



Estudio de la influencia de variables del tratamiento pseudo-Fenton en la inactivación de indicadores de contaminación fecal

Jorge Rodríguez Chueca doctor en Ingeniería Química y Medio Ambiente en la Universidad de Zaragoza

Saskia Louwen Pérez Auslandsvertrieb in Archea Anlagenbau

Rosa Mosteo Abad profesora titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

María Peña Ormad Melero profesora titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

Los procesos avanzados de oxidación (PAO) se presentan como una seria alternativa a la tecnología convencional utilizada con el fin de reducir la presencia de contaminantes peligrosos y microorganismos potencialmente patógenos en los efluentes líquidos. El objetivo del presente trabajo es estudiar la eficacia de los tratamientos pseudo-Fenton a pH 5 y al pH natural de las muestras ($\approx 7-8$), en la eliminación de dos indicadores de contaminación fecal presentes en las aguas residuales urbanas: *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* Además, se evalúa la influencia de cada una de las variables que participan en el proceso de inactivación.

Palabras clave

Aguas residuales, indicadores de contaminación fecal, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, desinfección, procesos de oxidación avanzada (PAO), reutilización aguas.

Study of influence of variables of pseudo-Fenton treatment in the inactivation of indicators of fecal contamination

*Advanced oxidation processes (AOP) are considered as a serious alternative to conventional technology in the removal of hazardous pollutants and pathogen microorganisms present in water effluents. The aim of this research work is to study the efficiency of pseudo-Fenton treatments at pH 5 and at natural pH of the samples ($\approx 7-8$), in the inactivation of two indicators of fecal contamination, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.*, present in urban wastewater effluents. In addition, it is assessed the influence of each variable of the inactivation treatment.*

Keywords

*Wastewater, indicators of fecal contamination, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, disinfection, advanced oxidation processes (AOP), water reuse.*



1. Introducción

La incorporación al ordenamiento jurídico español de la Directiva 91/271/CEE, relativa al tratamiento de aguas residuales urbanas, supuso la construcción y puesta en marcha de un elevado número de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (EDAR) en España. Las EDAR aseguran una calidad del vertido final que se adecua a los límites permitidos por la legislación vigente. A pesar de que la contaminación biológica constituye una parte importante de las aguas residuales urbanas, las EDAR no se diseñan con el objetivo de eliminarla, por lo que la presencia de estos contaminantes biológicos y otros orgánicos e inorgánicos persistentes peligrosos puede limitar su reutilización (Mosteo *et al.*, 2013).

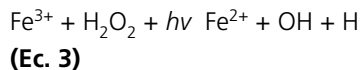
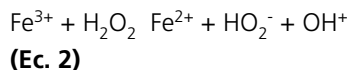
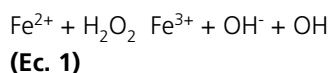
Por su parte, el Real Decreto 1620/2007, por el que se establece el régimen jurídico de reutilización de aguas depuradas, limita la presencia de metales, sustancias orgánicas peligrosas, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Legionella spp.*, etc., en las aguas, estableciendo valores máximos admisibles en función del uso concreto que se les vaya a dar (urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental).

El cloro es el agente más empleado en la desinfección del agua. Sin embargo, su aplicación (o de sus derivados) no es recomendable por la reacción de este y la materia orgánica, generándose subproductos organohalogenados como los trihalometanos (THM) y los ácidos halogenados (tricloroacético y percloacético) (Bueno, 1997), sustancias consideradas como peligrosas por la legislación vigente.

En los últimos años, los procesos avanzados de oxidación (PAO), basados en la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), como los radicales hidróxilo (OH·),

se postulan como complementos o alternativas a los tratamientos convencionales utilizados para reducir la presencia de contaminantes peligrosos y microorganismos potencialmente patógenos en los efluentes líquidos, potenciando así su posible reutilización y reduciendo los riesgos asociados para la salud pública y el medio ambiente (Ormad *et al.*, 2010; Mosteo *et al.*, 2009, 2010; Miguel *et al.*, 2012; Lanao *et al.*, 2012; Rodríguez Chueca *et al.*, 2012, 2013, 2014).

En 1894, Henry J. Fenton describe que el H₂O₂ puede ser activado por acción de sales de Fe (II) a pH ácido para oxidar el ácido tartárico (Fenton, 1894). Es en 1934 cuando Fritz Haber y Joseph Joshua Weiss proponen que el agente oxidante efectivo en la reacción Fenton es el radical hidróxilo (HO·), uno de los oxidantes más poderosos conocidos (E° = 2,73 V). A pesar de la complejidad del mecanismo de los procesos Fenton y foto-Fenton, estos pueden resumirse en las **ecuaciones 1, 2, y 3**:



En presencia de iones de hierro disuelto (Fe²⁺/Fe³⁺), el peróxido de hidrógeno se descompone de manera rápida y eficaz, produciendo radicales OH· (**ecuaciones 1 y 2**). Bajo la acción de la radiación solar, los fotones con una longitud de onda superior a 580 nm activan los organocomplejos de Fe³⁺ por foto-reducción, incrementando la producción de radicales hidróxilo (**ecuación 3**) (Pignatello *et al.*, 2006).

Además, las reacciones de fotólisis del peróxido de hidrógeno también participan en el aporte de radicales hidróxilo (**ecuación 4**). Sin embargo, la reacción 4 no tiene lugar con radiación solar natural, ya que esta no contiene fotones con longitud de onda inferior a 280 nm:



La tecnología Fenton depende de varios parámetros, como son la concentración de Fe²⁺/Fe³⁺, la concentración de H₂O₂, el pH, el tiempo de contacto, la intensidad de la fuente de radiación, así como la composición y población bacteriana en las muestras de agua (Malato *et al.*, 2009).

Los microorganismos indicadores de contaminación fecal se caracterizan por tener un comportamiento similar a los patógenos en lo referente a concentración, reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales. Sin embargo, pueden ser analizados de manera más rápida, sencilla y económica (Marín-Galván, 2003). *Escherichia coli* es el indicador de contaminación fecal más utilizado en el análisis de muestras de agua y aguas residuales (Rodríguez Chueca *et al.*, 2012, 2013, 2014; Rizzo *et al.*, 2014). Este bacilo Gram-negativo es uno de los habitantes más comunes en el tracto intestinal de hombres y otros animales de sangre caliente. Su presencia en muestras de agua es casi siempre indicativo de contaminación fecal y de la posible existencia de otros patógenos entéricos como *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Shigella sp.*, etc.

Por su parte, *Enterococcus sp.* son cocos Gram positivo. Se encuentran presentes en altas concentraciones en los medios acuáticos contaminados con aguas residuales y su presencia pone de manifiesto la exis-

tencia de contaminación reciente. Además, *Enterococcus sp.* presenta una mayor resistencia que *Escherichia coli* a los tratamientos, por lo que la legislación española en materia de aguas también lo incluye como indicador de patógenos fecales en aguas de consumo humano (RD 140/2003).

El presente trabajo de investigación tiene dos objetivos fundamentales. En primer lugar, estudiar la eficacia de los tratamientos pseudo-Fenton a pH 5 y al pH natural de las muestras de agua ($\approx 7-8$), en la eliminación de dos indicadores de contaminación fecal, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.*, presentes en aguas residuales urbanas. Y en segundo lugar, llevar a cabo el estudio estadístico de la influencia de las variables que participan en dicho proceso de inactivación.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras

Las muestras objeto de estudio en este trabajo de investigación son muestras de agua residual sintética (SE) tratada en una planta a escala de laboratorio de lodos activos (**Figura 1**). Dicha planta de lodos activos se alimenta con una muestra de agua residual sintética de acuerdo a lo establecido en la Directiva 82/243/EEC, simulando un agua residual urbana convencional. La composición del agua residual sintética es la siguiente: glucosa ($C_6H_{12}O_6$) (200 mg/L), peptona de carne (160 mg/L), extracto de carne (110 mg/L), urea ($CO(NH_2)_2$) (30 mg/L), NaCl (7 mg/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (4 mg/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 mg/L) y K_2HPO_4 (28 mg/L) (Rodríguez Chueca, 2013). La **Tabla 1** compara las principales propiedades fisicoquímicas de la muestra SE con las características de un efluente real (Rodríguez Chueca, 2013),

Figura 1. Esquema de la planta piloto de lodos activos, ubicada en el Laboratorio de Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza.

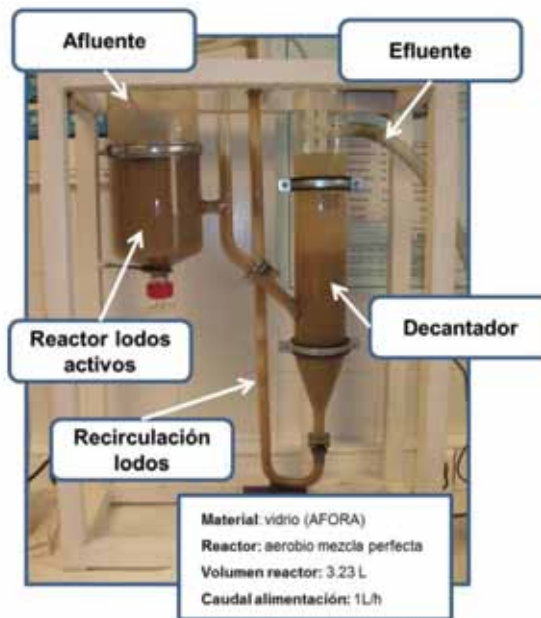


Tabla 1. Características fisicoquímicas y microbiológicas del efluente de agua residual sintética (SE) y del efluente de aguas residuales reales (Rodríguez Chueca, 2013).

Parámetro	SE	Efluente real
pH	8,20 ± 0,30	7,68 ± 0,58
Conductividad ($\mu S/cm$)	560 ± 12	1.991 ± 1.073
Turbidez (NTU)	81 ± 13	40 ± 49
Sólidos en suspensión total (mg/L)	11 ± 2	33 ± 21
COD (mg/L)	21 ± 4	19 ± 7
DQO (mg/L)	44 ± 9	72 ± 24
O ₂ disuelto (mg/L)	7 ± 1	5 ± 2
[NH ₄ ⁺] (mg/L)	38 ± 10	10 ± 8
<i>E. coli</i> (CFU/100 mL)	10 ² – 10 ³	10 ⁵ – 10 ⁶
<i>Enterococcus sp.</i> (CFU/100 mL)	10 ² – 10 ³	10 ⁴ – 10 ⁵

mientras que la **Tabla 2** muestra la metodología utilizada en el análisis de los diferentes parámetros fisicoquímicos.

Para llevar a cabo este trabajo de investigación se inocularon cepas salvajes de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* en las muestras SE. Dichas cepas salvajes fueron aisladas de efluentes reales de diferentes EDAR de la cuenca del río Ebro (España). Se preparan cultivos jóvenes y puros en medio de cultivo nutritivo (Scharlau, Panreac) y se incubó a 37 °C durante

cooccus sp. en las muestras SE. Dichas cepas salvajes fueron aisladas de efluentes reales de diferentes EDAR de la cuenca del río Ebro (España). Se preparan cultivos jóvenes y puros en medio de cultivo nutritivo (Scharlau, Panreac) y se incubó a 37 °C durante



Tabla 2. Metodología analítica para la caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de agua. N0ta: ¹Eaton *et al.*, 2005.

Parámetro	Método	Referencia
pH (T)	SM4500- H ⁺ B	Standard Methods ¹
Conductividad	7888:1985	UNE – EN ISO
Turbidez	7027:1999	ISO
Sólidos en suspensión total	SM 2540-D	Standard Methods ¹
COD	5310-B	Standard Methods ¹
DQO	410.4	EPA
O ₂	4500-O G	Standard Methods ¹
<i>E. coli</i>	9308-1:2000	UNE – EN ISO
<i>Enterococcus sp.</i>	7899-2:2000	UNE – EN ISO

24 h. Tras la incubación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada en suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%). Estas concentraciones bacterianas se adicionan a la muestra SE con el objetivo de obtener una concentración microbiana entre 10⁶-10⁷ CFU/100 mL para *Enterococcus sp.* y 10⁵-10⁶ CFU/100 mL para *Escherichia coli*.

2.2. Determinación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.*

El análisis de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* se realiza de acuerdo a la concentración final de los microorganismos en la muestra. Cuando la concentración de los microorganismos fue inferior a 600 CFU/100 mL, el cultivo y enumeración se lleva a cabo mediante el método de filtración por membrana (Standard Method 9215D; Eaton *et al.*, 2005), utilizando filtros de nitrato de celulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm (Millipore). El análisis de *Escherichia coli* se realiza de acuerdo al procedimiento UNE-EN ISO 9308-1, mientras que el cultivo y enumeración de *Enterococcus sp.* se lleva a cabo a través del procedimiento UNE-EN ISO

7899-2:2000. El límite de detección (LD) de este método experimental se sitúa en 1 CFU/100 mL.

Así mismo, cuando la concentración de los microorganismos es superior a 600 CFU/100mL, el cultivo y enumeración de los microorganismos se realiza mediante el método de placa difusa (Standard Method 9215C; Eaton *et al.*, 2005) a través del sistema de diluciones seriadas en suero fisiológico estéril. El límite de detección de este método experimental es de 200 CFU/100 mL.

En ambos métodos de análisis, las muestras se disponen sobre medios de cultivo selectivos como son MacConkey Agar (Scharlau, España) para *E. coli* y Slanetz & Bartley Agar (Scharlau, España) para *Enterococcus sp.* Las colonias de *E.coli* y *Enterococcus sp.* se cuentan tras un tiempo y temperatura de incubación de 24 h a 42 °C y 48 h a 37 °C, respectivamente.

La enumeración de las colonias se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC o CFU por su siglas en inglés, *colony-forming units*) por 100 mL de muestra. Estas concentraciones se transforman a base logarítmica, y la inactivación

bacteriana, $D = \text{Log} (N_t/N_0)$ se calcula teniendo en cuenta la concentración bacteriana inicial (N_0) y la concentración bacteriana al tiempo t (N_t).

2.3. Reactivos y análisis

Para llevar a cabo los tratamientos pseudo-Fenton se utiliza cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Probus, España) para obtener concentraciones de 2, 5 y 10 mgFe³⁺/L. La concentración final de hierro total y disuelto a pH 5 fue analizada mediante el método de la fenantrolina 3500-B (Eaton *et al.*, 2005), utilizando el fotómetro multiparámetro Hanna HI 83099, con el objetivo de controlar el hierro precipitado.

Además, se utiliza peróxido de hidrógeno (30%, v/v, Carlo Erba) en concentraciones (20, 25 y 50 mg/L) para llevar a cabo los tratamientos H₂O₂/oscuridad, H₂O₂/radiación UV-vis y pseudo-Fenton. La adición de peróxido de hidrógeno se establece al inicio de la reacción. Por lo tanto, se toma dicho instante como el tiempo cero del tratamiento y es preciso tomar muestras previas a esta adición, que serán las que se tomen como tiempo 0. Transcurrido este tiempo, es necesaria la neutralización del peróxido de hidrógeno utilizando Catalasa (Sigma Aldrich, Estados Unidos). La concentración de H₂O₂ se monitoriza a través de tiras de análisis semicuantitativo (test Peroxides, Merck Merckoquant). En todos los tratamientos se observó presencia de peróxido de hidrógeno residual tras la finalización de los mismos.

En último lugar, para llevar a cabo los tratamientos fotoasistidos se utiliza como fuente de radiación UV-vis una cámara solar Atlas Sun-test CPS+. Esta cámara está equipada con una lámpara de xenón que simula la luz solar natural. Además, incluye un sistema de agitación, fil-

tro de cuarzo y un filtro de 'vidrio de ventana', de manera que la irradiación que llega a las muestras lo hace con una longitud de onda entre 320 y 800 nm. De este modo, se simula la radiación solar que alcanza la superficie terrestre y se limitan las longitudes de onda a aquellas que no son letales para las células.

2.4. Tratamiento de datos

El análisis estadístico de los resultados se realiza con la ayuda de la versión para Windows de Minitab. Este software estadístico posee una

hoja de cálculo para el análisis de datos y permite realizar diseños de experimentos, obtención de gráficos, parámetros estadísticos y la obtención de modelos reducidos entre otros. Esta herramienta resulta muy útil en el estudio de experimentos con múltiples variables, permitiendo ver cómo se comportan de forma independiente y de forma combinada respecto al factor respuesta (Montgomery, 2001; Mosteo *et al.*, 2006; Rodríguez Chueca *et al.*, 2012). De este modo, se fijan los valores de las variables a estudiar, se establece

un intervalo de confianza del 95% y Minitab genera varios tipos de representaciones a partir del análisis de los resultados obtenidos, entre las que destacan:

- Gráfica del efecto de cada variable sobre el factor respuesta: se estima el efecto de cada variable sobre el factor respuesta y se representa la media de la inactivación obtenida para cada variable y para cada uno de los dos niveles seleccionados. La pendiente de la recta obtenida para cada variable es indicativa de la influencia de dicha variable sobre el

Tabla 3. Valores de inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* ($D \pm S$ log) tras 30 minutos de tratamiento radiación UV-vis, H_2O_2 /oscuridad, H_2O_2 /radiación UV-vis, pseudo-Fenton en ausencia y presencia de radiación, realizados tanto a pH 5 como al pH natural de las muestras.

[Fe ³⁺] mg/L	[H ₂ O ₂] mg/L	Radiación	pH 5		pH natural	
			<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Tratamiento radiación UV-vis						
0	0	On	-0,4 ± 0,05	-0,34 ± 0,09	-0,09 ± 0,02	-0,58 ± 0,19
Tratamientos H₂O₂/radiación UV-vis						
0	20	On	-1,54 ± 0,29	-3,30 ± 0,35	-1,58 ± 0,08	-0,61 ± 0,14
0	25	On	-1,83 ± 0,25	-1,35 ± 0,42	-0,27 ± 0,22	-0,43 ± 0,24
0	50	On	-0,17 ± 0,08	-0,69 ± 0,06	-0,25 ± 0,24	-0,54 ± 0,21
Tratamientos H₂O₂/Oscuridad						
0	20	Off	-0,62 ± 0,26	-1,59 ± 0,18	-0,69 ± 0,27	-0,20 ± 0,005
0	25	Off	-0,41 ± 0,12	-1,65 ± 0,10	-0,33 ± 0,06	-0,29 ± 0,12
0	50	Off	-0,16 ± 0,08	-0,30 ± 0,24	-0,43 ± 0,11	-0,41 ± 0,03
Tratamientos pseudo-Fenton (oscuridad)						
2	20	Off	-1,03 ± 0,12	-2,04 ± 0,25	-0,36 ± 0,08	-0,14 ± 0,04
5	20	Off	-0,31 ± 0,18	-1,08 ± 0,21	-0,22 ± 0,19	-0,11 ± 0,03
5	25	Off	-0,67 ± 0,06	-0,54 ± 0,02	-0,52 ± 0,03	-0,65 ± 0,00
10	50	Off	-0,41 ± 0,02	-1,44 ± 0,82	-0,19 ± 0,02	-0,27 ± 0,08
Tratamientos pseudo-Fenton/radiación UV-vis						
2	20	On	-0,52 ± 0,12	-2,76 ± 0,43	-1,38 ± 0,08	-0,69 ± 0,00
5	20	On	-1,42 ± 0,27	-5,29 ± 1,50	-0,07 ± 0,11	-0,20 ± 0,08
5	25	On	-1,51 ± 0,22	-4,87 ± 0,10	-2,13 ± 0,54	-1,44 ± 0,00
10	50	On	-0,50 ± 0,28	-1,59 ± 0,06	-0,75 ± 0,00	-2,17 ± 0,00



factor respuesta. A mayor pendiente, la influencia sobre el factor respuesta es más importante.

- Gráfica de interacciones entre variables: una gráfica de interacción muestra el impacto que tiene el cambio de la configuración de un factor sobre otro factor. Debido a que una interacción puede aumentar o disminuir los efectos principales, la evaluación de las interacciones es extremadamente importante. Se considera que una interacción entre dos variables es poco significativa cuando su representación en la gráfica es de líneas paralelas o casi paralelas. En cambio, la interacción entre las variables se aprecia cuando las líneas se cortan o tienen tendencia a cortarse.

3. Resultados y discusión

La **Tabla 3** muestra los resultados de desinfección de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* obtenidos tras la aplicación de los diferentes tratamientos estudiados (radiación UV-vis, H₂O₂/oscuridad, H₂O₂/radiación UV-vis, pseudo-Fenton en ausencia y presencia de radiación) durante 30 minutos en las condiciones de operación propuestas tanto a pH 5 como al pH natural de las muestras de agua.

En la **Tabla 3** se puede observar cómo la aplicación de H₂O₂ en el rango 20-50 mg/L en condiciones de ausencia de radiación no tiene un elevado poder desinfectante, observándose el máximo rendimiento con concentraciones alrededor de 20 y 25 mg/L, y no a 50 mg/L como se podría pensar. Y es que aunque altas dosis de H₂O₂ aumentan la generación de radicales oxidantes, una dosis excesiva puede provocar el efecto contrario (Wang y Lemley, 2001; Maezono et al., 2011).

Otros investigadores han estudiado el efecto del peróxido de hidró-

Escherichia coli es el indicador de contaminación fecal más utilizado en el análisis de muestras de agua y aguas residuales

geno en oscuridad sobre las poblaciones bacterianas seleccionadas en esta investigación. Rincón y Pulgarín (2004) obtienen resultados de inactivación de *Escherichia coli* similares a los presentados en la **Tabla 3** cuando realizan ensayos con 10 mg/L de H₂O₂/oscuridad a 30 minutos. Sin embargo, Ortega-Gómez et al. (2012) muestran resultados de inactivación de *Enterococcus sp.* próximos a 0,50 log para 30 minutos de tratamiento con 120 mg/L de H₂O₂/oscuridad, concentración muy superior a la utilizada en este estudio. Imlay y Linn (1986) distinguen dos tipos de inactivación provocada por el peróxido de hidrógeno y relacionada con la concentración de H₂O₂ exógeno adicionado. El primer modo de inactivación está relacionado con la aplicación de bajas concentraciones entre 30 y 100 mg/L y la otra vía de inactivación, con concentraciones superiores a 680 mg/L.

Para bajas concentraciones de H₂O₂ se atribuye al daño del DNA celular a través de reacciones Fenton intracelular. Por lo tanto, a la vista de los resultados presentados en este estudio, la adición de 25 mg/L (0,75 mM) podría estar participando en una reacción Fenton intracelular, aunque como se puede observar, con un poder desinfectante no muy significativo.

Así mismo, se puede observar cómo los tratamientos H₂O₂/radiación UV-vis (**Tabla 3**) obtienen mayores resultados de desinfección a pH 5

que al pH natural de las muestras. Además, de nuevo se aprecia cómo un aumento en la concentración de H₂O₂ no supone un aumento en el rendimiento de inactivación, invirtiéndose el efecto al añadir 50 mgH₂O₂/L. De este modo, los mejores resultados de eliminación bacteriana se obtienen de nuevo con concentraciones de H₂O₂ de 20 y 25 mg/L. Los valores de desinfección más altos se alcanzan para *Escherichia coli* (3,30 ± 0,35 log) utilizando 20 mg/L de H₂O₂ a pH 5 y *Enterococcus sp.* (1,83 ± 0,25 log) con 25 mg/L de H₂O₂ a pH 5.

Varios autores describen la inactivación bacteriana tras tratamientos H₂O₂/radiación UV-vis artificial. Lanao et al. (2012) consiguen una inactivación de 0,25 log sobre poblaciones de *Enterococcus sp.* presentes en aguas prepotables tras 30 minutos de tratamiento con 1,40 mg/L de H₂O₂/radiación UV-vis artificial (λ = 320-800 nm), aumentando a 8 log con radiación UV-B, UV-A y visible (λ = 290-800 nm), mientras que Ortega-Gómez et al. (2012) alcanzan un valor de 5 log de inactivación de *Enterococcus sp.* tras 120 minutos de tratamiento con 120 mg/L de H₂O₂ combinado con radiación UV-vis artificial (λ = 320-800 nm). Sin embargo, a los 30 minutos de tratamiento, el rendimiento obtenido no supera los 0,50 log.

A continuación se detallan los resultados de inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* tras realizar los tratamientos pseudo-Fenton en ausencia de radiación con diferentes dosis de Fe³⁺ y H₂O₂ durante 30 minutos (**Tabla 3**). Cuando el tratamiento se lleva a cabo a pH 5, los valores de inactivación alcanzados son ligeramente superiores a los obtenidos de manera independiente por cada uno de los agentes (tratamiento UV-vis y H₂O₂/oscuridad). En

El proceso pseudo-Fenton asistido con radiación UV-vis artificial aumenta el rendimiento de inactivación microbiana respecto a los mismos tratamientos en ausencia de radiación. La radiación UV-vis no solo incrementa la generación de radicales hidróxilo a través del proceso Fenton, sino que también genera un estrés adicional en las poblaciones bacterianas

cambio, si el proceso pseudo-Fenton se lleva a cabo al pH natural de las muestras, se alcanzan menores rendimientos de inactivación sobre las poblaciones bacterianas estudiadas. El principal motivo radica en la cantidad de hierro precipitado, superior cuanto mayor es el valor de pH, y que, por lo tanto, dificulta la reacción Fenton.

El pH óptimo para llevar a cabo los tratamientos Fenton es 2,8, puesto que a este valor de pH toda la cantidad de hierro adicionada se encuentra disuelto, por lo que la formación de radicales hidróxilo aumenta. Sin embargo, al trabajar a valores de pH neutro o cercano a la neutralidad (pH 5), se evitan costes adicionales como la acidificación previa del agua y su posterior neutralización.

Otros autores han investigado la inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* mediante procesos pseudo-Fenton en ausencia

de radiación UV-vis. Ortega-Gómez *et al.* (2012) muestran un valor de inactivación de *Enterococcus sp.* alrededor de 0,60 log tras 30 minutos de tratamiento con dosis de 10 mg/L de Fe^{2+} y 120 mg/L de H_2O_2 al pH natural del agua, reducción similar a la alcanzada en esta investigación a pesar de utilizar concentraciones muy superiores de peróxido de hidrógeno. Moncayo-Lasso *et al.* (2009) aplican el proceso Fenton a pH natural con dosis de 0,60 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2 para la inactivación de *Escherichia coli*, alcanzando reducciones de 1 log tras 30 minutos de tratamiento.

Finalmente, tal y como se muestra en la **Tabla 3**, el proceso pseudo-Fenton asistido con radiación UV-vis artificial aumenta el rendimiento de inactivación microbiana respecto a los mismos tratamientos en ausencia de radiación. La radiación UV-vis no solo incrementa la generación de radicales hidróxilo a través del pro-

ceso Fenton (**ecuación 3**), sino que también genera un estrés adicional en las poblaciones bacterianas.

El análisis de los resultados de inactivación muestra que *Escherichia coli* es más sensible al proceso de desinfección que *Enterococcus sp.* El principal motivo radica en la fina membrana celular de *Escherichia coli*, bacteria Gram negativa, frente al grueso recubrimiento que posee *Enterococcus sp.*, bacteria Gram positiva, y que, por tanto, le confiere una mayor resistencia ante cualquier agresión externa o estrés provocado. Este comportamiento se observa también en todos los tratamientos descritos anteriormente. Además, los mejores resultados de inactivación se obtienen a pH 5 con 5 mg/L de Fe^{3+} y 20 o 25 mg/L de H_2O_2 en presencia de radiación, siendo de $5,29 \pm 1,50$ y $4,87 \pm 0,10$ log respectivamente para *Escherichia coli*, y $1,42 \pm 0,27$ y $1,51 \pm 0,22$ log respectivamente en el caso de *Enterococcus sp.*

Tras el análisis de los resultados de inactivación mostrados en la **Tabla 3**, se observa que los tratamientos con 20 mg/L de H_2O_2 son los que obtienen mayores rendimientos de inactivación de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* De este modo, se decide fijar la variable concentración de H_2O_2 y estudiar estadísticamente con la herramienta informática Minitab las variables pH, presencia y ausencia de radiación UV-vis, concentración de Fe^{3+} y tipo de microorganismo. Los niveles escogidos para cada una de las variables se muestran en la **Tabla 4**.

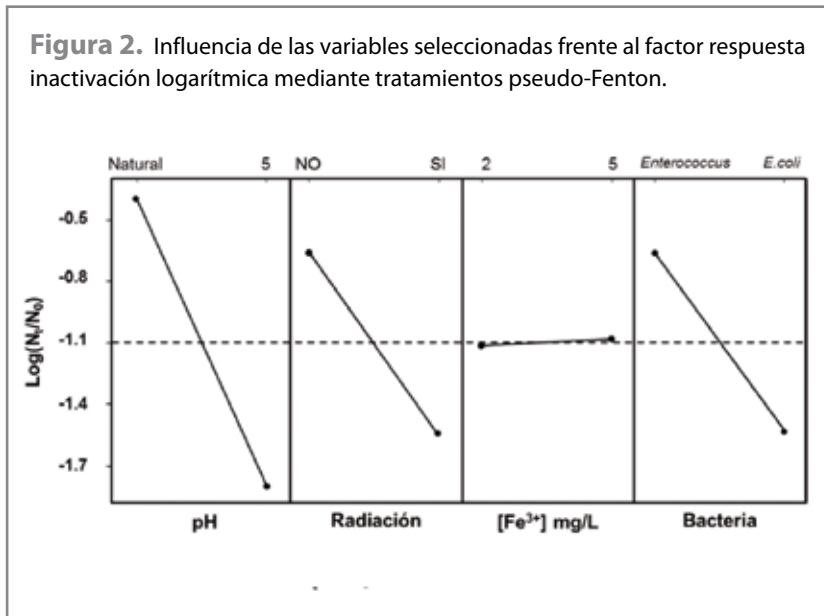
En la **Figura 2** se representan los efectos de cada una de las variables seleccionadas sobre la inactivación logarítmica en tratamientos pseudo-Fenton. Se puede observar cómo el pH y la radiación UV-vis tienen una influencia positiva sobre el factor respuesta, es decir, a pH 5 los resultados

Tabla 4. Niveles de las variables en los tratamientos pseudo-Fenton sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.*

Variables	Nivel bajo	Nivel alto
$[Fe^{3+}]$ mg/L	2	5
pH	5	natural
Radiación	Ausencia / Presencia radiación UV-vis	
Bacteria	<i>Enterococcus sp.</i> / <i>Escherichia coli</i>	



Figura 2. Influencia de las variables seleccionadas frente al factor respuesta inactivación logarítmica mediante tratamientos pseudo-Fenton.



de inactivación aumentan respecto a los obtenidos trabajando al pH natural de las muestras. Lo mismo ocurre con la radiación, alcanzándose mejores rendimientos de inactivación bacteriana en presencia de radiación UV-vis que en ausencia de ella.

Además, en la misma **Figura 2** se aprecia cómo los tratamientos pseudo-Fenton tienen una mayor influencia sobre las poblaciones de *Escherichia coli*, pues la desinfección alcanzada es mayor que la obtenida sobre *Enterococcus sp.* Finalmente, con la variable concentración de hierro se observa que un aumento de la misma en el rango estudiado no tiene influencia sobre el factor respuesta inactivación bacteriana, por lo que de este modo se confirman los resultados mostrados previamente en la **Tabla 3**.

Una vez determinada la influencia de cada una de las variables seleccionadas por separado, en la **Figura 3** se muestra su interacción. Así, la interacción más significativa para ambas formas celulares es la combinación [Fe³⁺] - Bacteria, pues sus líneas de tendencia se cortan. Tanto para una dosis de 2 como de 5 mg/L de Fe³⁺ se obtienen mejores rendi-

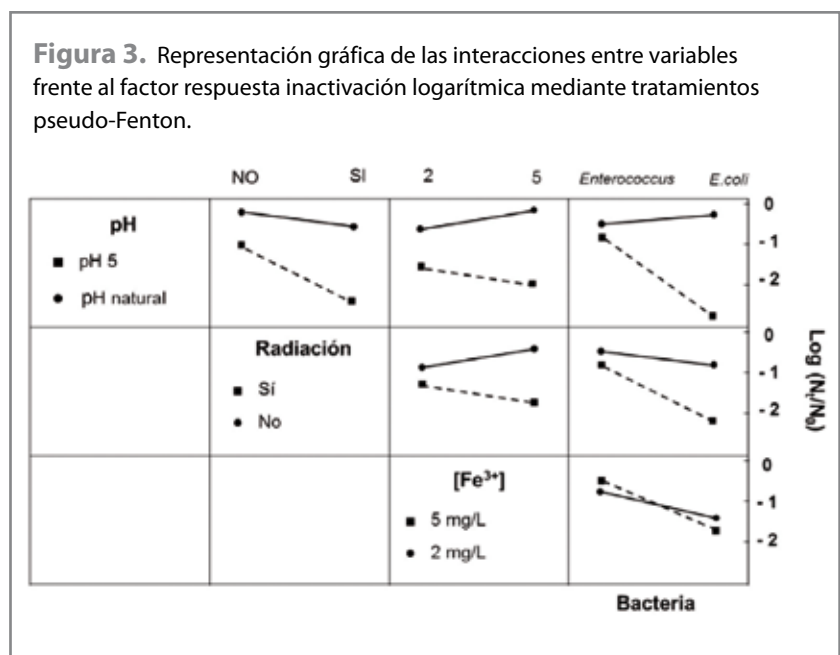
mientos de inactivación sobre *Escherichia coli* que sobre *Enterococcus sp.*, siendo ligeramente superiores con 5 mg/L de Fe³⁺. Sin embargo, para el caso de *Enterococcus sp.* los mejores rendimientos de inactivación se alcanzan con la dosis de hierro más baja. Además, el resto de interacciones entre variables tienen cierta importancia al existir tendencia a cruzarse entre las líneas.

De este modo, en ausencia de radiación UV-vis, los resultados a pH

5 son mejores que los obtenidos al pH natural de las muestras, aumentando en ambos casos cuando los tratamientos se llevan a cabo en presencia de radiación. El aumento de la concentración de Fe³⁺ solo tiene un efecto significativo sobre el factor respuesta cuando los tratamientos se llevan a cabo a pH 5 y en presencia de radiación UV-vis, mientras que cuando los tratamientos se llevan a cabo al pH natural de las muestras, el aumento de la dosis de hierro en el rango seleccionado no aumenta el rendimiento de inactivación.

Finalmente, se observa que a pH 5 se obtienen mejores rendimientos de inactivación logarítmica sobre *Escherichia coli*, mientras que al pH natural los rendimientos son ligeramente mejores para el caso de *Enterococcus sp.* Sin embargo, en ambos casos los tratamientos a pH 5 obtienen mejores rendimientos que al pH natural. Así mismo, tanto en presencia como en ausencia de radiación UV-vis artificial los mejores rendimientos de inactivación se alcanzan sobre *Escherichia coli*, siendo esta mejora en el rendimiento superior en presencia de radiación.

Figura 3. Representación gráfica de las interacciones entre variables frente al factor respuesta inactivación logarítmica mediante tratamientos pseudo-Fenton.



4. Conclusiones

Tras los resultados obtenidos en este estudio puede concluirse que:

- La eficacia de desinfección de los tratamientos pseudo-Fenton depende de un elevado número de variables; en concreto del pH del agua, del estado físico del hierro utilizado y su concentración, la presencia o ausencia de radiación UV-vis, así como del tipo de microorganismo que se quiere eliminar. En general, para el tratamiento de aguas residuales depuradas al pH natural, estos procesos son menos eficaces que los tratamientos H₂O₂/radiación UV-vis. Los mejores resultados de inactivación se obtienen con el tratamiento pseudo-Fenton asistido con radiación UV-vis a pH 5 con 5 mg/L de Fe³⁺ y 20 mg/L de H₂O₂.

- A pesar de que el H₂O₂ no genera ROS mediante irradiación con energía de longitud de onda mayor o igual que 280 nm, cuando este se utiliza en dosis de 20-25 mg/L se observa un gran poder desinfectante sobre *E. coli*, posiblemente como consecuencia de los radicales generados a través de una reacción Fenton en la que participa el hierro intracelular de la bacteria. Este efecto también se observa, aunque en menor medida, sobre *Enterococcus sp.*

- La población de *Enterococcus sp.* presenta una mayor resistencia que *Escherichia coli* a los tratamientos estudiados. Este comportamiento puede deberse a diferencias estructurales de la membrana celular de las bacterias Gram-negativa y las bacterias Gram-positiva. Por esta razón, se sugiere el uso de *Enterococcus sp.* como indicador de la calidad del agua en lugar de *E. coli*.

5. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la financiación obtenida por el grupo de

investigación consolidado T33 a través de DGA-FSE, y al MICINN-FEDER por la financiación de esta investigación incluida dentro del proyecto 'Regeneración de aguas depuradas mediante procesos de oxidación avanzada (CTM2008-01876/TEC-NO)'. Además, los autores también quieren agradecer a la Diputación General de Aragón por la beca predoctoral otorgada a Jorge Rodríguez Chueca.

Bibliografía

- [1] Bueno, J.L. (1997). Contaminación e ingeniería ambiental. Contaminación de las Aguas. Editorial F.I.C.Y.T.
- [2] Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E.; Franson, M.A.H. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. APA-AWWA-WEF, 21ª edición.
- [3] Fenton, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. Journal of Chemical Society of London, núm. 65, págs. 899-910.
- [4] Haber, F.; Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society, núm. 134, págs. 332-351.
- [5] Imlay, J.A.; Linn, S. (1986). Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. Journal of Bacteriology, núm. 166, págs. 519-527.
- [6] Lanao, M.; Ormad, M.P.; Mosteo, R.; Ovelleiro, J.L. (2012). Inactivation of *Enterococcus sp.* by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water. Solar Energy, núm. 86, págs. 619-625.
- [7] Malato, S.; Fernández Ibáñez, P.; Maldonado, M.I.; Blanco, J.; Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. Catalysis Today, núm. 147, págs. 1-59.
- [8] Marín Galvín, R. (2003). Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de la calidad de las aguas. Ediciones Díaz de Santos, Madrid (España).
- [9] Miguel, N.; Ormad, M.P.; Mosteo, R.; Ovelleiro, J.L. (2012). Photocatalytic degradation of pesticides in natural water: effect of hydrogen peroxide. International Journal of Photoenergy. DOI:10.1155/2012/371714.
- [10] Montgomery, D.C. (2001). Design and analysis of experiments. Wiley, New York (Estados Unidos), 5ª edición.
- [11] Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Mozas, E.; Sarasa, J.; Ovelleiro, J.L. (2006). Factorial experimental design of winery wastewaters treatment by heterogeneous photo-Fenton process. Water Research, núm. 40, págs. 1.561-1.568.
- [12] Mosteo, R.; Miguel, N.; Martín Muniesa, S.; Ormad, M.P.; Ovelleiro, J.L. (2009). Evaluation of trihalomethane formation potential in function of oxidation processes used during the drinking water production process. Journal of Hazardous Materials, núm. 172, págs. 661-666.
- [13] Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Goñi P.; Rodríguez Chueca, J.; García, A.; Clavel, A. (2013). Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities, Water Science & Technology, núm. 68(3), págs. 575-583.
- [14] Ormad, M.P.; Miguel, N.; Lanao, M.; Mosteo, R.; Ovelleiro, J.L. (2010). Effect of application of ozone and ozone combined with hydrogen peroxide and titanium dioxide in the pesticides removal from water. Ozone Science and Engineering, núm. 32, págs. 25-32.
- [15] Ortega Gómez, E.; Fernández Ibáñez, P.; Ballesteros Martín, M.M.; Polo López, M.I.; Esteban García, B.; Sánchez Pérez, J.A. (2012). Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival. Water Research, núm. 46, págs. 6.154-6.162.
- [16] Moncayo Lasso, A.; Sanabria, J.; Pulgarín, C.; Benítez, N. (2009). Simultaneous *E. coli* inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor. A new way for enhancing solar disinfection of natural water. Chemosphere, núm. 77, págs. 296-300.
- [17] Pignatello, J.J.; Oliveros, E.; MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. Critical Reviews of Environmental Science & Technology, núm. 36, págs. 1-84.
- [18] RD 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado 54, 21 de febrero de 2003.
- [19] RD 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Boletín Oficial del Estado 294, de 8 de diciembre de 2007.
- [20] Rincón A.G.; Pulgarín, C. (2004). Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂. Implications in solar water disinfection. Applied Catalysis B: Environmental, núm. 51, págs. 283-302.
- [21] Rizzo, L.; Sannino, D.; Vaiano, V.; Sacco, O.; Scarpa, A.; Pietrogiamici, D. (2014). Effect of solar simulated N-doped TiO₂ photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an *E. coli* strain in biologically treated urban wastewater. Applied Catalyst B: Environmental, núm. 144, págs. 369-378.
- [22] Rodríguez Chueca, J.; Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Ovelleiro, J.L. (2012). Factorial experimental design applied to *Escherichia coli* disinfection by Fenton and photo-Fenton processes. Solar Energy, núm. 86, págs. 3.260-3.267.
- [23] Rodríguez Chueca, J.; Morales, M.; Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Ovelleiro, J.L. (2013). Inactivation of *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* present in treated urban wastewater by coagulation-flocculation and photo-Fenton processes. Photochemical and Photobiological Sciences, núm. 12, págs. 864-871.
- [24] Rodríguez Chueca, J. (2013). Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza (España).
- [25] Rodríguez Chueca, J.; Polo López, M.I.; Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Fernández Ibáñez, P. (2014). Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using mild solar photo-Fenton. Applied Catalysis B: Environmental, núm. 150-151, págs. 619-629.
- [26] UNE-EN ISO 7899-2. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración de membrana. AENOR. Mayo de 2001
- [27] UNE-EN ISO 9308-1. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración en membrana. AENOR. Octubre de 2001.