sequía (IDEAM, 2001). De acuerdo con el Inventario Nacional de calidad del agua, los mayores índices de riesgo se encuentran en poblaciones menores de 20.000 habitantes; este valor decrece en la medida que hay un aumento de población y una estabilización de la estructura de servicios de la comunidad (Ministerio de Salud, 1998).

Dentro de las metas de desarrollo del milenio, el aseguramiento del acceso a agua segura se contempla como una de las prioridades actuales para los países en vías de desarrollo; las enfermedades transmitidas por el agua tienen un efecto global en el bienestar de la población, con una participación importante en la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad; se reportan 4.000 millones de casos de diarrea por año en todo el mundo, los cuales generan más de dos millones de muertes. La OMS reporta que las enfermedades infecciosas y parasíticas generan cerca de 9.5 millones de muertes al año (16.2% del total de las muertes); dentro de las principales causas de las muertes a nivel mundial las infecciones diarreicas se encuentran como la quinta causa de muerte en el mundo con un total de 2.2% del total de las muertes del planeta. De los 10.4 millones de niños menores de 5 años fallecidos, las enfermedades diarreicas y las infecciones neonatales involucran el 17% y 9% de las muertes, respectivamente. Aunque se ha presentado una reducción en la tasa de mortalidad en los países desarrollados como uno de los grandes logros en salud pública del último siglo, en estas regiones los patrones de

incidencia han sido reemplazados de fiebre tifoidea y cólera hace un siglo hacia un mayor número de reportes de infecciones virales y patógenos emergentes como especies de *Campylobacter* sp., *Cryptosporidium parvum* y SIDA (WHO, 2008).

Las poblaciones más pobres de América Latina son especialmente susceptibles a las enfermedades entéricas transmisibles por el agua tales como el cólera, la tifoidea, la hepatitis A y otras afecciones diarreicas a pesar de las medidas adelantadas por los organismos de salud; la enfermedad diarreica aguda (EDA) continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años por su alta incidencia y por los gastos médicos que genera el tratamiento requerido para los casos de desnutrición, re-hidratación e intolerancia a la lactosa; la tasa aproximada de mortalidad infantil para Colombia en este rango de edad supera las 50.000 muertes al año, teniendo como base únicamente los casos de muertes registradas por causas definidas (PAHO, 2005), por lo que el problema actualmente puede ser subestimado. De acuerdo con los datos de morbilidad y mortalidad del período de 1989 a 1991 el Ministerio de Salud de Colombia calculó que las enfermedades transmisibles y perinatales fueron responsables del 21% de los años de vida saludable perdidos por discapacidad en ese trienio. Entre 1989 y 1997 la diarrea fue la segunda causa de hospitalización en niños menores de 1 año y la segunda causa de hospitalización en niños de 1 a 4 años. Entre los patógenos virales, los Rotavirus han recibido especial atención por su asociación con la deshidratación grave, siendo uno de los agentes infecciosos con mayor incidencia y con altas tasas de mortalidad, en Colombia la epidemiología de este virus no está suficientemente caracterizada pero se ha encontrado que un 43% de muestras de heces fecales de 145 niños enfermos resultaron positivas para la detección de Rotavirus especialmente en niños de 6 a 24 meses (Cáceres *et al.*, 2005; WHO, 2006).

3.1.1 ACCESO Y CALIDAD DEL AGUA POTABLE

Los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para América Latina y la mayor parte del Caribe indican altos porcentajes de cobertura para agua potable y alcantarillado; en Colombia durante las últimas décadas se han alcanzado incrementos sustanciales en las coberturas de servicios públicos para las cabeceras municipales del país, este mejoramiento ha sido el resultado del proceso de reordenamiento y modernización del sector en conformidad con los lineamientos establecidos en la Constitución Política del 1991 y en la ley 142 de 1994. Sin embargo, se observan grandes inequidades en el acceso, uso y calidad del servicio con marcadas diferencias entre las zonas urbanas y las rurales; en los últimos años, la inclusión del criterio de acceso sostenible como medida de la disponibilidad del recurso en el tiempo ha permitido estimar las coberturas agua potable en 99% y 77% y las de acceso sostenible a saneamiento en 85 y 58% respectivamente (WHO & UNICEF, 2000; WHOSIS, 2008). Esto puede atribuirse a la baja densidad poblacional de las comunidades rurales que no permite cubrir los costos fijos de operación y mantenimiento de los sistemas de tratamiento, a la baja capacidad de gestión de los prestadores del servicio, a la poca efectividad de los recursos invertidos y los bajos incentivos de los municipios para utilizar los recursos del Estado.

Dentro de los objetivos planteados por el Departamento Nacional de Planeación para el cumplimiento de las metas de milenio, y en particular para “garantizar la sostenibilidad ambiental”, se plantea reducir el número de personas sin acceso a agua y saneamiento básico incrementando las coberturas de acueducto a 81,6% y la de saneamiento a 70,9%, se plantea “incorporar 2,3 millones de habitantes a una solución de abastecimiento de agua y 1,9 millones de habitantes a una solución de saneamiento básico, incluyendo soluciones alternativas para las zonas rurales, con proporciones estimadas del 50% de la población rural dispersa” (CONPES, 2005).

La infraestructura para el suministro de agua potable en la región andina se caracteriza por estar fragmentada y atender comunidades de menos de 10.000 habitantes. En las zonas rurales se han alcanzado valiosos avances en cobertura pero para el año 2003 aún se presentaban rezagos significativos en abastecimiento con un promedio de 66% y de agua servidas con un promedio de 57,9%; así mismo las debilidades en la gestión de los servicios, el bajo nivel de desarrollo tecnológico reflejaban diferencias importantes con relación a las zonas urbanas.

En el segundo inventario nacional de calidad del agua se planteó que la cobertura de agua de buena calidad para localidades con menos de 2.500 habitantes era del 9,56%, mientras que para aquellas con un rango entre 2.500-10.000 habitantes era de un 17,5%; a pesar de que se reportaban porcentajes de cobertura de acueducto de 93% y 84% respectivamente; los municipios reciben agua de baja calidad puesto que se enfocan los esfuerzos en la instalación de tuberías para la transmisión de aguas pero no existe interés por su calidad (Ministerio de Salud, 1998). En el año 2005, la población rural del país era de 12.6 millones de habitantes, equivalente a un 27% de la población, quienes se encuentran ubicados en cabeceras municipales, corregimientos y veredas dispersas por la geografía nacional. Para el año 1997 se estimó que las fuentes de aprovisionamiento de agua para los hogares en el país son los acueductos públicos (75%), acueductos comunales (10%), pozos de agua (5%), agua lluvia (0.5%), carrotanques (0,6%), ríos (7,4%) y otros sistemas (1,3%)(DANE, 1997).

La carencia de información de los sistemas de tratamiento y los índices de morbilidad y mortalidad infantil en las zonas rurales promovieron el desarrollo del Inventario Sanitario Rural en el año 2000 y 2002; a partir de la información obtenida, se estimó que la cobertura de abastecimiento de agua para las zonas rurales era de 56,3% y la cobertura de agua tratada de 11,8%; se reportaron 682 plantas de tratamiento de agua potable existentes, de las cuales 444 se encontraban en funcionamiento; el 44% de la población de las zonas rurales equivalente a más de 5 millones de colombianos no tienen servicio de abastecimiento ni realizan tratamiento alguno al agua; un 44% adicional se surten de redes de abasto sin tratamiento y solo un 12% de la población tiene acceso a acueducto, de los cuales un 3% tienen la desinfección como único tratamiento (UNICEF & MinAmbiente, 2005).

Los planes de seguridad del agua han sido desarrollados para organizar y sistematizar una larga historia de prácticas de manejo aplicadas a agua potable, asegurando su

aplicabilidad en el manejo de la calidad del agua; este sistema toma conceptos de otros sistemas de manejo de riesgo como la aproximación de sistemas multibarrera y Análisis de Riesgos en Puntos Críticos de Control (HACCP) aplicado en la industria de alimentos. Dentro de los elementos contemplados en estos planes se involucra la evaluación de los sistemas de tratamiento y el monitoreo operacional efectivo; dentro de este monitoreo se busca identificar parámetros de operación que brinden información sobre el control de los riesgos identificados, para asegurar los objetivos de cantidad y calidad del agua relacionados con las metas de salud que se hayan determinado para cada comunidad. Los parámetros seleccionados para el monitoreo operacional deben reflejar la efectividad de cada medida de control, proporcionando una indicación temporal del desempeño, incluyendo los sistemas de distribución.

Colombia ha desarrollado considerable normatividad para fortalecer la capacidad institucional en la provisión de servicios básicos de acueducto, alcantarillado y disposición de residuos sólidos, sin embargo se notan falencias en la planeación y gestión de los planes y programas con miras a mejorar la calidad de vida de la gente. Existe un vacío de información sobre el estado de los sistemas de acueducto en la toma de decisiones concernientes a los planes de desarrollo, lo cual conlleva a implementar soluciones poco efectivas y al desperdicio de recursos. En las propuestas está ausente el criterio de sostenibilidad, lo que conlleva a que la mayoría de redes de acueducto y alcantarillado sean obsoletas o se encuentren en mal estado y solo unos pocos municipios presentan proyectos para su mantenimiento y mejora; la mayoría de las municipalidades reporta la presencia de plantas de tratamiento, y a la vez reportan problemas con la calidad del agua. La información de los planes de desarrollo presenta una gran brecha entre las zonas rurales y las urbanas en términos de información, calidad de planeación, coberturas y calidades de los servicios y pertinencia de las inversiones.

3.1.2 EL ESTADO DE LA DESINFECCIÓN EN COLOMBIA

Como resultado de las actividades humanas y del acelerado crecimiento demográfico en América Latina y el Caribe se ha generado un deterioro progresivo de la calidad de las fuentes naturales de agua; los desechos descargados contienen y propician el desarrollo de una gran diversidad de organismos patógenos, incluyendo virus, bacterias, protozoos, hongos y huevos de helmintos. La información disponible respecto a la epidemiología de enfermedades transmisibles por agua y su relación con la infraestructura de tratamiento y el acceso sostenible a abastecimiento y saneamiento es limitada.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS)¹, ha reportado que la desinfección del 75% de los sistemas de agua de los municipios y comunidades de América Latina y el

¹ ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Citada por Reiff, F. M. El estado de la desinfección del agua potable en América Latina. Washington: Internacional Life Sciences Institute, 1996.

Caribe era inadecuado o inexistente; para 1984 se calculó que más del 90% de los pueblos y aldeas con menos de 10 mil habitantes carecían totalmente de sistemas de desinfección. En el período comprendido entre 1985 y 1991 se reporta un escaso avance debido a la constante explosión demográfica y al énfasis prestado por las instituciones en los planes de abastecimiento y saneamiento, donde se antepone la disponibilidad del agua antes que su calidad, basándose en la premisa de que solo la cantidad del agua aporta mejoras sanitarias.

La reaparición del cólera en el continente Americano en 1991, luego de más de un siglo de ausencia, contribuyó adicionalmente a reavivar el interés por la desinfección, puesto que en este evento se generaron cerca de 400.000 casos notificados y más de 4.000 defunciones en 16 países (OMS, s. f.). En el Segundo inventario nacional de la calidad del agua se reportan porcentajes de cobertura de agua de buena calidad solo en un 9,5% de los municipios con menos de 2.500 habitantes, dentro del universo del estudio se incluyeron solo cabeceras municipales, ignorando las poblaciones de las zonas rurales por su dispersión y distanciamiento de los centros urbanos, asumiendo por inferencia que poseen agua de mala calidad (Ministerio de Salud, 1998).

Tradicionalmente la desinfección constituye un paso final dentro de los procesos de tratamiento de agua para consumo; las tecnologías para este propósito involucran procesos físicos como la radiación ultravioleta, además de procesos de ultrafiltración y ósmosis inversa. Así mismo, se emplean compuestos químicos que incluyen la aplicación de agentes oxidantes o sus mezclas, los cuales reaccionan con los microorganismos alterando su metabolismo y/o estructura para generar así su muerte o inactivación; los procesos de desinfección de agua que emplean agentes oxidantes iniciaron su aplicación en Europa al final del siglo XIX. En los países industrializados la aplicación de sistemas de barreras múltiples para el tratamiento de agua de fuentes superficiales que involucran procesos de filtración y desinfección, han permitido controlar las enfermedades transmisibles por agua. La carencia de desinfección en sistemas de tratamiento en los países en desarrollo puede atribuirse a la ausencia de motivaciones políticas, incomprensión de la necesidad de desinfectar el agua, escasa disponibilidad y dificultad en el acceso a los desinfectantes, capacidad técnica insuficiente, instalaciones de desinfección mal diseñadas y equipos de mala calidad; selección de tecnologías de desinfección no apropiadas, vigilancia y monitoreo inadecuados, quejas de los usuarios por el sabor y olor en el agua, preocupación excesiva por los subproductos de desinfección, falla de la energía eléctrica y pre-tratamientos inadecuados del agua antes de la desinfección.

El método más difundido de desinfección del agua en zonas con limitaciones de acceso a agua o en situaciones de emergencia, es hervirla, puesto que es un método fácil de entender y relativamente sencillo de implementar. Sin embargo, es una de la opciones de desinfección más costosa por el consumo de combustibles; esto explica porqué la práctica no está difundida y generalmente se consume agua sumamente contaminada a la que sería absolutamente necesario desinfectar.

Los sistemas de desinfección que emplean cloro gaseoso abastecen gran parte de la población residente en grandes ciudades, puesto que a esta escala sigue siendo la alternativa menos costosa; su acceso es relativamente fácil en grandes cantidades y el método tiene un buen desempeño para el control de enfermedades de origen hídrico. Este desinfectante también se emplea para la desinfección en muchos municipios medianos y pequeños así como en algunos pueblos y aldeas. La segunda tecnología más utilizada para la desinfección es la aplicación de cloro mediante soluciones de hipoclorito, este proceso ha remplazado a la cloración gaseosa en muchos municipios de América Latina y el Caribe (Reiff, 1996).

Se reconoce que la cloración tiene inconvenientes, por el riesgo asociado de la generación compuestos tóxicos o sub-productos de desinfección o DBPs (Disinfection by-products), como resultado de su reacción con la materia orgánica presente y porque los quistes de protozoos y algunas esporas bacterianas no pueden ser inactivadas por éste método de desinfección. Los métodos restantes de desinfección empleados en las fuentes comunitarias de suministro de agua no representan en su conjunto más del 1% del total de agua desinfectada para consumo humano, incluyendo la ozonización, el empleo de dióxido de cloro, la luz ultravioleta y los oxidantes mezclados (Reiff, 1996).

En materia de desinfección la Organización Panamericana de la Salud recomienda que el agua superficial sea desinfectada después de haber sido filtrada, no obstante, en las comunidades rurales la desinfección en muchos de los casos es la única forma de tratamiento factible y la única barrera para minimizar la contaminación (Reiff, 1996). Cualquier sistema de desinfección que se emplee en el tratamiento del agua debe cumplir con unos parámetros mínimos estipulados por la legislación en cada país, la calidad del agua se evalúa teniendo en cuenta la concentración de microorganismos indicadores como indicio de la existencia de otros patógenos que son de interés para la salud pública.

En Colombia, la reglamentación vigente para agua potable emplea indicadores clásicos basados en concentraciones de bacterias como coliformes totales y *Escherichia coli*; sin embargo, no todas las enfermedades transmitidas por agua tienen etiología bacteriana, muchas son causadas por virus, helmintos y protozoos que difieren en sus estrategias de supervivencia, su resistencia a la desinfección y su persistencia ambiental (Lemarchand & Lebaron, 2003; Ashbolt, 2004); estas diferencias generan variaciones en las eficiencias de remoción entre los diversos sistemas de tratamiento empleados para potabilización (Gitis *et al.*, 2002; Medema *et al.*, 2003; Gabutti *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2010; Graczyk *et al.*, 2010).

La referencia para calidad del agua para consumo en el país se remite al decreto 1575 de 2007, donde se contempla como alternativa para desinfección principalmente a los compuestos derivados del cloro, sin embargo se permite el uso de otras tecnologías, siempre y cuando tengan el aval del Instituto Nacional de Salud y sean reconocidas por la Organización Mundial de la Salud. Las especificaciones técnicas para la calidad del agua potable se definen en la Resolución 2115 de 2007, y en su artículo 12 se establece que “de acuerdo con el mapa de riesgo, las autoridades ambientales en cooperación con autoridades sanitarias y las personas prestadoras de la jurisdicción, realizarán la

investigación para verificar la presencia de otros microorganismos patógenos en el agua y la viabilidad de establecer otros indicadores. Si se demuestra la presencia de microorganismos patógenos, las autoridades incorporarán en el mapa de riesgo, sus hallazgos y las acciones a seguir”.

La Organización Mundial de la Salud (2004) reporta que *E. coli* no es un adecuado indicador de la presencia de ciertos patógenos, por lo que la información derivada de su monitoreo en aguas proporciona muy poca evidencia del riesgo para la salud por diversos microorganismos, incluyendo los denominados emergentes (Nasser & Oman, 1999; Medema *et al.*, 2003). En circunstancias donde se emplee agua contaminada con virus entéricos y parásitos como fuente directa para consumo o cuando se presentan altos niveles de enfermedades virales y parasíticas en la comunidad, es recomendable incluir microorganismos más resistentes como indicadores de calidad del agua (WHO, 2006). El monitoreo de protozoos, particularmente *Cryptosporidium*, presenta inconvenientes debido a que se encuentra en bajas concentraciones, lo que hace que su seguimiento a través de los procesos de tratamiento sea tedioso y costoso. Se han evaluado indicadores complementarios a los coliformes como virus bacterianos ó bacteriófagos y bacterias aeróbicas formadoras de spora, que han demostrado incluso, ser indicadores conservativos respecto al número de ooquistes de *Cryptosporidium*, aún en los procesos de filtración y desinfección (Mazoua & Chauveheid, 2005).

3.2 MARCO TEÓRICO

3.2.1 Enfermedades transmitidas por agua

Gale (2001), plantea una clasificación para las enfermedades relacionadas con el suministro de agua:

- Enfermedades de origen hídrico: diseminadas a través del agua en las que el agua actúa como un portador pasivo, su incidencia depende del saneamiento.
- Enfermedades relacionadas con el agua: diseminadas por vectores e insectos que viven en el agua o cercanamente a ella.
- Enfermedades basadas en agua. Causadas por agentes infecciosos diseminados por contacto o ingestión de agua. El agua es importante en su ciclo de vida, como por ejemplo aquellos que usan caracoles como huéspedes.
- Enfermedades por aguas lavadas. Diseminadas por causa de una carencia de adecuada calidad del agua para mantenimiento adecuado de la higiene personal.

Las enfermedades transmitidas por agua tienen un efecto global sobre el bienestar de la población, si bien las principales tasas de morbilidad y mortalidad se presentan en países en desarrollo, igualmente se aprecia una incidencia significativa en los países desarrollados (Payment *et al.*, 1997; Craun *et al.*, 2010). Una proporción significativa de enfermedades transmitidas por agua tienden a no ser detectable mediante los sistemas

de reporte actuales, principalmente debido a que los síntomas de enfermedades gastrointestinales (nausea, diarrea, vomito, dolor abdominal) son usualmente leves y se presentan en un corto plazo. La falta de agua facilita la llegada de enfermedades por dos vías, aquellas que tienen lugar en brotes de transmisión fecal-oral y aquellas que ocurren por aguas servidas cuando no hay suficientes recursos para el lavado e higiene personal. Se presentan altas tasas de mortalidad por patógenos como *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, virus de Hepatitis E; especialmente cuando los sistemas de tratamiento o los servicios de salud son deficientes o ausentes (WHO & UNICEF, 2000).

Existen más de 150 microorganismos patógenos transmisibles por agua, con una diversidad tal que incluyen virus, bacterias, protozoos y helmintos. Para los países en desarrollo, especialmente aquellos donde gran parte de la población no tiene acceso a agua potable segura, se ha establecido que en el 80% de los casos de diarrea a nivel mundial son atribuibles a agua no-segura, saneamiento inadecuado e insuficiente higiene. A pesar que el número global de casos estimados de muerte por diarrea decayó de 4.6 millones antes de 1980 a 3.3 millones por año entre 1980 y 1990, para la década 1990-2000 se mantuvo un registro de 2.6 millones de muertes por año; además dentro de la categoría de diarrea se incluyen numerosas enfermedades, algunas tan graves como el cólera, la fiebre tifoidea y disentería bacteriana, todas ellas con rutas de transmisión fecal-oral.(Prüss-Üstün *et al.*, 2008). Pruss *et al.* (2002), estiman que el agua, el saneamiento y la higiene fueron responsables del 4 % de todas las muertes y 5.7 % del total de la carga por enfermedad ocurridas a nivel mundial. Otros estudios establecen que un 40 % de la población urbana contrae enfermedades infecciosas asociadas al consumo de agua (Cavallini & Young, 2002).

En las últimas décadas se ha establecido que algunos microorganismos han cambiado sus patrones de comportamiento en el tiempo puesto que ciertas enfermedades infecciosas han aparecido o incrementado su ocurrencia; estos brotes y epidemias se han conectado con procesos de agricultura intensiva, con migraciones humanas y cambios climáticos (Prüss *et al.*, 2002; Medema *et al.*, 2003). Como consecuencia, las autoridades sanitarias se ven enfrentadas con nuevas situaciones donde los microorganismos no son eficientemente removidos por los esquemas de tratamiento multi-barrera y pueden ser fácilmente diseminados por los sistemas de almacenamiento y distribución. Ejemplos de patógenos emergentes transmitidos por agua son: calicivirus, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter* sp, *Mycobacterium avium* y los protozoos *Cryptosporidium* sp, *Cyclospora* sp y *Toxoplasma* sp. (Woolhouse, 2002). Algunos microorganismos presentan efectos crónicos porque se han asociado con secuelas ligadas a enfermedades que aparecen tiempo después de la exposición al agua contaminada, como es el caso de Diabetes u otras patologías relacionadas con virus Coxsakie B4 (Amvros'eva *et al.*, 2004) Miocarditis relacionada con Echovirus (Ferreira *et al.*, 1995; Baboonian & Treasure, 1997); síndrome de Guillian-Barré asociado con *Campylobacter* (Prendergast *et al.*, 1998); cáncer gástrico ligado con *Helicobacter* (Uemura *et al.*, 2001). En Latinoamérica como en Colombia la información acerca de la incidencia de microorganismos emergentes es fraccionada, incompleta o inexistente.

3.2.2 Evaluación microbiológica de la calidad del agua

Desde una perspectiva netamente microbiológica, la calidad del agua para consumo se evalúa mediante la estimación de poblaciones de bacterias indicadoras cuya presencia puede ser indicio de la existencia de otros patógenos que son de interés en la salud pública, su uso se ha extendido por décadas y originalmente se desarrollaron como medida de la contaminación fecal de fuentes de suministro, subsecuentemente los mismos microorganismos fueron aplicados para estimar la eficiencia de los tratamientos, el deterioro del agua y la re-contaminación. De acuerdo con la WHO (2003) un microorganismo indicador ideal debe:

- Encontrarse ausente en aguas no contaminadas y presente cuando existan patógenos en la fuente de interés
- No debe multiplicarse en el ambiente para que sus poblaciones puedan asociarse con fuentes de contaminación en términos de distancia y tiempo
- Debe encontrarse en mayor número que los patógenos para facilitar su detección
- Debe responder a las condiciones ambientales y a los sistemas de tratamiento de forma similar a como se comportan los patógenos
- Debe ser fácil de aislar, identificar y medir
- Su diagnóstico no debe ser caro permitiendo tomar numerosas muestras
- No debe ser un patógeno para minimizar el riesgo durante los análisis

Para este fin, se han empleado tradicionalmente microorganismos entéricos como indicadores clásicos que incluyen a *Escherichia coli*, coliformes totales y fecales; empero, la Organización Mundial de la Salud reporta que la ausencia de *E. coli* no es garantía para establecer la ausencia de patógenos potenciales como: *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Tsukamurella* sp, *Yersinia* sp., *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium* sp. y protozoos como *Balantidium coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Ciclospora* sp., *Entamoeba* sp., *Giardia* sp., Microsporidios, *Naegleria* sp., *Toxoplasma* sp., Adenovirus, Astrovirus, Calcivirus, Enterovirus, virus de Hepatitis A y Rotavirus (WHO, 2006).

De otra parte, muchas bacterias tienen la capacidad de entrar en estado viable pero no cultivable, VBNC (por su sigla en inglés), como consecuencia básicamente de condiciones oligotróficas o de estrés ambiental (Pfeffer *et al.*, 2003); en dicho estado estos microorganismos no pueden ser recuperados por los métodos convencionales de cuantificación microbiana. Se encuentra bien documentado que cuando las condiciones para su crecimiento se hacen nuevamente favorables, ocurre un fenómeno de resucitación donde recuperan su actividad metabólica usual. Algunos microorganismos en este estado conservan su patogenicidad y pueden desarrollar procesos infecciosos (Rowan, 2004; Oliver, 2010). Actualmente existen técnicas de diagnóstico mucho más exactas para estimar la presencia de poblaciones en este estado, basadas en ensayos con ácidos nucleicos, pruebas inmunológicas y microscópicas, sin embargo, requieren de alta tecnología, mayor tiempo y son costosas, por ello difícilmente se pueden implementar

para un monitoreo rutinario, confinándolas a procesos de validación de la efectividad de un determinado proceso.

Aunque muchos microorganismos han sido implicados como agentes causantes de brotes de varias enfermedades, hay poca evidencia epidemiológica sobre los niveles endémicos de enfermedades de origen hídrico y su impacto. La asociación entre muchas afecciones con una ruta definida de exposición y su contribución al total de enfermedades, es a menudo muy incierta. Los estudios epidemiológicos han determinado las enfermedades gastrointestinales como la medida más adversa relacionada al consumo de agua, por otra parte, las enfermedades asociadas a la gastroenteritis son relativamente muy comunes y pueden ser transmitidas por varios medios, lo cual puede dificultar la distinción de las que realmente son ocasionadas por medio del agua. Se ha establecido un claro incremento de brotes de enfermedades a partir de aguas tratadas consideradas como seguras; la ineficacia de los indicadores de contaminación fecal en la detección de otras Enterobacterias como *Salmonella* sp y *Shigella* sp.; de protozoos como *Cryptosporidium parvum* y de virus, ha planteado la necesidad del uso de indicadores complementarios para aguas de consumo y recreación (Payment *et al.*, 1997; Barrell *et al.*, 2000); en los monitoreos operacionales se ha sugerido cuantificar indicadores más resistentes como esporas de *C. perfringens*, enterococos o bacteriófagos (WHO, 2006). Como una de las explicaciones a las discrepancias entre patógenos e indicadores se ha argumentado las diferencias en los ciclos de vida y en el comportamiento ambiental en aguas naturales contaminadas y efluentes de plantas de tratamiento (Barrell *et al.*, 2000; Lemarchand & Lebaron, 2003; Winfield & Groisman, 2003; Harwood *et al.*, 2005).

Los microorganismos patógenos tienen una serie de características que los distinguen de otros contaminantes del agua, pues son entidades discretas por lo que no pueden encontrarse en solución, se encuentran adheridos a sólidos suspendidos en el agua, presentan variaciones en su capacidad infecciosa y virulencia y su dosis-respuesta no es acumulativa, por tanto los parámetros operacionales para la calidad microbiológica deben incluir el monitoreo del efecto residual del desinfectante empleado y el diagnóstico de la presencia/ausencia de bacterias indicadoras fecales. Los virus son más persistentes en aguas naturales que los coliformes fecales y son removidos en menor grado en los sistemas de tratamiento de agua; los virus bacterianos o bacteriófagos comparten rasgos y propiedades fundamentales con los virus entéricos, tales como estructura, composición, morfología, tamaño y sitio de replicación, aunque empleen diferentes huéspedes; los fagos somáticos son un indicador útil de la presencia potencial de virus entéricos en aguas naturales y son un modelo valioso para estimar el comportamiento de estos en tratamientos de agua y en procesos de desinfección, además son detectados por metodologías relativamente rápidas, simples y comparativamente de bajo costo (Grabow, 2001; Lucena *et al.*, 2003; WHO, 2006). No existe correlación directa entre el número de fagos y los virus entéricos presentes, por lo que no pueden emplearse extensivamente para indicar el número de virus en aguas contaminadas; sin embargo, su ausencia puede tomarse como un buen indicio de la ausencia de virus entéricos (Nasser & Oman, 1999; Withey *et al.*, 2005).

Los bacteriófagos o colifagos son virus que parasitan células de *E. coli* y especies relacionadas, empleándolas para su replicación; dependiendo de su ruta de infección se dividen en dos grupos: somáticos y F-específicos (F-RNA). Los fagos somáticos inician la infección adhiriéndose a receptores permanentemente localizados en la pared de los huéspedes, se replican en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, pero en ciertas circunstancias pueden replicarse en ambientes acuáticos, incluyen un amplio rango de familias: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae y Microviridae con un amplio espectro morfológico. Los fagos F-RNA inician su infección ligándose a fimbrias sexuales que son producidas solamente por bacterias que porten el plásmido de fertilidad, las fimbrias se producen solo en fase logarítmica de crecimiento a temperaturas superiores a 30°C, no se replican en otros ambientes diferentes a tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, involucran un grupo compacto de fagos relacionados, los cuales pertenecen a las familias Leviviridae, y consisten en un genoma RNA de una sola hebra con cápside icosaédrica morfológicamente similar a picornavirus. Se han dividido en tipos serológicos del I al IV, los miembros del grupo I y IV se han reportado exclusivamente en heces de animales y el grupo III en heces de humanos. El grupo II se han detectado en heces humanas y en 28% de heces de porcinos (Leclerc *et al.*, 2000).

3.2.3 Tecnologías de desinfección de agua

La desinfección disminuye notablemente la incidencia de enfermedades transmisibles por el agua, la destrucción de patógenos microbianos es esencial y comúnmente involucra el uso de agentes químicos o radiaciones. Se requiere de la presencia de un efecto residual del agente desinfectante para proveer una seguridad intrínseca al agua, que la proteja de contaminaciones posteriores en los sistemas de almacenamiento y distribución. Los productos químicos comúnmente empleados para este proceso junto con la materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos) o inorgánica presente en el agua, favorecen la formación de productos de desinfección, que incluyen trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos, haloacetnitrilos y compuestos inorgánicos. El riesgo toxicológico asociado con estos compuestos tiene una incidencia importante en la salud de los consumidores, principalmente porque son carcinogénicos a bajas concentraciones (ver tabla 1). Se han identificado cerca de 250 compuestos incluyendo trihalometanos y productos no clorinados, pero solamente se han establecido los perfiles de comportamiento en agua potable para algunos de ellos (Chang *et al.*, 2001; Sadiq & Rodriguez, 2004; Kanokkantapong *et al.*, 2005).

La reducción de materia orgánica ha mostrado ser el método más eficiente para reducir la formación de THMs y proporciona mejores resultados con un adecuado control de los parámetros operacionales durante los tratamientos, como pH, tiempo de contacto y dosis de desinfectante. Aunque los procesos de desinfección propenden por asegurar la calidad microbiológica del agua, la aplicación descontrolada de agentes desinfectantes incrementa el riesgo toxicológico por la generación de importantes cantidades de DBP's durante el tratamiento mismo, durante su distribución y almacenamiento; ante esta

coyuntura, la implementación de sistemas de análisis de riesgos para cada localidad es una de las alternativas planteadas para manejar esta situación (Ashbolt, 2004).

Los desinfectantes son oxidantes fuertes que generan procesos de estrés oxidativo en las células como consecuencia de la producción de especies reactivas del oxígeno o ROS como aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; dependiendo de la especie química se generan alteraciones a nivel de membrana por peroxidación lipídica de proteínas estructurales y funcionales (Nadtochenko *et al.*, 2005), así como rompimiento de enlaces peptídicos o sulfhidrilos en las proteínas; en el material genético se produce daño en los anillos de timinas y adeninas por rompimiento y saturación además de fragmentación de las pentosas, también han reportado efectos en la cadena respiratoria (Maness *et al.*, 1999) y la generación de ROS mediante reacciones Fenton intracelulares (Farr & Kogoma, 1991). Para prevenir el daño por las ROS los organismos aeróbicos están equipados con defensas incluyendo antioxidantes como el glutatión, enzimas como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas junto con los mecanismos genéticos de defensa que se activan en respuesta al estrés oxidativo, los cuales han sido ampliamente estudiados tanto en procariotas como en eucariotas (Dowds *et al.*, 1987; Tamarit *et al.*, 1998; Kowaltowski & Vercesi, 1999; Cabiscol *et al.*, 2000; Ochsner *et al.*, 2000; Teissie *et al.*, 2002).

Tabla 1. Comparación de sistemas de desinfección aplicados en aguas

	Cloración	Ozonización	Radiación Ultravioleta	Electro-química	SODIS	Fotocatálisis
Efecto residual	+	-	-	-	-	-
Sensibles al tratamiento		Enterobacterias				
		<i>Vibrio cholerae</i>				
	Enterobacterias	<i>Helicobacter</i>	Enterobacterias	Enterobacterias		Enterobacterias
	<i>Helicobacter</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Enterobacterias	<i>Pseudomonas</i>
	Adenovirus	<i>Giardia</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Fusarium</i>
	<i>C. perfringens</i>	<i>Microsporidios</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Adenovirus	Rotavirus	<i>Candida</i>
		Adenovirus	<i>Giardia</i>			<i>Saccharomyces</i>
		<i>Calicivirus</i>				
Mayor resistencia al tratamiento	<i>Mycobacterium</i>					
	<i>Vibrio cholerae</i> ^R				<i>Cryptosporidium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Mycobacterium</i>	Microsporidios	Bacteriófagos	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
	<i>Giardia</i>	<i>Cyclospora</i>	Adenovirus	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cyclospora</i>	Fagos MS2
	<i>Cyclospora</i>					<i>Acanthamoeba</i>
	Microsporidios					
Formación de DBPs	+++	+	-	+	-	-
Requerimientos tecnológicos	Medio	Alto	Medio	Alto	Bajo	Medio
Costo de aplicación	Bajo	Alto	Alto	Alto	Muy bajo	Medio

Fuente: WHO (2006). Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva.

3.2.4 Fundamentos de tecnologías solares y fotocatalíticas

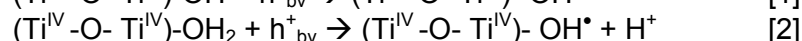
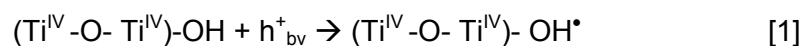
Los Procesos Avanzados de Oxidación o Advanced Oxidation Processes o AOPs, se basan en la producción de especies altamente oxidantes que permiten la destrucción de compuestos químicos bio-recalcitrantes y sustancias tóxicas. Dentro de las ROS se incluyen: el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Estos radicales son capaces de oxidar compuestos orgánicos, principalmente por abstracción de hidrógeno, por adición electrofílica a dobles enlaces generando radicales orgánicos libres ($\text{R}^\bullet$) que reaccionan a su vez con moléculas de oxígeno para formar peroxiradicales, e inician una serie de reacciones que producen estrés oxidativo en los microorganismos y degradación de moléculas orgánicas, incluso hasta la completa mineralización de ciertos contaminantes (Herrmann, 2005). La Organización Mundial de la Salud reconoce que los procesos basados en la generación de radicales hidroxilo permite la destrucción de compuestos que son difíciles de tratar por otros métodos, debido a la fuerte actividad oxidante no discriminatoria de estas especies oxidantes; en estos procesos se logra la reacción con una amplia gama de compuestos orgánicos y se reconoce el uso de peróxido de hidrógeno y ozono a una dosis de 0.4 ppm H_2O_2 por 1 ppm de O_3 con adición de bicarbonato (WHO, 2006).

El uso de la fotocatálisis para destruir compuestos orgánicos se remonta a la década de los años 70 (Teichner, 2008), un importante campo de investigación implica la generación de ROS a partir de semiconductores foto-activos, proceso denominado fotocatálisis heterogénea, debido a que el catalizador se encuentra en diferente fase que el sustrato. Aunque varios semi-conductores se han estudiado, en muchas de las aplicaciones se emplea dióxido de titanio (TiO_2) generalmente bajo la formulación P-25, la cual está formada por la forma cristalina anatasa en un 70% y por rutilo en un 30%; este es un material de fácil disponibilidad pues se emplea en la fabricación de pinturas, alimentos y en la industria farmacéutica (Malato *et al.*, 2009).

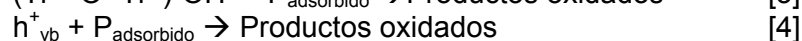
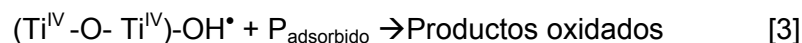
El proceso de fotocatálisis heterogénea sobre TiO_2 , se basa principalmente, en la iluminación del semiconductor con luz conteniendo mayor energía que su energía de banda prohibida (E_g anatasa TiO_2 : 3.2 eV vs electrodo estándar de hidrógeno[NHE]; rutilo TiO_2 : 3.0 eV) que corresponde a longitudes de onda del UV, esto hace posible la promoción de un electrón (e^-) desde la banda de Valencia (BV) hacia la banda de conducción (BC), dejando un hueco positivo (h^+) en la BV. Estos portadores de carga, el electrón y el hueco, pueden migrar hacia la superficie del semiconductor atrapándose sobre defectos de superficie ó reaccionando con un aceptor ó donador apropiado de electrones. Existe también la posibilidad que estos portadores de carga puedan recombinarse entre sí disipando el exceso de energía en forma de calor (Fujishima *et al.*, 2000; Thompson & Yates, 2006).

Los huecos pueden ser atrapados por grupos hidroxilo o moléculas de agua adsorbidos en la superficie, produciendo radicales $\bullet\text{OH}$ que posee un potencial oxidativo alto (~ 1.7 V

vs NHE) y son altamente reactivos con la materia orgánica y tóxicos para los microorganismos (Cho *et al.*, 2004):



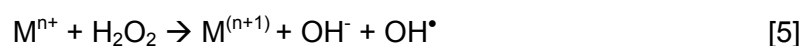
Así una molécula de contaminante previamente adsorbida sobre el TiO_2 puede ser fácilmente oxidada por un radical hidroxilo ó un hueco en la superficie de acuerdo con:



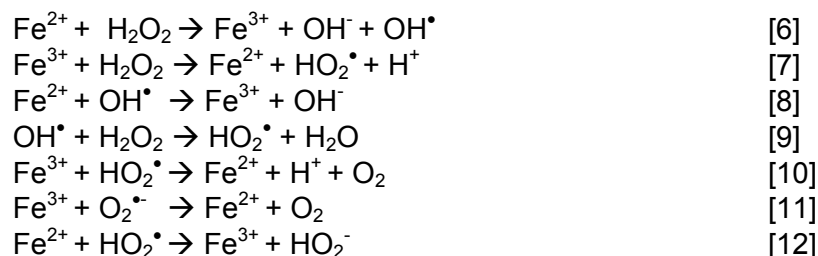
Actualmente se reconoce que los defectos por vacancias de oxígeno en la superficie del TiO_2 juegan un papel esencial en la adsorción de O_2 , las moléculas de oxígeno adsorbidas o los electrones foto-promovidos a la banca de conducción atrapados por estos defectos pueden producir radicales superóxido, los cuales en medio acuoso y ligeramente ácido tienden a dismutarse para generar peróxido de hidrógeno que actuará también como aceptor de electrones foto-excitados para finalmente producir radicales $\bullet\text{OH}$ (Thompson & Yates Jr, 2005).

Los primeros ensayos de desinfección empleando TiO_2 como catalizador se realizaron a escala in vitro en reactores tipo batch con simuladores solares y fuentes ultravioleta tomando como microorganismo modelo a *E. coli* K12, además se han ensayado configuraciones con lámparas inmersas y reactores coaxiales (Rincon *et al.*, 2005); los resultados obtenidos han llevado a un creciente interés por la potencialidad de estos procesos para desinfección; se ha probado su efectividad en la reducción de otras enterobacterias, de *Pseudomonas* sp., cocos y bacilos Gram positivos, levaduras, hongos, fagos MS2 y PL-1 y poliovirus (Blake *et al.*, 1999; Maness *et al.*, 1999; Rincon & Pulgarin, 2004; Lonnen *et al.*, 2005). No obstante, la inactivación de protozoos es efectiva solo contra sus trofozoitos pero no contra sus quistes; las esporas de bacilos son igualmente resistentes y no se ha reportado sus efectos sobre enterovirus. En aguas crudas con altos niveles de turbiedad, materia orgánica y otros compuestos químicos, la eficiencia de desinfección disminuye dependiendo en la mayoría de los casos de la complejidad de la matriz de agua a tratar (Rincón & Pulgarín, 2004; Castillo *et al.*, 2005; Malato *et al.*, 2009; Lydakis-Simantiris *et al.*, 2010).

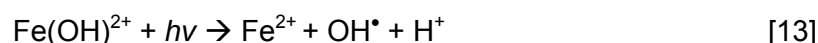
En la fotocatálisis homogénea el catalizador y el sustrato se encuentran en la misma fase. La reacción Fenton es un proceso que puede ocurrir en la oscuridad mediante el mecanismo:



Donde M es un metal de transición como el Manganese, el hierro o el cobre; en la ausencia de luz y de otros ligandos, el mecanismo más aceptado de descomposición del H₂O₂ en una solución ácida homogénea involucra la formación de hidroxiperoxil (HO₂[•]/O₂⁻) y radicales hidroxilo. Las reacciones tipo Fenton utilizan pequeñas cantidades de hierro ferroso (Fe²⁺) y requiere la adición de peróxido de hidrógeno para la generación de radicales hidroxilo. Estos radicales una vez se encuentran en solución atacan los compuestos orgánicos, para Fe²⁺, el esquema más aceptado de los procesos se describe a continuación:



En las reacciones denominadas foto-Fenton la aplicación de radiación ultravioleta y visible por debajo de los 580 nm (que equivale al 31 % de la radiación solar) incrementa la tasa de la reacción Fenton debido a la regeneración fotoquímica de hierro ferroso (Fe²⁺) por fotoreducción de acuacomplejos de iones férrico, los cuales permiten una generación adicional de radicales hidroxilo.



El ion ferroso regenerado reacciona con el peróxido generando un segundo radical hidroxilo y un ión férrico (reacción 6). El uso de esta tecnología tiene como ventaja que el hierro es abundante y no tóxico, el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y ambientalmente benigno, no se forman compuestos clorados y no existen limitaciones de transferencia de masa por tratarse de un sistema homogéneo. Presenta como inconveniente el requerimiento de pH ácidos para evitar la precipitación del hierro. Sin embargo, el empleo de otros compuestos como el ferrioxalato ha permitido llevar a cabo esta reacción en condiciones cercanas a la neutralidad (Cho *et al.*, 2004). Las reacciones Fotofenton han sido investigadas extensamente para la depuración de efluentes industriales, pero ha recibido escasa atención para la potabilización de agua.

3.2.5 Reactores fotocatalíticos

El diseño de reactores fotocatalíticos además de las consideraciones de distribución del flujo, el mezclado y la transferencia de masa involucra cierta complejidad por el uso de catalizadores suspendidos e inmovilizados y por la necesidad de contacto de estos con

los reactivos y las células, dado el tiempo de vida corto de los radicales formados. Los requerimientos de exposición del catalizador a la luz y las variaciones de esta en las diferentes latitudes y épocas del año dificulta un poco más la tarea de diseño y optimización. A esto se suma la dificultad de comparar reactores fotocatalíticos entre sí por sus diferencias geométricas a diferentes escalas y por los parámetros y la complejidad del sistema.

El parámetro Q_{uv} se ha empleado para interpretar los resultados de diferentes configuraciones de reactores solares, esta magnitud estima la energía UV acumulada en el foto-reactor por unidad de volumen tratada para períodos de tiempo durante el experimento, este parámetro se usa para normalizar la dosis de energía requerida en la reacción fotocatalítica para reducir cierta concentración bacteriana y ha permitido comparar configuraciones de reactores (ver tabla 2) (Blanco, 2005).

En el diseño de reactores que mejoren el aprovechamiento de la radiación, los resultados más promisorios tanto para descontaminación como para desinfección los ha mostrado el colector parabólico compuesto (CPC) (McLoughlin *et al.*, 2004); estos reactores surgieron en la década de los 70 para lograr concentrar la radiación solar en dispositivos estáticos (no siguen la trayectoria del sol) a un menor costo conservando propiedades de los colectores de placa plana como la recolección de radiación difusa y el uso de reactores estáticos (Malato *et al.*, 2004). Consisten de una serie de cilindros en vidrio ubicados sobre una superficie reflectante que tiene forma de involuta y que permite concentrar la radiación directa y la difusa que incide dentro del “ángulo de aceptación” (Blanco, 2005). El CPC ha demostrado su eficiencia para la reducción de poblaciones microbianas, puesto que esta ocurre en ausencia de catalizador, sin embargo, las células no son totalmente inactivadas, observándose recrecimiento en la oscuridad (Rincón & Pulgarín, 2004). El empleo de catalizadores inmovilizados o suspendidos incrementa la inactivación en varios órdenes de magnitud, la desinfección resulta de un efecto combinado entre la radiación solar y las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas.

Las concentraciones de catalizador empleadas para TiO_2 suspendido (en solución coloidal) generalmente oscilan en el rango de 0.1 a 1.0 g/L, el límite depende de la geometría del reactor y de las condiciones de trabajo en las cuales la mayor parte de las partículas deben estar iluminadas; cuando se usan altas concentraciones de catalizador, la radiación luego de viajar cierta distancia por la ruta óptica se ve afectada por la turbiedad y más específicamente por una alta tasa de “dispersión” o *scattering* que evita una iluminación homogénea en el seno de la suspensión, lo que disminuye drásticamente la velocidad del proceso. El TiO_2 inmovilizado presenta menores tasas de desinfección que el suspendido, entre los factores responsables de esta diferencia se puede incluir: El catalizador soportado disminuye la superficie específica del fotocatalizador accesible a la luz y a las bacterias; se aumenta la recombinación de los pares electrón/hueco generados; aumenta el recorrido de la luz hasta llegar a las capas de TiO_2 ; cambia la iluminación y difusión de O_2 a través de las capas de TiO_2 ; el catalizador inmovilizado está menos expuesto a fuerzas de fricción; la distancia media entre las bacterias y el TiO_2 aumenta, además se disminuye la posibilidad de ataque por radical hidroxilo por su tiempo de vida corto; decrece la penetración de partículas menores de 1 micra al interior

de las bacterias y no hay daños intracelulares; la geometría del reactor influye marcadamente en la distribución de la luz y su disponibilidad para excitar el catalizador.

Las aplicaciones en planta piloto han empleado el catalizador en suspensión e inmovilizado, sus principales diferencias incluyen el área superficial del catalizador, las tasas de reacción y el consumo de oxígeno. Dentro de las condiciones de operación se reporta que un incremento en el flujo permite alcanzar mayores eficiencias, asumiendo que es un requisito forzar la interacción entre los microorganismos y el catalizador.

Tabla 2. Reactores fotocatalíticos empleados en desinfección de agua

Reactor	Catalizador	Capacidad (L)	Volumen iluminado (L)	Superficie iluminada (m ²)	Tasa de recirculación (L min ⁻¹)	Q _{uv} (kJ L ⁻¹)	Reducción de <i>E. coli</i> (Log ₁₀ min ⁻¹)	Referencia
CPC	Suspendido (100 mg/L)	57-90	24	3.08	13-20.5	12	6 Log/ 1.5h	Rincon & Pulgarin, 2004
Cilíndrico con superficie reflectante en V	Soportado (94 mg/L)	1	0.4	0.057	2.8	7	4 Log/ 60 min	McLoughlin <i>et al.</i> , 2004b
Parabólico	Soportado (94 mg/L)	1	0.4	0.042	2.8	7	3.5 Log/ 60 min	McLoughlin <i>et al.</i> , 2004b
CPC	Soportado (94 mg/L)	1	0.4	0.057	2.8	~7.7	5 Log/ 60 min	McLoughlin <i>et al.</i> , 2004b
CPC	Suspendido (3 mg / L)	35	22.4	1.03	20	1.5	4 Log/ 30 min	McLoughlin <i>et al.</i> , 2004a
CPC	Suspendido (6 y 9 mg /L)	35	22.4	1.03	20	1.5 1.5	3.5 Log/ 25 min	McLoughlin, <i>et al.</i> , 2004a
CPC	Soportado (19.3 g /m ²)	11	5.4	0.125 0.25 0.5 0.75	22.5	2	3-3.5 Log/ 60 min	Fernández <i>et al.</i> , 2005
CPC	Soportado	14	2.27	0.41	2 .0	3.6	6 Log/ 90 min	Sichel <i>et al.</i> , 2007
CPC	Suspendido (tipo Fenton)	20	1.21	0.29	17.5	~10	No reporta	Moncayo <i>et al.</i> , 2009

No obstante, se ha determinado que la agitación no es crucial en ciertos casos puesto que reactores en batch de lecho empacado con TiO_2 soportado en películas delgadas han alcanzado reducciones de 4 Log *E. coli* en 30 minutos (Gelover *et al.*, 2006). La mayoría de trabajos en este campo usan muestras de agua contaminadas artificialmente, muy pocos trabajos se han realizado con aguas crudas provenientes de ríos o lagos (Wist *et al.*, 2002; Rincón & Pulgarín, 2004); los trabajos con desinfección solar se han llevado a cabo en condiciones de radiación UV artificial o con radiación solar típica de zonas estacionales. Dentro de los trabajos previos en este campo, figura un reactor de lecho fluidizado que empleó TiO_2 como catalizador en régimen continuo, y *E. coli* como microorganismo modelo, logrando alrededor de un 80% de desinfección en 60 minutos (Kabir *et al.*, 2003).

Trabajos recientes han reportado que el incremento en los flujos ocasiona lesiones mecánicas a las células, Fernández *et al.* (2005) encontraron que la acción de la fotólisis es más pronunciada a un flujo de 22 L min^{-1} que a 5 L min^{-1} ; Sichel *et al.* (2007) reportaron que para TiO_2 inmovilizado la eficiencia en la remoción tiende a disminuir inversamente al flujo entre 2 y 10 L min^{-1} , esto implicaría el uso de equipamiento con menor capacidad y por tanto mayor ahorro de energía. Fernández *et al.* (2005) evaluaron concentraciones de 0, 25, 20, 200 y 500 mg L^{-1} de TiO_2 en suspensión a una tasa de $22,5 \text{ L min}^{-1}$ y no encontraron diferencias en la remoción de *E. coli*. Se ha revisado el efecto del estrés osmótico en la supervivencia de *E. coli* en agua destilada en reactores CPC, los hallazgos indicaron que al recircular una suspensión bacteriana (10^4 UFC mL^{-1}) en oscuridad por más de 90 minutos se disminuyó el recuento bacteriano en 4 Log mL^{-1} a una tasa de 2 L/min, cuando la suspensión se realizó en solución salina la reducción fue solamente de 0.7 Log mL^{-1} (Sichel *et al.*, 2007).

Se han evaluado otras formulaciones de TiO_2 como el VP Aeroperl® P25/20 el cual es una versión granulada del Degussa P-25 con un tamaño de partícula mayor ($20 \mu\text{m}$) que permita su separación más fácilmente luego del proceso, sin embargo el peso específico del catalizador hace que se sedimente espontáneamente, reduciendo su eficiencia. La formulación Millenium PC-100 tiene casi el doble de área superficial del P-25 y posee un tamaño de partícula de $1,2 \mu\text{m}$ y tiene una eficiencia similar al P-25 por lo que puede ser una buena alternativa dependiendo de la facilidad con que pueda separarse del agua (Malato *et al.*, 2003).

3.2.6 Desinfección de agua con tecnologías solares

La tecnología SODIS (del término en inglés Solar Disinfection) es la primera aproximación para el uso de la radiación solar en procesos de desinfección, se emplean recipientes transparentes que al ser expuestos directamente al sol eliminan patógenos como resultado de la acción sinérgica de las longitudes de onda ultravioleta e infrarrojo, las cuales producen alteraciones en el material genético e incrementan la temperatura del agua, respectivamente. Esta tecnología es sostenible en comunidades pequeñas y tiene

alta aceptabilidad puesto que no tiene requerimientos de calidad de agua a tratar, no genera cambios químicos en el agua y posee un nivel de complejidad bajo; presenta como limitaciones que los volúmenes tratados son pequeños, entre 1 a 4 litros por día, y que no tiene efecto residual (WHO, s.f.). No existen reportes de estudios epidemiológicos para esta tecnología, pero se ha evaluado su efectividad con resultados satisfactorios contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, y bacteriófagos F2 y MS2 (Wegelin *et al.*, 1994; Sommer *et al.*, 1997; Oates *et al.*, 2003; McLoughlin *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004; Berney *et al.*, 2006). En Colombia se han realizado estudios para evaluar la eficiencia de este proceso para la remoción de *V. cholerae*, observando un efecto inverso entre una turbiedad de 5 NTU y el proceso de desinfección, encontrando una alta correlación entre la remoción de *V. cholerae* y la de coliformes termo-tolerantes (Solarte *et al.*, 1997).

Los métodos basados en fotocátalisis se caracterizan por la presencia de un catalizador, que es una sustancia química que incrementa la velocidad de reacción y reduce la energía de activación. Estos procesos se han desarrollado como una alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas con sustancias recalcitrantes, no obstante se ha demostrado su potencial para aplicación en procesos de desinfección, el uso de radiación solar para este fin ha incrementado en los últimos años (Herrmann, 2005; Rincon *et al.*, 2005). Las experiencias con desinfección solar por fotocátalisis solar en plantas piloto son relativamente recientes, una de las primeras fue llevada a cabo por Vidal *et al.* (1999) quienes emplearon reactores Colectores Parabólicos Compuestos con una superficie de 4,5 m² y un volumen total de 25 litros, demostraron la desactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* disminuyendo 4 Log₁₀ en 20 minutos, para una planta de 500 m² demostraron que la tecnología puede ser económicamente competitiva. Fernández *et al.* (2005) evaluaron TiO₂ suspendido e inmovilizado así como el efecto de la tasa de recirculación y la superficie irradiada, empleando a *E. coli* como indicador. Los estudios con aguas crudas o tratadas de zonas tropicales con una perspectiva de inactivación viral son incipientes.

Se ha realizado un apreciable número de trabajos a escala laboratorio empleando diferentes configuraciones y tamaños de reactores que incluyen reactores batch con volúmenes entre 10 y 50 mL, reactores de lámpara inmersa y reactores coaxiales; en otras circunstancias se ha fijado el TiO₂ sobre placas de vidrio, tubos de vidrio o sobre superficies plásticas. Como fuente de luz se emplean simuladores solares y generalmente a *E. coli* K-12 como microorganismo modelo. En 1985, Matsunaga y col. publicaron uno de los primeros reportes del efecto microbicida del TiO₂ cuando este se iluminaba con luz cercana a ultravioleta (UV) por 60 a 120 min. Este trabajo abrió las puertas a la aplicación de tecnología fotocatalítica en la desinfección de agua potable y para la remoción de bioaerosoles del aire en ambientes confinados. Trabajos posteriores trataron de identificar los mecanismos responsables de la desinfección. Matsunaga *et al.* (1988) propusieron que el efecto microbicida estaba relacionado con alteraciones en la Coenzima A. Saito *et al.* (1992) plantearon que el TiO₂ causa disrupción de la membrana y la pared celular por la liberación de K⁺ intracelular dándose paralelamente la muerte celular. Sunada *et al.* (1998) describieron el daño en la membrana externa de *E. coli* y encontraron que su endotoxina fue destruida bajo condiciones fotocatalíticas. Kikuchi *et al.* (1997) propusieron que la formación de H₂O₂ tiene un papel importante en el efecto bactericida a largo plazo.

Dunford *et al.* (1997) identificaron como otra de las causas de la muerte celular el efecto sobre el material genético de los microorganismos. Wamer *et al.* (1997) detectaron hidroxilación de bases pirimídicas en el DNA. Hidaka *et al.* (1997) demostraron la descomposición del DNA dentro de unas pocas horas después de la exposición a iluminación (Blake *et al.*, 1999). Huang *et al.* (2000) reportaron un incremento inmediato en la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas y la liberación posterior de grandes moléculas como la β -D-galactosidasa luego de 20 minutos de exposición, se propone que el daño a la pared celular tiene lugar en menos de 20 minutos y le sigue un daño progresivo de la membrana citoplasmática y los componentes intracelulares. El efecto bactericida también tiene lugar por pequeñas partículas de TiO_2 que penetran al interior celular. Existen numerosas referencias respecto al efecto del estrés oxidativo sobre los microorganismos, los mecanismos moleculares de resistencia se han estudiado extensamente, para el caso particular de la fotocatalisis, los efectos celulares de la interacción con los catalizadores como el dióxido de titanio se han estudiando solo recientemente (Koizumi & Taya, 2002; Nadochenko *et al.*, 2005; Gogniat *et al.*, 2006).

Estos trabajos han permitido identificar factores de relevancia en los procesos fotocatalíticos, como la interferencia de iones fosfato, sulfato, nitrato y bicarbonato; la materia orgánica presente en el agua también interfiere con el proceso compitiendo por los espacios activos del catalizador, presentándose menores eficiencias en la inactivación bacteriana a mayor concentración de materia orgánica presente (Rincón & Pulgarín, 2004). Otro de los fenómenos que se han reportado se relaciona con la denominada reactivación celular, en donde las poblaciones bacterianas expuestas a procesos de fotólisis (estrés por radiación UV) y fotocatalisis consiguen regenerarse por sus mecanismos de defensa al estrés oxidativo hasta alcanzar incluso la misma concentración celular existente al inicio del proceso (Rincón & Pulgarín, 2004). Adicionalmente se ha revisado el efecto del TiO_2 sobre virus, bacterias, hongos y protozoos en cultivos puros. En aguas naturales con altos niveles de turbiedad, materia orgánica y otros compuestos químicos, la eficiencia de desinfección disminuye dependiendo en la mayoría de los casos de la complejidad de la matriz de agua a tratar (Wist *et al.*, 2002; Rincón & Pulgarín, 2004). Uno de los aspectos en el cual la investigación se ha enfocado es en encontrar las condiciones óptimas para obtener los mejores resultados en este tipo de desinfección, empleando reacciones tipo Fenton y TiO_2 en suspensión y soportado (Rincón & Pulgarín, 2006). Se ha determinado que el incremento en la intensidad luminosa de 400 W/m^2 a 1000 W/m^2 aumenta 10 veces la inactivación de *E. coli*, la inactivación es más efectiva en períodos cortos con alta intensidad luminosa que viceversa, la relación entre la velocidad de reacción y la intensidad no siempre es lineal pero se observa proporcionalidad directa cuando se usa solo radiación UV (Sommer *et al.*, 1998).

4 METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones de la Sede Meléndez de la Universidad del Valle en el municipio de Santiago de Cali, corresponde a una investigación experimental cuantitativa desarrollada en dos etapas: escala laboratorio y escala piloto. En la escala laboratorio, a partir de ensayos exploratorios, se seleccionó un catalizador que fue evaluado en mayor detalle por ensayos confirmativos (*in vitro*); basados en la información obtenida se seleccionaron las condiciones de trabajo para la escala piloto. Las poblaciones empleadas en el análisis corresponden a las células bacterianas o a las partículas víricas de los microorganismos indicadores presentes en las aguas superficiales a evaluar. La unidad experimental es el volumen de agua cruda al que se le aplicaron los catalizadores y/o radiación. La variable de respuesta correspondió a la eliminación de partículas virales (bacteriófagos somáticos) o de células de *E. coli* en los volúmenes de agua tratados; en todos los casos las muestras tomadas fueron puntuales y se analizaron inmediatamente.

4.1 ENSAYOS A ESCALA LABORATORIO

Materiales y métodos

- **Agua** Se empleó agua destilada micro-filtrada estéril MilliQ® (Millipore) (18.2 MΩ.cm at 25 °C) en los ensayos exploratorios y confirmatorios; para algunos ensayos realizados con agua superficial se empleó agua del río Pance tomada a nivel del “Parque de Salud” en cantidad suficiente para realizar las experiencias a escala laboratorio, el agua se transportó inmediatamente y se mantuvo en refrigeración por debajo de los 5 grados Celsius y no se almacenó por más de dos días. Los resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica se presentan en el anexo 1.
- **Microorganismos** Se empleó como indicador viral al bacteriófago ΦX174 (DSMZ 13127) obtenido de la colección alemana de microorganismos típicos, como huésped se empleó una cepa denominada *E. coli* WG5 (DSMZ 4497); la crio-preservación, preparación de los stock de trabajo y análisis estándar se detallan en el anexo 2. La cuantificación en muestras inoculadas y en aguas crudas se realizó empleando la técnica de la doble capa de acuerdo con las especificaciones del método estándar de la ISO 10705-2 (2000), el cual consiste en realizar una mezcla de la muestra con un cultivo de la bacteria huésped en fase exponencial que son añadidos y mezclados en un tubo que contiene agar Scholtens semi-sólido para posteriormente ser vertido en la superficie de una placa petri que contiene una primera capa de agar Scholtens. Las siembras se realizaron por duplicado. Las placas se dejan solidificar y se incuban a 35±2 °C por 18 horas, los recuentos se expresan como Unidades Formadoras de Placa o PFU por mililitro. Cuando se analizaron aguas naturales se añadió a los medios ácido nalidíxico a una concentración de 250 µg mL⁻¹ en el agar semi-sólido para evitar proliferación de microorganismos indeseables.

- **Catalizadores** Para los procesos catalíticos heterogéneos se empleó dióxido de titanio Degusta P-25 con una superficie de 50 g m^{-2} , el cual está conformado por una relación anatasa:rutilo de 70:30; en las reacciones tipo Fenton se empleó sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fluka) a partir de una solución madre a 200 ppm filtrado a través de un cartucho Millipore® de 0.20 micras para su esterilización. Peróxido de hidrógeno al 35% v/v (Riedel-de Haen) se empleó a partir de una solución madre a 1000 ppm; las soluciones se prepararon en agua ultrapura estéril antes de cada experimento, todo el material se lavó con agua ultrapura y luego se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Las concentraciones de peróxido se estimaron mediante el sistema EM Quant® peroxide test (Merck) con rango de 0, 0.5, 2, 5, 10 y 25 mg L^{-1} .
- **Reactores** Se emplearon reactores tipo batch fabricados en vidrio tipo pirex® con una capacidad de 100 mL y un diámetro de 3.5 mL, con una tapa del mismo material.
- **Equipos** Para los ensayos fotocatalíticos se empleó un simulador solar SUNTEST de HANAU, que funciona con una lámpara de xenón de 1000 W de potencia, emitiendo un espectro compuesto por 0,5% de los fotones de longitud de onda de 300nm (UV-C) y alrededor del 7 % entre 300 y 400 nm (UV- B, A), el espectro emitido entre 400 y 800 nm es igual que el espectro solar.



Figura 1. Simulador solar SunTest y reactores batch empleados en los ensayos exploratorios

4.1.1 Ensayos exploratorios

Para los experimentos, los reactores estériles conteniendo un volumen de 80 mL de agua ultrapura, se mantuvieron con agitación constante en condiciones de oscuridad por 15 minutos previa inoculación del bacteriófago a concentraciones que oscilaron entre 10^5 y 10^6 PFU mL⁻¹, una vez adicionados los catalizadores se encendió inmediatamente el simulador solar. Durante los experimentos se emplearon diluciones decimales en solución salina peptonada tamponada (pH=7.0) bajo estrictas condiciones de asepsia en ambientes confinados, las siembras se realizaron por duplicado empleando el método de la doble capa.

Diseño experimental

Se realizaron una serie de ensayos exploratorios con 3 catalizadores cuyos niveles se presentan en la tabla 3, la variable de respuesta corresponde a la cantidad de unidades virales inactivadas por mililitro; cada proceso se ejecutó de manera independientemente y la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales fue al azar; los experimentos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura y radiación. Para la elaboración de los diseños y el análisis de los datos se empleó el software Minitab 14 ® ingresando los rangos especificados a continuación:

Tabla 3. Matriz de ensayos exploratorios

Experimento	Factores	Niveles
Catalizador 1	TiO ₂	0.5, 5.0, 50.0, 300.0 mg L ⁻¹
Catalizador 2	Hierro (II)	0.2-2.0 mg L ⁻¹
	H ₂ O ₂	0.5 – 20.0 mg L ⁻¹
Catalizador 3	TiO ₂	0.5 - 300.0 mg L ⁻¹
	Hierro (II)	0.1 - 2 mg L ⁻¹
	H ₂ O ₂	0.5 – 20 mg L ⁻¹

El modelo estadístico correspondió con un diseño completamente al azar, en el caso del catalizador 1 se realizaron tres repeticiones de cada experimento y los resultados se analizaron empleando comparaciones múltiples para identificar diferencias significativas. En el caso del catalizador 2 y 3 el diseño es completamente al azar con estructura factorial, se emplearon diseños fraccionados para identificar el efecto de las diferencias en las concentraciones para los rangos analizados, las diferentes combinaciones obtenidas a partir del diseño se presentan en las tablas 4 y 5, el tiempo de exposición se fijó en un valor de 15 minutos mediante ensayos previos en función de la energía recibida por el volumen de agua (KiloJulios L⁻¹) de acuerdo con la ecuación 17:

$$Q_{uv,n} = Q_{uv,n+1} + (t_n - t_{n-1}) UV_{g,n} (A_r/V_t) \quad [14]$$

Donde:

$Q_{uv,n}$: Radiación acumulada en KJ L^{-1}
 $t_n - t_{n-1}$: Diferencia de tiempo en segundos
 $UV_{g,n}$: Intensidad luminosa en W m^{-2}
 A_r : Área del reactor en m^2
 V_t : Volumen total de reactor en m^3

Para los reactores batch empleados en los ensayos: $A_r = 2,37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$; $V_t = 8,0 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3$; la intensidad luminosa se estableció empleando el software Proasis DAS-Win 3.55, en esta fase se descartaron dos de los catalizadores.

Tabla 4. Diseño experimental generado por el software Minitab 14® para el sistema luz+ $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$

Orden del experimento	Puntos centrales	Fe^{2+} (mg L^{-1})	H_2O_2 (mg L^{-1})
1	1	0,2	0,50
2	1	2,0	0,50
3	0	1,1	10,25
4	1	0,2	20,00
5	0	1,1	10,25
6	1	2,0	20,00

Tabla 5. Diseño experimental generado por el software Minitab 14® para el sistema luz+ $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$

Orden del experimento	Puntos centrales	TiO_2 (mg L^{-1})	Fe^{2+} (mg L^{-1})	H_2O_2 (mg L^{-1})
1	1	150,0	2,60	38,25
2	1	150,0	0,10	12,75
3	0	87,5	1,35	25,50
4	1	25,0	0,10	38,25
5	1	25,0	2,60	12,75
6	0	87,5	1,35	25,50

4.1.2 Ensayos confirmativos

A partir del catalizador seleccionado se evaluaron los siguientes factores como función de la reducción del bacteriófago ΦX174 contra el tiempo de exposición de acuerdo con la matriz presentada en la Tabla 6.; las curvas se realizaron por duplicado y para cada punto se muestran las barras de error para $\alpha=0.05$. Se realizaron ensayos en agua ultrapura y en agua natural, cuando se alcanzaron niveles no detectables de bacteriófagos luego del punto final de cada curva, se realizaron análisis de “recrecimiento” a las 24 horas y 48 horas.

Tabla 6. Matriz de ensayos reacciones tipo Fenton

Factores	Luz	Oscuridad
Hierro (II)	✓	✓
H ₂ O ₂	✓	✓
Luz	✓	
Luz+H ₂ O ₂	✓	✓
Fenton		✓
Foto-Fenton	✓	

4.2 ENSAYOS A ESCALA PILOTO

Materiales y métodos

- **Agua** Para cada curva se recolectó un volumen de agua superficial equivalente 40 litros de agua (dos veces la capacidad del reactor), se transportó y almacenó como se establece en el numeral 4.1.
- **Microorganismos** La cuantificación del bacteriófago se realizó mediante los métodos descritos en 4.1. En estos ensayos se empleó adicionalmente *E. coli* K-12 ATCC 23716 obtenida de la colección americana de cultivos típicos, en los ensayos el microorganismo se encontraba en fase estacionaria de crecimiento (ver Anexo 3); la cuantificación se realizó por recuento en placa superficial por duplicado sobre agar Plate count para los ensayos con agua ultrapura, y en agar Chromocult® (Merck) durante los ensayos con aguas naturales. Las cajas petri se incubaron a 44°C por 24 horas, las colonias sospechosas se confirmaron bioquímicamente. Se seleccionaron las diluciones con recuentos entre 30-300 colonias y los resultados se expresan en términos de Unidad Formadora de Colonia por mililitro o UFC mL⁻¹. Durante los experimentos se emplearon diluciones decimales en solución salina peptonada tamponada (pH=7.0) bajo estrictas condiciones de asepsia en ambientes confinados, las siembras se realizaron por duplicado tanto para virus como para bacterias.
- **Reactivos** Se emplearon los reactivos como se describe en el numeral 4.1.
- **Reactor** Se empleó un Colector Parabólico Compuesto (CPC) conformado por tubos de vidrio Pyrex® de 1.5 metros de largo con un radio de 1.6 cm, 3.2 cm de diámetro interno y 3.6 de diámetro externo y un área iluminada de 0.905 m²; el volumen iluminado equivale a 8 litros de agua; el reactor estaba conectado a un reservorio con una capacidad de 20 litros, la recirculación se realizó con una bomba centrífuga de 65W ajustando la velocidad a aproximadamente 10 L min⁻¹, el reactor se encontraba instalado con una inclinación de 3 grados, la cual corresponde a la latitud de la ciudad de Santiago de Cali (ver figura 2). Para los ensayos con la tecnología SODIS se emplearon recipientes en resina PET transparentes previamente lavados y desinfectados con capacidad de 1.5 litros sin superficie reflectiva.

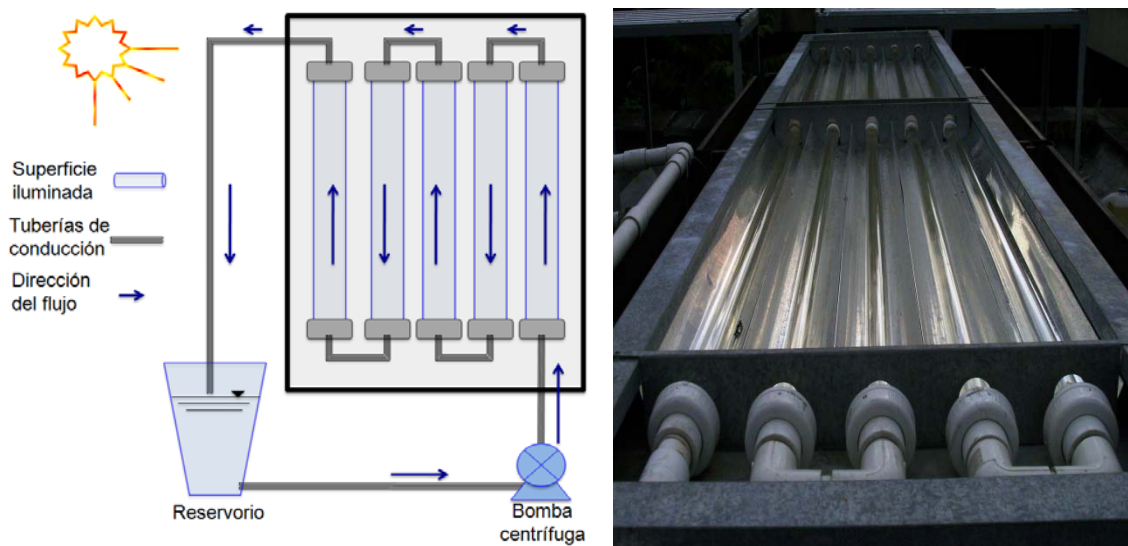


Figura 2. Esquema del montaje y detalle del reactor Colector Parabólico Compuesto

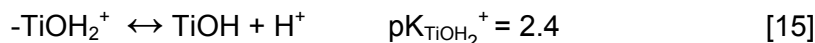
Se seleccionaron las concentraciones de catalizadores de los ensayos a escala laboratorio en función del nivel de remoción de microorganismos; cada uno de estos procesos se evaluó a escala piloto en el reactor CPC empleando la misma calidad de agua cruda, el proceso se repitió con dos muestras de agua tomadas en diferente fecha, estas muestras también se emplearán para la tecnología SODIS. Se tomaron muestras adicionales de los últimos puntos para almacenar en la oscuridad y evaluar la reparación en la oscuridad a las 24 y 48 horas para las células bacterianas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESCALA LABORATORIO: ENSAYOS EXPLORATORIOS

5.1.1 Catalizador 1. Ensayos con dióxido de titanio

En la ilustración 3 se presenta la reducción del bacteriófago Φ X174 en condiciones de oscuridad, se puede apreciar que no existe una reducción significativa en las concentraciones del virus para esta condición; teniendo en cuenta que las interacciones entre las moléculas del sustrato y la superficie del catalizador influyen fuertemente en las velocidades de reacción; la ausencia de adsorción podría explicarse debido a que para las condiciones de trabajo (pH inicial = 6.5) las cargas superficiales del virus y del TiO_2 son ligeramente negativas (ver ecuaciones 15 y 16), lo que ocasiona que la adsorción sobre la superficie del catalizador sea muy escasa. Esto coincide con lo encontrado por Koizumi y Taya (2002) quienes evaluaron la adsorción del bacteriófago MS2 (virus RNA) en la superficie del catalizador TiO_2 P25 Aerojil® (relación anatasa:rutilo 70:30, una densidad media de $3.8 \cdot 10^3 \text{ Kg m}^{-3}$) en su trabajo observaron que la adsorción del virus era relativamente baja, variando entre 4.2 y 5.4 $\text{Log}_{10} \text{ PFU mg}^{-1}$ de TiO_2 los cuales estaban fuertemente influenciados por el pH, siendo en su orden $10.0 < 3.0 < 7.0 < 8.0 < 5.0 < 6.0$.



Para el sistema luz+ TiO_2 , en la figura 3 se observa que las concentraciones equivalentes a 0.5 y 50.0 mg L^{-1} presentaron un decrecimiento con cierta tendencia lineal mientras que a 5 mg L^{-1} se observa claramente la presencia de un “lagging” u hombro durante los cinco primeros minutos, continuando con una tendencia lineal hasta alcanzar una inactivación de aproximadamente 2 $\text{Log}_{10} \text{ mL}^{-1}$. Existe una gran diferencia en las velocidades de inactivación durante los primeros minutos de las concentraciones mencionadas en comparación con 300 mg L^{-1} , a esta concentración se aprecia la desaparición de hombros y una velocidad de inactivación mucho mayor, esto puede explicarse debido a que el incremento en la concentración del catalizador pudo generar una mayor concentración de especies oxidantes, sin embargo, la curva muestra una tendencia asintótica luego de los 5 minutos, que podría estar relacionada con la pérdida de la eficiencia del efecto microbicida debido a procesos de competencia por las especies reactivas presentes por parte de los detritos liberados en el proceso; algunos autores han argumentado que la presencia de colas en las cinéticas foto-catalíticas podrían deberse a que los microorganismos podrían quedar inmersos en agregados del catalizador donde se dificulte la llegada de fotones (Benabbou *et al.*, 2007). Debe tenerse en cuenta que la literatura disponible de la inactivación de virus con TiO_2 es limitada a la fecha, por lo que con la información recolectada en estos ensayos exploratorios no es posible ahondar en la discusión de los mecanismos subyacentes.

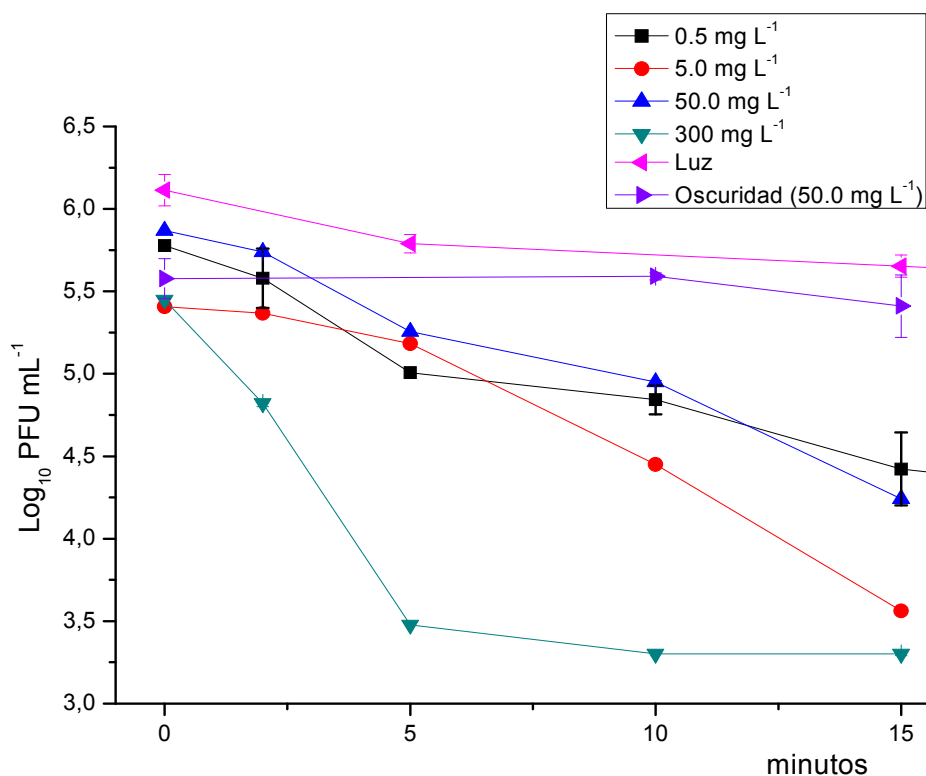


Figura 3. Inactivación del bacteriófago Φ X174 en un simulador solar para los sistemas luz, oscuridad/TiO₂, luz+TiO₂. pH inicial = 6.5

Koizumi y Taya (2002) encontraron tendencias lineales para las tasas de inactivación del bacteriófago MS2 con TiO₂ y aplicaron el modelo de Chick-Watson para determinar las constantes de las tasas aparentes de inactivación con coeficientes de correlación de 0.93 y 1.00 de acuerdo con:

$$N_{\text{final}}/N_{\text{inicial}} = e^{(-k't)} \quad [17]$$

Si bien, una de las grandes ventajas de este tipo de modelos es su simplicidad, es difícil generalizar su aplicación para comparar diferentes estudios debido a que la ley de Chick asume una cinética de primer orden, la cual no se cumple para la mayoría de los microorganismos; además que requiere introducir parámetros sin significado real para ajustar el modelo a los datos observados; otros modelos propuestos de mayor complejidad incluyen parámetros para describir las tendencias con hombros y colas en las curvas, así como las relaciones tiempo-concentración pero se centran en reportar resultados para bacterias, principalmente *E. coli*; muchos de estos modelos se ajustan bien a los datos experimentales pero aun persiste una gran brecha en los mecanismos de desinfección y en la aplicación de modelos mecanicistas más robustos (Dalrymple *et al.*, 2010).

La supervivencia de los microorganismos frente a la inactivación por TiO_2 dependerá de factores tales como la cepa empleada, su tendencia a aglomerarse, la geometría de los reactores y las clases de lámparas empleadas; dado que para llevar a cabo la inactivación, aquellos microorganismos con escasa adsorción en la superficie del catalizador serán más afectados por los radicales hidroxilos generados que por los huecos fotogenerados; esto ha sido confirmado para sistemas TiO_2/UV en la inactivación del bacteriófago MS2 (RNA) donde se encontró que la reducción se debía principalmente a los radicales hidroxilo presentes en la solución mientras que para la bacteria *E. coli* fue mayor el efecto de los radicales hidroxilo presentes en la superficie del catalizador, otras ROS tales como $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 tuvieron efecto letal en menor grado únicamente para la bacteria (Cho *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2011). Liga *et al.* (2011) observaron una inactivación similar usando TiO_2 dopado con plata y radiación UV, para una intensidad de 2.5 mW cm^{-2} encontraron que la radiación por sí sola no disminuía las poblaciones del bacteriófago MS2 (RNA) y que fueron los radicales hidroxilo presentes en la solución los principales responsables de la inactivación. Además reportan la ausencia de cambios en los títulos del virus en las 24 horas posteriores a la inactivación, sugiriendo que un efecto de inactivación adicional estaba ausente en el período en oscuridad (Liga *et al.*, 2011).

5.1.2 Catalizador 2. Ensayos foto-Fenton

Para determinar el efecto de la fotocatalisis homogénea empleando reacciones tipo Fenton en la reducción del bacteriófago ΦX174 (pH inicial=6.5), se realizó un diseño factorial 2^2 con dos puntos centrales, las corridas se ejecutaron aleatoriamente y son independientes entre ellas, en este tipo de diseños es importante verificar la ortogonalidad de los datos, por ello, a partir del análisis de varianza se determinó que la curvatura no fue significativa ($P>0.05$), es decir, todos los puntos se encontraban en el mismo plano (ver Anexo 4); los resultados se expresaron como la reducción de unidades logarítmicas al cabo de 15 minutos de radiación en un simulador solar. El análisis de varianza mostró que para las condiciones evaluadas la interacción entre los factores $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ era significativa ($P<0.05$) y que el incremento de sus concentraciones no necesariamente indicaba un incremento en la velocidad de reacción (efectos principales $P>>0.05$), sin embargo, debe tenerse en cuenta que este tipo de diseño es exploratorio y no permite hacer inferencias de la variación del comportamiento en períodos de tiempo mayores.

Para los rangos evaluados se observaron reducciones de las poblaciones del bacteriófago entre 2.3 y $3.5 \text{ Log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$ (ver figura 4), en ensayos previos se determinó que ni el peróxido ni el hierro por sí solos producen una reducción significativa de los recuentos, por lo que es probable que las especies generadas sean las responsables de la inactivación. Los valores de remoción más bajos se obtuvieron con las combinaciones más altas y más bajas de los factores $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ respectivamente; la combinación de los niveles de los factores que minimizó la respuesta fue $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2 0.5:2.0 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$ seguido del punto central $1.1:10.25 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$.

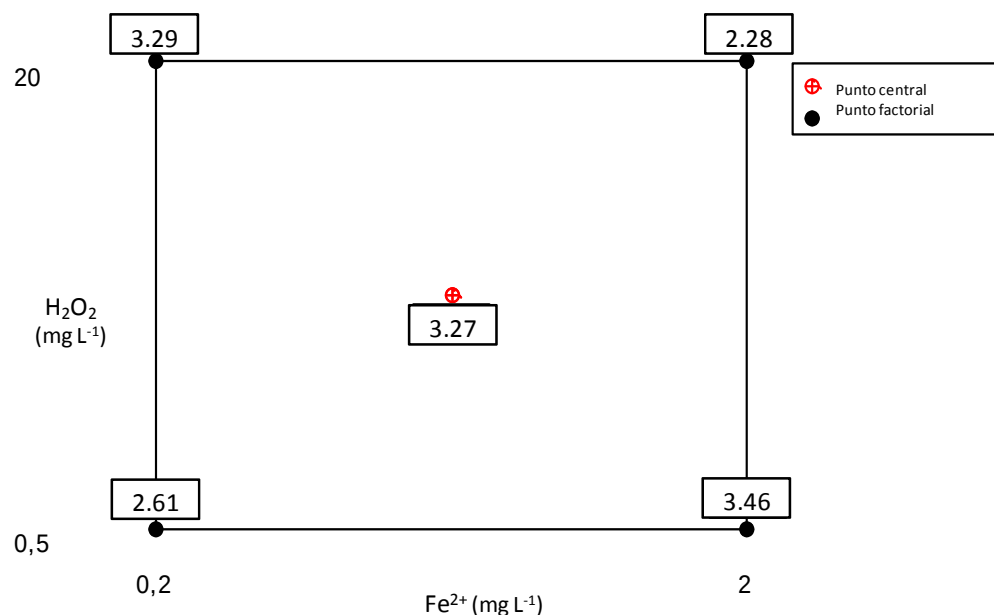


Figura 4. Datos medios para la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} para el sistema luz+ Fe^{2+} / H_2O_2 en un diseño factorial 2^2 con puntos centrales. Punto central Fe^{2+} : 1.1 mg L^{-1} ; H_2O_2 : 10.25 mg L^{-1} . Concentración inicial $\cong 5.5 \text{ Log}_{10}$ PFU mL^{-1} . Tiempo de irradiación: 15 min

Como se puede apreciar en la figura 5, se estableció una interacción entre las dosis empleadas de Fe^{2+} y H_2O_2 ; para las concentraciones bajas de hierro, el exceso de peróxido puede tener un efecto adverso, algunos autores al evaluar la influencia de la concentración del agente oxidante, han observado que a bajas concentraciones se reduce la tasa de reacción mientras que el exceso de H_2O_2 puede llevar a una competencia por los radicales hidroxilos reduciendo su cantidad en el sistema (reacción 18), además el peróxido puede empezar a descomponerse por la oxidación del contaminante mismo (Malato *et al.*, 2009). Otros aspectos relacionados con la influencia de las reacciones Fenton y tipo Fenton en la inactivación microbiana se discutirán con mayor detalle en un apartado posterior.



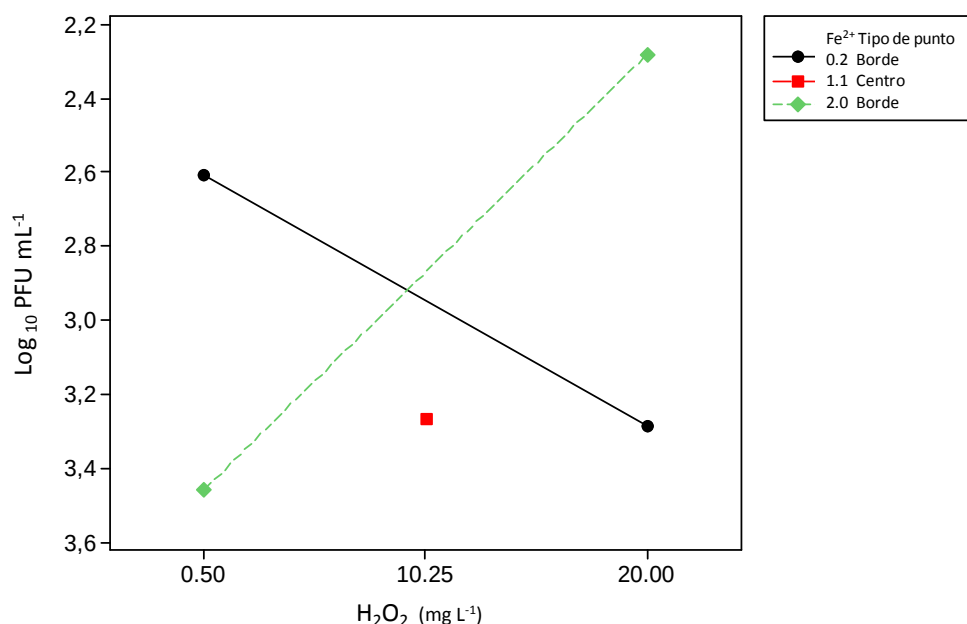


Figura 5. Datos medios para la interacciones de los factores Fe^{2+} y H_2O_2 (mg L^{-1}) en la reducción del bacteriófago ΦX174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} en un diseño factorial 2^2 con puntos centrales

5.1.3 Catalizador 3. Ensayos $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$

En la figura 6 se presenta el diseño factorial fraccionado con dos puntos centrales empleado para determinar el efecto del sistema luz+ $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, las diferencias entre las concentraciones evaluadas de hierro y de peróxido con referencia a los anteriores sistemas son producto del diseño factorial generado por el software Minitab 14®; las corridas experimentales se ejecutaron de manera aleatoria y son independientes entre ellas. De acuerdo con el análisis de varianza (ver anexo 5), la curvatura que indica la presencia de torceduras producto de la interacción entre los factores, se presentó como no significativa ($P > 0.05$), lo que indica que los puntos centrales se encuentran dentro del cubo; el efecto principal de todos los factores mostró significancia sobre la inactivación del bacteriófago ($P < 0.05$). Cho *et al.* (2005) encontraron que la presencia de Fe^{2+} en el sistema luz+ TiO_2 incrementó la generación de radicales hidroxilo libres en la masa de la suspensión (ver ecuación 6) y por ende la inactivación del bacteriófago MS2. La presencia de Fe^{2+} puede ayudar a prevenir la recombinación de cargas y eventualmente incrementar la formación de radicales hidroxilo libres o superficiales, este incremento de la inactivación se observó con el bacteriófago MS2 y no con *E. coli*

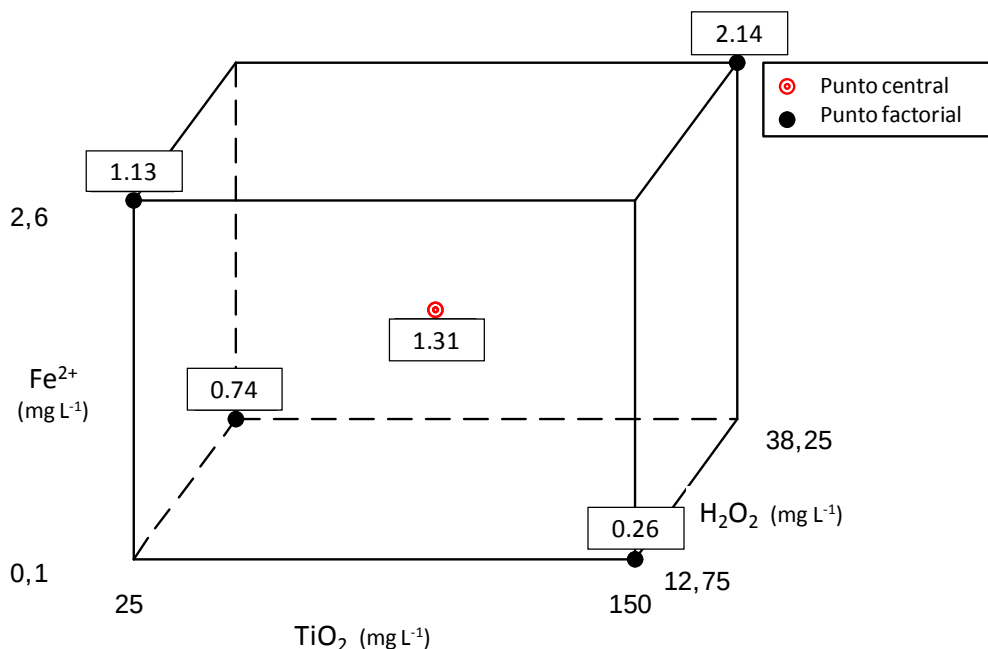


Figura 6. Datos medios para la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como Log_{10} PFU mL^{-1} de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} para la reacción Luz+TiO₂/Fe²⁺/H₂O₂ en agua ultrapura

Otros estudios han evaluado la interacción de este sistema para la mineralización de sustancias modelo y contaminantes como pesticidas; una aproximación similar a través de un análisis multivariado fue realizada por Nogueira *et al.* (2004); además se han reportado sinergias entre las reacciones heterogéneas y homogéneas en función del pH para este tipo de sistemas (Marugán *et al.*, 2006; Marugán *et al.*, 2007). La combinación de TiO₂ con la reacción foto-Fenton incrementa significativamente el número de reacciones catalíticas heterogéneas y homogéneas que pueden tener lugar en el reactor, desde una perspectiva de conjunto, la presencia de TiO₂ puede proveer una ruta para la reducción del hierro férrico complementando las reacciones dependientes de la luz, esto puede promover el ciclo Fenton y por ende la generación de radicales hidroxilo. Desde otro punto de vista, la presencia de hierro férrico puede mejorar la separación de cargas en la superficie del TiO₂ por captura de los electrones de la banda de conducción, estabilizando los huecos de la banda de valencia y reduciendo la tasa de recombinación. Consecuentemente, la combinación TiO₂/Fe²⁺ puede producir un efecto sinérgico, incrementando la actividad de los catalizadores, incluyendo los mecanismos de generación de radicales hidroxilo. Se ha reportado que el uso del sistema TiO₂/Fe²⁺, en total ausencia de peróxido, y se ha sugerido que el mecanismo responsable de la degradación está relacionado con el ciclo foto-químico hierro-TiO₂ propuesto por Mestánková *et al* (2004).

En la figura 7 se observa un efecto antagonista entre TiO₂ (25 mg L⁻¹) y el H₂O₂ puesto que al incrementar la concentración de peróxido se observa una reducción en la tasa de inactivación de los bacteriófagos; esta interacción negativa puede ser el resultado de la modificación de la superficie del TiO₂ por la reacción con el peróxido o mayor

recombinación de los radicales hidroxilo formados en los huecos de las bandas de valencia más que de los electrones de la banda de conducción, como se ha sugerido para sistemas $\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Xu, 2001). El H_2O_2 tiene dos funciones en la oxidación fotocatalítica, forma radicales hidroxilo y acepta electrones foto-generados de la banda de conducción del semiconductor promoviendo separación de cargas; además, como es un mejor aceptor de electrones que el Fe^{3+} , cuando se encuentra a altas concentraciones obstaculiza la reducción de Fe^{3+} por los electrones foto-generados del TiO_2 ; bajo estas circunstancias, la única vía para la reducción de Fe^{3+} es a través de los fotones solares (Marugán *et al.*, 2006).

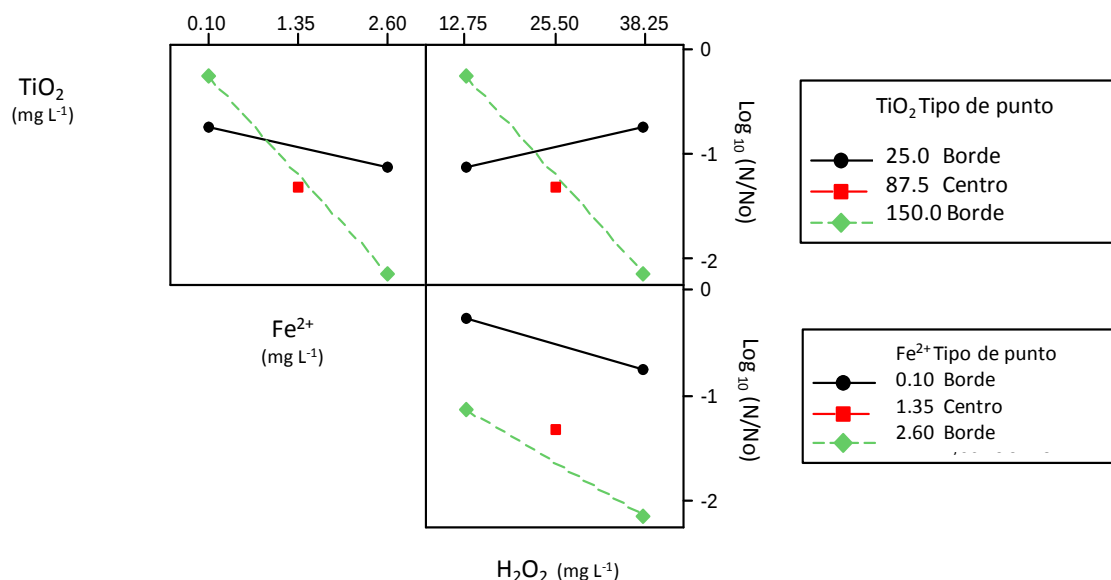


Figura 7. Datos medios para la interacción de los factores $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ en la reducción del bacteriófago ΦX174 expresados como $\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{N}_0)$ [PFU mL⁻¹] de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1}

5.2 ESCALA LABORATORIO: ENSAYOS CONFIRMATORIOS

En los ensayos exploratorios, bajo los rangos de concentración estudiados y las condiciones evaluadas, el sistema luz+ $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ mostró las mayores tasas de inactivación para el bacteriófago ΦX174 ($> 3 \text{ log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$) por lo que se procedió a analizar en mayor detalle este sistema en agua ultrapura y en agua cruda. En la figura 8 se observa que la inactivación del fago no obedece a reacciones con el ion ferroso ni a las concentraciones de peróxido empleadas, la presencia de iones Fe^{2+} en la solución en condiciones de oscuridad no genera radicales hidroxilo para producir un detrimento en la población viral, al parecer, tampoco la disociación del H_2O_2 en OH^- y $\text{OH}^\bullet$ en condiciones de oscuridad es capaz de generar reacciones oxidativas suficientes con la cápside vírica para disminuir notablemente la población.

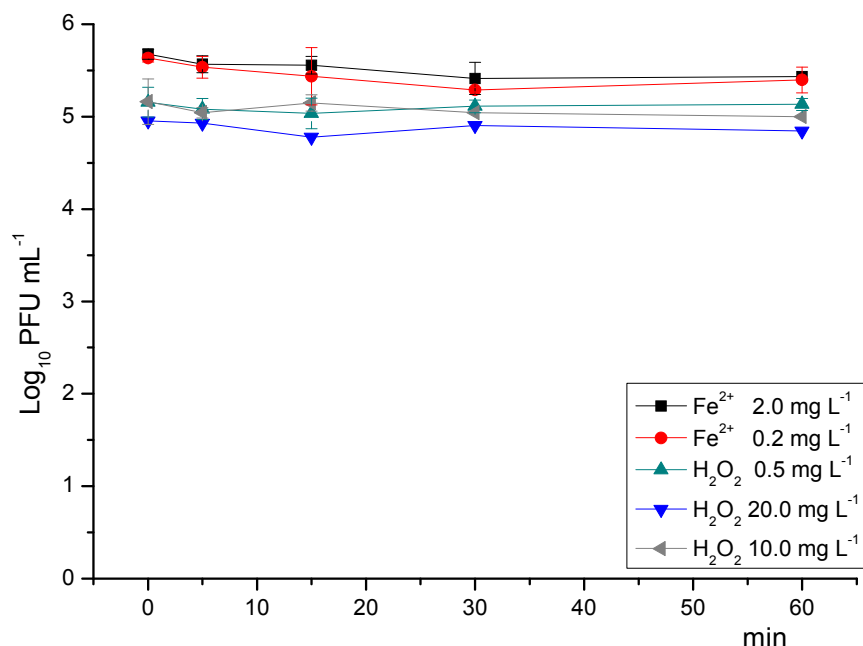


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de Fe^{2+} y H_2O_2 en la reducción del bacteriófago ΦX174 en agua ultrapura (Condiciones de oscuridad)

La reacción conjunta del sistema luz+ H_2O_2 puede generar fotólisis en microorganismos dependiendo de su sensibilidad al espectro empleado, la disociación del peróxido generará ROS adicionales que entran en contacto con la materia orgánica, sin embargo, la baja inactivación relacionada con este sistema (ver figura 9) puede deberse a que las moléculas de peróxido absorben fotones a longitudes menores a 250 nm, por lo que la escasa generación de radicales hidroxilo sumado a su efecto dependiente de la difusión, no logra una reducción significativa de la población viral. Se puede apreciar un ligero efecto de la luz en la reducción de las poblaciones virales, puesto que los virus al igual que la mayoría de los microorganismos son sensibles a la inactivación por el espectro UV, por lo que se emplea como tratamiento final en aguas potables; en aguas crudas y residuales estos efectos pueden verse aminorados debido a la diferencia en la composición, a la turbiedad y a la ecología propia de los microorganismos indicadores y de los patógenos. Sinton *et al.* (2002) evaluaron la inactivación por luz solar de varios microorganismos indicadores en mezclas de efluentes de plantas de tratamiento secundario/agua de río o aguas residuales domésticas/agua de río, y determinaron que los bacteriófagos ΦX174 fueron inactivados principalmente por longitudes de onda UV-B (<318 nm) con una contribución secundaria de longitudes UV-A (318-342 nm) mientras que los bacteriófagos F-RNA (MS2) fueron inactivados por un amplio rango de longitudes de onda.

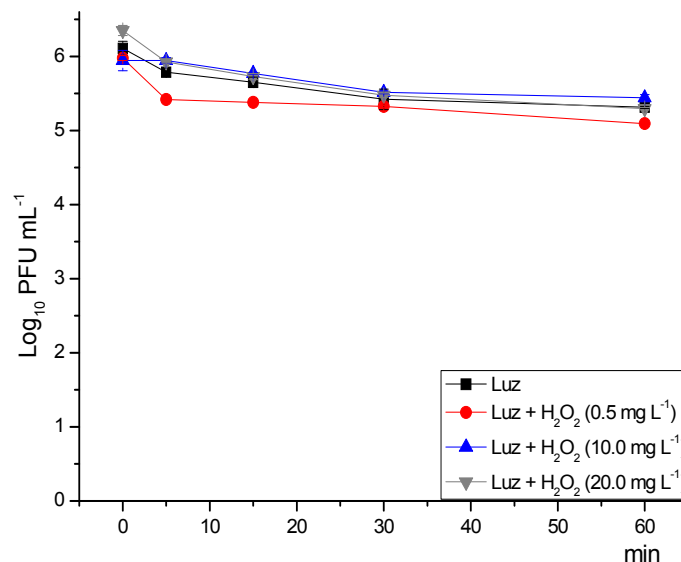


Figura 9. Efecto de la luz y la concentración de H₂O₂ en la reducción del bacteriófago ΦX174 en agua ultrapura (Energía total: 800 W m⁻²; Uv: 14 W m⁻²) pH inicial 6.0

En la figura 10 se presenta la inactivación del bacteriófago ΦX174 por reacciones tipo Fenton y tipo Foto-Fenton, se observa que para la reacción Fenton, las relaciones molares con concentraciones de peróxido de 0.5 mg L⁻¹ no logran aminorar las poblaciones del virus, en estos experimentos las concentraciones de peróxido se redujeron a valores menores de 0.5 mg L⁻¹ pero fueron detectadas trazas de peróxido hasta los 30 minutos; para la relación molar más alta de este sistema (Fe²⁺:H₂O₂ 2.0:20.0 mg L⁻¹) se presentó un residual de peróxido de 10 mg L⁻¹ hasta los 60 minutos. Se puede apreciar el incremento en la inactivación debido a la aplicación de reacciones tipo Foto-Fenton pues para la relación molar Fe²⁺:H₂O₂ 2.0:0.5 mg L⁻¹ se alcanzó una diferencia de 1.5 Log₁₀, de manera similar para la relación 2.0:20.0 se alcanzó una diferencia de 1 log₁₀. Como se mencionó en el apartado 3.2.4 la radiación permite la regeneración fotoquímica del hierro por fotoreducción de acuacomplejos de iones férrico, los cuales permiten una generación adicional de radicales hidroxilo de acuerdo con la ecuación 13.

Los bacteriófagos como virus bacterianos son entidades biológicas acelulares, esto implica que presentan un estadio fuera de su huésped en el cual el patógeno actúa como una partícula de material genético (DNA o RNA) empaquetado en proteína; la oxidación de estas proteínas será el primer paso en la inactivación viral. La interacción del H₂O₂ y OH[•] con las proteínas de la cápside viral estará en función del punto isoeléctrico de las partículas víricas y su composición proteica; Hawkins & Davies (1998) establecieron una selectividad en el ataque de los radicales hidroxilos en sitios específicos de aminoácidos y péptidos, a partir de ello se propuso que en presencia de oxígeno, la fragmentación de las proteínas expuestas a OH[•] era selectiva, particularmente a residuos de glicina y alanina. Gerrity *et al* (2008) observaron variaciones en la respuesta de 4 bacteriófagos a la inactivación fotocatalítica y establecieron una correlación con las concentraciones o densidades hipotéticas superficiales de residuos de alanina, glicina y prolina presentes en las cápsides virales.

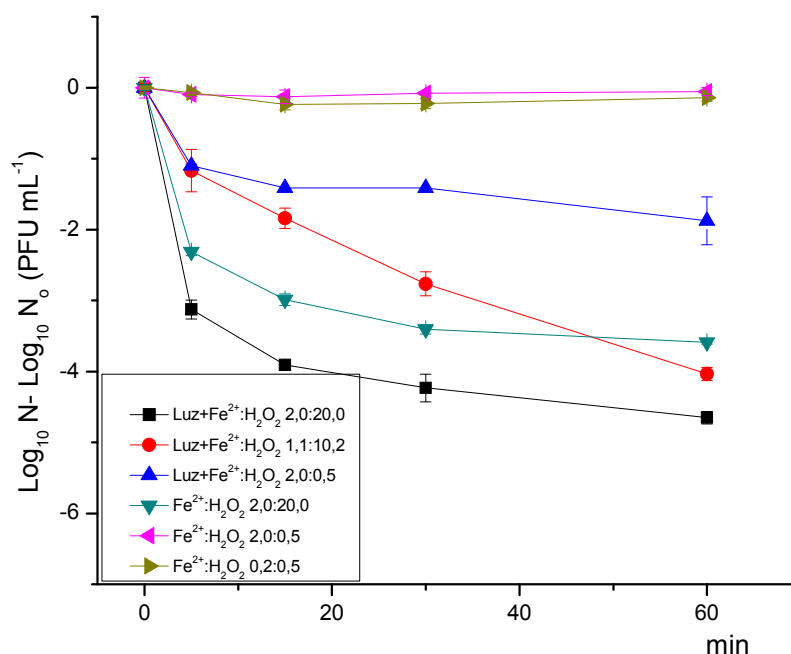


Figura 10. Comparación de los sistemas luz+Fe²⁺:H₂O₂ y Fe²⁺:H₂O₂ (mg L⁻¹) en la inactivación del bacteriófago ΦX174 en agua ultrapura

Kim *et al.* (2010) en la inactivación del bacteriófago MS2 con reacciones tipo Fenton pudieron establecer dos estadios en la cinética de desinfección; un primer estadio que ocurría en los primeros minutos donde se alcanzaba la mayor reducción de los virus, era dominado por el daño producido a partir de los radicales hidroxilo generados por la oxidación del Fe²⁺ en la superficie interna o externa de la cápside viral más que por aquellos generados en la masa de la solución. La reacción Fenton en la superficie puede ocurrir por la reacción del H₂O₂ con especies de Fe²⁺ que están acomplejadas a grupos funcionales específicos en la estructura de la cubierta viral como aminoácidos u otros compuestos. Dado que la cubierta viral del fago MS2 contiene prácticamente todos los aminoácidos y teniendo en cuenta que las constantes de estabilidad para el acomplejamiento del Fe²⁺ para los aminoácidos son similares, es factible que el hierro pueda interactuar con cualquiera de ellos.

La segunda etapa identificada que mostro una velocidad de inactivación mucho menor, fue bloqueada por la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), se estableció que la presencia de radicales superóxido no contribuyen directamente al daño en la cápside viral sino que intervienen en el ciclo de reducción del hierro férrico de acuerdo con la ecuación 11 (Kim *et al.*, 2010).

El sistema luz+Fe²⁺/H₂O₂ logró la mayor tasa de inactivación en comparación con los otros sistemas: luz, luz+H₂O₂, H₂O₂ y Fe²⁺/H₂O₂ tanto en agua ultrapura como en agua del río Pance; en la figura 11 se presenta el efecto del sistema luz+Fe²⁺/H₂O₂ a varias relaciones molares, para la relación luz+Fe²⁺:H₂O₂ 2.0:0.5 el peróxido se consumió rápidamente, mientras que para la relación 0.2:0.5 un residual de peróxido se detectó hasta el minuto

30; en el primer caso, el exceso de hierro favoreció la reacción tipo foto-Fenton durante los primeros minutos con el consumo de todo el peróxido y el efecto posterior observado estaría relacionado con el efecto de la radiación, mientras que para la segunda relación molar la segunda etapa podría presentar tanto efecto de la radiación como de la regeneración fotoquímica del hierro. La combinación luz+Fe²⁺:H₂O₂ 0.2:20.0 (mg L⁻¹) presentó un decrecimiento con tendencia lineal y un limitado consumo de peróxido con un residual de 10 mg L⁻¹ a los 60 minutos; este exceso de peróxido pudo generar reacciones competitivas con las especies oxidantes como se explicó en el apartado 5.1.2.

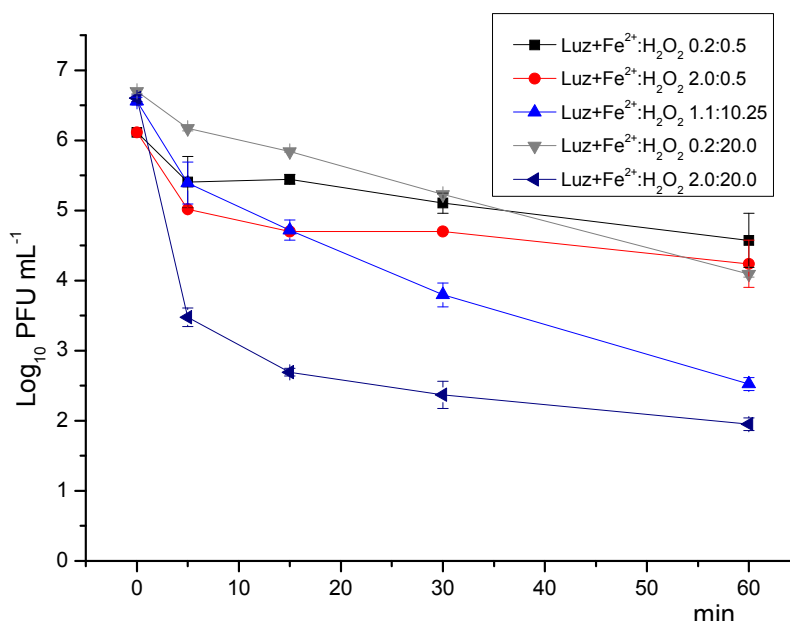


Figura 11. Efecto del sistema luz+Fe²⁺:H₂O₂ (mg L⁻¹) en la tasa de inactivación del bacteriófago ΦX174 en agua ultrapura en un simulador solar

Las relaciones molares que permitieron las mayores inactivaciones fueron en su orden luz+Fe²⁺:H₂O₂ 2.0:20.0 y 1.1:10.25, para la primera combinación el consumo de peróxido se redujo a la mitad en los 5 primeros minutos y a aproximadamente 2 mg L⁻¹ en los 30 minutos, se observó un residual de 0.5 mg L⁻¹ a los 60 minutos; para la segunda concentración molar en los primeros 5 minutos la concentración de peróxido estuvo en el rango 2.0-5.0 mg L⁻¹ y se observó una concentración residual en el rango 0.5-2.0 mg L⁻¹. En los primeros minutos la tasa de conversión de Fe²⁺ a Fe³⁺ es más rápida que la reacción inversa, es por ello que se observa un importante decrecimiento de la población viral, dicha inactivación ocurrirá principalmente por la reacción 6 ($k = 53-76 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), generando una alta concentración de radicales hidroxilo que inician la oxidación de las proteínas de la cápside, estas oxidaciones alterarán su configuración y por tanto alteran el proceso de reconocimiento con el huésped y la consecuente infección. Una segunda etapa en la cinética ocurre donde el hierro presente, luego de los primeros minutos de reacción, es principalmente Fe³⁺, durante esta etapa la regeneración de hierro ferroso a partir del hierro férrico por medio de las reacciones 7 y 10 ($k = 1-2 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $0.33-$

$2.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) se convierten en el paso limitante (Sagawe *et al.*, 2001); otras reacciones puede contribuir a la regeneración del hierro ferroso (reacción 11; $k=0.05\text{-}1.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

En la figura 12 se presenta la inactivación del bacteriófago ΦX174 en agua cruda del río Pance, se observa una escasa reducción por efecto de la luz esto podría deberse a efectos de auto-filtro de la radiación, que implica absorciones competitivas de fotones por otras especies químicas, usualmente contaminantes en aguas residuales o materia orgánica natural; esta competición por la absorbancia de luz puede permitir reacciones directas de fotólisis, las cuales generalmente tienen bajos rendimientos cuánticos (Blanco-Galvez *et al.*, 2007). Adicionalmente se observa que no existe diferencia en la inactivación por luz y luz+ H_2O_2 , lo que concuerda con lo observado en el agua ultrapura.

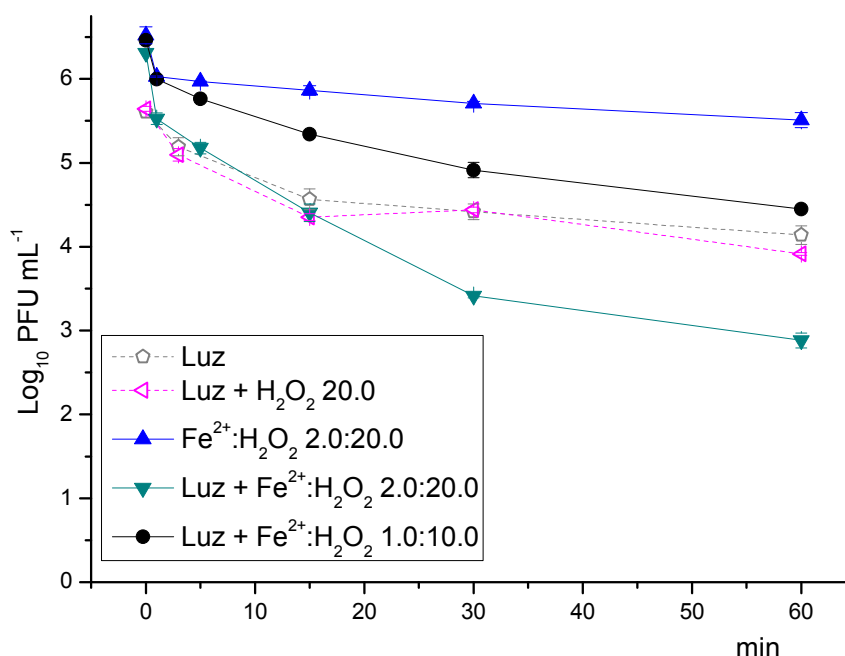


Figura 12. Efecto de los sistemas luz, luz+ H_2O_2 , $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ y luz+ $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ en la tasa de inactivación del bacteriófago ΦX174 en agua cruda del río Pance. pH inicial =6.9. Las concentraciones se expresan en mg L^{-1}

Respecto a las reacciones tipo Fenton y foto-Fenton, se observa una disminución en la inactivación viral en todas las relaciones molares empleadas en comparación con el agua ultrapura; la reacción tipo Fenton disminuyó notablemente su eficiencia puesto que la mayor parte de la inactivación ocurrió dentro del primer minuto con solo $0.5 \text{ Log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$ en comparación con los $3.5 \text{ Log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$ observados en el agua ultrapura, los niveles de peróxido se mantuvieron en 10 mg L^{-1} luego del primer minuto. Para la relación molar luz+ $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ 2.0:20.0 mg L^{-1} se aprecia una disminución de 1 Log_{10} entre el agua cruda y el agua ultrapura, se observó una disminución de la concentración de peróxido a 10 mg L^{-1} en los primeros minutos, la cual se mantuvo hasta el minuto 30 y un residual de aproximadamente 5 mg L^{-1} fue observado a los 60 minutos. Este mayor consumo de

peróxido en comparación con la reacción tipo Fenton estaría relacionado una regeneración del Fe^{2+} por efecto de la radiación de acuerdo con la ecuación 13.

Se observa adicionalmente en las figuras 11 y 12, una diferencia en la cinética entre el agua ultrapura y el agua cruda para las reacciones tipo foto-Fenton, la primera etapa descrita en el agua ultrapura para la relación molar luz+ Fe^{2+} : H_2O_2 2.0:20.0 mg L^{-1} alcanzó una reducción de aproximadamente 3 Log_{10} PFU mL^{-1} mientras en el agua cruda se redujo a 1 Log_{10} continuando con una reducción paulatina en el título de bacteriófagos, esta diferencia se debe al hecho de que la única materia orgánica disponible que es susceptible de oxidación son las partículas virales a diferencia del agua cruda donde la presencia de moléculas orgánicas e incluso de otros microorganismos, competirá por las especies reactivas formadas ($\text{OH}^\bullet$) en los primeros minutos; el hierro presente llegará a la mayoría de las partículas virales para iniciar su acomplejamiento con los aminoácidos de la cápside viral, por lo que el efecto subsecuente que se observó estará relacionado con las especies oxidantes formadas a partir de estos complejos, aunque se ha identificado como producto de las reacciones del H_2O_2 con quelatos orgánicos de Fe^{3+} a la especie ferril (potencial redox de 1 V vs NHE) como otra de las especies oxidantes presentes (Sun & Pignatello, 1992; Lipczynska-Kochany & Kochany, 2008).

Dado que las sales solubles de Fe^{2+} tienden a co-precipitarse en presencia de oxohidróxidos de Fe^{3+} si ambos iones se encuentran presentes a pH neutro, mientras que a pH ácidos (pH $\approx$ 3.0) las especies de Fe^{3+} se mantienen solubles, una alternativa para impedir la precipitación del hierro en procesos de tratamiento es la adición de compuestos que puedan quelar el hierro y que permitan trabajar a pH neutro; Kim *et al.*, (2010), adicionaron oxalato de sodio a un sistema tipo Fenton (oscuridad), y observaron la desaparición de la primera etapa de la cinética de inactivación donde se observaba un acelerado decaimiento de la población del fago MS2, pero no detuvo la subsiguiente inactivación, donde el Fe^{3+} es la especie dominante, esto es debido a que el oxalato forma rápidamente complejos (reacción 19) y estos reaccionan más rápidamente con el peróxido (reacción 20) que la reacción sin el hierro acomplejado; el decrecimiento en la inactivación debida a este agente quelante puede ser debida al incremento en el consumo de Fe^{2+} para producir oxidantes en el seno de la solución. En su trabajo, la adición de ácidos húmicos, como sustancia modelo de la materia orgánica naturalmente presente en el agua, resultó en un decrecimiento de la inactivación por el sistema Fenton que puede atribuirse a la formación de complejos entre Fe^{2+} y grupos carboxilo de ácidos húmicos o a procesos de captación de especies oxidantes por estos ácidos, puesto que al ser los principales componentes de la materia orgánica, contienen unidades alifáticas y aromáticas con varios grupos funcionales incluyendo ácidos carboxílicos y grupos quinona (Kim *et al.*, 2010).



5.3 ESCALA PILOTO: ENSAYOS CPC Y SODIS

En la figura 13 se observa el efecto de la recirculación en la oscuridad y de los sistemas luz+H₂O₂ y luz+Fe²⁺:H₂O₂ vs. tiempo en un reactor CPC; se observa que no existe un detrimento de la población del bacteriófago Φ X174 por efecto de estrés mecánico producto de la recirculación en la oscuridad cuando se emplea una velocidad de 10 L min⁻¹; el sistema luz+H₂O₂ tampoco mostró un efecto adverso en la población, se detectó para esta condición un residual de peróxido de aproximadamente 10 mg L⁻¹ luego de 6 horas de exposición, lo que concuerda con lo reportado en el apartado anterior. Para el sistema luz+Fe²⁺:H₂O₂ se observó una reducción por debajo del nivel de detección a los 50 minutos de tratamiento, ensayos posteriores de viabilidad realizados a las 24 y 48 horas no mostraron crecimiento alguno.

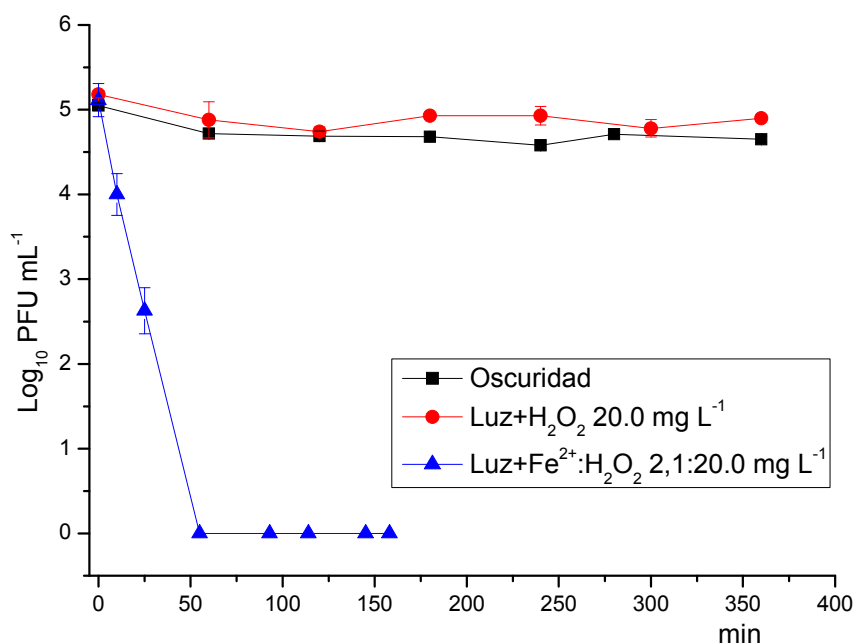


Figura 13. Efecto de los sistemas luz+H₂O₂ y luz+Fe²⁺:H₂O₂ en la inactivación del bacteriófago Φ X174 en un reactor CPC con agua cruda del río Pance. pH inicial=6.3

En la figura 14 se presenta la comparación en la remoción del bacteriófago Φ X174 entre el reactor CPC, donde se adicionó Fe²⁺:H₂O₂ a diferentes relaciones molares y el sistema SODIS donde no hubo adición de reactivos. A bajas concentraciones de peróxido el sistema luz+Fe²⁺:H₂O₂ en el reactor CPC solo logró disminuir aproximadamente 1 Log₁₀ PFU mL⁻¹. De manera similar a lo observado anteriormente en los reactores batch, la dosis de peróxido se consumió rápidamente durante los primeros minutos, reduciendo la eficiencia de la reacción tipo foto-Fenton; la inactivación posterior puede ser coadyuvada por la presencia de materia orgánica que acomplejó el hierro como se mencionó en el apartado 5.2. Los mejores resultados en la inactivación se observan con las mayores concentraciones de peróxido, donde el exceso del agente oxidante permitió una continua regeneración del hierro; al comparar la inactivación, a diferencia de lo observado en los reactores tipo batch, no se observan diferencias significativas en la inactivación

empleando 0.4 y 20.0 mg L⁻¹ de H₂O₂ para las mismas dosis de radiación recibidas por el CPC. La tecnología SODIS no produjo una disminución de las poblaciones del bacteriófago, la escasa reducción pudo deberse a que la temperatura nunca alcanzó los 50°C aunque se registraron temperaturas de 40°C entre la primera y segunda hora del tratamiento de un total de 4 horas de exposición.

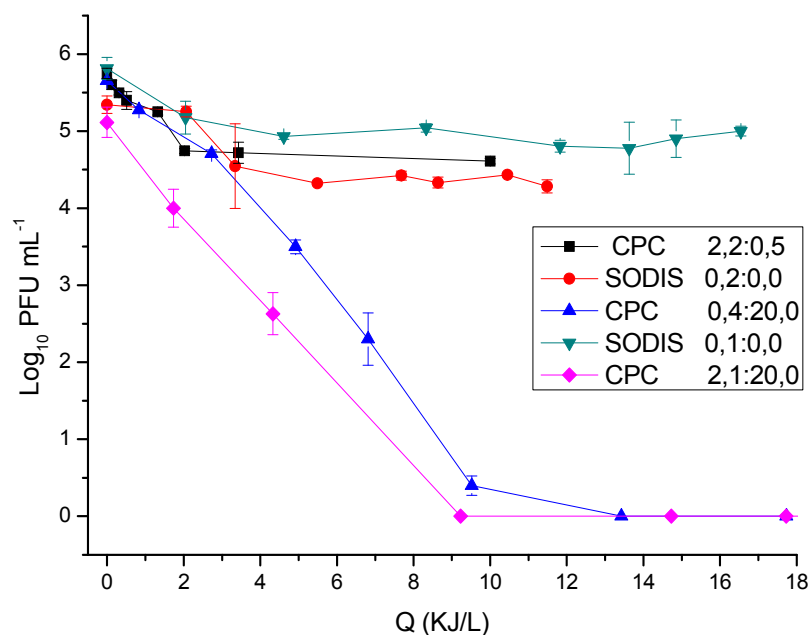


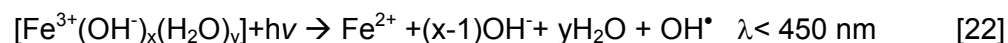
Figura 14. Inactivación del bacteriófago Φ X174 en agua cruda del río Pance a pH natural en un reactor CPC vs. la tecnología SODIS. Las concentraciones se expresan como la relación $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ (mg L⁻¹) para el reactor CPC, los valores de hierro para SODIS corresponden a la concentración de hierro total naturalmente presente en el agua cruda expresados en mg L⁻¹ y en ningún caso se adicionó H₂O₂

La inactivación natural de patógenos en aguas es un proceso dependiente de la luz, tanto la desinfección basada en radiación UV como en lagunas de estabilización de aguas residuales, involucra múltiples efectos dependiendo de la susceptibilidad al espectro de luz empleado; numerosos reportes han intentado explicar la reducción de microorganismos indicadores en lagunas mediante el daño sufrido por el DNA como consecuencia del componente ultravioleta de la radiación solar y la respuesta intrínseca de los microorganismos a las alteraciones de su material genético (Sinton *et al.*, 1999). Curtis *et al.* (1992) han tenido en cuenta procesos simultáneos de atenuación de la radiación UV por los gases de la atmósfera, la turbiedad y profundidad de los sistemas de tratamiento, proponiendo como mecanismo alternativo a la foto-oxidación directa, la foto-oxidación endógena y exógena, es decir, aquella producida por especies oxidantes presentes al interior microbiano o en la masa de agua respectivamente, los autores en un trabajo posterior encontraron evidencia de estos dos mecanismos en lagunas de estabilización y empleando secuestrantes (scavengers) establecieron que los ROS más importantes que contribuyen a la foto-inactivación de coliformes fecales fueron H₂O₂ y ¹O₂.

Kohn & Nelson (2007) evaluaron la inactivación solar del bacteriófago MS2 en un simulador con haz colimado empleando muestras de efluentes de una laguna de estabilización y una matriz con ácidos húmicos como sensibilizadores (compuestos que absorben luz); sus resultados indicaron que la foto-oxidación exógena juega un rol más importante que la radiación UV-B debido a la rápida atenuación de esta por longitudes de onda mayores, por el color y la turbiedad del agua. Además reportaron diferencias en la concentración de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) cerca a los sensibilizadores contra la masa de la suspensión que contenía ácidos húmicos; determinaron que concentraciones de ROS se encontraban presentes en bajas concentraciones en estado-estable en efluentes de la lagunas de estabilización y que estas especies incrementan acorde con la concentración de materia orgánica natural presente.

Los virus desprovistos de cubierta pueden ser inactivados por $^1\text{O}_2$ producido en suspensiones acuosas de foto-sensibilizadores iluminados con UV-A, el bacteriófago MS2 es más susceptible que los fagos DNA de cadena doble (PRD1 el cual tiene una membrana lipídica interna y el T7 que carece totalmente de lípidos), teniendo tasas de inactivación importantes sólo con UV-A. La transferencia de $^1\text{O}_2$ a las cápsides genera modificaciones oxidativas de sus proteínas con menores daños en el DNA y en los lípidos. Análisis moleculares sugieren que el oxígeno singlete induce entrecruzamiento de las estructuras secundarias de las proteínas de la cápside, impidiendo consecuentemente su habilidad de unirse a los receptores de superficie del huésped bacteriano (Badireddy *et al.*, 2007; Hotze *et al.*, 2009).

Los cromóforos biológicos pueden actuar como sensibilizadores y pueden incrementar el daño producido por la radiación UV-cercana; el aminoácido triptófano ha sido identificado como uno de ellos y se ha demostrado que la fotólisis de una suspensión del bacteriófago T7 generó H_2O_2 y este posteriormente produjo $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Craggs *et al.*, 1994). En el sistema Foto-Fenton las principales especies que absorben luz son complejos del ión férrico, los cuales pueden regenerar Fe^{2+} por transferencias foto-inducidas metal-ligando, especialmente la fotólisis de acuacomplejos de hierro férrico, los cuales además de reducir hierro ferroso, generan radicales hidroxilo adicionales por las reacciones 21 y 22: (Lapertot *et al.*, 2006)



Los radicales orgánicos generados por estos acuacomplejos pueden seguidamente ser mineralizados en la presencia de oxígeno molecular disuelto, los peróxidos orgánicos generados pueden posteriormente reaccionar con hierro ferroso y en la presencia de O_2 se puede regenerar el H_2O_2 y por ende contribuir a la reducción de agentes oxidantes. Dependiendo del pH, el número de radicales hidroxilo en los complejos, la absorción de luz y los rendimientos cuánticos pueden variar (Pignatello, 1992). En ambientes naturales el efecto indirecto de la foto-oxidación se encuentra entre los factores más importantes en la inactivación microbiana en aguas superficiales (Springthorpe *et al.*, 1993).

En la figura 15 se presenta el efecto de los tratamientos en CPC y SODIS para *E. coli* K-12, la cual fue evaluada simultáneamente con el bacteriófago; se observa un efecto más pronunciado de la radiación solar en la tasa de supervivencia de este microorganismo, puesto que se alcanzó la total inactivación en el período evaluado, los ensayos de reparación en la oscuridad mostraron recrecimiento en todos los casos para la tecnología SODIS. En los ensayos de recrecimiento en oscuridad para el sistema luz+Fe²⁺/H₂O₂ no se observó recrecimiento cuando se aplicaron dosis de 20 mg L⁻¹ de H₂O₂ por más de 4 horas. El recrecimiento de *E. coli* en el sistema SODIS difiere del trabajo publicado por Berney *et al.* (2006) en donde empleando celdas de cuarzo con capacidad de 30 mL, se alcanzó la inactivación total de células de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* expuestas a radiación solar, no se observó recrecimiento luego de un periodo de almacenamiento por 48 horas en oscuridad y un detallado estudio de viabilidad de microorganismos incluyendo el potencial de membrana, la presencia de ATP y la permeabilidad de membrana, mostró que para sus condiciones la radiación fue suficiente para alcanzar la total inactivación; la discrepancia podría correlacionarse con las diferencias en la composición de las aguas tratadas, por la presencia de iones inorgánicos o de mayores concentraciones de ROS naturalmente presentes; en su trabajo encontraron que *S. typhimurium* fue más resistente a la inactivación, para *E. coli* y *S. flexneri* se observó sensibilidad por encima de los 45°C y solo de 40°C para el *Vibrio cholerae*.

Davies-Colley *et al.* (1999) reportaron la ocurrencia de daño directo a los componentes celulares de *E. coli* por radiación solar en la región UV y foto-inactivación endógena y exógena la cual puede ser iniciada tanto por UV como por espectro visible; en presencia de oxígeno, la excitación de sensibilizadores que transfieren energía a otras moléculas permite la formación de ROS, los cuales pueden dañar los componentes celulares. En la foto-inactivación endógena, los sensibilizadores implican moléculas localizadas dentro de los microorganismos como las flavinas, mientras que en la exógena los sensibilizadores son moléculas localizadas al exterior celular como sustancias húmicas y fúlvicas. (Curtis *et al.*, 1992; Davies-Colley *et al.*, 1999). La luz visible a 556 nm se ha encontrado que contribuye a la foto-inactivación de fagos RNA pero presenta la desventaja de tener una baja penetración en la columna de agua (Sinton *et al.*, 2002). Comparado con el OH[•] y O₂^{•-}, el H₂O₂ presenta un menor efecto en *E. coli* debido a la presencia y expresión de sistemas contra el estrés oxidativo como la presencia de enzimas catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), algunos autores han postulado que el peróxido foto-generado puede entrar en las células y ser activado por vía Fenton para incrementar el daño celular (Blake *et al.*, 1999).

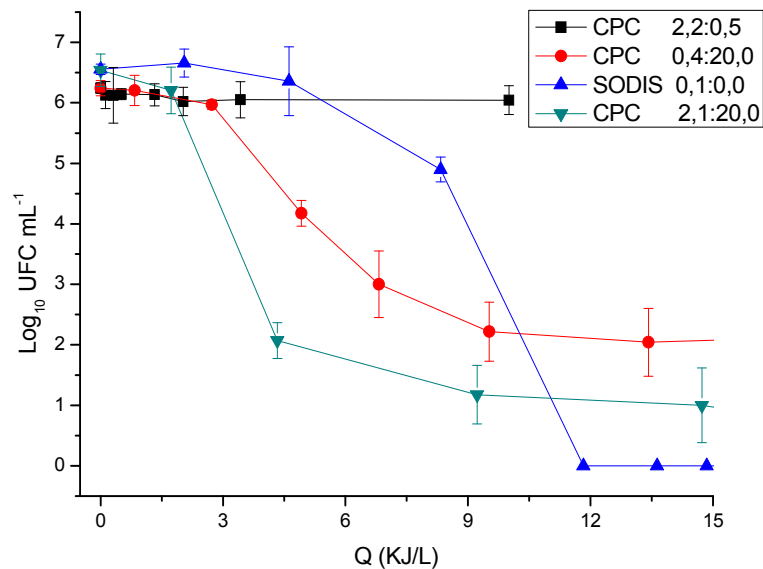


Figura 15. Inactivación de *E. coli* K-12 en agua cruda del río Pance a pH natural en un reactor CPC vs. la tecnología SODIS. Las concentraciones se expresan como la relación $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ (mg L^{-1}) para el reactor CPC, el valor de hierro para SODIS corresponde con la concentración de hierro total naturalmente presente en el agua cruda en mg L^{-1} y en ningún caso se adicionó H_2O_2

El efecto de las reacciones tipo Fenton en células bacterianas fue estudiado por Diao *et al.* (2004), quienes usaron agua residual artificial para analizar el efecto de la reacción Fenton a pH 4 en la inactivación de *E. coli*, contrariamente a lo esperado no se observó una lisis celular masiva al emplear microscopía electrónica de barrido, sino que la reacción produjo un incremento del daño de la membrana celular y pérdida del material intracelular sin desintegración de la pared bacteriana (Diao *et al.*, 2004); la actividad biológica de núcleos Fe-S y la aplicación de reacciones Fenton para desinfección de lodos han sido descritos previamente (Kakhlon & Cabantchik, 2002; Kiley & Beinert, 2003; Debowski & Krzemieniewski, 2007; Cengiz *et al.*, 2009).

Recientemente, Moncayo-Lasso *et al.* (2008) evaluaron la inactivación de *E. coli* en un CPC junto con la tasa de oxidación de la materia orgánica en agua de un efluente de un filtro lento de arena mediante el sistema luz+ $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sin ajustar el pH, al emplear 0.6 mg L^{-1} de Fe^{3+} y 10 mg L^{-1} de H_2O_2 redujeron más de 6 Log₁₀ en 4 horas; aunque en este estudio el agua tratada presentó turbiedades muy bajas en comparación con las aguas crudas evaluadas en este estudio, los resultados muestran que las tasas de inactivación son concordantes y en el estudio se asume que la inactivación está muy relacionada con la química del Fe^{3+} .

Los procesos de respuesta a estrés oxidativo han sido bien caracterizados en bacterias y principalmente en *E. coli* como microorganismo modelo; se ha establecido que la

formación de oxidantes como anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno ocurre por la reducción incompleta del oxígeno hasta agua en la respiración celular bacteriana, esto ocurre por exposición a radiación, por la presencia de exceso de metales u otros factores. $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 adicionalmente se forman cuando el oxígeno molecular oxida por casualidad enzimas redox que están diseñadas para la transferencia de electrones a otros sustratos; en condiciones *in vitro* estos radicales se forman principalmente por la auto-oxidación de deshidrogenasas de la cadena respiratoria que emplean como co-factores a flavinas reducidas que son quienes transfieren electrones al oxígeno (Storz *et al.*, 1990).

Dado que la única ROS que puede dañar directamente las biomoléculas es el radical hidroxilo, la generación de estos radicales por reacciones tipo Fenton intracelulares posee gran impacto en los procesos de estrés oxidativo; aunque el efecto de este radical se encuentre limitado por su tasa de difusión, el daño incluye desde carbonilación de proteínas y peroxidación de membranas hasta efectos más drásticos como lesiones del DNA que pueden ser mutagénicas o letales (Imlay, 2003). El hierro que cataliza estas reacciones intracelulares es hierro libre, es decir, que no se encuentra incorporado a enzima alguna ni a proteínas almacenadoras, sino que presumiblemente está ligado a metabolitos o a la superficie de biomoléculas. La respuesta celular para combatir el estrés oxidativo por estas reacciones involucra la expresión de una variedad de enzimas como las catalasas, las superóxido dismutasas y las peroxidasas que permiten inactivar H_2O_2 directamente o sus productos; también se mantienen bajas las concentraciones de hierro ferroso libre en el citoplasma mediante las ferritinas (proteínas almacenadoras); recientemente se ha establecido que las proteínas denominadas Dps (DNA-binding proteins) y que son expresadas en células estresadas por inanición o por oxidación, son centros de anclaje y de almacenamiento de Fe^{2+} , donde su oxidación se lleva a cabo más efectivamente con H_2O_2 en comparación con la ferritina donde se emplea oxígeno molecular, el uso de H_2O_2 como un oxidante fisiológico del hierro reduce significativamente la producción de radicales hidroxilo (Zhao *et al.*, 2003; Bellapadrona *et al.*, 2010).

El efecto de la aplicación del reactivo Fenton en cultivos bacterianos *in vitro* implica que la pérdida de viabilidad es el resultado de la liberación de componentes intracelulares de *E. coli* sin daño aparente en la pared celular, dado que los mecanismos de homeóstasis de hierro son complejos se han propuesto algunas aproximaciones a los procesos subyacentes en la inactivación bacteriana donde se menciona la interacción entre los mecanismos de captura de hierro y su consecuente liberación como consecuencia de las alteraciones causadas por ROS, además se mencionan procesos de peroxidación lipídica, y difusión de ROS al citoplasma celular una vez que se ha comprometido la integridad de la membrana; la oxidación de núcleos Fe-S puede acarrear la liberación de hierro intracelular de las ferritinas o enterobactinas y la presencia de algunos compuestos que actúan como foto-sensibilizadores internos que pueden iniciar reacciones oxidativas, liberación de Fe^{2+} y generación de peróxido de hidrógeno (Spuhler *et al.*, 2010).

El uso de superficies reflectivas en la aplicación de la desinfección solar de aguas lluvias, ha permitido incrementar la tasa de inactivación en 20 a 30% comparado con el SODIS tradicional, la sinergia entre el efecto de la radiación y el incremento en el efecto térmico ha permitido una inactivación total de *E. coli* y coliformes totales aún en condiciones

climáticas moderadas. Las condiciones óptimas para el tratamiento se encuentran aún bajo estudio, para agua lluvia el mejor desempeño se logró con pH ácidos (5.0) y baja turbiedad, el recrecimiento ocurrió luego de un día de almacenamiento cuando se trataron aguas con altas turbiedades y con pH básicos (Amin & Han, 2009; Amin & Han, 2009).

Otros autores reportan que la aplicación del SODIS a especies de *Salmonella* presentes en agua a pH natural no evitó su recrecimiento luego de un almacenamiento por 72 horas; sin embargo, la adición de 10 mg L^{-1} de H_2O_2 mostró ausencia de crecimiento de bacterias con el hierro naturalmente presente en la agua (Sciacca *et al.*, 2010), sin embargo los métodos de cuantificación que emplean medios cromogénicos y no ensayos de viabilidad más específicos puede llevar a subestimar las poblaciones presentes. En países de África ecuatorial se ha reportado que se requieren 6 horas de exposición a la luz pero para turbiedades mayores a 100 NTU se requieren 7 horas junto con temperaturas mayores a los 50°C para evitar el re-crecimiento de *E. coli* K-12 (Ubomba-Jaswa *et al.*, 2010); esto confirma que para las condiciones de tratamiento se requiere evaluar las condiciones locales de intensidad y la variación estacional de la calidad de las aguas superficiales .

Otras aproximaciones para establecer las condiciones de tratamiento han evaluado en mayor detalle aspectos del metabolismo celular bacteriano para esclarecer los efectos de la tecnología SODIS; Bosshar *et al.* (2009) evaluaron en una zona septentrional el desempeño en la inactivación de poblaciones de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, mediciones de los niveles celulares de ATP, la capacidad de asimilar glucosa, la integridad de la membrana citoplasmática permitieron establecer que la cadena respiratoria de las enterobacterias es uno de los principales objetivos de la radiación solar y de la UV-A, en la mayoría de los casos durante el almacenamiento en la oscuridad, el estado fisiológico de las bacterias continuaba en deterioro aún en ausencia de radiación, lo que implicaba la inactivación de los sistemas de reparación en la oscuridad. Se observó que el contenido de ATP celular decreció rápidamente en *E. coli* y *Shigella flexneri* por la irradiación con luz solar mientras que en *Salmonella typhimurium* un incremento inicial se observó antes de observar una vertiginosa declinación; los autores proponen que luego de una activación inicial del metabolismo energético, el cual se reflejó en el consumo de glucosa y los niveles de ATP, los procesos respiratorios cesaron y el ATP remanente se consumió en procesos de recuperación, probablemente síntesis de componentes o enzimas o en el mantenimiento del potencial de membrana, particularmente en el sistema de la ATP sintasa.

Las enterobacterias evaluadas fueron más susceptibles a la misma dosis de luz cuando fueron expuestas a la radiación solar por dos días consecutivos con un período de almacenamiento en oscuridad (noche) que cuando fueron iluminadas continuamente con radiación UV-A; con un tiempo de exposición continuo de 8 horas se logró, para sus condiciones, la inactivación de los sistemas de reparación o fue un efecto combinado con las condiciones oligotróficas de la matriz (agua mineral) que no permitió la inducción de la respuesta adecuada. En las condiciones evaluadas, los autores afirman que se requieren relativamente bajas dosis de luz ($<400 \text{ W m}^{-2}$) para dañar irreversiblemente las células pues intensidades mayores ($>700 \text{ W m}^{-2}$) pueden llevar a una sobreestimación del efecto, en este trabajo se emplearon celdas de cuarzo como recipientes para la exposición solar, por lo que los resultados no pueden ser totalmente extrapolados al SODIS tradicional (Bosshard *et al.*, 2009).

La aplicación de la tecnología SODIS ha sido estudiada para numerosos patógenos, lo que ha permitido difundir su uso y en últimas aminorar el impacto de cuadros diarreicos en el mundo; por su bajo costo, fácil implementación y ausencia de requerimientos energéticos ha podido incorporarse en comunidades distantes y en países con limitaciones de acceso sostenible a agua potable (Meierhofer & Landolt, 2009). La aplicación de AOPs como ozono/UV y fotocátalisis heterogénea ha tenido numerosas publicaciones en la desinfección de agua (potable y residual) para un amplio espectro de microorganismos; sin embargo, reportes para los procesos foto-Fenton son limitados a la fecha (Sjogren & Sierka, 1994; Cho *et al.*, 2004b); la aplicación de reacciones tipo foto-Fenton en sistemas de tratamiento de agua, se muestra factible desde un punto de vista de remoción de indicadores virales y patógenos, sin embargo, al ser un campo novedoso, requiere mayor profundización para optimizar y modelar el comportamiento de una amplia gama de patógenos con el fin de asegurar la inocuidad de los efluentes tratados y de confrontar y establecer las bondades y limitaciones de la aplicación de estos sistemas en reactores solares como tecnologías sostenibles para el tratamiento de aguas.

5 CONCLUSIONES

En los ensayos preliminares, bajo las condiciones evaluadas, la mayor reducción de las poblaciones virales en presencia de TiO_2 fue de $2.0 \text{ Log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$ para una concentración de 5.0 mg L^{-1} de catalizador, en el caso del sistema $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ la mayor reducción se observó para unas concentraciones de $150.0/2.6/38.25 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$ respectivamente y fue equivalente a una reducción de $2.1 \text{ Log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$.

El sistema $\text{luz}+\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ mostró las mayores tasas de inactivación para el bacteriófago ΦX174 con $3.5 \text{ log}_{10} \text{ PFU mL}^{-1}$, las relaciones molares que lograron las mayores inactivaciones fueron $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ $2.0:20.0$ y $1.1:10.2 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$. El peróxido de hidrógeno a concentraciones de hasta 20 mg L^{-1} ni el sistema $\text{Luz}+\text{H}_2\text{O}_2$ mostraron un detrimento significativo de las poblaciones virales, probablemente debido a la escasa formación de radicales hidroxilo a partir de longitudes de onda mayores a 250 nm y por las limitaciones de difusión de este radical que dificultan su contacto con la cápside viral.

Se identificaron dos etapas en las curvas de inactivación en agua ultrapura, una primera de mayor velocidad que ocurre en los primeros minutos del tratamiento donde se consume aproximadamente la mitad del peróxido adicionado y una segunda etapa con una menor velocidad de reacción y menor consumo de peróxido; estas etapas no se pudieron identificar en agua cruda del río Pance.

El uso de reactores CPC junto con reacciones tipo foto-Fenton permitieron inactivar poblaciones del bacteriófago ΦX174 y de *E. coli* K-12 en una matriz compleja como el agua cruda; las ventajas del CPC en el aprovechamiento de la radiación difusa y la mayor concentración de ROS como producto de reacciones tipo foto-Fenton permitieron alcanzar una mayor eficiencia en términos de inactivación microbiana en comparación con el SODIS tradicional. Este trabajo de investigación debe complementarse con el estudio de la inactivación de otros indicadores y patógenos evaluando su viabilidad y capacidad infecciosa. La implementación de CPC como alternativa de tratamiento requerirá de instalaciones con diseños que se adapten a necesidades locales y que impliquen bajos costos de operación, mantenimiento y con muy bajo o nulo consumo energético.

La aplicación de SODIS tradicional, en las condiciones evaluadas, no afecta significativamente a los bacteriófagos pero mostró un fuerte efecto en las poblaciones de *E. coli* K-12 llegando a límites no detectables. Como los ensayos de recrecimiento evidenciaron que no se logró su inactivación total se requiere evaluar para esta tecnología las dosis de radiación, el tiempo de exposición y el uso de indicadores de calidad de agua complementarios a los coliformes, todo ello en condiciones acopladas a las necesidades de los usuarios finales, especialmente donde el acceso a reactivos pueda ser una limitante o en situaciones catastróficas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Amin, M. T. and M. Y. Han (2009). "Roof-harvested rainwater for potable purposes: Application of solar collector disinfection (SOCO-DIS)." Water Research **43**(20): 5225-5235.
- Amin, M. T. and M. Y. Han (2009). Roof-harvested rainwater for potable purposes: Application of solar disinfection (SODIS) and limitations. Water Science and Technology. **60**: 419-431.
- Amvros'eva, T. V., *et al.* (2004). "Outbreak of enteroviral infection in Vitebsk during pollution of water supply by enteroviruses." **49**(1): 30-34.
- Ashbolt, N. J. (2004). "Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions." Toxicology **198**(1-3): 229-238.
- Ashbolt, N. J. (2004). "Risk analysis of drinking water microbial contamination versus disinfection by-products (DBPs)." Toxicology **198**(1-3): 255-262.
- Baboonian, C. and T. Treasure (1997). "Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease." Heart **78**: 539-543.
- Badireddy, A. R., *et al.* (2007). "Inactivation of bacteriophages via photosensitization of fullerol nanoparticles." Environmental Science and Technology **41**(18): 6627-6632.
- Barrell, R., *et al.* (2000). "Microbiological standards for water and their relationship to health risk." Commun Dis Public Health. **3**: 8-13.
- Bellapadrona, G., *et al.* (2010). "Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell." Free Radical Biology and Medicine **48**(2): 292-297.
- Benabbou, A. K., *et al.* (2007). "Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation." Applied Catalysis B: Environmental **76**(3-4): 257-263.
- Berney, M., *et al.* (2006). "Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*." Journal of Applied Microbiology **101**: 828-836.
- Blake, D. M., *et al.* (1999). "Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells." Separation and purification Methods **28**: 1-50.
- Blanco-Galvez, J., *et al.* (2007). "Solar photo catalytic detoxification and disinfection of water: Recent overview." Journal of Solar Energy Engineering, Transactions of the ASME **129**(1): 4-15.
- Blanco, J. (2005). El reactor fotocatalítico: estado del arte. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. M. A. Blesa and J. B. G. San Martín, Universidad Nacional de San Martín: 271-293.
- Bosshard, F., *et al.* (2009). "Solar disinfection (SODIS) and subsequent dark storage of *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* monitored by flow cytometry." Microbiology **155**(4): 1310-1317.
- Cabiscol, E., *et al.* (2000). "Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(35): 27393-27398.
- Cáceres, D. C., *et al.* (2005). "La enfermedad diarreica aguda: un reto para la salud pública en Colombia." Rev Panam Salud Publica **17**(1): 6-14.

- Castillo, J. A., *et al.* (2005). "Evaluation of the photocatalytic treatment for the removal of pathogenic agent from different biological wastewater treatment effluent." Water and Environmental Management Series. (WEMS): 139-154.
- Cavallini, J. M. and L. E. Young. (2002). "Sistemas Integrados de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales en América Latina: Realidad y Potencial. Resumen ejecutivo." Retrieved 17 de octubre, 2006, from <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsaar/e/proyecto/proyecto.html> rejecutivo.pdf.
- Cengiz, M., *et al.* (2009). "Effects of fenton and ozone on E. coli HB101 and tetM gene in manure samples." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **32**(SUPPL. 1): 90-91.
- CONPES (2005). Metas y estrategias de Colombia para el logro de los objetivos de desarrollo del milenio - 2015. Bogotá, CONSEJO NACIONAL DE POLÍTICA ECONÓMICA Y SOCIAL. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN.: 29 p.
- Craggs, J., *et al.* (1994). "Synergistic action of near-UV and phenylalanine, tyrosine or tryptophan on the inactivation of phage T7: Role of superoxide radicals and hydrogen peroxide " J. Photochem. Photobiolo. B: Biol. **24**: 123-128.
- Craun, G. F., *et al.* (2010). "Causes of Outbreaks Associated with Drinking Water in the United States from 1971 to 2006." Clinical Microbiology Reviews **23**(3): 507-528.
- Curtis, T. P., *et al.* (1994). "Light penetration in waste stabilization ponds." Water Research **28**(5): 1031-1038.
- Curtis, T. P., *et al.* (1992). "Influence of pH, Oxygen, and Humic Substances on Ability of Sunlight To Damage Fecal Coliforms in Waste Stabilization Pond Water." Appl. Environ. Microbiol. **58**(4): 1335-1343.
- Chang, E. E., *et al.* (2001). "Characteristics of organic precursors and their relationship with disinfection by-products." Chemosphere **44**(5): 1231-1236.
- Cho, M., *et al.* (2011). "Inactivation and surface interactions of MS-2 bacteriophage in a TiO₂ photoelectrocatalytic reactor." Water Research **45**(5): 2104-2110.
- Cho, M., *et al.* (2004). "Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection." Water Research **38**(4): 1069-1077.
- Cho, M., *et al.* (2005). "Different inactivation behaviors of MS-2 phage and Escherichia coli in TiO₂ photocatalytic disinfection." Applied and Environmental Microbiology **71**(1): 270-275.
- Cho, M., *et al.* (2004). "Inactivation of Escherichia coli by Photochemical Reaction of Ferrioxalate at Slightly Acidic and Near-Neutral pHs." Applied and Environmental Microbiology **70**(2): 1129-1134.
- Dalrymple, O. K., *et al.* (2010). "A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection." Applied Catalysis B: Environmental **98**(1-2): 27-38.
- DANE. (1997). "Departamento Nacional de Estadística. Condiciones de vida, Calidad de vida, indicadores históricos. Porcentaje de hogares por fuente de aprovisionamiento de agua según regiones, 1997." Retrieved 20 de abril de 2009, 2007, from URL: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/condiciones_vida/calidad_vida/cv_aprov_agua.xls.
- Davies-Colley, R. J., *et al.* (1999). "Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: Interactions of environmental factors with sunlight." Water Research **33**(5): 1220-1230.
- Debowski, M. and M. Krzemieniewski (2007). "The influence of Fenton's reagent on the raw sludge disinfection." Environment Protection Engineering **33**(1): 65-76.

- Diao, H. F., *et al.* (2004). "Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction." Process Biochemistry **39**: 1421-1426.
- Dowds, B. C. A., *et al.* (1987). "Relationship among Oxidative Stress, Growth Cycle, and Sporulation in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **169**(12): 5771-5775.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991). "Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." Microbiological Reviews **55**(4): 561-585.
- Ferreira, A., *et al.* (1995). "Enteroviruses as a possible cause of myocarditis, pericarditis and dilated cardiomyopathy in Belem, Brazil." Braz. j. med. biol **28**(8): 869-874.
- Fujishima, A., *et al.* (2000). "Titanium dioxide photocatalysis." Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews **1**: 1-21.
- Gabutti, G., *et al.* (2004). "Relationship between Indicators of Faecal Pollution and Presence of Pathogenic Microorganisms in Coastal Seawaters. ." Journal of Coastal Research **20**(3): 846-852.
- Gale, P. (2001). "Developments in microbiological risk assessment for drinking water." Journal of Applied Microbiology **91**: 191-205.
- Gelover, S., *et al.* (2006). "A practical demonstration of water disinfection using TiO₂ films and sunlight." Water Research **40**(17): 3274-3280.
- Gerrity, D., *et al.* (2008). "Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light." Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering **43**(11): 1261-1270.
- Gitis, V., *et al.* (2002). "Fluorescent dye labeled bacteriophages—a new tracer for the investigation of viral transport in porous media: 2. Studies of deep-bed filtration." Water Research **36**: 4235–4242.
- Gogniat, G., *et al.* (2006). "The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity." FEMS Microbiology Letters **258**(1): 18-24.
- Gonzalez, A. M., *et al.* (2010). "Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil " Can. J. Microbiol. **56**(2): 188-194.
- Grabow, W. (2001). "Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water." Water SA **27**(2): 251-268.
- Graczyk, T. K., *et al.* (2010). "Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. ." Parasitology Research **106**(5): 1103-1108.
- Harwood, V. J., *et al.* (2005). "Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection." Applied and Environmental Microbiology **71**(6): 3163-3170.
- Hawkins, C. L. and M. J. Davies (1998). "EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides." Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2 **12**: 2617-2622.
- Herrmann, J. M. (2005). Destrucción de contaminantes orgánicos por fotocátalisis heterogénea. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. M. A. Blesa and J. Blanco. San Martín, Editorial Escuela de Posgrado Universidad Nacional de San Martín: 147-164.
- Hotze, E. M., *et al.* (2009). "Mechanisms of Bacteriophage Inactivation via Singlet Oxygen Generation in UV Illuminated Fullerol Suspensions." Environmental Science & Technology **43**(17): 6639-6645.
- IDEAM. (2001, Julio 31 de 2006). "Estudio Nacional del Agua." Retrieved 15 de marzo de 2007, 2007, from <http://www.ideam.gov.co/publica/index4.htm> enatexto.pdf.

- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annual Review of Microbiology **57**(October): 395-418.
- Kabir, M., *et al.* (2003). "Desifecting E. coli bacteria in drinking water using a novel fluidized bed reactor." International Journal of Chemical Reactor Engineering **1**: 1-10.
- Kakhlon, O. and Z. I. Cabantchik (2002). "The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes." Free Radical Biology and Medicine **33**(8): 1037-1046.
- Kanokkantapong, V., *et al.* (2005). "Characterization of haloacetic acid precursors in source water." Journal of Environmental Management **80**(3): 214-221.
- Kiley, P. J. and H. Beinert (2003). "The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria." Current Opinion in Microbiology **6**(2): 181-185.
- Kim, J. Y., *et al.* (2010). "Inactivation of MS2 coliphage by Fenton's reagent." Water Research **44**(8): 2647-2653.
- Koizumi, Y. and M. Taya (2002). "Kinetic evaluation of biocidal activity of titanium dioxide against phage MS2 considering interaction between the phage and photocatalyst particles." Biochemical Engineering Journal **12**: 107-116.
- Kowaltowski, A. J. and A. E. Vercesi (1999). "Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress." Free Radical Biology & Medicine **26**(3): 463-471.
- Lapertot, M., *et al.* (2006). "Enhancing biodegradability of priority substances (pesticides) by solar photo-Fenton." Water Research **40**(5): 1086-1094.
- Leclerc, H., *et al.* (2000). "Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters." Journal of Applied Microbiology **88**(5): 5-21.
- Lemarchand, K. and P. Lebaron (2003). "Occurrence of Salmonella spp. and Cryptosporidium spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators." FEMS Microbiol Lett **218**: 203-209.
- Liga, M. V., *et al.* (2011). "Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment." Water Research **45**(2): 535-544.
- Lipczynska-Kochany, E. and J. Kochany (2008). "Effect of humic substances on the Fenton treatment of wastewater at acidic and neutral pH." Chemosphere **73**(5): 745-750.
- Lonnen, J., *et al.* (2005). "Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water." Water Research **39**: 877-883.
- Lucena, F., *et al.* (2003). "Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America." J Appl Microbiol **94**: 808-815.
- Lydakis-Simantiris, N., *et al.* (2010). "Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO₂ photocatalysis." Desalination **250**(1): 351-355.
- Malato, S., *et al.* (2003). "Effect of operating parameters on the testing of new industrial titania catalysts at solar pilot plant scale." Applied Catalysis B: Environmental **42**(4): 349-357.
- Malato, S., *et al.* (2004). "Engineering of solar photocatalytic collectors." Solar Energy **77**(5): 513-524.
- Malato, S., *et al.* (2009). "Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends." Catalysis Today **147**(1): 1-59.
- Maness, P. C., *et al.* (1999). "Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism." Appl Environ Microbiol **65**: 4094-4098.
- Marugán, J., *et al.* (2007). "Solar photocatalytic degradation of dichloroacetic acid with silica-supported titania at pilot-plant scale." Catalysis Today **129**(1-2): 59-68.
- Marugán, J., *et al.* (2006). "Fe/TiO₂/pH Interactions in Solar Degradation of Imidacloprid with TiO₂/SiO₂ Photocatalysts at Pilot-Plant Scale." Industrial & Engineering Chemistry Research **45**(26): 8900-8908.

- Mazoua, S. and E. Chauveheid (2005). "Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water." Water Res **39**: 5186-5198.
- McLoughlin, O. A., *et al.* (2004). "Photocatalytic disinfection of water using low cost compound parabolic collectors." Solar Energy **77**: 625-633.
- McLoughlin, O. A., *et al.* (2004). "Solar disinfection of contaminated water: a comparison of three small-scale reactors." Solar Energy Photocatalysis **77**(5): 657-664.
- Medema, J. G., *et al.* (2003). Safe drinking water: an ongoing challenge. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. WHO and OECD. London, International Water Association: 11-49.
- Meierhofer, R. and G. Landolt (2009). "Factors supporting the sustained use of solar water disinfection - Experiences from a global promotion and dissemination programme." Desalination **248**(1-3): 144-151.
- Mestánková, H., *et al.* (2004). "Homogeneous (Fe(III)) and heterogeneous (TiO₂) photocatalytic systems for pollutant removal from the aquatic compartment: comparison and complementarity." Water Sci Technol **49**(4): 165-170.
- Ministerio de Salud (1998). Segundo Inventario Nacional de Calidad del Agua. Santa Fe de Bogotá, D. C., Ministerio de Salud. Dirección General de Promoción y Prevención. Subdirección de Ambiente y Salud.
- Moncayo-Lasso, A., *et al.* (2008). "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 **42**(15): 4125-4132.
- Nadtochenko, V. A., *et al.* (2005). "Dynamics of E. coli membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy." J Photochem Photobiol A **169**: 131-137.
- Nasser, A. M. and S. D. Oman (1999). "Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. Research notes." Water Res **33**(7): 1748-1752.
- Nogueira, R. F., *et al.* (2004). "Evaluation of the combined solar TiO₂/photo-Fenton process using multivariate analysis." Water Sci Technol **49**(4): 195-200.
- Oates, P., *et al.* (2003). "Solar disinfection (SODIS): simulation of solar radiation for global assessment and application for point-of-use water treatment in Haiti." **37**: 47-54.
- Ochsner, U. A., *et al.* (2000). "Role of the Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG Operon in Oxidative Stress Defense and DNA Repair: OxyR-Dependent Regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF." J Bacteriol **182**(16): 4533-4544.
- Ojeda, E. O. and R. A. Uribe (2000). Informe Nacional Sobre La Gestión Del Agua En Colombia: Recurso Hídricos, Agua Potable y Saneamiento.
- Oliver, J. D. (2010). "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria." FEMS Microbiology Reviews **34**(4): 415-425.
- OMS. (s. f.). "Epidemias mundiales e impacto del cólera." Retrieved 18 de marzo de 2009, 2007, from URL: <http://www.who.int/topics/cholera/impact/es/>.
- Paspaltsis, I., *et al.* (2009). "Photocatalytic degradation of prions using the photo-Fenton reagent." Journal of Hospital Infection **71**(2): 149-156.
- Payment, P., *et al.* (1997). "A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water." Int J Environ Health Research **7**(1): 5-31.
- Pfeffer, C. S., *et al.* (2003). "Ecology of Vibrio vulnificus in estuarine waters of eastern North Carolina." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3526-3531.
- Pignatello, J. J. (1992). "Dark and photoassisted Fe³⁺-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide." Environmental Science and Technology **26**(5): 944-951.

- Prendergast, M. m., *et al.* (1998). "Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* O:41 Strains Associated with Guillain-Barre' Syndrome Exhibit Mimicry of GM1 Ganglioside." *Infection and immunity* **66**(8): 3649-3755.
- Prüss-Üstün, A., *et al.* (2008, 23 octubre de 2010). "Safe water, better health costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health." Retrieved 23 octubre de 2010, 2010, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596435_eng.pdf.
- Prüss, A., *et al.* (2002). "Estimating the Burden of Disease from Water, Sanitation, and Hygiene at a Global Level." **110**: 537-542.
- Reiff, F. M. (1996). El estado de la desinfección del agua potable en América Latina y el Caribe. La calidad del agua potable en América Latina y el Caribe. G. F. Craun and R. Castro. Washington, ILSi: 101-113.
- Reiff, F. M. (1996). Tecnologías de desinfección del agua para comunidades pequeñas y zonas rurales. La calidad del agua potable en América Latina y el Caribe. G. F. Craun and R. Castro. Washington, ILSi: 153-185.
- Rincon, A.-G. and C. Pulgarin (2004). "Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO₂: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection?" *Solar Energy* **77**(5): 635-648.
- Rincón, A.-G. and C. Pulgarin (2006). "Comparative evaluation of Fe³⁺ and TiO₂ photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water." *Applied Catalysis B: Environmental* **63**: 222-231.
- Rincon, A., *et al.* (2005). Desinfección de agua por fotocatalisis. Aspectos básicos. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. M. A. Blesa and J. B. G. San Martín, Universidad Nacional de San Martín: 197-218.
- Rincon, A. G. and C. Pulgarin (2006). "Comparative evaluation of Fe³⁺ and TiO₂ photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water." *Applied Catalysis B: Environmental* **63**(3-4): 222-231.
- Rincón, A. G. and C. Pulgarín (2004). "Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacteria consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time." *Appl Catal B Env* **49**: 99-112.
- Rincón, A. G. and C. Pulgarín (2004). "Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: implications in solar water disinfection." *Appl Catal B Env* **51**(3): 283-302.
- Rowan, N. J. (2004). "Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? Viewpoint." *Trends in Food Science & Technology* **15**: 462-467.
- Sadiq, R. and M. J. Rodriguez (2004). "Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: A review." *Science of the Total Environment* **321**(1-3): 21-46.
- Sagawe, G., *et al.* (2001). "The insulated solar fenton hybrid process: Fundamental investigations." *Helvetica Chimica Acta* **84**(12): 3742-3759.
- Sciaccia, F., *et al.* (2010). "Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild *Salmonella* sp. in PET bottles by H₂O₂ addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron." *Chemosphere* **78**(9): 1186-1191.
- Sichel, C., *et al.* (2007). "Effects of experimental conditions on *E. coli* survival during solar photocatalytic water disinfection." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **189**(2-3): 239-246.
- Sinton, L. W., *et al.* (1999). "Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage- polluted seawater." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8): 3605-3613.

- Sinton, L. W., *et al.* (2002). "Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters." Applied and Environmental Microbiology **68**(3): 1122-1131.
- Sjogren, J. C. and R. A. Sierka (1994). "Inactivation of phage MS2 by iron-aided titanium dioxide photocatalysis." Applied and Environmental Microbiology **60**(1): 344-347.
- Solarte, Y., *et al.* (1997). "Uso de la radiación solar (UV-A y temperatura) en la inactivación del *Vibrio cholerae* en agua para consumo humano. Factores que condicionan la eficiencia del proceso." ColombiaMédica **28**: 123-129.
- Sommer, B., *et al.* (1997). "SODIS-an emerging water treatment process." J. Water SRT - Aqua **46**(3): 127-137.
- Sommer, R., *et al.* (1998). "Time dose reciprocity in UV disinfection of water." Water Science and Technology **38**(12): 145-150.
- Springthorpe, V. S., *et al.* (1993). "In situ survival of indicator bacteria, MS-2 phage and human pathogenic viruses in river water." Water Science and Technology **27**(3-4): 413-420.
- Spuhler, D., *et al.* (2010). "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 **96**(1-2): 126-141.
- Storz, G., *et al.* (1990). "Bacterial defenses against oxidative stress." Trends Genet **6**(11): 363-368.
- Sun, Y. and J. J. Pignatello (1992). "Chemical treatment of pesticide wastes. Evaluation of iron(III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(2): 322-327.
- Tamarit, J., *et al.* (1998). "Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells exposed to oxidative stress." J Biol Chem **273**(5): 3027-3032.
- Teichner, S. J. (2008). "The origins of photocatalysis." Journal of Porous Materials **15**(3): 311-314.
- Teissie, J., *et al.* (2002). "Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review." Bioelectrochemistry **55**: 107-112.
- Thompson, T. and J. Yates (2006). "Surface Science Studies of the Photoactivation of TiO_2 s New Photochemical Processes." Chem. Rev. **106**(4428-4453).
- Thompson, T. L. and J. T. Yates Jr (2005). " TiO_2 -based photocatalysis: Surface defects, oxygen and charge transfer." Topics in Catalysis **35**(3-4): 197-210.
- Ubomba-Jaswa, E., *et al.* (2010). "Investigating the microbial inactivation efficiency of a 25 L batch solar disinfection (SODIS) reactor enhanced with a compound parabolic collector (CPC) for household use." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **85**(8): 1028-1037.
- Uemura, N., *et al.* (2001). "*Helicobacter pylori* Infection and the Development of Gastric Cancer." N Engl J Med **345**(11): 829-832.
- UNICEF and MinAmbiente (2005). Resultados Inventario Sanitario Rural. Región Occidente. Departamento de Cauca. S. B. y. A. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo territorial. Dirección de Agua Potable. Bogotá: 2-11.
- Walker, D. C., *et al.* (2004). "Development and evaluation of a reflective solar disinfection pouch for treatment of drinking water." Applied and Environmental Microbiology **70**(4): 2545-2550.
- Wegelin, M., *et al.* (1994). "Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments." J. Water SRT - Aqua **43**(3): 154-169.
- WHO (2006). Chemical aspects. Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. Geneva. **1**: 221-294.

- WHO (2006). Microbial aspects. Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. Geneva: 121-144.
- WHO (2006). Microbial fact sheets. Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. Geneva. 1: 221-294.
- WHO. (2006). "Mortality Country Fact Sheet 2006." Retrieved agosto 3 de 2010, from http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_amro_col_colombia.pdf.
- WHO. (2008). "The global Burden of Disease: 2004 update. Part 2: causes of death." Retrieved 18 de agosto de 2010, 2010, from http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf.
- WHO. (s.f.). "Managing water in the home: accelerated health gains from improved water supply." Retrieved 15 mayo de 2010, 2010, from URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/0207tab20/en/.
- WHO and OECD (2003). Assessing Microbial Safety of Drinking Water. London, International Water Association.
- WHO and UNICEF. (2000, s. f.). "Global Water Supply and Sanitation Assessment (GWSSA) 2000 REPORT." Water Supply and Sanitation Monitoring Retrieved 03 de septiembre 2009, 2009, from http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/globalassess/en/index.html.
- WHOSIS. (2008). "WHO Statistical Information System: Core Health Indicators." Retrieved julio 15 de 2010, from http://apps.who.int/whosis/database/core/core_select_process.cfm?countries=col&indicators=PopAccessImprovedWaterUrban&indicators=PopAccessImprovedWaterRural&indicators=PopAccessImprovedSanitationUrban&indicators=PopAccessImprovedSanitationRural.
- Winfield, M. D. and E. A. Groisman (2003). "Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli." Applied and Environmental Microbiology **69**(7): 3687-3694.
- Wist, J., et al. (2002). "Evaluation of photocatalytic of crude water for drinking - water production." J Photochem Photobiol A **147**: 241-246.
- Withey, S., et al. (2005). "Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. Review article." Science of the Total Environment **339**: 1-18.
- Woolhouse, M. (2002). "Population biology of emerging and re-emerging pathogens." Trends in Microbiology **10**((Suppl.): S3-S7).
- Xu, Y. (2001). "Comparative studies of the Fe^{3+/2+}-UV, H₂O₂-UV, TiO₂-UV/vis systems for the decolorization of a textile dye X-3B in water." Chemosphere **43**(8): 1103-1107.
- Zhao, G., et al. (2003). "Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells: A FERRITIN-LIKE DNA-BINDING PROTEIN OF ESCHERICHIA COLI " J. Biol. Chem. **277**: 27689-27696.

ANEXOS

ANEXO 1

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DE AGUAS CRUDAS

Caracterización bioquímica de aguas crudas

Parámetro	Unidades	Muestras			
		1	2	3	4
		Jul 10-11	Jul 13	Jul 21-23	Ago 15
Turbiedad	NTU	1.5	2.1	0.95	1.8
Color	PCU	3.6	4.0	3.5	2.0
Hierro total	mg L ⁻¹	4.24	0.25	0.22	0.10
pH	pH	7.5	7.0	7.2	6.9
Bacterias mesofílicas	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	4.0	3.6	3.4	3.9
Coliformes fecales	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	0.3	0.9	1.5	1.1
Bacteriofagos somáticos	UFP mL ⁻¹	0	0	0	0

ANEXO 2

TÉCNICA DOBLE CAPA PARA ESTIMACIÓN DE BACTERIÓFAGO Φ x174

PREPARACIÓN DE STOCK DE E. coli WG5

- Rehidratar el liofilizado del cultivo de referencia de la cepa huésped en 3 mL de Caldo Scholtens modificado (CSM) usando una pipeta pasteur.
- Transferir este volumen 50 $\pm$ 5 mL de CSM en un erlenmeyer de 300 mL.
- Incubar a 36 $\pm$ 2 °C por 20 $\pm$ 4 horas en incubadora con agitación suave o en baño maría.
- Adicionar 10 mL de glicerol estéril o el suficiente para alcanzar una concentración final de glicerol del 15-20% (v/v) y mezclar bien.
- Alicuotar en viales plásticos por ejemplo de 0.5 mL y almacene a -70 $\pm$ 10°C en nitrógeno líquido.

PREPARACIÓN CULTIVOS DE TRABAJO DE E. coli WG5

- Remueva el vial de cultivo stock del congelador y permítale alcanzar temperatura ambiente (15-30°C).
- Inocule sobre una caja de agar MacConkey u otro medio con lactosa en el que se puedan obtener colonias separadas.
- Incube a 36 $\pm$ 2°C por 20 $\pm$ 4 horas.
- El contenido remanente del vial puede usarse para inocular más cajas en el mismo día de trabajo.
- En un erlenmeyer de 300 mL con 50 $\pm$ 5 mL de Caldo Scholtens Modificado (CSM) aclimatado a temperatura ambiente o 37°C inocule de 3 a 5 colonias típicas lactosa positivas del agar McConkey
- Incube a 36 $\pm$ 2°C con agitación vigorosa por 5 $\pm$ 1 hora.
- Adicione 10 mL de glicerol estéril y mezcle bien..
- Alicuotar en viales de 2 mL y almacenar en un congelador a -70 $\pm$ 10°C por un máximo de 2 años.

CALIBRACIÓN DE LAS MEDIDAS DE ABSORBANCIA PARA CONTEOS DE MICROORGANISMOS VIABLES

- Adicione 50 $\pm$ 5 mL de Caldo Scholtens modificado (CSM) en un frasco cónico nefelométrico precalentado a 37°C
- Coloque asépticamente una porción del medio en una celda. Ajuste la absorbancia del espectrofotómetro a cero entre 550 nm (500-650 nm) y descarte el medio transferido a la cubeta.
- Remueva el vial de trabajo de congelación y permítale equilibrar hasta temperatura ambiente (15-30°C)
- Inocule 0.5 mL del cultivo de trabajo y incube a 36 $\pm$ 2°C con agitación moderada en una incubadora por más de 3.5 horas (probar hasta entre 3 y 5)
- Cada 30 minutos realice una medición de absorbancia y retire 1 mL para realizar siembra en placa realizando diluciones hasta 10⁻⁷ y sembrando 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. En agar nutritivo estándar o en agar Scholtens modificado por duplicado

- Puede realizarse filtración por membrana con 1 mL de las diluciones en los mismos agares por duplicado
- Incubar a 36 $\pm$ 2°C por 20 $\pm$ 4 horas emplear para el recuento las cajas que contengan entre 30-300 colonias
- Este procedimiento debe ejecutarse entre 2 y 3 veces para establecer la relación entre la absorbancia y el conteo de colonias.

PREPARACIÓN DE STOCK DEL BACTERIÓFAGO Φ X174

- 25 mL de caldo modificado de Scholtens en un erlenmeyer de 300 mL se inocula con el huésped (*E. coli* o un mutante resistente al ácido nalidíxico).
- Incubar a 36 $\pm$ 2°C por 20 $\pm$ 4 horas con agitación a 100 $\pm$ 10 rpm.
- Precalentar otros 25 mL en un erlenmeyer de 300 mL a temperatura ambiente e inocular con 0.25 mL del cultivo del numeral anterior.
- Incubar como máximo por 90 minutos, adicione el fago Phix174 de una solución stock para dar una concentración final de 10⁷/mL.
- Incube por 4 a 5 horas.
- Adiciones 2.5 mL de cloroformo mezcle bien y refrigere toda la noche a 5 $\pm$ -3°C.
- Decante la fase acuosa en tubos de centrifuga y centrifuge como mínimo a 3000g por 20 min.
- Pipetee el sobrenadante cuidadosamente y almacene a 5 $\pm$ -3°C.

OBTENCIÓN DE BACTERIÓFAGOS A PARTIR DE SU EXTRACCIÓN DESDE UNA CALVA

- Remover la calva de interés de la placa de agar semisólido en donde se encuentra con la ayuda de una espátula o un asa de siembra.
- Resuspender ésta en 300 μ l de PBS en un microtubo.
- Agitar en vortex durante dos minutos
- Agregar una gota durante cloroformo
- Agitar en vortex durante dos minutos
- Centrifugar a 16.000 g. durante 5 min.
- Conservar el sobrenadante

ENRIQUECIMIENTO EN FASE LÍQUIDA PARA LA OBTENCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

- Crecer la bacteria huésped hasta una concentración de 10⁸ UFC/ml
- Tomar 1 ml de la bacteria en un tubo de 25 ml, poner 100 μ l de la extracción de la calva del fago y agregar 9 ml caldo MSB.
- Incubar en las condiciones descritas durante 24 ($\pm$ 4 horas)
- Tomar una alícuota de 700 μ l y agregar 300 μ l de cloroformo
- Agitar durante 5 min en el vortex
- Centrifugar a 16000 xg por 5 min.
- Hacer diluciones decimales y titular de la manera habitual con la bacteria huésped de donde se aisló el fago.
- En caso de no obtener un título mínimo de 10⁹ ufp/ml se empleó la siguiente técnica.

ENRIQUECIMIENTO EN FASE SÓLICA PARA LA OBTENCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

- Hacer una placa de titulación mediante la técnica de Adams (1959), poniendo 100 µl del fago enriquecido o de la extracción de la calva
- Incubar en las condiciones descritas por 24 (±4 horas)
- Verter 2-3 ml de PBS sobre la superficie del agar semisólido y dejarlo en la nevera durante 15-20 min.
- Con la ayuda de un asa de Digrafsky, remover el agar semisólido y ponerlo en un tubo 10 ml.
- Agitar en el vortex hasta deshacer completamente el agar semisólido
- Centrifugar a 3000 rpm por 10-15 min.
- Recoger el sobrenadante y filtrarlo por filtros de 0,22 µm de poro, de baja adsorción proteica Millex GP de Millipore®.
- Agregar glicerol (concentración final de 5-10% v/v) y dispensar en alícuotas de 1 ml y congelar a -20 o -70°C
- A partir de una de las alícuotas hacer diluciones decimales y titular de la manera habitual con la bacteria huésped de donde se aisló el fago.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL HUÉSPED

- Con medio CSM precalentado a 37°C ajuste la lectura del espectrofotómetro a cero a 550 nm (500-650 nm).
- Coloque 50+/- 5 mL de CSM en un erlenmeyer de 300 mL y precaliente a 37°C.
- Remueva el vial de cultivo de trabajo del congelador y permítale atemperar a temperatura ambiente (15-30°C).
- Inocule 0.5 mL del cultivo de trabajo e incube a 36+/-2°C con agitación moderada.
- Mida la absorbancia asépticamente cada 30 minutos y descarte el medio que se empleó para llenar la cubeta.
- Al llegar a una concentración equivalente a 10⁸ ufc/ mL basado en los cálculos de las curvas de calibración de absorbancia retire el cultivo de la incubadora y enfríelo rápidamente en hielo. Este inóculo debe usarse en el mismo día de trabajo.

PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA LA ESTIMACIÓN DE BACTERIÓFAGOS SOMÁTICOS DE ACUERDO CON ISO 10705-2

- Preparación del huésped
- Con medio CSM precalentado a 37°C ajuste la lectura del espectrofotómetro a cero A 550 NM.
- Coloque 50+/- 5 mL de CSM en un erlenmeyer de 300 mL y precaliente a 37°C.
- Remueva el vial de cultivo de trabajo del congelador y permítale atemperar a temperatura ambiente (15-30°C).
- Inocule 0.5 mL del cultivo de trabajo e incube a 36+/-2°C con agitación moderada.
- Mida la absorbancia asépticamente cada 30 minutos y descarte el medio que se empleó para llenar la cubeta.
- Al llegar a una concentración equivalente a 10⁸ ufc/ mL basado en los cálculos de las curvas de calibración de absorbancia retire el cultivo de la incubadora y enfríelo rápidamente en hielo. Este inóculo debe usarse en el mismo día de trabajo.

Análisis estándar

- Funda botellas con 50 mL de agar Scholtens Modificado semi-sólido (ASMss) en un baño maría a 45+/-1°C.

- Asépticamente transfiera 300 microlitros de solución de cloruro de calcio precalentada a temperatura ambiente y distribúyalo en alícuotas de 2.5 mL en tubos con tapa.
- Colóquelos en un baño a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.
- A cada tubo adicione 1 mL de la muestra original o diluida si se requiere precalentada a temperatura ambiente, examine cada alícuota al menos por duplicado.
- Adicione 1 mL de cultivo de inóculo (huésped) a cada tubo y mezcle cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.
- Vierta el tubo sobre una placa petri precalentada a temperatura ambiente. Distribuya en la superficie y permita solidificar en una superficie horizontal fría.
- Permita secar la placas incubando con las tapas parcialmente abiertas y luego incube boca abajo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 horas. No apile más de 6 cajas.
- Seleccione la dilución con más de 30 placas o calvas y cuente dentro de las 4 horas finalizada la incubación usando luz indirecta oblicua.

Recomendaciones

- Una solución fresca de cloruro de trifetil tetrazolio puede adicionarse al agar ASMss para incrementar el contraste de las calvas
- Los tubos inoculados con el huésped no pueden durar en el baño maría a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ por más de 10 minutos.
- Debe evitarse adicionar la muestra y el huésped al tiempo para evitar solidificación del medio.
- En caso de que la muestra tenga alta cantidad de biota acompañante adicionar ácido nalidixico a una concentración de 250 microgramos/mL al agar ASMss.
- Las muestras con bajos recuentos de fagos requieren emplear 10 mL de ASMss, 60 microlitros de solución de cloruro de calcio y 1 mL de cultivo de huésped y 5 mL de muestra por duplicado.
- Verter sobre dos cajas petri conteniendo 20 mL de Agar Scholtens Modificado (ASM)

ANEXO 3

REACTIVACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA *E. coli* K-12:

Retire un crio-preservedo del congelador y permítale descongelarse a temperatura de refrigeración por al menos 30 min.

Agite el crio-vial en vórtex al menos por 10 segundos. Destape el vial y transfiera 100 μ L a un tubo conteniendo caldo nutritivo. Incube a 35 $\pm$ 2°C por 18 horas con agitación a 100 rpm.

A partir de este cultivo transfiera un volumen suficiente para inocular en una proporción de 1:100 el volumen final de trabajo de caldo nutriente. Incube bajo las mismas condiciones.

Retire el cultivo de la incubadora y centrifuge a 3000 rpm por 10 minutos a 5°C.

Extraiga el sobrenadante y resuspenda el pellet.

Agite en vórtex, repita el procedimiento dos veces mas.

Ajuste la concentración final acorde con las curvas de densidad óptica propias de cada microorganismo.

ANEXO 4

ANOVA de dos vías para el diseño factorial 2^2 con puntos centrales para la reacción $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$

Fuente	GL	Seq SS	Adj MS	F	P
Effectos principales	2	0.06890	0.034450	6.89	0.260
Interacción 2-vías	1	0.86490	0.864900	172.98	0.048
Curvatura	1	0.17280	0.172800	34.56	0.107
Error Residual	1	0.00500	0.005000		
Error Puro	1	0.00500	0.005000		
Total	5	1.11160			

ANEXO 5

ANOVA para la reducción del bacteriófago Φ X174 expresado como $\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{No})$ de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} para la reacción $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$

Fuente	GL	Seq SS	Adj MS	F	P
Efectos principales	3	1.91347	0.637825	797.28	0.026
Curvatura	1	0.07841	0.078408	98.01	0.064
Error Residual	1	0.00080	0.000800		
Error puro	1	0.00080	0.000800		
Total	5	1.99268			