

INACTIVACIÓN DE FITOPATÓGENOS PRESENTES EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS SOLAR



MARÍA INMACULADA POLO LÓPEZ
PILAR FERNÁNDEZ IBÁÑEZ
ISABEL OLLER ALBEROLA



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

Ciemat

Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas

INACTIVACIÓN DE FITOPATÓGENOS PRESENTES EN AGUA MEDIANTE FOTOCATÁLISIS SOLAR

MARÍA INMACULADA POLO LÓPEZ

PILAR FERNÁNDEZ IBÁÑEZ

ISABEL OLLER ALBEROLA

Es propiedad:

EDITORIAL CIEMAT
Avda. Complutense, 40
28040-MADRID
2013

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M-35016-2013
ISBN: 978-84-7834-709-4
NIPO: 721-13-061-6

El CIEMAT no comparte necesariamente las opiniones y juicios expuestos en este documento,
cuya responsabilidad corresponde únicamente a los autores.

Este trabajo de investigación se ha realizado en el marco del proyecto FITOSOL (Referencia AGL2006-12791-C02-01): “Eliminación de fitopatógenos en agua mediante fotocatálisis: aplicación a la desinfección y reutilización de soluciones nutritivas en cultivos hidropónicos recirculantes”, el cual se ha coordinado y realizado en la Plataforma Solar de Almería (grupo de Tratamiento Solar de Aguas) del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), en colaboración con la Universidad de Almería (Departamento de Ingeniería Química).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problemática del agua	2
1.1.1. El consumo urbano y el desarrollo industrial	5
1.1.2. El consumo agrícola	8
1.2. Normativa de regulación del agua y Ley Española de reutilización	10
1.3. Principales microorganismos patógenos en ambientes acuáticos	16
1.3.1. El género <i>Fusarium</i>	20
1.3.2. El género <i>Phytophthora</i>	23
1.4. Técnicas convencionales de desinfección del agua	25
1.4.1. Eliminación física de microorganismos	26
1.4.1.1. <i>Filtración con membranas</i>	26
1.4.1.2. <i>Radiación ultravioleta</i>	28
1.4.2. Eliminación química de microorganismos	31
1.4.2.1. <i>Desinfección química con cloro y derivados</i>	31
1.4.2.2. <i>Desinfección con ozono (O₃)</i>	33
1.4.3. Técnicas de potabilización doméstica	34
1.4.4. Técnicas de desinfección en agricultura	36
1.4.4.1. <i>Tratamientos físicos</i>	36
1.4.4.2. <i>Tratamientos químicos</i>	37
1.5. La radiación solar y su efecto germicida	38
1.5.1. Radiación solar terrestre	38
1.5.2. Desinfección de agua con radiación solar	40
1.6. Captadores Solares CPC	43
1.7. Procesos Avanzados de Oxidación	48
1.7.1. Fotocatálisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO ₂)	49
1.7.1.1. <i>Fundamentos</i>	49

1.7.1.2. Capacidad de la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 para la desinfección de aguas	52
1.7.1.3. Evaluación de la eficiencia fotocatalítica en desinfección	55
1.7.1.4. Experiencias con energía solar natural	57
1.7.1.5. Dióxido de titanio inmovilizado	58
1.7.1.6. Dióxido de titanio modificado	59
1.7.2. Fotocatálisis homogénea mediante foto-Fenton	60
1.7.2.1. Fundamentos	60
1.7.2.2. Desinfección de agua con foto-Fenton	64
1.7.3. Peróxido de hidrogeno y radiación solar	66
2. MATERIALES Y MÉTODOS	69
2.1. Microorganismos: clasificación, características y generación	69
2.1.1. El género <i>Fusarium</i>	69
2.1.2. El género <i>Phytophthora</i>	72
2.2. Técnicas de cuantificación de microorganismos	76
2.2.1. Recuento en placa	76
2.2.2. Recuento directo al microscopio	79
2.3. Tipos de agua utilizadas en el trabajo experimental	80
2.3.1. Agua destilada	80
2.3.2. Agua natural de pozo	80
2.3.3. Agua simulada de salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)	81
2.3.4. Efluente real de una EDAR	82
2.4. Técnicas analíticas	83
2.4.1. Cromatografía iónica . Determinación de aniones y cationes inorgánicos	83
2.4.2. Carbono Orgánico Disuelto	85
2.4.3. Turbidez del agua	87
2.4.4. pH, Oxígeno Disuelto, temperatura y conductividad	88
2.4.5. Hierro en muestras de agua (ISO 6332)	88
2.4.6. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en muestras de agua	90
2.4.7. Dióxido de titanio	91

2.5. Reactores solares	94
2.5.1. Reactor de botella	94
2.5.2. Reactor solar CPC de 14 L	96
2.5.3. Prototipo de foto-reactor solar CPC de 60 L	97
2.6. Medida y evaluación de la radiación UV solar	99
2.7. Procedimiento Experimental	101
2.7.1. Ensayos solares	101
2.7.2. Ensayos de control en oscuridad	103
2.7.3. Evaluación del efecto germicida de la radiación solar	103
2.8. Modelos cinéticos y ajuste estadístico de datos	104
2.8.1. Descripción de los modelos de inactivación con radiación UV	104
2.8.2. Aplicación de los modelos a las cinéticas experimentales	107
 3. DESINFECCIÓN FOTOCATÁLITICA CON TiO₂	109
3.1. Evaluación del proceso de inactivación de <i>F. solani</i> en reactor de botella y CPC de 14 L	109
3.1.1. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> en reactor de botella con agua destilada	109
3.1.2. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> en reactor solar CPC de 14 L con agua destilada	113
3.1.3. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> en reactor solar CPC de 14 L con agua natural de pozo	117
3.2. Influencia del tipo de espora en el tratamiento TiO₂/Solar	120
3.2.1. Estudio de la interacción entre espora y catalizador	123
3.3. Escalado del proceso de desinfección fotocatalítica con TiO₂ a reactor CPC de 60 L	127
3.3.1. Parámetros de cálculo utilizados para el diseño del reactor fotocatalítico solar de 60 L	127
3.3.2. Evaluación de la capacidad fotocatalítica del reactor CPC de 60 L	132
3.3.2.1. Selección del caudal de operación	132
3.3.2.2. Inactivación de microconidios en agua destilada y en agua natural de pozo	133
3.3.2.3. Inactivación de macroconidios en agua destilada y agua natural de pozo	137

3.3.2.4. Inactivación de clamidosporas en agua destilada y agua natural de pozo	139
3.3.3. Ajuste cinético de los resultados de desinfección en el reactor CPC de 60 L	140
3.4. Post-tratamiento del TiO₂ para su recuperación	142
4. DESINFECCIÓN DE AGUA MEDIANTE H₂O₂ Y RADIACIÓN SOLAR	145
4.1. Evaluación de la autodescomposición del H ₂ O ₂	145
4.2. Inactivación de esporas de <i>F. equiseti</i> mediante H ₂ O ₂ /Solar en reactor de botella	150
4.2.1. Confirmación del proceso foto-Fenton en el interior de las esporas	159
4.3. Efecto de la radiación visible y UV-A en el tratamiento H ₂ O ₂ /Solar	163
4.4. Inactivación de <i>F. equiseti</i> mediante H ₂ O ₂ /Solar en reactor CPC de 60 L	165
4.5. Cinéticas de desinfección del tratamiento H ₂ O ₂ /Solar	169
5. DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR	171
5.1. Efecto del pH en el proceso foto-Fenton, H ₂ O ₂ /Solar y foto-inactivación solar en la inactivación de microconidios de <i>F. solani</i>	172
5.1.1. Influencia del proceso de Fenton en la viabilidad fúngica	172
5.1.2. Influencia del pH en la foto-inactivación solar	174
5.1.3. Influencia del pH en el tratamiento H ₂ O ₂ /Solar	176
5.1.4. Influencia del pH en el foto-Fenton solar	179
5.1.4.1. Foto-Fenton a pH 8	179
5.1.4.2. Foto-Fenton a pH 5	179
5.1.4.3. Foto-Fenton a pH 4	180
5.1.4.4. Foto-Fenton a pH 3	180
5.1.5. Influencia de la concentración de reactivos en el foto-Fenton solar	184
5.1.6. Comparación de H ₂ O ₂ /Solar y foto-Fenton a pH 3	185
5.1.7. Cinéticas de inactivación	187

5.2. Efecto de los parámetros de operación sobre el foto-Fenton solar en la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	188
5.2.1. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de zoosporas de <i>P. capsici</i>	188
5.2.2. Efecto del pH sobre la viabilidad de zoosporas de <i>P. capsici</i>	190
5.2.3. Tratamiento H ₂ O ₂ /Solar para la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	191
5.2.4. Tratamiento Fe ²⁺ /Solar para la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	194
5.2.5. Tratamiento Fe ³⁺ /Solar para la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	197
5.2.6. Tratamiento de foto-Fenton solar con Fe ²⁺ para la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	201
5.2.7. Tratamiento de foto-Fenton solar con Fe ³⁺ para la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	203
5.2.8. Estudio cinético de la inactivación de zoosporas de <i>P. capsici</i>	206
 6. DESINFECCIÓN DE EFLUENTES DE EDAR CON H₂O₂/SOLAR, TiO₂/SOLAR Y FOTO-FENTON SOLAR EN REACTOR CPC DE 60 L	209
6.1. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> con H ₂ O ₂ /Solar	209
6.2. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> con TiO ₂ /Solar	213
6.3. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> con Fenton	215
6.4. Inactivación de esporas de <i>F. solani</i> con foto-Fenton: comparación de la eficiencia utilizando Fe ²⁺ y Fe ³⁺	217
6.4.1. Agua destilada	217
6.4.2. Agua simulada de salida de EDAR	220
6.4.3. Agua real de salida de EDAR (El Bobar, Almería)	226
6.5. Estudio cinético de los distintos tratamientos solares evaluados en reactor CPC de 60 L	229
 7. ASPECTOS REMARCABLES DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA MEDIANTE TRATAMIENTOS SOLARES	231
 8. CONCLUSIONES	235

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	237
--------------------------------------	------------

10. ANEXO. ANÁLISIS DEL RECURSO UV-A SOLAR PARA LA APLICACIÓN DE DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA DE AGUAS	268
--	------------

ABREVIATURAS

A	Apertura del captador solar. Área (m ²)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	Ácido haloacético
APHA	Asociación americana de salud pública (American Public Health Association)
ARN	Ácido ribonucleico
C	Concentración de agente desinfectante (mg/L)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CEE	Comunidad Económica Europea (EEC, European Economic Community)
CI	Cromatografía iónica
CIT	Carbono Inorgánico Total
CT	Carbono Total
COD	Carbono Orgánico Disuelto
CPC	Captadores Parabólicos Compuestos
CT	Concentración de agente desinfectante-Tiempo exposición (mg min/L)
DBO ₅	Demanda Biológica de Oxígeno
DMA	Directiva Marco del Agua
Dosis	Intensidad de radiación UV acumulada por unidad de tiempo (J/m ²)
DQO	Demanda Química de Oxígeno
E	Energía
e-/h+	Par electrón/hueco
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
E _G	Energía de activación de un semiconductor
EPA,USEPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency)
erg	Ergio (1 × 10 ⁻⁷ J)
FAO	Organización de la Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FC	Factor de Concentración de un captador solar
$h\nu$	Energía de un fotón de frecuencia ν
HO ₂ [•]	Radical hidroperóxido
I	Intensidad de radiación (W/m ²), o irradiancia solar
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
IWA	Asociación Internacional del Agua (International Water Association)
J	Julio (3.6 × 10 ⁻⁶ kW·h)
λ	Longitud de onda (nm)
LD	Límite de detección (UFC/mL)

LIP	Fuente disponible de hierro (Labile iron pool)
log	logaritmo
NDIR	Detector de infrarrojos no dispersivo
NOM	Materia Orgánica Natural (Natural Organic Matter)
NU, ONU	Naciones Unidas, Organización de las Naciones Unidas
θ_A	Semiángulo de aceptación en captadores solares (radianes)
$O_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
OD	Oxígeno disuelto
OH $^{\bullet}$	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO, World Health Organization)
ONPG	o-nitrofenil-galactósido
PAO	Proceso Avanzado de Oxidación
PBC	Bifenilos Policlorados
PET	Tereftalato de polietileno
PNUMA	Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, United Nations Environment Programme)
PNCB	p-cloronitrobenceno
PSA	Plataforma Solar de Almería
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVC	Policloruro de vinilo
Q_{UV}	Energía UV global acumulada por unidad de volumen (kJ/L)
$R^{\bullet}$	Radical orgánico
RD	Real Decreto
ROS	Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SEM	Microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope)
SODIS	Desinfección solar de agua (Solar water Disinfection)
SOD	Superóxido Dismutasa
SOLAW	Estado Mundial de la Tierra y los recursos del agua (The State of the World's Land and Water Resources)
sp. (pl. spp.)	Especie, especies
SPD	Subproductos de desinfección (DBP, Disinfection by-products)
T	Tiempo exposición (min)
T^a	Temperatura (°C)
TDE	Tiempo de desinfección efectiva (min)
TEM	Microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscope)
THM	Trihalometanos
TOC	Carbono Orgánico Total (Total Organic Carbon)
TOX	Haluros Orgánico Total (Total Organic Halurs)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias (CFU, Colony Formation Units)
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization)
UNDP	Programa de desarrollo de las Naciones Unidas (United Nations Development Programme)

UNF	Unidades Nefelométricas de Formacina (NTU, Nefelometric Turbidity Units)
UNFPA	Fondo de Población de las Naciones Unidas (United Nations Population Fund)
USGS	Servicio Geológico de Estados Unidos (United States Geological Survey)
UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta-A, rango longitud de onda 320-380 nm (UV cercano o N-UV)
UV-B	Ultravioleta-B, rango longitud de onda 290-320 nm (UV medio o M-UV)
UV-C	Ultravioleta-C, rango longitud de onda 190-290 nm, (UV lejano o F-UV)
$\bar{UV}_{G,n}$	Promedio de irradiancia UV incidente en la superficie de un captador (W/m^2)
V_i	Volumen iluminado del reactor (L)
Vis	Visible
V_t	Volumen total del reactor (L)

RESUMEN

El elevado estrés existente sobre los recursos hídricos del planeta se debe fundamentalmente al uso indiscriminado de las fuentes de agua dulce y, en muchos casos, a la contaminación química y microbiológica de las mismas. Por ello, recientemente la comunidad científica ha dedicado interés y esfuerzo en desarrollar métodos que permitan aprovechar el agua que ya ha sido utilizada para otros fines. En materia de reutilización de aguas es crítico realizar un tratamiento efectivo para reducir la carga de contaminantes químicos y agentes patógenos. Las técnicas tradicionales de tratamiento y purificación de aguas dan solución a gran parte del problema pero presentan ciertas limitaciones. Por ello existen diversas tecnologías en fase de investigación encaminadas a resolver las limitaciones de las tradicionales.

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) se basan en la generación de radicales hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), que permiten la mineralización de una gran variedad de compuestos orgánicos debido a su elevado potencial de oxidación y su baja especificidad. Las propiedades oxidativas de los PAO también pueden utilizarse para la inactivación de microorganismos, tal y como muestran los trabajos científicos publicados en los últimos quince años. Especialmente interesantes son aquellos PAO que utilizan la radiación solar como fuente de fotones. Esto permitiría a medio y largo plazo desarrollar métodos de tratamiento de aguas de bajo coste con un mínimo impacto sobre el medioambiente. El objetivo fundamental de este trabajo es explorar las capacidades de diversas técnicas fotoquímicas solares para la desinfección de agua y su posible reutilización.

En este trabajo de investigación se estudia la eficiencia de diferentes tratamientos fotocatalíticos solares para la inactivación de esporas del género *Fusarium* y *Phytophthora* en agua. Ambos géneros fúngicos son causantes de graves problemas de contaminación de agua y suelos en agricultura. Dichas esporas son muy interesantes en esta investigación por su elevada resistencia a los tratamientos convencionales de desinfección de agua y a los factores ambientales, permitiendo observar gradientes de eficiencia entre los distintos métodos evaluados.

Uno de los tratamientos estudiados es la fotocatálisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO_2). Este semiconductor genera radicales $\text{OH}^\bullet$ en agua y en presencia de oxígeno al ser iluminado con fotones de longitud de onda inferior a 390 nm. Este catalizador ha sido ampliamente estudiado en la literatura mostrando resultados prometedores en la desinfección de agua. Otra de las técnicas fotocatalíticas que actualmente está empezando a considerarse para la desinfección de aguas es el

foto-Fenton, ciclo de reacciones catalíticas promovidas por sales de hierro, H_2O_2 y fotones de longitudes de onda inferiores a 580 nm. En este campo los aportes científicos son más escasos. Gran parte del trabajo experimental presentado en esta memoria se ha realizado con el proceso de foto-Fenton y luz solar. Al igual que en la descontaminación de compuestos orgánicos, la desinfección con foto-Fenton presenta una elevada eficacia para la inactivación de las esporas objeto de estudio. Se ha investigado también el tratamiento de H_2O_2 con radiación solar y por primera vez se demuestra su capacidad para la inactivación de hongos en agua. Este tratamiento no se puede considerar fotocatalítico pero produce cambios fotoquímicos y fotobiológicos que vulneran la viabilidad de los microorganismos. Este proceso es novedoso en la desinfección de aguas y, dado los resultados positivos que se han encontrado, podría considerarse como una alternativa de bajo coste para el tratamiento y reúso de agua en agricultura.

La presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos de forma natural en el agua tiene un efecto sobre la eficiencia fotocatalítica. Por ello, además de los diferentes tratamientos solares, se han evaluado diferentes tipos de agua: (i) agua destilada, donde no se producen interferencias en la formación de radicales $OH^\bullet$ por la ausencia de compuestos químicos; (ii) agua natural de pozo, la cual se caracteriza por una elevada concentración de carbonatos y bicarbonatos (conocidos secuestradores de radicales $OH^\bullet$); (iii) agua simulada de salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) y (iv) agua real de salida de EDAR (El Bobar, Almería, España) con elevada carga de compuestos químicos (orgánicos e inorgánicos) y microorganismos.

Todos estos procesos aplicados a los diferentes tipos de aguas se han investigado en primer lugar en volúmenes pequeños. Para ello se han utilizado reactores solares de botella de 200 mL. Esta escala de trabajo permite obtener evidencias preliminares acerca del comportamiento y eficiencia de un determinado proceso. Tras estos estudios preliminares, todos los procesos se estudiaron experimentalmente en reactor solar CPC de 60 L. Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo experimental han demostrado la elevada eficiencia del sistema CPC en la inactivación de esporas fúngicas con los tres procesos solares investigados y los diferentes tipos de agua. Esto demuestra que estas tecnologías solares llevadas a cabo en reactor CPC son una buena opción a tener en cuenta para ser aplicada en un futuro real y a escalas de tratamiento superiores dado el carácter modular de los reactores CPC.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento desmesurado del consumo de agua a nivel mundial ha derivado en uno de los principales problemas medioambientales que afectan actualmente a la población humana: la escasez de agua dulce. En el pasado, la aparente abundancia de agua en el mundo generó la falsa impresión de que era un bien inagotable y este recurso se derrochaba de forma descontrolada. No fue hasta la década de los 70 cuando la escasez de agua comenzó a ser un problema importante en los países desarrollados. Desde entonces y hasta la actualidad no ha cesado el esfuerzo por alcanzar el derecho que todo ser humano tiene al acceso a este recurso y garantizar su disponibilidad para la población mundial.

Es por ello que la búsqueda de alternativas para abastecer de agua a la población mundial es una carrera donde intereses políticos, económicos y sociales están en juego. Una de las principales fuentes de abastecimiento de agua puede ser la utilización del agua que ya ha sido empleada en alguna actividad, es decir, la reutilización del agua. Sin embargo, previo a esta posible reutilización, el agua debe cumplir con unos requerimientos de calidad para que no constituya un peligro para la salud humana, de animales y de cultivos.

Este trabajo de investigación está enmarcado dentro del proyecto FITOSOL, que fue concebido para dar cabida a alternativas a los tratamientos convencionales de desinfección de agua. La fotocátalisis solar estudiada en esta memoria presenta ventajas frente a los tratamientos convencionales de desinfección, tales como su efecto germicida frente a microorganismos resistentes o el uso de una fuente renovable de energía, el sol.

1.1. Problemática del agua

La distribución mundial de los recursos hídricos no es homogénea y no todos ellos están disponibles para el hombre. La figura 1.1 muestra la distribución mundial del agua y la tabla 1.1 muestra además el tiempo de residencia, el volumen total y el volumen de agua dulce acumulada en cada componente en los que ésta se divide.

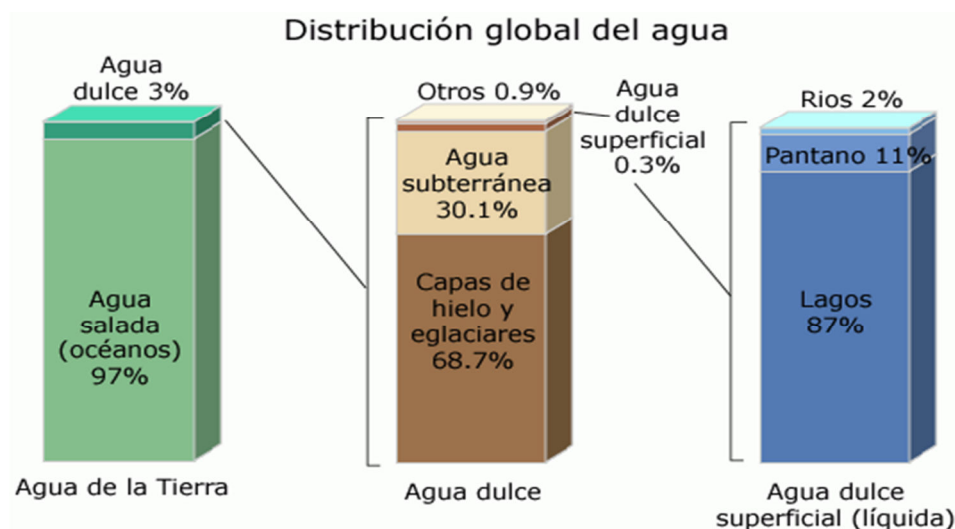


Figura 1.1. Diagrama de la distribución global del agua [Shiklomanov, 1993 y USGS. <http://ga.water.usgs.gov/edu/watercyclespanish.html>]

Del total de la superficie terrestre, aproximadamente el 70 % está cubierta por agua, de la cual un 97,5 % es agua salada, y el restante 2.5 % es agua dulce. El agua dulce a su vez se encuentra repartida de forma desigual, de manera que aproximadamente el 70 % se encuentra congelada en glaciares, áreas montañosas o suelos periglaciares. Esto significa que el agua que constituye estos componentes presenta tiempos de residencia muy altos y, por tanto, no están disponibles para ser utilizados (Tabla 1.1). El restante 30 % lo constituyen lagos, corrientes, pantanos, humedales y acuíferos accesibles que de forma natural son renovados mediante

precipitación. Sin embargo, de todos ellos solo el 1 % del agua dulce del mundo puede ser utilizada para el consumo humano y el 17 % para la agricultura.

Tabla 1.1. Tiempos de residencia estimados y volúmenes de agua almacenados de los principales componentes de la hidrosfera terrestre [Shiklomanov y Rodda, 2003].

Componentes	Tiempo medio de residencia	Total de agua acumulada (miles de km ³)	Agua dulce acumulada (miles de km ³)
Capa permafrost de suelos periglaciares	10000 años	300	300
Hielo polar	9700 años	24023	24023
Océanos	2500 años	1338000	-
Glaciares montañosos	1600 años	40,6	40,6
Agua subterránea (excepto la Antártida)	1400 años	23400	10530
Lagos	17 años	176,4	91,0
Pantanos	5 años	11,5	11,5
Humedad del suelo	1 año	16,5	16,5
Corrientes	16 días	2,1	2,1
Atmosfera	8 días	12,9	12,9
Biosfera	Varias horas	11,2	11,2
Total		1385985	35029

Los recursos hídricos no están disponibles de forma homogénea y, aunque existe cierta incertidumbre en las estimaciones estadísticas derivadas del uso del agua y de los recursos renovables, se ha podido estimar que el 85% de la población mundial reside en las zonas más secas de la tierra. Esto se traduce en más de mil millones de personas con acceso restringido a los recursos hídricos renovables [Vörösmarty, 2005].

Ya en la década de los 90 se estimaba que el 40 % de la población mundial sufría graves problemas de sequías. Actualmente, un tercio de esta población vive en países que sufren estrés hídrico de moderado a alto (donde el consumo supera el 10 % de los recursos renovables de agua dulce). El informe del Desarrollo Humano presentado en 2006 por el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (UNDP) estima la disponibilidad de agua per capita a nivel mundial y ésta se representa en la figura 1.2.

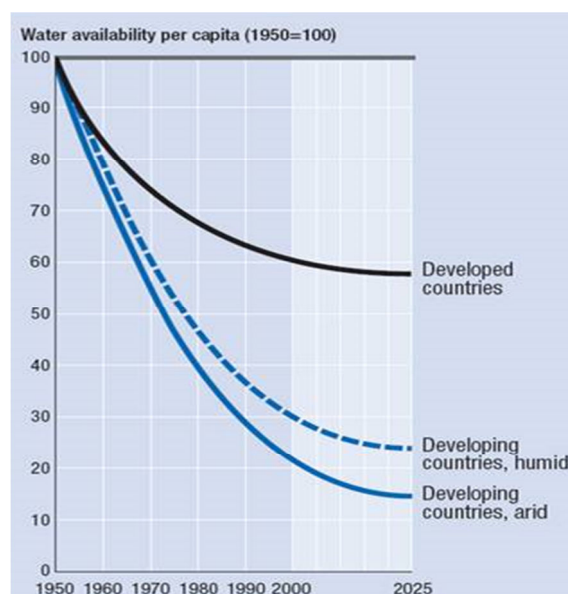


Figura 1.2. Disponibilidad de agua per capita en el mundo desde 1950 a 2025 [UNDP, 2006. <http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/chapters/>]

Se observa un fuerte descenso en la disponibilidad de agua que han sufrido países en vías de desarrollo y se estima que esta tendencia continúe al menos hasta el año 2025, aunque con un descenso menos pronunciado.

La escasez de agua se debe básicamente a que mientras que el consumo no deja de aumentar, las recargas de agua para renovar los recursos hídricos por las precipitaciones son limitadas, llegándose a alcanzar el límite en la obtención y extracción de los mismos. Hay que tener en cuenta que no todas las entradas de agua cuentan en la recarga del recurso puesto que aproximadamente un tercio de ellas se pierde por evaporación; otro tercio se fija en el suelo por la vegetación y los organismos que componen la biosfera; y otro tercio llega a cauces y lagos superficiales y subterráneos y finalmente, al mar. Ejemplos de impactos importantes sobre la excesiva explotación del agua se pueden observar en áreas de los Estados Unidos, China e India, donde se está consumiendo agua subterránea con más rapidez de la que se repone, y por tanto, los niveles hidrostáticos disminuyen constantemente. Algunos ríos, tales como el Río Colorado en el oeste de los Estados Unidos y el Río Amarillo en China, con frecuencia se secan antes de llegar al mar. Estos y otros casos relacionados con problemas en la escasez del agua a nivel mundial se pueden consultar en la página web (último acceso 10 de Septiembre 2012): <http://www.bbc.co.uk/spanish/especiales/agua/default.stm>

Las principales actividades humanas que conllevan altos consumos de agua se dividen en tres sectores principales: la industria, el doméstico y la agricultura. La

figura 1.3 muestra los porcentajes estimados del consumo de agua en función de estos tres sectores en todos los continentes [FAO, 2011. www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf].

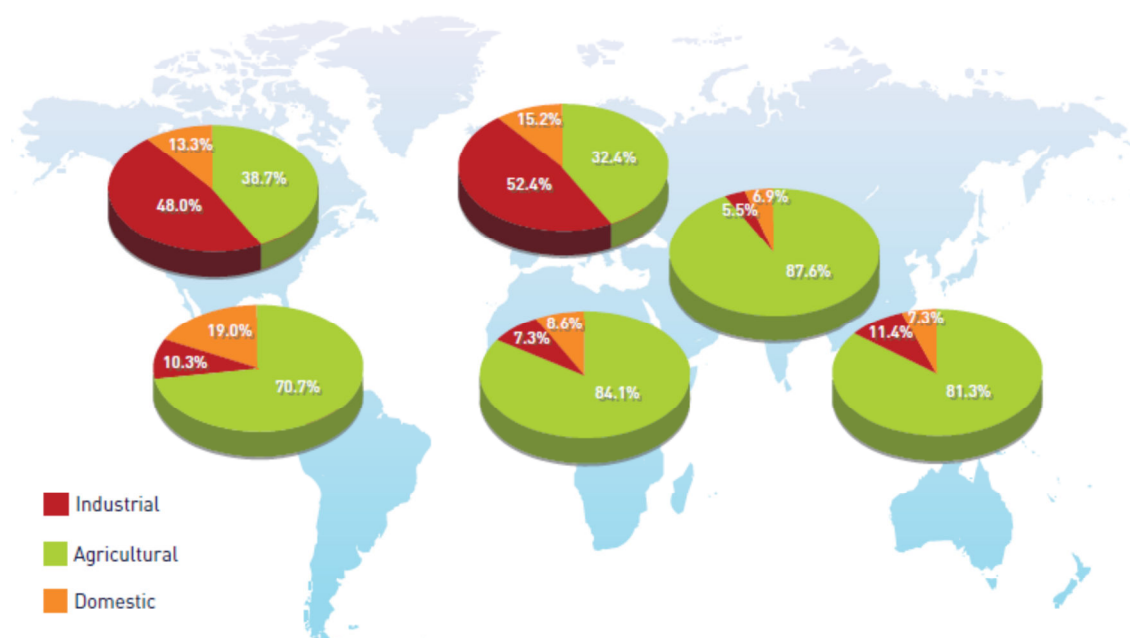


Figura 1.3. Distribución continental del agua consumida de los sectores agrícola, doméstico e industrial [FAO, 2011. www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf]

Se puede observar que, de manera generalizada, la agricultura es el sector que consume el mayor porcentaje de agua, seguido del uso industrial y finalmente, el consumo doméstico.

1.1.1. El consumo urbano y el desarrollo industrial.

El aumento del consumo industrial de agua está motivado por el crecimiento de la población y por el incremento de países de rápida industrialización como es el claro ejemplo de China. En este país, el consumo industrial de agua se ha duplicado desde 1980 hasta alcanzar el 21 %, y las perspectivas actuales indican que la demanda aumentará un 20 % más en el año 2030. La presión resultante amenaza con incrementar el grave estrés relacionado con este recurso [UNDP, 2006. <http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/chapters/>].

Se estimaba que el constante crecimiento de la población mundial derivaría para el año 2015 en un total de 7 mil millones de personas habitando el planeta. Sin embargo, el 31 de octubre de 2011 se alcanzó esta cifra de acuerdo con los datos del

Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA, siglas en inglés), y este dato sigue aumentando por lo que se pronostica que la población humana llegará a alcanzar los 9 mil millones de habitantes en 2050 [UNFPA, 2011. http://foweb.unfpa.org/SWP2011/reports/SP-SWOP2011_Final.pdf].

Si el consumo de agua estimado de un ser humano se promedia en 50 L/día para realizar actividades cotidianas tales como beber, cocinar, lavar y sanearse, el uso doméstico incrementará sustancialmente el porcentaje de agua requerida para este fin. El consumo urbano también aumenta con la renta per cápita, debido al incremento de usos recreativos como campos de golf, parques, jardines, etc. y las actividades derivadas del turismo.

Sin embargo, para una gran parte de la población mundial, no solo la falta de acceso es un problema sino que una de las mayores amenazas para su salud radica en el consumo continuado de agua no tratada. Al ritmo actual, el acceso universal al agua potable no podrá asegurarse hasta el año 2050 en África, el 2025 en Asia y el 2040 en América Latina y el Caribe. Mientras que el porcentaje de población con acceso a agua potable aumentó del 79 % (4100 millones) en 1990 al 82 % (4900 millones) en el año 2000 según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente 1100 millones de personas carecen de dicho acceso y 2400 millones no tienen acceso a servicios sanitarios adecuados. Otros datos preocupantes recogidos por la OMS relacionados con el acceso al agua potable y al saneamiento son [http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/es/]:

- La falta de agua potable genera cientos de millones de casos de enfermedades y más de 5 millones de muertes cada año.
- La diarrea y el cólera son la principal causa de muerte en niños menores de 5 años.
- Con el suministro adecuado de agua potable y de saneamiento, la incidencia de algunas enfermedades y consiguiente muerte podría reducirse hasta en un 75 %.
- 31 países carecen totalmente de acceso a fuentes de agua limpia.
- De cada cuatro personas una no dispone de agua potable.
- Cada ocho segundos muere un niño por beber agua contaminada.

La concienciación social, proveniente especialmente de los países desarrollados, no ha cesado en su labor de propagar información acerca del problema tan importante que supone la escasez de agua y saneamiento. Y ello lo refleja la multitud

de conferencias acontecidas desde 1972 hasta la actualidad, las más destacadas se resumen en la Tabla 1.2.

Todas estas conferencias y foros abordan, entre otros muchos aspectos, el problema del acceso al agua potable y el saneamiento, así como el desarrollo sostenible mediante una adecuada gestión del agua y conservación de los ecosistemas. En La Declaración de los Objetivos del Milenio (Nueva York, Estados Unidos) en el año 2000 se señaló la necesidad de reducir a la mitad, para el año 2015, la proporción de la población careciente de acceso al agua potable, bien por no poder costearlo o bien por no tener acceso a los servicios básicos de saneamiento, según lo convenido en el Plan de Aplicación de las Decisiones de la Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Social [NU, 2000. <http://www.un.org/spanish/milenio/ares552.pdf>].

Uno de los logros más importantes se alcanzó en 2010 con la Declaración del Derecho al Agua, reconocido por 189 países en la Organización de las Naciones Unidas (ONU). En este texto se puede leer explícitamente que la ONU: “Declara el derecho al agua potable y el saneamiento como un derecho humano esencial para el pleno disfrute de la vida y de todos los derechos humanos” [ONU. <http://www.politicaspUBLICAS.net/panel/agua/dhagua/667-onu-2010-resolucion-aqua.html>].

El número de congresos y conferencias en los últimos años ha seguido aumentando significativamente y en este propósito han colaborado asociaciones internacionales como la Asociación Internacional del Agua (IWA). La IWA es un punto de referencia mundial para los profesionales del agua, integrando la cooperación de un número nada despreciable de miembros [<http://www.iwahq.org/1nb/home.html>].

Tabla 1.2. Principales conferencias relacionadas con el agua desde 1972 hasta la actualidad [Modificado de UNESCO, 2009].

Foros internacionales	Lugar de celebración	Año
Conferencia (Naciones Unidas) sobre el ser humano y el medioambiente	Estocolmo, Suecia	1972
Conferencia NU del agua	Mar del Plata, Argentina	1977
Década Internacional del suministro de agua potable y Saneamiento		1981-90
Consulta global sobre agua potable y Saneamiento para los 90s	Nueva Delhi, La India	1990
Década Internacional de la reducción de desastres naturales		1990-2000
Conferencia Internacional del agua y el medio ambiente	Dublín, Irlanda	1992
Conferencia NU del Medioambiente y Desarrollo	Rio de Janeiro, Brasil	1992
Conferencia Ministerial en Suministro sobre Agua Potable y Saneamiento Medioambiental	Noordwijk, Países Bajos	1994
Conferencia Internacional NU sobre Población y Desarrollo	El Cairo, Egipto	1994
Cumbre Mundial sobre Alimentación	Roma, Italia	1996
1 ^{er} Foro Mundial del Agua	Marrakech, Marruecos	1997
Conferencia Internacional sobre Agua y Desarrollo Sostenible	Paris, Francia	1998
Declaración del Milenio	Nueva York, EE.UU	2000
2 ^o Foro Mundial del Agua	La Haya, Países Bajos	2000
Conferencia Internacional sobre Agua Dulce	Bonn, Alemania	2001
Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible	Johannesburgo, Sudáfrica	2002
3 ^{er} Foro Mundial del Agua	Kyoto, Japón	2003
Década Agua para la Vida		2005-15
4 ^o Foro Mundial del Agua	Ciudad de México, México	2006
5 ^o Foro Mundial del Agua	Estambul, Turquía	2009
Congreso Mundial del Agua (IWA)	Montreal, Canadá	2010
6 ^o Foro Mundial del Agua	Marsella, Francia	2012
Congreso y Exposición Mundial del Agua (IWA)	Busan, Corea del Sur	2012

1.1.2. El consumo agrícola

Si se suman las tendencias actuales en la demanda de agua por parte de países desarrollados y en vías de desarrollo, se estima que las extracciones mundiales de agua pasarán de 3800 km³ en 1995 a 4300-5200 km³ en el año 2025 [Shiklomanov, 1999]. Y esta gran diferencia se debe principalmente a la expansión de la agricultura necesaria para proveer de alimento a la creciente población mundial.

La agricultura es la actividad humana responsable del consumo de aproximadamente el 70 % del agua dulce, y hasta del 90 % en las regiones tropicales áridas de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [FAO, 2006]. El agua de riego procede generalmente de acuíferos subterráneos y aguas embalsadas o estancadas. En muchos países, el agua subterránea se ha convertido en el sostén principal de las actividades agroalimentarias. El 33 % de la población mundial, sobretodo la rural, depende del agua subterránea para la irrigación y la extracción abusiva del agua está provocando que los niveles freáticos de agua dulce estén descendiendo a un ritmo alarmante. Son tres los problemas principales que caracterizan la utilización del agua subterránea: el agotamiento debido a un exceso de extracción de este recurso, las inundaciones y la salinización causada por un drenaje insuficiente. El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) informó que la tasa de pérdida de tierras regadas por anegamiento y salinidad es de 1,5 millones de hectáreas al año [Tolba, 1992]. La superficie afectada por la salinidad, como porcentaje del área total de regadío, se estima en un 10 % en México, un 11 % en la India, un 21 % en Pakistán, un 23 % en China y un 28 % en los Estados Unidos [Umali, 1993].

El excesivo consumo de agua por parte de la agricultura es debido por un lado a los requerimientos para la producción de alimentos y, por otro lado, a la deficiencia de la mayoría de los sistemas de riego. Se estiman que son necesarios 1000-3000 m³ de agua por tonelada de cereal cosechado, o lo que es lo mismo 1-3 toneladas de agua para producir 1 kg de cereal. Para dar cobertura a las necesidades alimentarias diarias de una persona se necesitan 2000-5000 L de agua [FAO, 2011. www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf]. La deficiencia en la mayoría de los sistemas de riego supone pérdidas del 60 % del agua por evaporación o reflujo a ríos y mantos acuíferos. El riego por embalsado es una práctica muy extendida que día a día va siendo sustituida por otras técnicas más eficientes como el riego localizado. La irrigación ineficiente desperdicia el agua y también provoca riesgos ambientales y de salud, tales como la pérdida de tierra agrícola productiva debido a la saturación y, a su vez, el agua estancada puede provocar la transmisión de enfermedades como la malaria.

Como alternativa a los principales problemas generados por los sistemas tradicionales de agricultura intensiva, especialmente en áreas donde el suelo ha sido agotado, surgió en la década de los 90 un nuevo sistema denominado cultivo hidropónico. Este sistema ha aumentado en zonas semiáridas con alta radiación

solar y suficiente agua subterránea. Se trata de un método que permite el desarrollo de plantas en un medio acuoso sin suelo, donde las raíces permanecen en contacto con una solución mineral nutritiva. Este contacto se produce manteniendo las raíces sumergidas en tanques de agua así como empleando diferentes sustratos inertes como es la perlita [Vázquez y Carpena, 2005], la lana de roca [Le bot y Adamowicz, 2006] y la fibra de coco [Raviv, 2005]. Esta tecnología presenta la ventaja de la optimización de factores como la temperatura del sustrato, agua, pH y solución nutritiva para satisfacer las necesidades de las plantas en continuo crecimiento y sin estrés [Schnitzler, 2008].

Además de los problemas derivados del excesivo consumo de agua por la agricultura también hay que sumar las pérdidas de cosechas y, por tanto, económicas, asociadas a las enfermedades que atacan los cultivos y que entran en los mismos a través del agua empleada para su riego. Incluso los métodos de recirculación de una solución nutritiva que presentan beneficios ecológicos, requieren un exhaustivo manejo de los cultivos ya que, bajo ciertas condiciones, los patógenos pueden extenderse fácilmente a través de dichos sistema poniendo en peligro todo el cultivo. Es más, la solución nutritiva usada en cultivos sin suelo, constituye un sistema de crecimiento diferente al cultivo tradicional, y causa la aparición de nuevas enfermedades [Runia y Boonstra, 2001].

Por tanto, sea cual sea el mecanismo que se emplee para la reducción del consumo de agua en la agricultura así como para dar cobertura a las necesidades básicas del ser humano, existe un punto común en todas ellas y éste es que el agua debe cumplir con unos mínimos requisitos de seguridad microbiológica con el fin de evitar la transmisión de enfermedades tanto a personas como a cultivos.

1.2. Normativa de regulación del agua y Ley Española de reutilización

Los problemas derivados del uso del agua llevaron a la publicación de la Directiva Marco del Agua (DMA), Water Framework Directive [Directiva 2000/60/EC] por parte de la Comisión del Medio Ambiente del Parlamento Europeo. En esta Directiva se establece un “MARCO COMUNITARIO DE ACTUACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA POLÍTICA DE AGUAS”. Previamente la Directiva 98/83/EC establecía la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, siendo el objetivo principal garantizar la salubridad y limpieza del agua [Directiva 1998/83/EC http://www.belt.es/legislacion/vigente/seg_ind/prl/higiene/cont_biolo/pdf/Dir_98_83.PDF]. El objetivo de la Directiva 2000/60/EC es establecer un marco para la protección

de las aguas superficiales continentales, aguas de transición, costeras y subterráneas contribuyendo a:

- Garantizar el suministro de agua superficial o subterránea en buen estado.
- Reducir la contaminación de las aguas subterráneas.
- Proteger las aguas territoriales y marinas.
- Lograr objetivos como la prevención de la contaminación del medio marino.

La normativa en España relacionada con el reglamento del agua es muy amplia y se inició en 1985 con la aprobación de la Ley de Aguas 29/1985 [BOE. Ley 29/1985 <http://www.boe.es/boe/dias/1985/08/08/pdfs/A25123-25135.pdf>], desde entonces se han aprobado diversos textos y Reales Decretos, los cuales se citan a continuación:

- Ley 11/2005, de 22 de junio, por la que se modifica la Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano.
- Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.
- Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios de prevención y control de la legionelosis.
- Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica.
- Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.
- Real Decreto Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las Normas Aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas.

Además de la regulación de las cuencas hidrológicas, en los últimos años ha surgido el problema de la manipulación de las aguas residuales. En la Directiva Europea 2000/60/EC, la reutilización del agua fue incluida como medida complementaria del programa de medidas aplicables con el fin de cumplir los objetivos del artículo 4 de la DMA. En esta directiva se hace una sola referencia en el Anexo VI, parte B, en la que se enumeran las medidas complementarias que cada

demarcación hidrográfica puede incluir en el programa de medidas. Previa a esta normativa, en el Anexo I de la Directiva 91/271/CEE del 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, se fijaron las condiciones de calidad de las aguas urbanas [Directiva 91/271/CEE http://www.marm.es/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm7-28959.pdf].

La reutilización del agua presenta un claro beneficio ya que permite un incremento neto del recurso de agua dulce en los casos en los que el agua depurada se vierte al mar o se pierde a través de la evaporación. En zonas de interior permitiría sustituir al agua potable en los usos que requieren una calidad menos exigente reservando la de mayor calidad para el abastecimiento. Una de las mayores ventajas de la reutilización del agua es la garantía tanto de la calidad como del caudal, ya que no depende de la estacionalidad del recurso ni de las épocas de sequía. Una de las principales vías para reducir la presión que existe actualmente en el consumo del agua es la reutilización de la que ya ha sido empleada para otras actividades teniendo en cuenta que en los países en desarrollo, aproximadamente el 90-95 % de las aguas residuales y el 70 % de los desechos industriales se vierten sin ningún tratamiento sobre cursos de aguas naturales.

La reutilización del agua tratada requiere de estandarizar una serie de parámetros físicos, químicos y biológicos para que el agua no sea perjudicial para la salud o para el uso al que está destinada. Las consecuencias del vertido a los cauces naturales de aguas sin un tratamiento previo pueden determinar diferentes efectos cuando los contaminantes superan la capacidad de autodepuración de los cursos de agua. Estos efectos varían desde la eutrofización de sistemas por contaminación de origen agropecuario a través del uso incontrolado de plaguicidas tóxicos y fertilizantes, con elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo, hasta la aparición de enfermedades cancerígenas por acumulación de metales pesados, materia orgánica y nuevos compuestos tóxicos (PCB, etc). Sin olvidar tampoco que esta agua es portadora de multitud de agentes microbiológicos patógenos que pueden producir diversas enfermedades desde asintomáticas hasta mortales.

En España, la reutilización del agua tratada se regula a través del Real Decreto de Reutilización 1620/2007 aprobado el 7 de diciembre de 2007 modificándose parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico aprobado por Real Decreto 849/1986 [BOE. RD 1620/2007 <http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>]. Este RD tiene por objetivo establecer el régimen jurídico para la reutilización de aguas depuradas, de

acuerdo al artículo 109.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, del 20 de julio. El RD 1620/2007 establece una serie de definiciones que facilita la comprensión del texto, como por ejemplo la definición de los conceptos de reutilización de aguas y de agua regenerada, tal y como se describe a continuación:

- Reutilización de las aguas: aplicación, antes de su devolución al dominio público hidráulico y al marítimo terrestre para un nuevo uso privativo de las aguas que, habiendo sido utilizadas por quien las derivó, se han sometido al proceso o procesos de depuración establecidos en la correspondiente autorización de vertido y a los necesarios para alcanzar la calidad requerida en función de los usos a que se van a destinar.
- Aguas depuradas: aguas residuales que han sido sometidas a un proceso de tratamiento que permita adecuar su calidad a la normativa de vertidos aplicable.
- Aguas regeneradas: aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan.

Además, este RD de reutilización, trata también aspectos relativos al régimen jurídico y establece las condiciones de calidad que debe cumplir el agua regenerada para su uso indicando los usos permitidos y prohibidos. En el Anexo I de este RD se establecen los valores máximos admisibles de los parámetros en función de los usos a los que el agua está destinada. Se describen 13 usos distintos separados en 5 tipos principales: urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental.

La tabla 1.3 muestra los criterios de calidad de naturaleza microbiológica para la reutilización de las aguas del RD 1620/2007 español comparados con los establecidos por anteriores recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) a fin de observar todos los parámetros que determinan la calidad del agua así como el grado de semejanza. La tabla 1.4 a su vez muestra los requerimientos en los parámetros físico-químicos aplicados para el mismo fin.

Tabla 1.3. Criterios de calidad microbiológica según RD de reutilización, OMS y USEPA [Adaptado de la Guía para la aplicación del Real Decreto 1620/2007, 2010].

Parámetro	ESPAÑA RD 1620/2007 de reutilización*	OMS Recomendaciones 2006	USEPA Recomendaciones 2004
Nematodos intestinales (huevos/10L)	Uso agrícola (2): < 1 Uso urbano (1): <1 Uso industrial (3.1.a y b): no se fija límite (3.1.c- 3.2): <1 Uso recreativo (4.1): <1 (4.2): no se fija límite. Uso ambiental (5.1 y 5.3): no se fija límite. Uso ambiental (5.2): <1	Uso agrícola: Riego con o sin restricciones: ≤10 reducido ≤1 (es decir, no detectable) cuando hay niños menores de 15 años expuestos. Resto usos: sin recomendaciones	Sin recomendaciones
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	Uso agrícola (2.1): < 100 (2.2): < 1.000 (2.3): < 10000 Uso urbano (1.1): 0 (1.2): <200 Uso industrial (3.1.c): < 1000 (3.1a-b): < 10000 (3.2): 0 Uso recreativo (4.1): <200 (4.2): < 10000 Uso ambiental (5.1): < 1000 (5.2): 0 (5.3): no se fija límite (5.4): se estudiará en cada caso	Uso agrícola: Riego sin restricciones: ≤1000 (aumenta a ≤10000 cuando la cosecha de raíz no haya crecido) Riego con restricciones ≤100000 en conjunto con técnicas de control de exposición humana. Reducida a ≤10000 por exposición de niños < de 15 años. Puede aumentar a 1000000 cuando la agricultura local esté altamente mecanizada. Riego localizado: no hay recomendaciones. Resto usos: sin recomendaciones	Uso agrícola: cultivos comestibles que no se procesan industrialmente: no detectable. Usos agrícolas: cultivos comestibles que se procesan comercialmente; cultivos no comestibles: < 200 Riego en áreas de acceso restringido, construcción; uso industrial; uso ambiental: ≤200 Usos urbanos; masas de agua recreativas; agua potable: no detectable
<i>Legionella</i> spp. (UFC/L)	Uso urbano (1.1-1.2): si hay riesgo de aerosoles: <100 Uso agrícola (2.1): <1000 Uso industrial (3.1): <100 Uso recreativo (4.2): <1000	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones
<i>T.saginata/T.solium</i> (huevos/L)	Uso agrícola (2.2): <1	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones
Enterovirus, <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia</i> spp.	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones

*Nomenclatura de la división de los 5 usos principales del agua, cada uno de ellos son especificaciones dentro del uso general: Uso 1, urbano (1.1, 1.2); Uso 2, agrícola (2.2-2.3); Uso 3, industrial (3.1-3.3); Uso 4, recreativo (4.1-4.3); Uso 5, ambiental (5.1-5.4).

Tabla 1.4. Criterios físico-químicos de calidad según RD de reutilización, OMS y USEPA [Adaptado de la Guía para la aplicación del Real Decreto 1620/2007, 2010].

Parámetro	ESPAÑA RD de reutilización	OMS Recomendaciones 2006	USEPA Recomendaciones 2004
Sólidos en suspensión (mg/L)	Uso urbano (1.1): <10 (1.2): <20 Uso agrícola (2.1): <20 (2.2): <35 Uso industrial (3.1-3.2): < 35 (3.3): < 5 Uso recreativo (4.1): <20 (4.2): < 35 Uso ambiental (5.1-5.3): <35 (5.2): <10 (5.4): se estudiará en cada caso	Sin recomendaciones	Riego de áreas de acceso restringido; riego de cultivos que se procesan comercialmente; cultivos no comestibles; estanques de jardines; construcción; uso industrial; uso ambiental: entre 5 y 30
Turbidez (UNT)	Uso urbano (1.1): <2 (1.2): <10 Uso agrícola (2.1): <10 (2.2 y 2.3): no se fija límite. Uso industrial(3.1.a y b): < 15 (3.1.c): no se fija límite (3.2): <1 Uso recreativo (4.1): <10 (4.2): no se fija límite Uso ambiental (5.1 y 5.3): no se fija límite (5.2): <2	Sin recomendaciones	Uso urbano;uso agrícola (cultivos comestibles que no se procesan comercialmente); estanques recreativos; uso potable (recargar acuíferos con agua potable por inyección; aumento de superficie de suministro) ≤2
Fósforo total (mg/L)	Uso recreativo (4.2-4.3): <25	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones
Nitrógeno total (mg/L)	Uso ambiental (5.1-5.2): <10	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones
NO ₃ (mg/L)	Uso ambiental (5.1-5.2): <25	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones
Cl ₂ residual	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones	1 mg/L (mínimo)- No se mide para recarga de acuíferos por percolación
Carbono Orgánico Total (TOC) (mg/L)	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones	Reutilización para agua potable (recarga de acuíferos por inyección y aumento de superficie de suministro) ≤3
Haluros Orgánicos Total (TOX)(mg/L)	Sin recomendaciones	Sin recomendaciones	Uso para agua potable (recarga de acuíferos por inyección) ≤0,2

La reutilización del agua residual no es aplicable a todas las actividades del ser humano y el RD 1620/2007 español establece también los usos en los que se prohíbe la reutilización, que son los siguientes:

- Para el consumo humano, salvo situaciones de declaración de catástrofe en las que la autoridad sanitaria especificará los niveles de calidad exigidos a dichas aguas y los usos. En ningún caso se permite la potabilización para agua de bebida.

- Para los usos propios de la industria alimentaria, determinado en el artículo 2.1b) del Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, salvo lo dispuesto en el anexo I.A.3.calidad 3.1c) para el uso de aguas de proceso y limpieza en la industria alimentaria.
- Para uso en instalaciones hospitalarias y otros usos similares.
- Para el cultivo de moluscos filtradores en acuicultura.
- Para el uso recreativo como agua de baño.
- Para el uso en torres de refrigeración y condensadores evaporativos, excepto lo previsto para uso industrial en el anexo I.A.3.calidad 3.2.
- Para el uso en fuentes y láminas ornamentales en espacios públicos o interiores de edificios públicos.
- Para cualquier otro uso que la autoridad sanitaria o ambiental considere un riesgo para la salud de las personas o un perjuicio para el medio ambiente, cualquiera que sea el momento en el que se aprecie dicho riesgo o perjuicio.

La reutilización para consumo agrícola podría determinar una fuerte reducción de la presión generada sobre la escasez del agua. Además, garantizaría la eliminación de microorganismos patógenos de plantas responsables de altas pérdidas económicas relacionadas con la producción agrícola.

1.3. Principales microorganismos patógenos encontrados en ambientes acuáticos

Todas las fuentes de agua son portadoras de fauna microbiológica, no obstante, algunas son especialmente peligrosas por su elevado contenido en especies patógenas, como son las aguas residuales. Un agente microbiológico se considera patógeno cuando genera enfermedad en otro organismo. El espectro de patógenos procedentes del agua varía en función de factores tales como los incrementos en la población humana y de animales, un aumento del uso de aguas residuales para otras actividades, cambios en los estilos de vida y mejoras en medicina, movimientos poblacionales migratorios y presiones selectivas sobre nuevos patógenos y mutaciones en los ya existentes. La tabla 1.5 muestra las

diferentes concentraciones de agentes patógenos notificadas en publicaciones científicas en distintos recursos hídricos.

Tabla 1.5. Ejemplos de concentraciones detectables máximas (por litro) notificadas en publicaciones científicas de agentes patógenos entéricos e indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de aguas [OMS, 2006].

Grupo de agente patógeno o indicador	Lagos y embalses	Ríos y arroyos afectados	Ríos y arroyos silvestres	Aguas subterráneas
<i>Campylobacter</i> spp.	20-500	90-2500	0-100	0-10
<i>Salmonella</i> spp.	-	3-58000	1-4	-
<i>E. coli</i> (genérica)*	10000-1000000	30000 -1000000	6000-30000	0-1000
Virus	1-10	30-60	0-3	0-2
<i>Cryptosporidium</i> spp.	4-290	2-480	2-240	0-1
<i>Giardia</i> spp.	2-30	1-470	1-2	0-1

**E. coli* genérica o biotipo 1 hace referencia a todas las variedades no patógenas para el hombre ni para animales y se encuentra de forma natural en el intestino.

No obstante, en aguas residuales se puede encontrar un rango mucho más amplio de microorganismos. La tabla 1.6 muestra los principales microorganismos patógenos encontrados en aguas residuales, así como enfermedades producidas por los mismos, el rango típico de presencia y su dosis infectiva.

Se define la dosis infectiva como el número mínimo de organismos requerido para causar una infección. Estos valores varían según el tipo de organismos. En general, virus y protozoos tienen dosis infecciosas bajas, típicamente entre 1 y 10^2 quistes o partículas, mientras que bacterias necesitan grandes dosis para causar infección, entre 10^2 y 10^9 Unidades Formadoras de Colonias (UFC). La dosis infectiva también varía en función del huésped y éstas son por norma general más bajas en niños, personas inmunológicamente comprometidas o enfermas y ancianos. Igualmente ocurre cuando el huésped es un animal o una planta

Tabla 1.6. Microorganismos patógenos comúnmente encontrados en aguas residuales, enfermedades que producen, rango de concentración típico y dosis infectiva [Adaptado ^aMetcalfe y Eddy, 1991; ^bLazarova y Bahri, 2005; ^cFratamico y cols., 2005; ^dOMS, 2011].

Microorganismos	Enfermedad	Dosis infectiva	Rango típico
Bacterias			
<i>Bacillus</i> sp.	Antrax, Intoxicación alimentaria	10^6 - 10^{11} ^(c)	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	-	100 - 10^6 ^(d)
<i>Clostridium</i> spp.	Gangrena gaseosa	10^6 - 10^{10} ^(c)	-
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis, diarrea	10^2 - 10^9 ^(a)	10^6 - 10^{10} ^(d)
<i>Salmonella</i> spp.	Intoxicación alimentaria, fiebre tifoidea y paratifoidea	1 - 10^8 ^(a)	<10 a 10^9 ^(a)
<i>Shigella</i> spp.	Shigelosis (disenteria bacilar)	10^2 ^(a) - 10^6 ^(c)	<10 ^(d)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera (cólera asiático)	10^8 ^(a)	100 - 10^6 ^(d)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniosis (gastroenteritis)	10^9 ^(c)	-
Protozoos parasitarios			
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiosis (diarrea)	10 - 30 quistes ^(a)	1 - 10^4 ^(d)
<i>Entamoeba coli</i>	Diarrea, ulceración	10 - 100 quistes ^(a)	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasis (disentería amebiana)	10 - 100 quistes ^(a)	10 - 10^3 ^(b)
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (diarrea, malabsorción)	1 - 10 quistes ^(a)	1 - 10^4 ^(d)
Helminthos parasitarios			
<i>Taenia saginata</i>	Tenia Taneiasis	<10 huevos ^(b)	-
<i>Ancylostoma</i> spp.	Anemia	<10 huevos ^(b)	-
<i>Ascaris</i> spp.	Ascariasis	<10 huevos ^(b)	-
<i>Schistosoma</i> spp.	Esquistosomiasis	<10 huevos ^(b)	-
<i>Taenia</i> spp.	Taeniasis	<10 huevos ^(b)	-
<i>Trichuris</i> spp.	Anemia, diarrea	<10 huevos ^(b)	-
Virus			
<i>Enterovirus</i>	Gastroenteritis, meningitis	1 - 72 partículas ^(a)	1 - 1000 ^(d)
<i>Virus de la Hepatitis</i>	Hepatitis de tipo infeccioso	<100 partículas ^(a)	10^1 - 10^4 ^(b)
<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis	1 - 10 partículas ^(b)	50 - 5000 ^(d)
<i>Virus Norwalk</i>	Gastroenteritis	1 - 10 partículas	-

Existen diversas vías de transmisión de los patógenos desde el agua hasta el huésped, bien por consumo directo de agua contaminada, por inhalación de aerosoles o por contacto con material contaminado. La figura 1.4 muestra ejemplos de bacterias, virus, protozoos y helmintos y sus rutas de infección, en esta figura se observa que la ingestión de agua es la principal vía de transmisión.

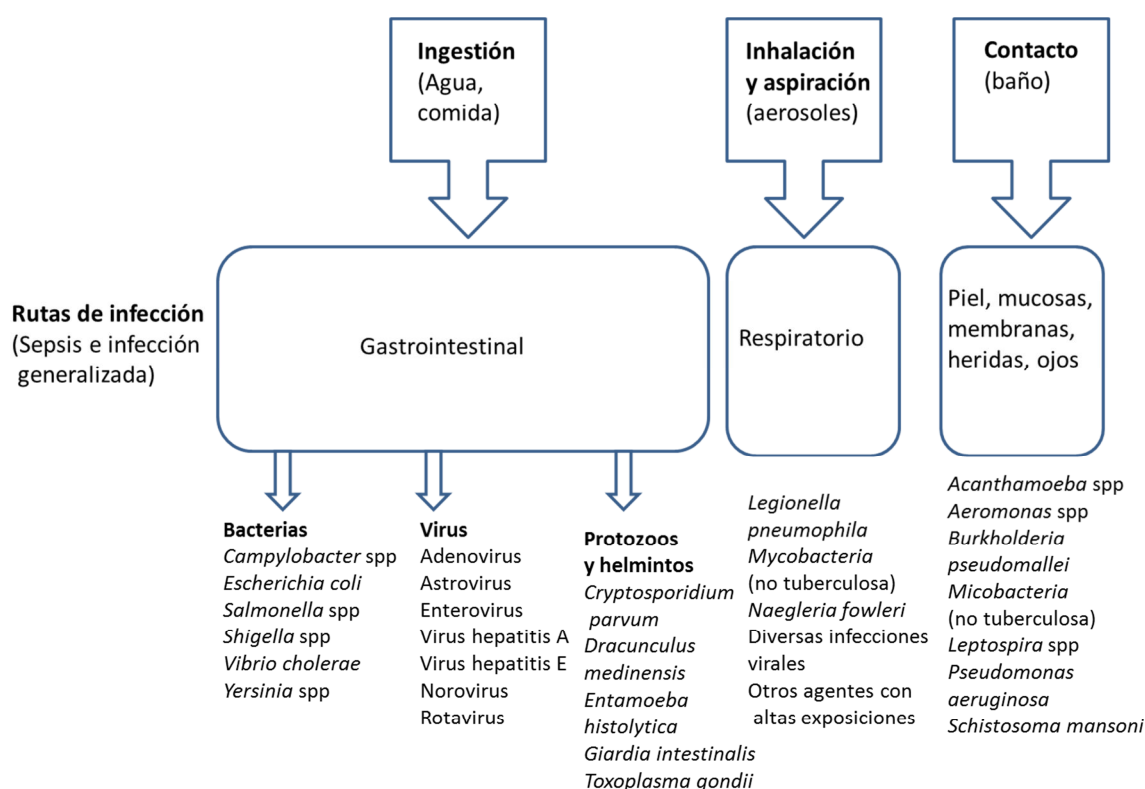


Figura 1.4. Vías de transmisión de patógenos [OMS, 2006].

Los criterios microbiológicos descritos por el RD 1620/2007 se centran especialmente en patógenos humanos, mientras que no se hace mención a otros patógenos, especialmente de plantas, los cuales son importantes desde el punto de vista del reúso de agua para la agricultura. Probablemente una revisión de estos microorganismos debería hacerse para cubrir un mayor rango de patógenos, especialmente aquellos que son muy resistentes a los tratamientos de desinfección. La figura 1.5 muestra la relación de microorganismos encontrados en aguas residuales y su resistencia a desinfectantes como el ozono y el cloro.

Aunque existen indicadores de la contaminación fecal, como la bacteria *E. coli*, estos son normalmente demasiado sensibles a los tratamientos desinfectantes. Por ello, la evaluación de una técnica de desinfección con un indicador como *E. coli* dará resultados inciertos sobre la desinfección de otros microorganismos más resistentes como por ejemplo esporas de bacterias y hongos u ooquistes parasitarios. Por tanto, las nuevas técnicas de desinfección deberían probar su eficacia frente a patógenos más resistentes.

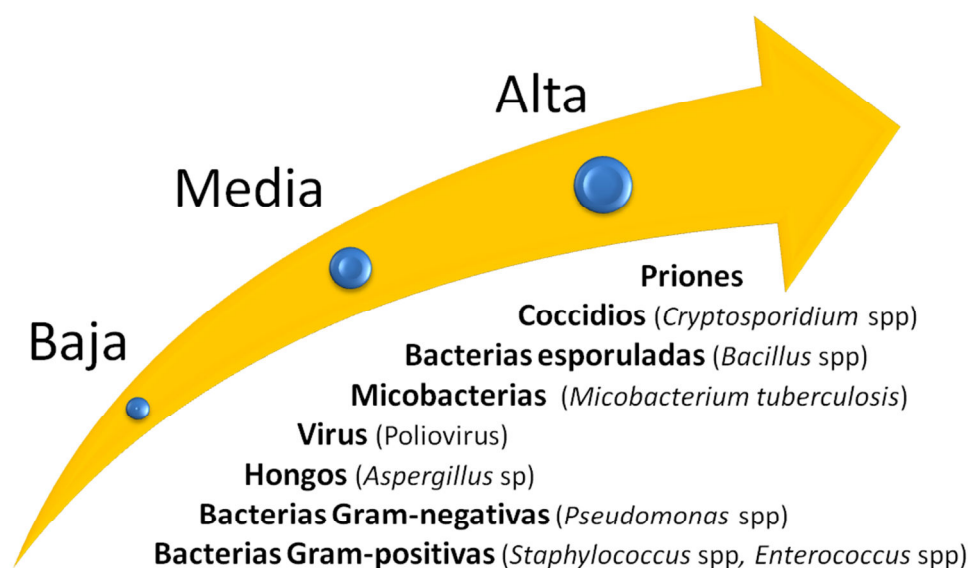


Figura 1.5. Resistencia de diferentes microorganismos a desinfectantes químicos [Rutala y Weber, 2004].

En este trabajo experimental se han utilizado como indicadores de la eficiencia del proceso de desinfección solar y fotocatalítico solar, esporas de microorganismos fitopatógenos cuya ocurrencia en fuentes de agua comunes para el riego de cultivos constituye un problema especialmente importante en este sector. No obstante, algunas especies de los patógenos analizados pueden ser también fuente de episodios epidemiológicos en humanos. Se seleccionaron dos géneros, el género *Fusarium* y el género *Phytophthora*. A continuación se van a detallar los aspectos epidemiológicos más importantes de ambos patógenos.

1.3.1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* pertenece al reino Fungi (hongos) y lo constituyen numerosas especies de hongos filamentosos. Desde el punto de vista de su distribución geográfica o biogeografía, se encuentran ampliamente distribuidos en suelo, en asociación con plantas [Summerell y cols., 1993; Sangalang y cols., 1995]. También se pueden encontrar en diversos ambientes acuáticos como embalses, ríos, lagos, estanques, zonas costeras [Palmero-Llamas y cols., 2008a] e incluso se han aislado en sistemas de distribución de agua en hospitales [Anaissie y cols., 2001].

Este género se caracteriza por producir tres tipos diferentes de esporas denominadas microconidios, macroconidios y clamidosporas, los cuales se alternan y combinan de diferentes formas en las especies del género *Fusarium*, de modo que la

presencia o ausencia de cada tipo de espora determina un carácter taxonómico para la clasificación de las diferentes especies. Las características morfológicas y estructurales de las distintas esporas de éste hongo se describen en detalle en la sección 3.1.1. Las esporas del género *Fusarium* son altamente resistentes a compuestos químicos y como ha sido previamente comprobado en otros trabajos, también lo son a los tratamientos fotocatalíticos solares [Sichel y cols., 2009]. El control de *Fusarium* spp. al igual que otros hongos se realiza normalmente mediante el empleo de fungicidas como el etridiazol.

La mayoría de sus especies son saprobios, absorben los nutrientes de plantas en descomposición o animales, e inofensivos. Sin embargo existen especies oportunista patógenas de plantas, humanos y animales [Nelson y cols., 1994]. Este género también puede producir dos tipos de toxinas denominadas fumonisinas y tricotecenos [Beckman, 1987; Agrios, 2004]. Los tricotecenos son producidos por varias especies y contaminan cereales como avena, trigo, cebada y maíz y producen por norma general intoxicaciones alimentarias [Peraica y cols., 1999]. Las fumonisinas, por su parte, son producidas específicamente por *Fusarium verticillioides* (sin. *moniliforme*). Se ha relacionado la fumonisina B1 (FB1) con la presentación de cáncer esofágico en humanos, leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar porcino entre otros [Peraica y cols., 1999]. Su distribución es mundial, siendo el maíz el cultivo más afectado por esta toxina. Se encuentra clasificada según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) dentro del grupo 2B como “Posiblemente carcinógeno para el ser humano” [IARC, 1987; Peraica y cols., 1999].

Las especies patógenas de plantas hacen de este género un enemigo con alto impacto en el presente y futuro de la industria agrícola y, por extensión, en la nutrición de una parte importante de la población mundial. Desde el punto de vista epidemiológico, se han descrito diversos episodios producidos por *Fusarium* spp. de pérdidas importantes en diferentes tipos de cultivo, como ejemplo cabe destacar la epidemia mundial conocida como “la enfermedad de Panamá” que afectó a la variedad comercial de bananas “Grand Michel” producida por *F. oxysporum* hace 100 años y que llevó a la casi extinción de la especie, la cual, actualmente, solo se cultiva en jardines [Koeppel, 2007]. Otro ejemplo del impacto de *Fusarium* spp. en la agricultura es la amenaza para los cultivos de café. Desde 1927, *Gibberella xylarioides* (*Fusarium xylarioides*), que causa “la marchitez del café”, es responsable de enormes pérdidas en la producción de café en África [Rutherford, 2006]. También son comúnmente infectados cereales como la cebada causando un importante

impacto económico en las industrias de malta y cerveza, así como la cebada forrajera. Las pérdidas totales de cosecha de cebada y trigo causado por *Fusarium* spp. en los EE.UU. entre 1991 y 1996 se estimaron en 3 mil millones de dólares [Priest y Campbell, 2002]. Otro ejemplo es la marchitación vascular de la palma africana producida por *F. oxysporum* siendo esta enfermedad la más destructiva de esta planta, causando grandes pérdidas en áreas altamente productivas del sudeste de Asia [Flood, 2006].

En el sudeste de España, también se han producido importantes pérdidas económicas causadas por este hongo en plantaciones de tomate (*Lycopersicum esculentum*), melón (*Cucumis melo*) y berenjena (*Solanum melongena*) [Tello y Lacasa, 1988; Gómez Vázquez y Tello, 2000; Urrutia Herrada y cols., 2004]. La enfermedad en estas plantas incluye síntomas como marchitamiento vascular y pudrición de la raíz y el tallo [O'Donnell y cols., 1998]. Los efectos de este hongo sobre plantas y frutos se pueden observar en la figura 1.6, donde se muestra una planta de tomate afectada por éste hongo y una espiga de maíz inoculada con *F. verticillioides*.

Entre las enfermedades más significativas que pueden producir en el ser humano cabe destacar la onicomycosis (infección en las uñas), queratitis micótica o queratomycosis (infección de la córnea del ojo), favorecida en ocasiones por la contaminación de lentes de contacto [Zhang y cols., 2007]. También se ha detectado que *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, y rara vez, otras especies pueden producir de forma más generalizada en personas inmunológicamente deprimidas infecciones agresivas al penetrar el hongo en la circulación sanguínea [Howard, 2002]. En estos pacientes, la piel también está a menudo afectada por estos hongos [Gupta y cols., 2000].



Figura 1.6. a) Foto de planta de tomate afectada por *Fusarium* sp. b) Espigas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* mostrando síntomas de podredumbre.

Algunos casos de impacto de *Fusarium* spp. sobre animales es la micosis producida por *F. solani* en ballenas grises (*Halichoerus grypus*), en el león marino de California (*Zalophus californianus*) [Migaki y Jones, 1983], en el cachalote pigmeo (*Logia breviceps*), en el delfín atlántico (*Lagenorhynchus acutus*) [Frasca y cols., 1996], en el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) y en la foca común (*Phoca vitulina*) [Leslie y cols., 2001]. También *F. solani* causa diversas infecciones en crustáceos como gambas (*Penaemus monodon*) y cigalas (*Penaemus semisulcatus*) [Corolini, 1989; Khoa y cols., 2004] y en tortugas marinas [Cabanés y cols., 1997].

1.3.2. El género *Phytophthora*

La taxonomía de este género ha sido muy controvertida dada sus particulares características. Tradicionalmente fue incluido en el reino Fungi y actualmente se le sigue considerando como un “pseudohongo”, aunque se clasifica en el reino Cromistas dentro del grupo *Oomycota* [Dick, 1995a; 1995b]. Los *Oomycotas* difieren de los hongos verdaderos por su naturaleza diploide, la morfología cristaloide de las mitocondrias, el aparato flagelar de las zoosporas (lo que les confiere movilidad), la bioquímica de la pared celular la cual contiene solo esqueleto microfibrilar de celulosa y β -1,3-glucano como material amorfo en lugar de quitina, sus diferentes vías metabólicas por las que no transforman el escualeno a esteroides y su único sistema de biología molecular [Erwin y Ribeiro, 1996].

Este género es agente causal de enfermedades en plantas, no habiéndose descrito ningún caso de enfermedad en el ser humano. De hecho, el nombre de *Phytophthora* deriva del griego y significa *phyto*-planta y *phthora*-destructor. Desde el punto de vista de la agricultura, la entrada de este fitopatógeno supone la pérdida de la cosecha dado el alto grado de facilidad de dispersión y la rapidez en la aparición de los síntomas [MacDonald y cols., 1997; Bush y cols., 2003]. Esta capacidad de atacar a las plantas está favorecida por la rápida producción de las denominadas zoosporas, las cuales constituyen el principal método de dispersión de este género desde los primeros tejidos infectados y bajo condiciones medioambientales favorables, especialmente en presencia de agua. Estas esporas nadadoras asexuales biflageladas o zoosporas son producidas en esporangios donde pueden llegar a diferenciarse entre 20 y 40 zoosporas por esporangio [Bernhardt y Grogan, 1982]. Este fitopatógeno, bajo condiciones de estrés, también genera otro tipo de esporas de pared más gruesa denominadas clamidosporas como estructura de

supervivencia y oosporas que, además, constituyen una fuente de variabilidad genética [Erwin y Ribeiro, 1996]. Las características morfológicas y estructurales de las distintas esporas de éste hongo se describirán en detalle en la sección 3.1.2. El gran desarrollo de esporangios exhibido en agua permite la rápida expansión de la enfermedad lo que causa la pérdida completa de plantaciones en viveros e invernaderos, así como en cultivos hidropónicos [Erwin y Ribeiro, 1996].

Los principales síntomas se producen sobre tejidos aéreos incluyendo la pudrición del fruto, hojas y corona aunque también puede verse afectada la raíz [Hausbeck y Lamour, 2004; Granke y cols., 2009]. Se han descrito asociaciones de enfermedades incluyendo la podredumbre parda de los cítricos, la muerte súbita del roble y otras enfermedades de plantas ornamentales con especies de *Phytophthora* presentes en el agua de riego [Whitesides y Oswalt, 1973; van Kuik, 1992; Garbelotto y Rizzo, 2005]. En particular, la especie utilizada en este trabajo experimental, *P. capsici* es el agente causal de la enfermedad del tizón del pimiento (*Capsicum* sp.), aunque este patógeno también puede infectar otras solanáceas y cucurbitáceas como el pepino (*Cucumis sativus*), berenjena (*Solanum melongena*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), calabaza (*Cucurbita* sp.), calabacín (*Cucurbita pepo*) y melón (*Cucumis melo*) [Gevens y cols., 2007]. La figura 1.7 muestra los efectos que éste fitopatógeno puede generar sobre frutos y plantas en cultivos de pimiento.

Phytophthora sp., en los últimos años, ha adquirido una gran importancia desde el punto de vista científico y económico por ser un patógeno de amplio espectro. Se trata de un patógeno del suelo con una amplia adaptación medioambiental, ya que se puede encontrar tanto en ambientes terrestres [Granke y cols., 2009] como en hábitat acuáticos [Hong y Moorman 2005; Kong y cols., 2009]. Se encuentra distribuida por todo el mundo. Ha sido aislada en Norteamérica y Sudamérica, Asia, África y Europa [Erwin y Ribeiro, 1996]. Más de 20 especies se han recuperado de diferentes fuentes de agua [Hong y Moorman 2005; Kong y cols., 2009], y varios nuevos taxones se han recuperado de ambientes acuáticos a la espera de una descripción formal [Brasier y cols., 2003; Hong y cols., 2008; Reeser y cols., 2011].



Figura 1.7. a) Foto de pimientos afectados por *P. capsici* y b) plantación afectada por el mismo patógeno.

A menudo, el impacto económico global es difícil de estimar. En 2010, 77850 hectáreas de pimiento chili y campana fueron plantados en los EE.UU. con un valor estimado de 772 millones de dólares los cuales son susceptibles de ser atacados por éste fitopatógeno. La producción de hortalizas en todo el mundo se estima en más de mil millones de dólares [Lamour y cols., 2012].

El control de este patógeno se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante prácticas como el barbecho, variación de la época de siembra y de los cultivos y fungicidas. Sin embargo, *P. capsici* no es susceptible a la mayoría de los fungicidas de amplio espectro, por ejemplo mefenoxam (clase fenilamida de los derivados de fungicidas metalaxil), esta insensibilidad ha sido observada en estudios de *P. capsici* en pimiento e incluso se ha observado la aparición de cepas resistentes [Lamour y cols., 2000]. El control de la enfermedad en ocasiones puede resultar muy difícil por lo que el control más efectivo consiste en la aplicación de fungicidas preventivos. Actualmente los productos agroquímicos más utilizados para el control de este patógeno son: Curzate, metalaxyl, fosetil-Al y milfuran [Erwin y Ribeiro, 1996].

1.4. Técnicas convencionales de desinfección del agua

El término desinfección se refiere al proceso que tiene como objetivo la inactivación de microorganismos patógenos, minimizando la probabilidad de transmisión de enfermedades y, en el caso de que el medio sea acuático, evitando su transmisión hídrica. La desinfección se consigue al provocar una alteración en los mecanismos celulares de los organismos mediante la destrucción o alteración de la organización estructural (daños en la pared celular), la interferencia con el metabolismo energético (inhibición de la actividad enzimática), la interferencia con la

biosíntesis y el crecimiento (alterando la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) y todo ello conlleva la pérdida de viabilidad del microorganismo [Blatcley y cols., 1997].

Distintas técnicas se utilizan para la desinfección del agua. Algunas producen una desinfección primaria, en la que el microorganismo es inactivado durante el proceso y se puede añadir un desinfectante secundario para mantener la calidad del agua en los sistemas de distribución. Y otras producen una desinfección secundaria, que supone una barrera final contra la contaminación bacteriana y el recrecimiento, manteniendo una desinfección residual [Al Dufour y cols., 2003].

1.4.1. Eliminación física de microorganismos

Los métodos de desinfección física se aplican considerando los microorganismos como partículas en suspensión. Entre otros podemos encontrar la coagulación, floculación y sedimentación así como la filtración donde se encuentran los procesos de filtración granular, filtración lenta en arena, filtración rápida, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. La aplicación de radiación también se considera un método físico de desinfección, el más habitual es la radiación UV-C.

1.4.1.1. Filtración con membranas

La filtración mediante membranas sigue el principio de la separación de partículas basada en el tamaño de poro y en su distribución. Según la membrana elegida se pueden separar sólidos en suspensión, bacterias, parásitos y quistes, así como proteínas, pesticidas y ácidos húmicos entre otros, de forma que aplicando esta tecnología se puede obtener agua libre de patógenos y compuestos químicos [LeChevallier y Au, 2004]. La figura 1.8 muestra la eliminación de microorganismos en función del tamaño medio del poro del filtro.

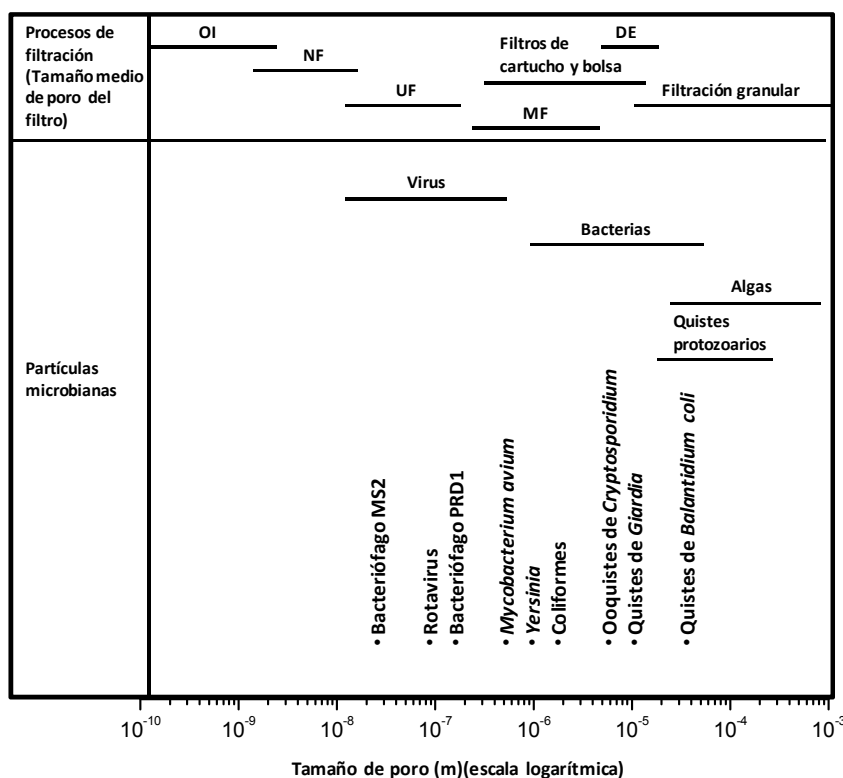


Figura 1.8. Eliminación de microorganismos en función del tamaño de poro del filtro. TD = Tierra de diatomeas; MF = microfiltración; NF = nanofiltración; OI = ósmosis inversa; UF = ultrafiltración [Adaptado de LeChevallier y Au, 2004].

La retirada de partículas del agua mediante el uso de membranas se basa en ejercer una presión transmembrana para conducir el agua, mediante presión o vacío, a través de las mismas, generándose dos corrientes, la del agua tratada o permeado y la del rechazo que contiene las partículas y los sólidos separados. Las membranas pueden clasificarse en función del material (acetato de celulosa, polisulfonas, compuestos de polivinilo, así como materiales cerámicos o aceros inoxidable), su forma y disposición (plana, tubular, transversal o tangencial) y tamaño del poro (microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa).

La tecnología de membrana se ha desarrollado en los últimos años con fines industriales para obtener concentrados o para aprovechar el permeado. En este sentido su aplicación en el tratamiento de aguas presenta un gran interés basado principalmente en las nuevas necesidades que precisa este sector, tales como altos estándares de calidad, reducido impacto medioambiental de los efluentes tratados, mínimo espacio disponible para las instalaciones y amplio rango de aplicación. Una de las ventajas de esta tecnología es que la separación se realiza de manera continua y se puede combinar con otros procesos de separación creando procesos híbridos y el escalado es relativamente sencillo. Sin embargo, presenta el

inconveniente de la colmatación de la membrana (fouling y biofouling), lo que obliga a su limpieza regular para no reducir la producción y, periódicamente, a su sustitución. Además, su uso se encuentra limitado debido a las altas inversiones y los elevados costes de operación que lleva asociados.

1.4.1.2. Radiación Ultravioleta

El método de desinfección UV mediante radiación UV-C consiste en el uso de lámparas que emiten radiación con longitudes de onda de 200 a 280 nm. Esta radiación se utiliza por su alto poder germicida. La aplicación de esta radiación se lleva a cabo mediante lámparas de vapor de mercurio desde las que se transfiere la energía electromagnética al material genético del organismo (ADN o ARN).

La radiación UV-C es absorbida por los nucleótidos, promoviendo la formación de enlaces entre nucleótidos adyacentes, con lo que se forman los conocidos dímeros (Figura 1.9), siendo los más comunes los dímeros de timina-timina, aunque también suelen darse los de citosina-citosina, citosina-timina y de uracilo, en el caso de ARN. La formación de un número suficiente de dímeros implica el colapso del ADN o del ARN de modo que no puede replicarse y, por tanto, el microorganismo muere [Bolton y Linden, 2003]. La inactivación de los microorganismos mediante UV es función de la longitud de onda que absorbe su ADN. El punto máximo se alcanza a las longitudes de onda cercanas a 265 nm (Figura 1.9), por lo que es conveniente que la emisión de la lámpara coincida con el punto de máxima absorción que se encuentra cerca de 265 nm, como es el caso de las lámparas de mercurio de baja presión empleadas convencionalmente, cuya longitud de onda irradiada se sitúa en 254 nm [Harm, 1980].

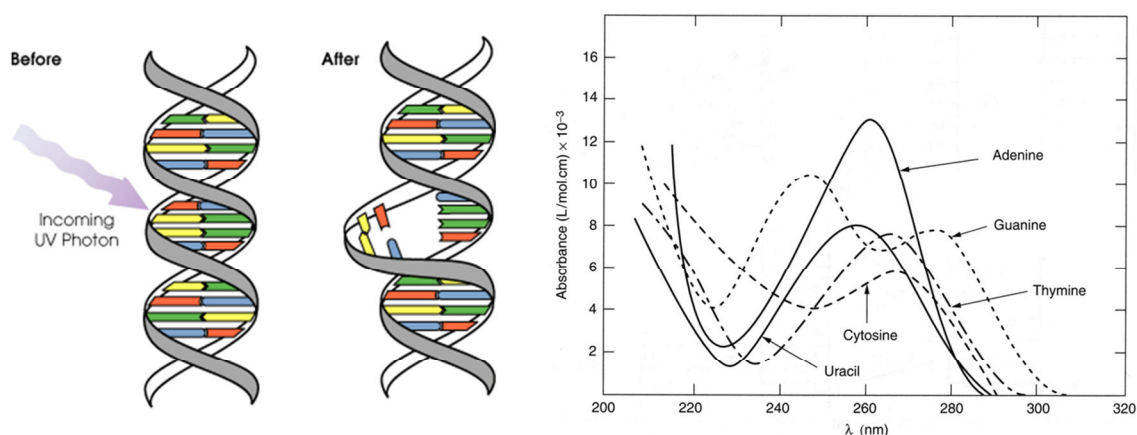


Figura 1.9. Estructura del ADN antes y después de ser irradiado con luz UV-C. Gráfica representando el máximo de absorción de radiación UV por las distintas bases nitrogenadas [Masschelein, 2002].

Las lámparas de media presión irradian luz a mayor intensidad y longitudes de onda más cortas, lo que determina menores tiempos de contacto para lograr un determinado nivel de desinfección. En ocasiones, reducir el tiempo de contacto puede producir un resultado final en el que no se alcanza una desinfección eficiente [Al Dufour y cols., 2003]. Esto se debe a que no todo el sistema, en términos de volumen de agua, se trata adecuadamente lo cual puede estar favorecido por la configuración del sistema, volúmenes de agua excesivos, etc.

Los factores que afectan a la acción germicida de la luz UV-C dependen de la absorción por parte de los microorganismos, lo cual, a su vez, va a depender de las propiedades del propio fluido y de las sustancias presentes en el mismo tales como sólidos en suspensión. Estas partículas pueden crear sombras que eviten la incidencia de la radiación UV sobre los microorganismos por lo que los sólidos en suspensión se limitan a 30 mg/L y, en general, la turbidez a 5 UNF (Unidades Nefelométricas de Formazina). Para la aplicación del tratamiento UV-C, la transmitancia del agua es otro factor importante, por lo que se recomienda que ésta sea por lo menos el 55 %. Las partículas minerales de hierro, manganeso, calcio y magnesio pueden producir incrustaciones en las paredes de la lámpara y absorber parte de la radiación UV-C, por ello se limitan a 0,3 mg/L. Los compuestos orgánicos como el ácido húmico y los taninos absorben parte de la radiación UV-C, por lo que disminuyen la potencia disponible para la desinfección. El estado del equipo, el envejecimiento de las lámparas y la estabilidad del suministro eléctrico también influyen en la capacidad germicida de la radiación UV-C.

Un aspecto importante en la eficiencia de este proceso es la existencia de mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos denominados fotorreactivación o

fotorreparación, en los que una enzima fotorreactiva, tras absorber radiación entre 300 y 500 nm, rompe el dímero formado. Esta capacidad de regeneración se da en bacterias y otros microorganismos, pero nunca en virus, y su intensidad está relacionada con la extensión del daño UV-C, la exposición a la luz reactivadora, el pH y la temperatura del agua. El fenómeno de fotorreactivación requerirá que la exposición del microorganismo a la luz reactivadora no supere más de dos a tres horas desde su inactivación [Groocock, 1984; Masschelein, 2002], teniendo en cuenta que el grado de reactivación es una función inversamente proporcional a la dosis de radiación utilizada.

La velocidad de inactivación microbiana varía en función del microorganismo y de la longitud de onda de la radiación UV-C. En general, dosis de 400 J/m² reducen poblaciones bacterianas entre 4 y 8 log y víricas entre 3 y 6 log. Los protozoos son más resistentes requiriendo mayores dosis de radiación, pero se conoce que 410 J/m² puede reducir hasta 4 log de estos microorganismos y similares reducciones se han observado en esporas de *Bacillus subtilis* [Al Dufour y cols., 2003].

Las principales ventajas de usar radiación UV-C son que no precisa almacenamiento químico ni equipo para su manipulación o alimentación y que no genera subproductos de desinfección identificados. Mientras que entre las desventajas se encuentra la ausencia de actividad residual, y el compromiso de la eficiencia del proceso por variables tales como la transmitancia, contenido en minerales, longitud de onda de radiación y el suministro eléctrico. Entre los principales factores limitantes de su aplicación real se encuentran los elevados costes de inversión, mantenimiento y operación.

Las aplicaciones prácticas de la radiación UV comenzaron en 1901 cuando se consiguió producir esta luz de forma artificial. Los primeros intentos experimentales se llevaron a cabo en Marsella, Francia, en 1910. Entre 1916 y 1926, se usó radiación UV en los Estados Unidos para la desinfección del agua. Sin embargo, la popularidad del cloro y sus derivados, asociados a su bajo coste de aplicación, hicieron que se retrasara la producción de equipos hasta la década de los 50 y más aún hasta los años 70 que es cuando las lámparas UV comienzan a ser fiables y de vida prolongada [Masschelein, 2002].

Al comienzo del siglo XXI, en Europa existen unos 2000 sistemas de desinfección de agua con UV. Sin embargo, este método se aplica principalmente en pequeños sistemas de abastecimiento de agua tales como hospitales, industrias de alimentos y bebidas y hoteles. Recientemente se ha incrementado su uso para la

desinfección de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, especialmente en Estados Unidos y Canadá [Masschelein, 2002].

1.4.2. Eliminación química de microorganismos

Entre los productos químicos más empleados para la desinfección de agua cabe destacar el cloro y sus derivados, el ozono, y de manera minoritaria otros compuestos como el bromo, yodo o el permanganato potásico.

1.4.2.1. Desinfección química con cloro y derivados

El cloro ha desempeñado una función muy importante protegiendo los sistemas de abastecimiento de agua frente a enfermedades infecciosas transmitidas por el agua durante más de un siglo. Además, los desinfectantes basados en cloro son los únicos que proporcionan una protección duradera, ya que previenen el recrecimiento microbiano y proporcionan protección continua durante todo el proceso de distribución del agua, gracias a su efecto residual dependiendo de la dosificación.

La cloración del agua se puede llevar a cabo con diferentes compuestos, como puede ser el cloro gaseoso, los hipocloritos, cloraminas o el dióxido de cloro que, previa reacción con agua, se transforma en ácido hipocloroso que es el que realmente realiza la función germicida.

Entre los factores que afectan a la eficiencia de la desinfección con cloro se encuentran el tipo y la concentración de microorganismos, la naturaleza y concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, temperatura, pH y contenido en materia orgánica. En el tratamiento de aguas es muy importante conocer el tiempo de contacto y la dosis de agente desinfectante. El valor CT combina la dosis de desinfectante y el tiempo de exposición a una mínima cantidad de desinfectante residual, de modo que representa el tiempo (T, en minutos) necesario para que una concentración de desinfectante residual (C, mg/L) inactive un microorganismo [USEPA, 1999]. La tabla 1.7 muestra los valores CT de distintos desinfectantes para varios tipos de microorganismos. Los desinfectantes más efectivos son aquellos que tienen los valores de CT más bajos, destacando en primer lugar el ozono seguido del dióxido de cloro.

Tabla 1.7. Valores CT (en mg min/L) para distintos desinfectantes [Block, 2001].

Microorganismo	Cloro pH 6-7	Cloramina pH 8-9	Dióxido de cloro pH 6-7	Ozono pH 6-7
<i>E. coli</i>	0,034-0,05	95-180	0,4-0,75	0,02
Poliomielitis 1	1,1-2,5	768-3740	0,2-6,7	0,1-0,2
Rotavirus	0,01-0,05	3806-6476	0,2-2,1	0,006-0,06
Fago f2	0,08-0,18	Nd ^a	Nd ^a	Nd ^a
Quistes de <i>Giardia lamblia</i>	47-150	2200 ^b	26 ^b	0,5-0,6
Quistes de <i>Giardia muris</i>	30-630	1400	7,2-18,5	1,8-2,0

^a Nd: no hay datos; ^b 99,99 % de inactivación a un pH =6-9; 90% de inactivación a pH 7 y 25°C.

Múltiples ventajas son las que presenta la aplicación de cloro como método de desinfección, entre otras se puede destacar que es un potente germicida ya que reduce el nivel de los microorganismos patógenos en el agua hasta valores casi imposibles de detectar. La persistencia del cloro residual mantiene el efecto germicida durante un tiempo muy superior a cualquier desinfectante alternativo. También destruye el sulfuro de hidrógeno y elimina el amoníaco y otros compuestos nitrogenados que obstaculizan la desinfección.

En 1974, los científicos de la EPA (Environment Protection Agency) encontraron que el cloro reacciona con ciertos compuestos orgánicos formando trihalometanos (THM) [Metcalf y Eddy, 2005]. Los estudios toxicológicos emprendidos sugirieron que era cancerígeno para animales de laboratorio, apareciendo el temor de que pudieran ser potencialmente cancerígenos también para los humanos. En este contexto, la EPA decidió fijar límites para estos subproductos de desinfección (SPD). El objetivo era reducir los niveles de SPD sin comprometer la protección microbiana, siendo uno de los mejores métodos, la eliminación de los precursores orgánicos antes de la desinfección mediante coagulación y clarificación, adsorción en carbón activo, o membranas.

El dióxido de cloro es un desinfectante más potente que el cloro y la cloramina ya que puede atravesar la membrana celular de la bacteria y destruirla. Su capacidad germicida se produce en un amplio rango de pH (3 a 9) y esta capacidad aumenta con la acidez, siendo más potente que el cloro en un tiempo de contacto más corto. Presenta una excelente acción germicida contra los virus al ser absorbido y penetrar en la capa proteica de la cápsida viral, reaccionando con su material genético. No reacciona con el nitrógeno amoniacal para formar aminas cloradas ni con material oxidable para formar compuestos organoclorados, destruyendo hasta un 30 % de los precursores de THM. Desinfecta y oxida eficazmente actuando sobre *Giardia* sp. y *Cryptosporidium* sp., y no requiere de desinfección secundaria. Sus desventajas son

la descomposición en subproductos inorgánicos (clorito y, en menor grado, clorato) y requiere equipos de generación y manejo de productos químicos en el lugar de uso.

Las cloraminas se obtienen por la reacción de cloro y amoníaco resultando un producto antiséptico muy estable cuya acción es menos potente que la del cloro pero su persistencia en el agua es muy superior. Además presenta menores niveles de formación de THM y ácidos haloacéticos (AHA) y es un desinfectante eficaz de películas biológicas en los sistemas de distribución. Entre las desventajas se encuentran la formación de subproductos de desinfección, incluidos compuestos basados en nitrógeno, la necesidad de mayores dosis y tiempos de contacto que el cloro; su función germicida viral y parasitaria cuestionable (Tabla 1.7), y debido a la generación de amoníaco residual, puede promover la formación de bacterias y algas.

1.4.2.2. Desinfección con ozono (O_3)

El ozono en solución acuosa puede reaccionar con los microorganismos de forma directa igual que oxida la mayoría de compuestos orgánicos. La acción germicida se lleva a cabo gracias a su elevado poder oxidante (Tabla 1.8). Por otro lado, la combinación del ozono con radiación UV, H_2O_2 y H_2O_2 /UV genera una elevada cantidad de radicales hidroxilo, los cuales tienen un alto potencial germicida y, por tanto, un elevado poder de desinfección. Estos últimos procesos son Procesos Avanzados de Oxidación (PAO)(Sección 1.6).

Tabla 1.8. Potenciales redox de algunos oxidantes referidos al electrodo normal de hidrógeno [Legrini y cols., 1993]

Especie	Potencial de oxidación
Flúor	3,06
Radical hidroxilo	2,80
Oxígeno singlete	2,42
Ozono	2,07
Peróxido de Hidrógeno	1,78
Radical peróxido	1,70
Permanganato	1,68
Ácido hipobromoso	1,17
Cloro dióxido	1,57
Ácido hipocloroso	1,45
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Iodo	0,54

La escasa implantación del ozono como método de desinfección es debido a sus costes de inversión y operación [Metcalf, 2005], además de precisar un método de desinfección residual, normalmente la cloración. El ozono no forma subproductos de desinfección organoclorados, pero pueden aparecer compuestos bromados si el agua contuviera bromuros, además de otros productos orgánicos como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, quininas y peróxidos que son potencialmente cancerígenos y mutagénicos [Silva y cols., 2010].

Se han observado valores CT por debajo de 0,5 mg min/L en la inactivación de 2 log en bacterias, y 0,5 y 1 mg min/L consiguen inactivar 2 log de partículas virales con ozono. En el caso de los quistes de *Giardia* spp. se ha logrado inactivar hasta 2 log, a temperaturas por encima de 15 °C con valores de CT de 0,7 mg min/L, mientras que a iguales condiciones, *Cryptosporidium* spp. requiere valores de CT diez veces más altos [Al Dufour y cols., 2003]. En general, el tratamiento con ozono, presenta valores de CT inferiores a los del cloro (Tabla 1.7).

1.4.3. Técnicas de potabilización doméstica

Las técnicas más habituales de desinfección doméstica utilizadas en países en vías de desarrollo son el hervido de agua, la cloración casera, la adición de semillas naturales o el empleo de filtros [OMS, 2011].

El hervido de agua es una técnica que solo precisa de combustible (leña, gas, gasolina) y un recipiente resistente al calor. Se pueden obtener de 3 a 4 L por recipiente y el agua puede presentar cualquier tipo de características físicas. Para alcanzar la desinfección se debe hervir varios minutos, aunque la duración de hervido aumenta con la altitud, añadiéndose un minuto por cada mil metros por encima del nivel del mar.

Los compuesto químicos más empleados en desinfección doméstica de agua son el cloro y el alumbre potásico $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. La cloración casera requiere un recipiente cerrado y cloro (comercial o hipoclorito de sodio). Se usa normalmente para desinfectar de 20 a 25 L. El agua debe ser relativamente clara, con una turbidez inferior a 5 UNF, por lo que en caso contrario se filtra previamente. El alumbre potásico es un compuesto práctico y económico que permite sedimentar las partículas suspendidas en el agua. Como alternativa se puede usar el sulfato de aluminio que tiene un efecto similar. Este proceso no garantiza un agua apta para consumo humano, por lo que requiere de un tratamiento de desinfección adicional.

Otra técnica empleada en algunas comunidades en América, que no ha sido difundida masivamente, es la adición de productos naturales como semillas de frutos, habas, yuca, durazno, etc. Las semillas secas se muelen y se añaden 0,5 g de polvo por cada litro de agua a tratar. Tras dos horas de reposo, las partículas sedimentan en el fondo del recipiente, y se utiliza la parte superior del volumen de agua. Esta técnica tampoco garantiza agua apta para consumo.

La sedimentación se emplea para aclarar el agua ya que durante el almacenamiento en recipientes, los sólidos en suspensión y algunos de los patógenos se depositan en el fondo del recipiente. Al almacenar el agua que tiene sólidos suspendidos en condiciones no contaminantes por un día se puede eliminar más del 50 % de las bacterias. Períodos más largos de almacenamiento conducirán a reducciones aún mayores. El agua que queda en la parte superior del recipiente será relativamente clara y tendrá menos patógenos. Pero igualmente no garantiza su completa desinfección.

Distintos tipos de filtros se utilizan a nivel doméstico, como el filtro de bioarena. Se trata de un envase que contiene capas de arena y grava. El filtro permite tratar hasta 60 L/hora. Otro tipo de filtro es el filtro lento de arena. Este se compone de barriles de metal o plástico, que contienen capas de arena y grava. El agua a tratar debe estar clarificada antes de llenar el filtro (<30 UNF). En ambos casos, el agua pasa lentamente a través de las capas y sube por su propio peso por una tubería conectada a la pared del filtro. El uso continuo del filtro hace que los espacios entre los granos de arena se obstruyan, de modo que, cuando el agua pasa muy lentamente, se debe hacer una limpieza de las capas de arena. Para una mayor seguridad se recomienda desinfectar posteriormente el agua filtrada.

Los filtros cerámicos utilizan un elemento filtrante de arcilla poroso saturado con plata coloidal, colocado en un recipiente de arcilla o plástico. Pueden tener forma de cazuela, vela o disco y se fabrican localmente. Hay que usarlos con aguas claras o filtradas previamente. Permiten filtrar 2 L por hora. Una variante de los filtros cerámicos es el filtro de mesa, este se compone de dos recipientes de PVC (20 L); el superior contiene uno o dos filtros de cerámica, y el inferior almacena el agua. El agua a tratar debe tener menos de 5 UNF, obteniéndose 20 L al día. Se coloca el agua en el recipiente superior donde se retienen en primer lugar las partículas gruesas, evitando así la colmatación de la arena al añadir el agua a filtrar. La arena retiene las partículas finas y los filtros de cerámica se encargan de la microfiltración, reteniendo protozoarios y gran parte de las bacterias.

Una técnica muy distinta a las anteriores es la que se conoce como desinfección solar (SODIS). Esta técnica permite obtener agua libre de patógenos requiriendo solamente botellas de plásticos transparentes de tereftalato de polietileno (PET) de 1,5 a 3 L y luz solar. Se pueden obtener de 2 a 40 L al día, y es necesario un pre-tratamiento para aguas con una turbidez > 30 UNF. Las botellas transparentes y limpias se llenan con el agua a tratar y se exponen al sol durante 6 horas, si el día es nublado se dejan dos días expuestas a la radiación solar. Si se exponen las botellas al sol sobre una superficie metálica, se reduce el tiempo requerido para la desinfección debido al aumento de la temperatura del agua. El agua desinfectada no tiene riesgo de recontaminación por estar dentro de la botella y se puede tener guardada 2 días a la sombra. Las características de esta técnica así como el efecto germicida de la radiación solar se encuentran detallados en la sección 1.5.

1.4.4. Técnicas de desinfección en agricultura

Las técnicas empleadas para la desinfección del agua y mantener los cultivos libres de patógenos pueden variar desde procesos físicos como la solarización al empleo de productos químicos. Algunos de estos métodos pueden afectar muy negativamente al rendimiento del cultivo o producir derivados potencialmente tóxicos para la agricultura.

1.4.4.1. Tratamientos físicos

Entre los tratamientos físicos más empleados en la desinfección del suelo se encuentra el vapor de agua. Esta técnica es muy eficaz pero muy costosa y el efecto es mayor sobre suelos secos que húmedos. El vapor de agua se obtiene en una caldera móvil con una temperatura que oscila entre los 80 y 100 °C, desde donde se conduce por tubería y se inyecta vapor al suelo.

Un tratamiento que está aumentando recientemente en algunos países, como por ejemplo España es lo que se conoce como solarización de suelos. Esta técnica logra desinfectar el suelo recubriendo el terreno con una lámina plástica de polietileno de un espesor entre 0,025 y 0,1 mm durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 6 semanas, pudiendo efectuar riegos por debajo de la lámina durante este tiempo. Así se alcanzan temperaturas de 45 a 50 °C a una profundidad de 10 cm y de 38 a 45 °C a 20 cm, lo que provoca la destrucción de todos los parásitos existentes en el suelo.

Además, con la solarización se consigue una reducción de las pérdidas de calor latente por evaporación ya que el plástico impide la evaporación del agua del suelo al producirse una condensación del agua en la cara interna del plástico. Asimismo se reducen las pérdidas de calor debidas a la emisión infrarroja del suelo, y aumenta la capacidad calorífica y la conductividad térmica del suelo, lo que produce un aumento en la eficiencia de la transmisión del calor. La solarización se suele realizar los meses de verano, en los que la temperatura ambiental es más alta. Esta técnica tiene un claro efecto herbicida pero los estudios realizados recientemente demuestran que algunas malas hierbas, sobre todo aquellas que son perennes, tienen la capacidad de rebrotar después del tratamiento [Labrada, 2004].

1.4.4.2. Tratamientos químicos

Los compuestos químicos empleados para el control de plagas en agricultura son los pesticidas. Entre ellos destacan el bromuro de metilo. Este es un fumigante de acción general con una clara actividad contra nemátodos, insectos, hongos y malas hierbas. Se formula conjuntamente con clorocipicrina por la gran toxicidad del bromuro y porque la acción de ambos juntos es más intensa que por separado. Este aditivo, al igual que otros fumigantes biocidas, afecta a la microflora del suelo, sobre todo a las bacterias nitrificantes y destruye la flora celulítica. También se han detectado casos de fitotoxicidad en algunos cultivos hortícolas como la cebolla, el clavel, el crisantemo, etc., pudiendo llegar a producir resistencia de algunos patógenos criptogámicos. El empleo de este compuesto es muy controvertido ya que afecta a la capa de ozono.

Otros compuestos empleados son el dicloropropeno y sus mezclas, los cuales, además de nematicidas (dicloropropano y metilisotiocianato) amplían el campo de actividad hasta hongos y malas hierbas en germinación. Algunos fungicidas, insecticidas y en cierta medida herbicidas se pueden encontrar con el nombre comercial de Metam-Sodio, Metam-Potasio, Dazomet y Nema. El cloro se emplea como desinfectante del agua de riego, sin embargo es frecuentemente fitotóxico y a menudo inefectivo [Jarvis, 1998].

Para la desinfección del suelo también existen productos más específicos como el quintoceto o PNCB que controlan diferentes patógenos fúngicos del suelo como *Sclerotinia* spp., *Phytium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Plasmodihora brassicae* entre otros, y también se utiliza en la desinfección de semillas. El fungicida conocido como Nabam se aplica normalmente en el agua de riego y hace frente al mildiu del

pimiento. El etridiazol se aplica directamente al terreno para la desinfección de semillas, combatiendo patógenos como *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. Otros productos con acción insecticida y nematicida son el carbofurano, fenamifos, oxamilo, furatiocarb, forato y aldicarb.

Algunos de los efectos secundarios sobre el suelo tras la aplicación de cualquiera de los dos métodos estudiados, tanto físicos (vapor de agua) como químicos, son la acumulación excesiva de nitrógeno amoniacal y el aumento de la salinidad. Otros efectos pueden derivarse del uso de compuestos químicos (pesticidas, fertilizantes, fungicidas, etc.) tanto en el suelo y agua como en la fauna y flora de un ecosistema. Entre estos efectos se puede destacar la intoxicación directa de humanos y animales. Su uso excesivo puede determinar la aparición de resistencias de las plagas a los plaguicidas. La degradación del medio ambiente por compuestos químicos se debe a varias acciones que pueden tener lugar de forma simultánea, por ejemplo la contaminación de los recursos hídricos lo cual trae aparejado la pérdida de fauna y flora acuática, pérdida del recurso como fuente de agua y alimento e intoxicación humana y animal. Por otro lado, según la composición química del plaguicida, estos pueden ser absorbidos por partículas de arcilla o materia orgánica afectando gravemente al suelo, su fauna y flora mientras que otros son fácilmente arrastrados por el flujo del agua lo que provoca la contaminación de aguas subterráneas. Otro de los principales problemas asociados al uso de plaguicidas químicos es la persistencia en las cadenas tróficas, insecticidas con estructura química del tipo de los compuestos clorados, poseen la capacidad de fijarse en el tejido adiposo animal y conlleva la acumulación paulatina en la cadena trófica. Además, al igual que sobre plagas, estos compuestos tienen acción sobre insectos y flora benéfica que cumplen un papel fundamental en las cadenas tróficas y que igualmente son destruidas.

1.5. La radiación solar y su efecto germicida

1.5.1. Radiación solar terrestre

A la superficie de la tierra llegan longitudes de onda comprendidas entre 320 y 900 nm, correspondientes a la radiación UV-B lejana, UV-A, radiación visible e infrarroja. De toda la radiación que incide sobre la superficie terrestre, la densidad superficial de energía radiante se distribuye en un 7,8 % de ultravioleta, un 47,3 % de visible y un 44,9 % de infrarroja [Fernández-Ibáñez, 2004].

La radiación solar global recibida en la superficie terrestre se puede dividir en la suma de dos componentes, directa y difusa. La radiación directa es la que no sufre interacciones al atravesar la masa atmosférica. Y la radiación difusa es la que llega al nivel del suelo con una dirección distinta a la directa debido a los procesos de absorción y dispersión de luz que tienen lugar a su paso por la atmósfera. En general, la irradiancia solar ultravioleta presenta una proporción de componente difusa, en relación con la global, relativamente elevada si se compara con la visible. Esto es debido a que la presencia de nubes y vapor de agua dispersa los fotones UV, aunque éstos no son absorbidos.

En un emplazamiento determinado, la radiación UV está sometida a variaciones en su intensidad por las posibles alteraciones de los agentes atmosféricos que la atenúan, así como por las condiciones climatológicas siempre cambiantes, siendo la presencia de nubes, el factor predominante de atenuación en la región UV [Blanco, 2002a].

De toda la energía radiante emitida por el Sol en un año (Potencia = 10^{33} erg/s → Energía = $3,15 \times 10^{34}$ J = $8,75 \times 10^{27}$ kWh), tan sólo se reciben en la Tierra $5,4 \times 10^{24}$ J. Cuando la energía radiante emitida por el sol alcanza nuestro planeta sufre, como ya se ha mencionado, una serie de fenómenos de absorción, dispersión, etc., cuya naturaleza e intensidad dependen de los componentes atmosféricos con los que interacciona y de la longitud de onda de la radiación. La figura 1.10 refleja el efecto de los distintos elementos atmosféricos sobre la radiación solar recibida en la superficie terrestre.

Aunque se puede establecer un valor promedio estimado de irradiancia global UV recibida, los valores de densidad de energía UV varían con la localización del emplazamiento (longitud y latitud) y con el tiempo. Por ello, es muy importante medir en cada localización estos valores durante los experimentos solares, y para ello se emplean piranómetros de radiación UV global (descrito en capítulo 2, sección 2.6).

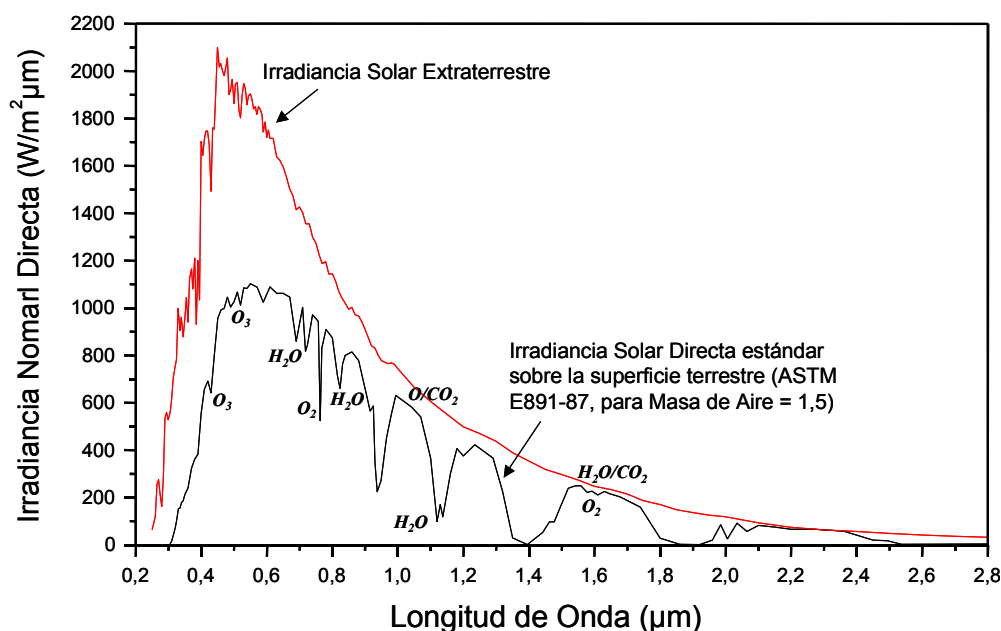


Figura 1.10. Espectros terrestre con el Sol a 48,2° de ángulo cenital [ASTM, 1987] y extraterrestre [Thekaekara, 1973].

1.5.2. Desinfección de agua por radiación solar

Desde tiempos muy antiguos se conoce la acción negativa que tiene la radiación solar sobre la capacidad de reproducción de los microorganismos. Sin embargo fue Acra y cols. los que definieron el concepto de desinfección solar (SODIS) aplicado a la desinfección de agua de bebida y soluciones de rehidratación oral [Acra y cols., 1980]. En 2005, el tratamiento SODIS, fue aprobado por la OMS como uno de las opciones de tratamiento recomendados para desinfectar agua a escala doméstica, especialmente recomendado para países en vías de desarrollo [OMS, 2009. http://www.who.int/household_water/en/].

Este proceso combina el efecto de la radiación solar junto con el aumento de temperatura para inactivar principalmente bacterias en agua. El sistema requiere la disponibilidad de botellas de plástico (PET) como contenedores para llenarlas con agua contaminada con una turbidez inferior a 30 UNF. El agua se expone al sol durante un mínimo de 6 horas para obtener las ventajas sinérgicas entre radiación UV solar y temperatura [Wegelin y cols., 1994], mientras que en días nublados se requiere un periodo de al menos 2 días consecutivos de exposición.

La desinfección bacteriana por radiación solar es proporcional a la intensidad de la radiación y a la temperatura e inversamente proporcional a la profundidad del

agua, debido a la dispersión de la luz. La atenuación de la radiación en profundidad de la capa de agua depende de la longitud de onda, por ejemplo, de 200 a 400 nm, la reducción es de menos del 5 % por metro de profundidad, y a mayores longitudes de onda ésta puede ser de hasta un 40 % por metro [Caslake y cols., 2004].

Cada fracción del espectro UV genera diferentes daños sobre las células, de modo que ésta se divide en:

- UV-Vacio (100-200 nm): no tiene efectos sobre las células porque es rápidamente disipada en el agua en distancias cortas y además no alcanza la superficie terrestre.
- UV-C (200-280 nm): es la más energética y peligrosa para las células ya que comprende la longitud de onda de máxima adsorción del ADN. No alcanza la superficie terrestre porque es retenida principalmente en la capa de ozono. Esta radiación, como ya se ha mencionado anteriormente, es empleada para desinfección de agua mediante el uso de lámparas.
- UV-B (280-320 nm): Al igual que la UV-C queda casi totalmente retenida por la capa de ozono y puede provocar alteraciones en el ADN.
- UV-A (320-400 nm): llega casi en su totalidad a la superficie terrestre y sus efectos son iguales a los del UV-B pero requiere de mayores dosis para generar el mismo efecto al ser menos energética.

La figura 1.11 resume los principales daños generados sobre las células por la fracción del espectro solar que corresponde a cada rango de radiación ultravioleta. La inactivación de células microbianas por exposición a la radiación UV obedece a distintos mecanismos que dependen del rango UV empleado.

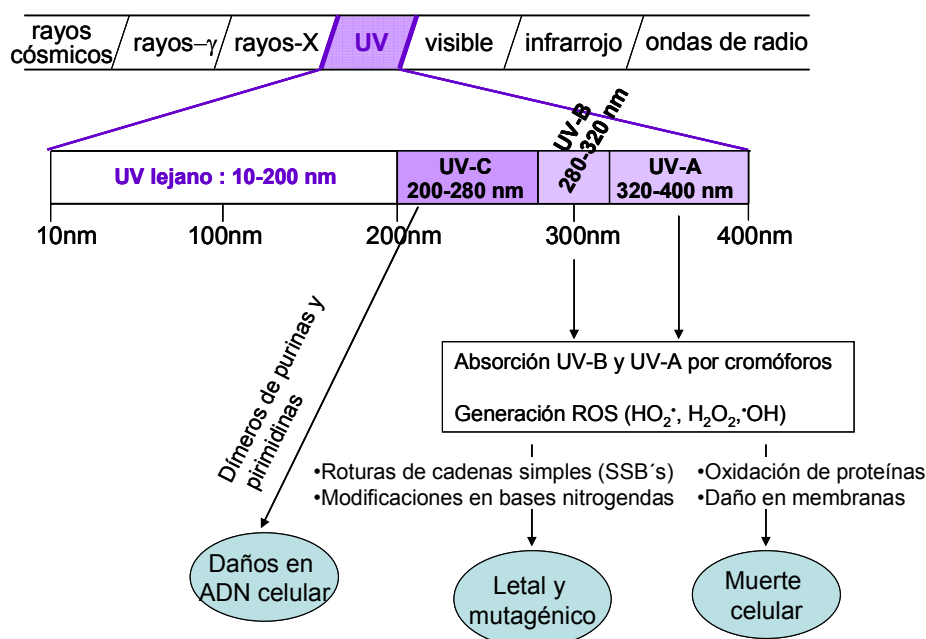


Figura 1.11. Principales daños biológicos producidos por las distintas franjas del espectro UV [Malato y cols., 2009].

La luz del sol utilizada durante la desinfección solar se compone principalmente de los rayos UV-A (sólo un 4,5 % de la radiación UV solar es UV-B) y el mecanismo de inactivación principal es un proceso fotooxidativo debido a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés) tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Las ROS pueden provocar la peroxidación de lípidos e incluso lesiones del ADN mediante la formación de dímeros de pirimidina. Cuando las ROS reaccionan con el ADN, éste se rompe en una sola cadena modificándose las bases nitrogenadas, lo que puede ser letal y mutagénico. Además se pueden oxidar proteínas y provocar daños en la membrana que conducen a la muerte celular. Las diferencias en la inactivación de bacterias a temperaturas de entre 12 y 40 °C parecen ser insignificantes [Wegelin y cols., 1994; Berney y cols., 2006]. Sin embargo, cuando la temperatura sube a 50 °C la acción bactericida se duplica, debido a la fuerte sinergia entre la radiación UV y el aumento de temperatura [McGuigan y cols., 1998].

El éxito del proceso SODIS ha sido probado experimentalmente en multitud de patógenos del agua [Boyle y cols., 2008; Ubomba-Jaswa, 2009a]. Sin embargo, el verdadero efecto positivo del empleo de esta técnica se ha observado mediante los estudios de campo que corroboran la reducción de la incidencia de enfermedades de transmisión hídrica como la diarrea cuando la población utiliza éste método de desinfección del agua de bebida. Los primeros ensayos de campo se llevaron a cabo

en Kenia, en poblaciones Maasai, y demostraron la reducción de la incidencia de diarrea en niños menores de 5 años comparada con grupos control (aquellos que no utilizaron SODIS) [Conroy, 1996]. A este estudio le han seguido otros realizados en poblaciones de Camboya, comunidades rurales de Kenia y Sudáfrica entre otros, revelando datos muy positivos en cuanto al impacto del uso de SODIS como técnica de tratamiento de aguas para reducir diarreas en niños menores de 5 años [du Preez y cols., 2010; McGuigan y cols., 2011; du Preez y cols., 2011].

Los esfuerzos por mejorar y entender este proceso constituyen por si solo un área de investigación. Proyectos europeos como SODISWATER (EU FP6-2006-INCO-031650) [www.rcsi.ie/sodis] han permitido no solo desarrollar estudios de campo sino también mejorar la eficiencia del proceso mediante el escalado de fotoreactores solares de bajo coste que permiten el incremento del volumen tratado. Se han obtenido resultados muy prometedores mediante el desarrollo de un reactor solar que permite inactivar 25 L de agua contaminada con 10^6 CFU/mL de *E. coli* K-12 en 5 horas, en días completamente soleados e incluso con una turbidez de 100 UNF [Ubomba-Jaswa y cols., 2010].

1.6. Captadores Solares CPC

Los reactores tipo CPC (Colectores Parabólicos Compuestos) surgieron en los años 80 para concentrar radiación solar mediante dispositivos fijos. Estos sistemas combinan características de los sistemas parabólicos de alta concentración y alta temperatura (por encima de 400 °C) y los sistemas planos fijos no concentradores (hasta 150 °C). Las ventajas de este sistema para su aplicación a la fotocátalisis solar se resumen a continuación [Romero y cols., 1999; Blanco y cols., 2000; Malato y cols., 2002a; 2002b; 2004; Robert y Malato, 2002]:

- Aprovechamiento de radiación directa y difusa, frente a los de seguimiento de la trayectoria solar, los cuales sólo captan la directa.
- Su rendimiento óptico es muy alto ya que aprovechan toda la radiación que les llega y, puesto que no recibe un flujo fotónico excesivo, se obtiene una eficiencia en las reacciones de fotocátalisis muy elevada.
- No se producen aumentos de temperatura importantes en el seno de la reacción fotocatalítica, por lo que se evitan problemas de pérdidas o volatilización de compuestos orgánicos.

- Permite el uso de reactores presurizados, tanto para evitar pérdidas de volátiles como para aumentar la concentración de O_2 , si fuese necesario.
- Requiere el uso de un reactor tubular evitando los problemas de los sistemas no concentradores, que tienen flujo laminar y ofrecen una transferencia de materia muy baja. En el tubular se puede producir flujo turbulento, favorable para la fotocatalisis.
- Sus costes de construcción, instalación y mantenimiento se pueden abaratar bastante si se compara con los captadores de seguimiento.

Los captadores CPC son estáticos y presentan una superficie reflectante cuya sección es una curva compuesta por, a su vez, dos curvas que, para el caso de un absorbedor cilíndrico, son una parábola y la envoluta del absorbedor. En el caso de aplicaciones fotocatalíticas, el absorbedor es un reactor cilíndrico transparente, lo que permite el bombeo del agua.

Los captadores tipo CPC consiguen concentrar sobre el receptor toda la radiación solar que incide sobre los mismos por debajo del ángulo de aceptación ($2\cdot\theta_A$, Figura 1.12) y permiten obtener un factor de concentración (FC) de 1 [Collares-Pereira y cols., 1995; Blanco y cols., 2002a].

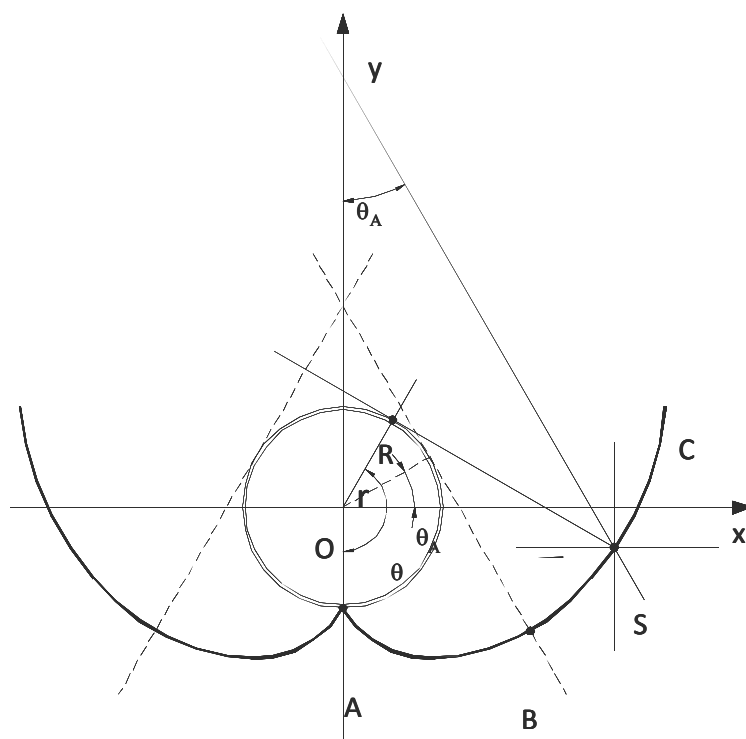


Figura 1.12. Esquema de diseño de la curva del captador CPC [Blanco, 2002a].

Tal caso ocurre cuando el semiángulo de aceptación es 90° , lo cual permite captar toda la radiación UV, directa y difusa, que alcanza al área de apertura del CPC. El factor de concentración de un captador CPC de dos dimensiones viene dado por la ecuación 1.1.

$$FC_{CPC} = \frac{1}{\sin \theta_A} = \frac{A}{2\pi r} \quad (1.1)$$

Donde (θ_A) es el semi-ángulo de aceptación, r es el radio del absorbedor y A es la apertura del captador. El semi-ángulo de aceptación (θ_A) , para aplicaciones fotocatalíticas es $60^\circ - 90^\circ$. Este amplio ángulo de aceptación permite que el receptor pueda recoger tanto radiación directa como una gran parte de la radiación difusa. La luz reflejada por el espejo CPC se distribuye en todo el tubo receptor de modo que toda la circunferencia del tubo receptor está iluminada de forma homogénea con la totalidad de la luz UV que entra en la apertura del CPC (Figura 1.13).

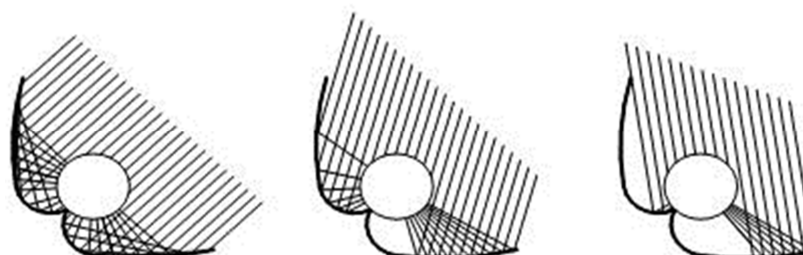


Figura 1.13. Diagrama de rayos de la radiación reflejada en la superficie de un espejo CPC [Blanco y cols., 2000; 2002a]

Los dispositivos CPC para aplicaciones fotocatalíticas se fabrican generalmente con reflectores de aluminio anodizado ya que se trata de una superficie de alta reflectividad en el UV que además es resistente a la alta radiación solar y a las condiciones meteorológicas adversas [Malato y cols., 1996; Vidal y cols., 1999; Blanco y cols., 2000; 2002b].

El sistema completo debe ser cerrado, de modo que el medio acuoso pueda mantenerse sin alterarse al pasar por el sistema de tuberías, y que el material empleado para este objetivo no se vea afectado ni por el tipo de reactivo ni por los distintos pHs ni por temperaturas ligeramente altas ($40-50^\circ\text{C}$). El material generalmente utilizado en el sistema de tuberías y valvulería es el polietileno.

También debe permitir la fluidez del líquido a una mínima presión y máxima homogeneidad. El movimiento del agua a lo largo del sistema se lleva a cabo con bombas centrífugas cuya potencia se escoge en función del volumen total del reactor y el máximo flujo requerido para el tratamiento fotocatalítico (normalmente es un régimen turbulento). Adicionalmente, lo deseable es que sea resistente a la intemperie y fácil de manejar y de limpiar por el usuario.

Desde el punto de vista de su transparencia en el rango UV el mejor material para el tubo reactor es el cuarzo, pero es muy caro. Por ello, y para cumplir todas las exigencias anteriores, se utiliza el vidrio borosilicatado, a pesar de que presenta el problema de que contiene cierta cantidad de hierro que absorbe fotones de longitud de onda inferior a 400 nm [Blanco y cols., 2002b]. Sin embargo, una reducción en la cantidad de hierro (<50 mg/kg de vidrio) permite obtener vidrios de alta transmisividad en el rango UV de 300 a 400 nm [Blanco y cols., 2000].

Tanto los espejos CPC como los tubos de vidrio borosilicatado se montan sobre un marco que, a su vez, es el soporte para la conexión de los tubos, válvulas, bombas, etc. [Blanco y cols., 2000].

La energía UV global anual recibida sobre un plano aumenta con la inclinación fija del captador solar. Este incremento depende de varios factores como las condiciones climáticas, inclinación, orientación y la cantidad de radiación solar directa y difusa en una determinada localización [Duffie y Beckman, 2006]. La inclinación del reactor hacia el ecuador favorece la captación de la radiación solar directa en detrimento de la difusa. La inclinación óptima coincide con la latitud del emplazamiento donde se ubica el captador. Los reactores tipo CPC ubicados en la Plataforma Solar de Almería (latitud: 37°84' N, longitud: 2°34' W), se encuentran inclinados 37° sobre la horizontal y orientados hacia el sur. Según Duffie y Beckman la ganancia anual de radiación solar global es de un 10 % en el plano inclinado respecto al horizontal [Duffie y Beckman, 2006]. Este balance positivo se debe a que el espectro global que alcanza la superficie terrestre presenta una elevada fracción de radiación directa cuya captación se ve favorecida en el plano inclinado. En la figura 1.14 se representa la relación de la irradiancia mensual medida en la PSA en el plano inclinado respecto al horizontal del espectro global y UV.

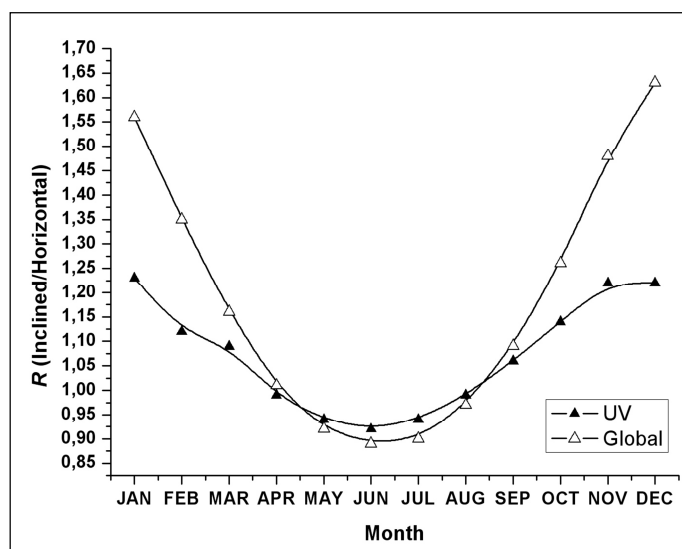


Figura 1.14. Irradiancia mensual media en la PSA: relación entre medida en plano inclinado y horizontal (espectro global y UV) [Navntoft y cols., 2012].

Las medidas de irradiancia solar realizadas en la PSA durante varios años en plano horizontal e inclinado (37°) y en el espectro global y UV muestran que durante los meses de agosto a abril la ganancia de radiación solar oscila entre 1 y 1,25 en el rango UV y de 1 a 1,55 en el global. Por otro lado, en los meses de mayo a julio se da una pérdida en esta relación de hasta 0,95 (UV) y 0,85 (global) (Figura 1.14) [Navntoft y cols., 2012].

Son muy numerosos los trabajos científicos que demuestran que el uso de reactores solares tipo CPC tienen un gran potencial para degradar contaminantes persistentes en agua mediante procesos fotocatalíticos [Agüera y cols., 2000; Herrmann y cols., 2002; Augliaro y cols., 2002; Malato y cols., 2000; 2000b; 2009]. Recientemente también se ha demostrado con éxito su capacidad para la desinfección de aguas [Fernández-Ibáñez y cols., 2005; Sichel y cols., 2007b; Navntoft y cols., 2008; Ubomba-Jaswa y cols., 2010]. Las instalaciones experimentales de la PSA (Figura 1.15) cuentan con un gran número de plantas CPC para la investigación en los tratamientos fotocatalíticos. Todos ellos se basan en el uso de captadores estáticos tipo CPC con reactores de vidrio tubulares, variando los valores de parámetros tales como por ejemplo el paso óptico, volumen total, sistema de post-tratamiento, pre-tratamiento, etc., según la investigación para la que se utilizan.



Figura 1.15. Vista general de los foto-reactores CPC en las instalaciones de la PSA.

1.7. Procesos Avanzados de Oxidación

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) son procesos oxidativos basados en la generación de radicales hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$). Estos son la segunda especie con mayor potencial oxidante (potencial $E_0 = 2,80 \text{ V}$) tras el flúor (ver Tabla 1.8). Los radicales hidroxilo, caracterizados por su baja selectividad, pueden mineralizar casi cualquier compuesto orgánico. Es por ello que, además de degradar compuestos recalcitrantes, son eficientes en la inactivación de microorganismos. De entre los PAO actualmente disponibles (Tabla 1.9) esta memoria se centra en el estudio de aquellos que utilizan radiación solar como fuente de energía.

Tabla 1.9. Principales procesos avanzados de oxidación.

No-fotoquímicos	Fotoquímicos (Lámpara UV o radiación solar)
Fenton	UV/ H_2O_2
$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	UV/ O_3
Oxidación electroquímica	UV/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$
Cavitación hidrodinámica/ultrasónica	UV/ TiO_2
Agua sub/super crítica	Foto-Fenton

El término fotocatalisis fue definido por primera vez en el año 1976 por Carey como la aceleración de una foto reacción mediante la presencia de un catalizador, siendo la luz y el catalizador imprescindibles [Carey, 1976]. Este término incluye un proceso según el cual una especie química es alterada como resultado de absorción de radiación por parte de una especie fotosensible, que, en el caso de la fotocatalisis,

es el catalizador. El concepto de fotocátalisis heterogénea se basa en el uso de un sólido semiconductor (TiO_2 , ZnO , CdS , óxidos de hierro, ZnS , etc.) irradiado con fotones de longitud de onda apropiada para generar una reacción en la interfase sólido/líquido o sólido/gas. Por definición, el catalizador debe poder ser reutilizado después de actuar en el sistema de oxidación-reducción sin sufrir cambios significativos [Herrmann, 2005]. En la fotocátalisis homogénea, todos los componentes se encuentran en la misma fase, generalmente disueltos en la fase líquida y se emplean sales de hierro, cobre, etc.

En este trabajo se han utilizado principalmente dos PAO: la fotocátalisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO_2) y el proceso de foto-Fenton con sales de hierro (fotocátalisis homogénea), ambos activados con radiación solar natural.

1.7.1. Fotocátalisis heterogénea con dióxido de titanio (TiO_2)

1.7.1.1. Fundamentos

Los fotocatalizadores más investigados hasta el momento son los óxidos metálicos semiconductores y, particularmente, el TiO_2 que presenta una elevada estabilidad química y es apto para trabajar en un amplio rango de pH. Además, el coste relativo de este semiconductor es bajo ya que el titanio es el noveno compuesto más abundante de la corteza terrestre. Sus costes de producción son bajos pues existe un mercado de TiO_2 en todo el mundo, con lo cual se produce en grandes cantidades. Se utiliza para numerosas aplicaciones y productos como en pinturas, protectores solares, medicamentos, pasta de dientes, etc. Las aplicaciones de procesos fotocatalíticos con rendimientos cuánticos máximos se han registrado siempre con TiO_2 . En particular, el catalizador comercial Aeroxide P-25 (Evonik Degussa Corporation, antes Degussa P25) es la forma más activa de entre todas las disponibles y generalmente proporciona las mejores eficiencias de degradación [Sakthivel y cols., 2000; Yamazaki y cols., 2001]. El dióxido de titanio puede encontrarse en estado oxidado como tres formas cristalinas distintas, brookita, rutilo y anatasa, siendo ésta última la más activa desde el punto de vista fotocatalítico [Fernández-Ibáñez, 2004]. Aeroxide P-25 se caracteriza por tener una proporción 70:30 de anatasa:rutilo [Tech. Bulle Pigm., Degussa, 1991], un tamaño medio de partícula de 20-40 nm y un área específica (área superficial por unidad de masa de muestra) de $55(\pm 5) \text{ m}^2/\text{g}$ [Fernández-Ibáñez, 2004].

La figura 1.16 muestra un diagrama del proceso de fotocátalisis en una partícula de TiO_2 iluminada por luz solar. Este proceso se produce cuando la partícula

es irradiada con una longitud de onda cuya energía es superior al ancho de banda del semiconductor ($\lambda < 387 \text{ nm}$; $E > E_G = 3,2 \text{ eV}$), provocando el paso de un electrón desde la banda de valencia hasta la banda de conducción para generar, en presencia de agua, radicales hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$).

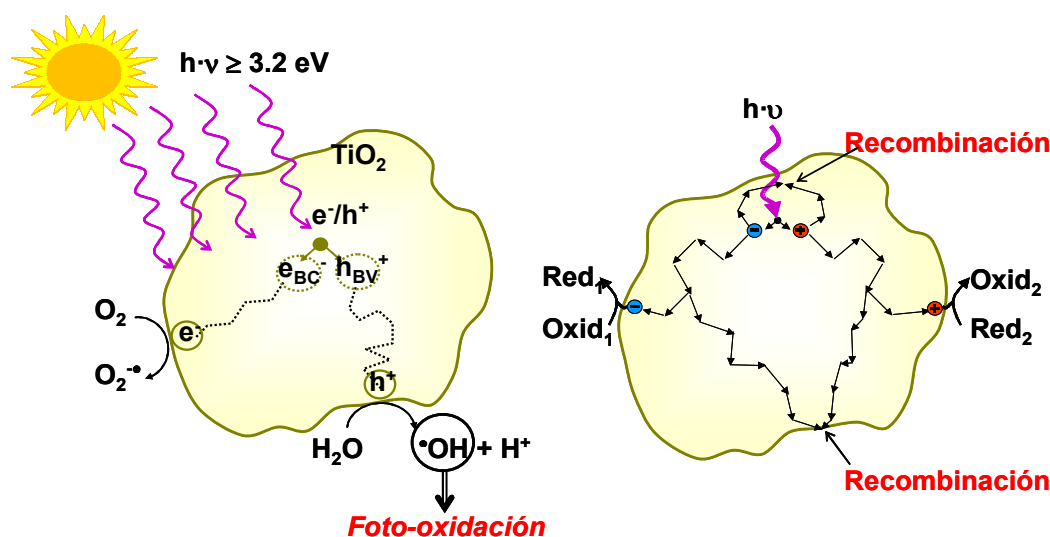
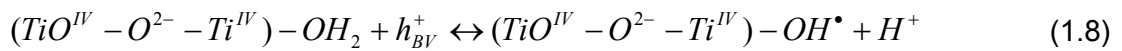
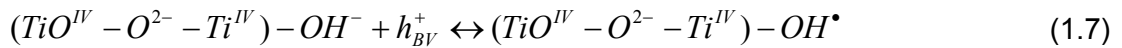
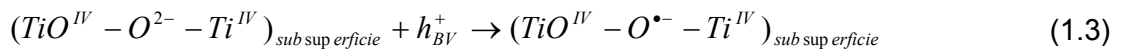


Figura 1.16. Representación del proceso fotocatalítico heterogéneo en una partícula de catalizador de TiO_2 suspendida en agua y del proceso de generación y recombinación de un par e^-/h^+ sobre una partícula de TiO_2 [Fernández-Ibáñez, 2004].

La formación de los distintos radicales, así como otros procesos que pueden tener lugar durante la fotocatalisis con TiO_2 , se pueden explicar mediante las reacciones 1.1 a 1.8 [Serpone y cols., 1993]. La primera consecuencia, tras la absorción de radiación (UV cercano), es la generación de pares electrón/hueco (e^-/h^+) que se separan entre la banda de valencia y la de conducción (Reacción 1.1). Ambos migran rápidamente hacia la superficie [Bahnmann y cols., 1993] donde el hueco es atrapado por trampas de energía sub-superficial ($\text{Ti}^{\text{IV}}\text{-O}^{2-}\text{-Ti}^{\text{IV}}$) y el electrón por trampas superficiales ($-\text{Ti}^{\text{IV}}-$) (Reacciones 1.3 y 1.4), o bien por trampas externas mediante donantes de electrones ($\text{Red}_{2,\text{ads}}$) y captadores de electrones ($\text{Ox}_{1,\text{ads}}$) respectivamente (Reacciones 1.5 y 1.6) [Fernández-Ibáñez, 2004].

Antes de que se produzca la foto-excitación del catalizador, es necesario que las especies Red_2 y Ox_1 se encuentren previamente adsorbidas en la superficie para, de este modo, evitar la posible recombinación de los pares e^-/h^+ generados (Reacción 1.2). Si el medio tiene capacidad oxido-reductora (como por ejemplo el agua), éste también actúa como donante y aceptor de electrones, de manera que para una superficie de TiO_2 hidratada e hidroxilada, los huecos retenidos sobre las

“trampas” superficiales del TiO_2 (Reacción 1.3) generan radicales $\text{OH}^\bullet$ enlazados a la superficie (Reacciones 1.7 y 1.8.). El electrón generado puede ser capturado por el oxígeno pre-absorbido para formar el radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacción 1.10), evitándose en gran medida la recombinación e^-/h^+ (Reacción 1.2), que detendría el proceso [Fernández-Ibáñez, 2004].



En la fase acuosa y en presencia de O_2 disuelto, el agua actúa como elemento reductor, es decir, donador de electrones y así las reacciones 1.5 y 1.6 se transforman respectivamente en las reacciones 1.9 y 1.10. De modo que en ausencia de agua y oxígeno no se produce degradación alguna.



El principio que gobierna la eficiencia de la degradación fotocatalítica oxidativa es la minimización de la recombinación e^-/h^+ y la potenciación, en la interfase semiconductor/electrolito, de la transferencia electrónica para “capturar” los electrones y/o huecos foto-generados y hacerlos reaccionar con las especies en disolución.

1.7.1.2. Capacidad de la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 para la desinfección de aguas

En los últimos años, la degradación de compuestos químicos por procesos fotocatalíticos o fotoquímicos ha ganado importancia en el área del tratamiento de las aguas residuales [Gogate y Pandit, 2004]. Numerosos trabajos han demostrado la ventaja que supone la aplicación de procesos de oxidación fotocatalítica que permiten el uso efectivo de la luz solar como fuente de radiación, lo cual da lugar a un ahorro económico especialmente en operaciones a gran escala [Malato y cols., 2009].

Desde el punto de vista de la desinfección de aguas, la aplicación de procesos fotocatalíticos también ha adquirido gran importancia en el ámbito científico. Y de todos los PAO, el más conocido e investigado en esta área ha sido la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 . La eficiencia de este proceso sobre la inactivación microbiana ha sido ampliamente estudiada desde 1985. En este año Matsunaga y cols. demostraban por primera vez el potencial de este tratamiento para inactivar, en 120 minutos, una especie bacteriana Gram-positiva (*Lactobacillus acidophilus*), otra Gram-negativa (*E. coli*), y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) irradiando suspensiones de TiO_2/Pt . Sin embargo, el alga *Chlorella vulgaris* que también fue evaluada en este estudio presentó un 55 % de supervivencia tras el tratamiento. Estas diferencias fueron atribuidas en primer lugar a las diferencias estructurales de las membranas y paredes celulares de los microorganismos evaluados. Los autores explicaron la desinfección mediante la oxidación fotoquímica de la coenzima A intracelular y la consecuente pérdida de la función respiratoria [Matsunaga y cols., 1985].

Desde entonces hasta la actualidad, el número de publicaciones científicas en revistas internacionales no ha cesado, prueba de ello lo demuestran las 439 entradas que se obtienen al introducir los términos " TiO_2 " y "disinfection" en la buscador "Web of knowledge" (18 de diciembre de 2011). La tabla 1.10 resume los principales hallazgos y estudios realizados en la inactivación de microorganismos mediante fotocatalisis heterogénea con TiO_2 desde 1985 hasta la actualidad.

Tabla 1.10. Resumen de los principales hallazgos y estudios realizados en la inactivación de microorganismos mediante fotocátalisis heterogénea con TiO₂ desde 1985 hasta la actualidad.

Año	Autor	Aporte científico
1985	Matsunaga	La desinfección se debió a la oxidación fotoquímica de la coenzima A. Inactivación en 120 minutos de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Saccaromyces cerevisiae</i> con TiO ₂ /Pt excepto <i>Chlorella vulgaris</i> .
1988	Matsunaga	Sistema de esterilización con TiO ₂ inmovilizado en membrana de acetilcelulosa.
1992	Saito	Estudio de la relación entre la fuga de iones de K ⁺ con la reducción de la viabilidad celular en mutantes de <i>Streptococcus</i> sp.
1993	Ireland	Primer estudio de desinfección fotocatalítica para el agua de bebida. Reactor de flujo y anatasa cristalina. Se usó agua de grifo sin cloro y aguas naturales contaminadas con <i>E. coli</i> .
1994	Zhang	Descenso de 4 log en la concentración de <i>E. coli</i> tras 23 minutos de exposición a luz solar en reactores "batch".
1995	Pham	Reducción del 95% de las esporas de <i>Bacillus pumilus</i> con TiO ₂ en suspensión.
1999	Maness	Primera evidencia de que la reacción de peroxidación lipídica es la base del mecanismo de muerte en <i>E. coli</i> K-12 con fotocátalisis (TiO ₂).
2000	Herrera Melián	Primer estudio de desinfección con TiO ₂ de aguas residuales reales, con luz solar y lámpara UV-C.
2002	Wist	Informó de la desventaja del TiO ₂ por falta de efecto residual debido al fuerte recrecimiento de las bacterias del río Cauca (Cali, Colombia) a las 24 h del tratamiento.
2003	Ibáñez	Estudió la inactivación de diferentes microorganismos con TiO ₂ suspendido: <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella typhimurium</i> .
2003	Sunada	Observó la degradación de la pared celular y salida de contenido celular tras el tratamiento, proponiendo que el primer sitio de ataque era la membrana externa. Estos estudios se realizaron con <i>E. coli</i> y TiO ₂ fijado en láminas.
2004, 2005	Kiwi	Realiza estudios de degradación de la pared celular por espectroscopía y microscopía en <i>E. coli</i> con TiO ₂ en suspensión.
2004	Nadtochenko	Estudia también la degradación de la pared celular por espectroscopía y microscopía.
2001, 2003 2004a,b,c 2005a,b	Rincón y Pulgarin	Realizaron una completa y detallada caracterización de los factores físico-químicos que influyen en el proceso de inactivación fotocatalítica con TiO ₂ de <i>E. coli</i> y otras bacterias: la influencia de los diferentes tipos de consorcios de bacterias, las fuentes de agua, TiO ₂ en suspensión o soportado, dosis de radiación, efectos post-tratamiento, etc.
2004	Seven	Demostró la inactivación de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida albicans</i> con una concentración de catalizador muy baja: 0,01 g/L de TiO ₂ , ZnO y arena del desierto del Sahara. No consiguió inactivar el hongo <i>Aspergillus niger</i> .
2005	Lonnen	Inactivación de los hongos <i>C. albicans</i> y <i>F. solani</i> con TiO ₂ inmovilizado.
2006	Goniat	Estudios de adsorción celular en partículas de TiO ₂ suspendidas. La citometría de flujo confirmó la relación entre la adsorción bacteriana (<i>E. coli</i> K-12) y pérdida de integridad de la membrana.
2006	Maneerat y Hayata	Demostraron la actividad antifúngica del TiO ₂ en suspensión y fijado sobre <i>Penicillium expansum</i> . Alto potencial de control de enfermedades post-cosecha.
2007a,b,c	Sichel	Amplio estudio de parámetros físico-químicos que afectan a la inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i> y <i>Fusarium</i> sp. en reactores solares de botella y CPC con radiación solar natural y TiO ₂ suspendido e inmovilizado.
2005-12	Otros autores (sección 1.6.1.5, 1.6.1.6)	Investigación de catalizadores inmovilizados en diferentes sustratos así como TiO ₂ modificado químicamente para mejorar los rendimientos de inactivación microbiana.

Uno de los principales retos de la investigación en este campo fue determinar con exactitud cuál era el mecanismo de desinfección. Y, aunque inicialmente se propuso como vía de inactivación la dimerización de la coenzima A y consecuente inhibición de la respiración celular por Matsunaga y cols. en 1985, existen multitud de evidencias de que la acción letal ocurre sobre membranas y paredes celulares microbianas [Maness y cols., 1999; Sunada y cols., 2003b; Nadtochenko, 2004; Kiwi y Nadtochenko, 2004; 2005]. Maness y cols. explicaron sus resultados por la peroxidación del componente poliinsaturado del fosfolípido de la membrana celular, provocando una pérdida de funciones celulares esenciales, como la actividad respiratoria, y finalmente, la muerte celular. Con otros estudios de microscopía electrónica (TEM y SEM) se han detectado productos lipídicos de la peroxidación, la difusión de componentes intracelulares al medio, por ejemplo cationes, ARN y proteínas, la permeabilidad a moléculas marcadas de bajo peso, por ejemplo, o-nitrofenil-galactósido (ONPG) [Saito y cols., 1992; Huang y cols. 2000; Nadtochenko y cols., 2004; Gogniat y cols., 2006; Wu P. y cols., 2008; 2009; 2010; Kambala y Naidu 2009; Wu D. y cols., 2009; Vacaroiu y cols., 2009; Chung y cols., 2009] que avalan la teoría de la degradación de la pared celular.

Actualmente, parece existir un consenso en la comunidad científica de que el primer lugar de ataque del TiO_2 sobre el microorganismo se produce en la membrana y la pared celular [Malato y cols., 2009]. La figura 1.17 muestra el proceso de generación de radicales hidroxilo con TiO_2 y el mecanismo de desinfección de este tratamiento. Los radicales generados sobre la superficie del semiconductor atacan a los componentes de la pared celular, alterando la funcionalidad de ésta y provocando la muerte celular. Pero hay más posibles formas de generar daño en la célula, como la posibilidad de entrada de pequeñas partículas de TiO_2 que pueden producir la oxidación de otros compuestos celulares [Blanco-Gálvez y cols., 2007].

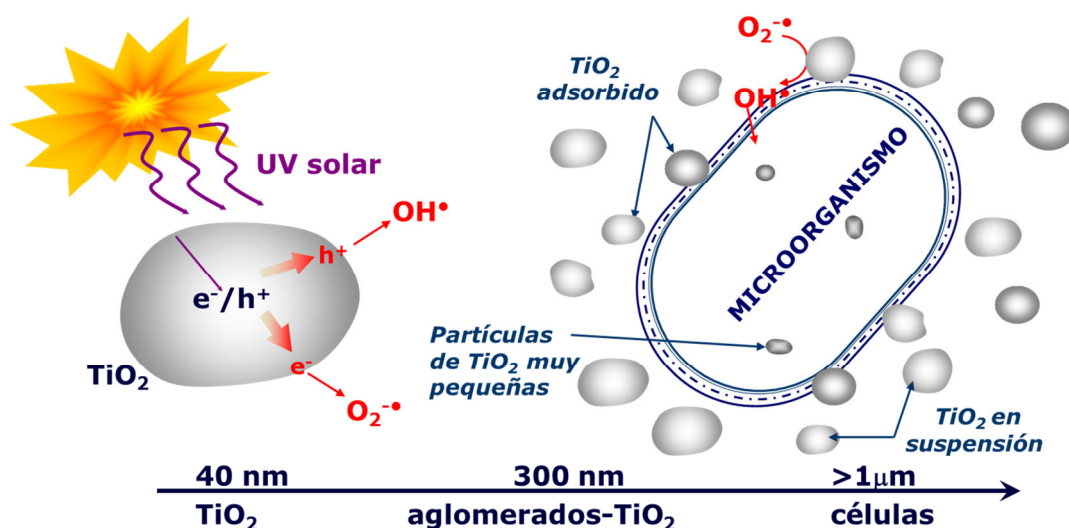


Figura 1.17. Mecanismo de desinfección del proceso fotocatalítico con TiO_2 [Blanco-Gálvez y cols., 2007].

1.7.1.3. Evaluación de la eficiencia fotocatalítica en desinfección

En los tratamientos mediante radiación solar, la evaluación de la radiación solar se convierte en crítico, ya que la presencia de fotones determina la eficiencia del proceso. Como se ha mencionado anteriormente, este parámetro varía con el tiempo y de un emplazamiento a otro. El tiempo real del ensayo no se puede utilizar para la evaluación de la eficacia del proceso, pues la irradiancia solar varía con el tiempo. El uso del tiempo experimental como variable independiente puede llevar a una interpretación inadecuada de los resultados ya que, por norma general, en los foto-reactores existen elementos iluminados y otros sin iluminación. Por ello el uso del tiempo de residencia, es decir, el tiempo que el agua está bajo la acción de la radiación solar, podría ser más adecuado. No obstante esta variable no siempre es idónea a la hora de evaluar el proceso de desinfección debido a que no tiene en cuenta las variaciones de la irradiancia solar durante la exposición [Sichel y cols., 2007b; Malato y cols., 2009]. Por tanto, habría que utilizar a su vez el tiempo de iluminación y la cantidad de fotones solares que entran en el foto-reactor.

Un aspecto importante a tener en cuenta para evaluar resultados es la configuración del foto-reactor. En la literatura se pueden encontrar numerosos estudios con distintas configuraciones de reactores solares, que utilizan radiación solar natural o simulada con lámparas. Para unificar criterios de evaluación, la IUPAC recomienda comparar los sistemas solares basándose en la energía captada por el área del receptor solar en la unidad de tiempo [Bolton y cols., 2001]. Los dos parámetros que tienen en cuenta estas consideraciones (tiempo de residencia,

irradiancia y área de captador solar) son la dosis acumulada (J/m^2) y la energía acumulada por unidad de volumen de agua tratada, Q_{UV} (J/L) (ver definiciones en el capítulo 3, sección 3.6) [Malato y cols., 2009].

El modo de irradiación del foto-reactor también tiene una gran influencia en el comportamiento de la desinfección. Cuando el sistema es irradiado de forma continua (sin interrupciones temporales) el efecto bactericida del proceso es más rápido y más eficiente que cuando la luz se aplica de manera intermitente (foto-reactivación o foto-reparación) [Rincón y cols. 2003; Fernández-Ibáñez y cols., 2005; Ubomba-Jaswa y cols., 2009b].

Otra consideración a tener en cuenta en un proceso de desinfección por irradiación (solar o artificial) es el tiempo que tardan los microorganismos en acusar el daño provocado por la radiación, el cual se manifiesta a través de técnicas de cuantificación. Este tiempo depende de la intensidad del tratamiento y del microorganismo en cuestión.

Rincón y Pulgarín estudiaron la velocidad de inactivación bacteriana en procesos fotocatalíticos solares para el agua potable [Rincón y Pulgarín, 2004c]. Demostraron que la dosis UV solar necesaria para alcanzar los niveles deseados de desinfección no puede ser el único indicador de la eficiencia del proceso, y propusieron un nuevo parámetro denominado "Tiempo de Desinfección Efectiva" (TDE), definido como el tiempo de tratamiento necesario para evitar el recrecimiento de bacterias después de 24 ó 48 h en la oscuridad tras el fototratamiento. Estudiaron el efecto específico del tiempo de residencia del agua en la parte iluminada del sistema de desinfección solar, la intensidad de la luz y la hora del día (mañana o tarde) expuestos a la radiación solar, concluyendo que no se puede tener en cuenta solamente la dosis de fotones total en el resultado final de inactivación.

Por otro lado, Sichel y cols. en 2007, hicieron experimentos con diferentes superficies iluminadas en reactores solares, en diferentes estaciones del año y bajo condiciones ambientales cambiantes (es decir, días soleados y nublados) bajo radiación solar natural. Todos los resultados obtenidos de inactivación bacteriana con *E. coli* y fúngica con *F. solani* y *F. anthophilum* mostraron que, una vez que se alcanza una dosis solar mínima, la eficacia de la desinfección fotocatalítica no mejora por aumentar la superficie irradiada del captador o la intensidad inicial de radiación. Determinaron que la mínima energía UV necesaria para alcanzar una cierta desinfección depende del microorganismo y de la configuración del reactor [Sichel y cols., 2007b].

Por ello, la medida y evaluación de la energía solar UV captada por un foto-reactor durante el proceso fotocatalítico es imprescindible en los trabajos de investigación de este campo.

1.7.1.4. Experiencias con energía solar natural

Muchos estudios fotocatalíticos han sido desarrollados con simuladores solares y pocas son las experiencias llevadas a cabo con radiación solar natural. Una de las primeras contribuciones a la desinfección fotocatalítica solar de agua fue desarrollada por Zhang y cols. quienes observaron una reducción de 4 log en la concentración de *E. coli* con suspensiones de TiO_2 a distintas concentraciones expuestas a radiación solar en 23 minutos [Zhang y cols., 1994]. En el trabajo de Block y cols. se estudió la inactivación bacteriana en presencia de TiO_2 irradiado con luz solar y lámpara UV. Observaron una fuerte reducción de bacterias comunes tales como *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* en menos de 10 minutos [Block y cols., 1997].

Sichel y cols. realizaron en la Plataforma Solar de Almería un estudio sobre el efecto del TiO_2 en distintas especies del género *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. oxysporium*, *F. anthophilum*, *F. verticilloides* y *F. solani*). Este trabajo mostró que todas ellas podían ser inactivadas mediante suspensiones de TiO_2 (Aeroxide P25, Degussa, Alemania) en 6 horas utilizando foto-reactores de botella de 250 mL, aunque con amplias diferencias en cuanto a resistencia en la inactivación fotocatalítica. *F. verticillioides* (productor de microconidios) fue el más susceptible a la fotocatálisis con TiO_2 y *F. equiseti* (productor de macroconidios y clamidosporas) el más resistente. Este estudio constituye la primera evidencia de que las diferencias estructurales en las esporas parecen determinar su resistencia al tratamiento fotocatalítico [Sichel y cols., 2007a].

El empleo de reactores solares tipo CPC, al igual que en descontaminación, ha sido un éxito de eficacia en las distintas aplicaciones de desinfección de agua en las que se ha investigado [Malato y cols., 2009]. Vidal y cols. publicaron el primer estudio de fotocatálisis solar con TiO_2 en planta piloto para desinfección de agua. Construyeron un prototipo de CPC de bajo coste, de 4,5 m² de superficie de captador para un mayor aprovechamiento de la radiación solar. Los resultados mostraron una reducción de 5 log tras 30 minutos de radiación en *E. coli* y *Enterococcus faecalis* con una concentración de 0,5 g/L de TiO_2 y una media de radiación solar de 25 W/m² [Vidal y cols., 1999; Vidal y Díaz, 2000]

McLoughlin y cols. en 2004 desarrollaron un CPC de bajo coste para desinfección fotocatalítica solar de agua contaminada con *E. coli* y radiación solar natural. Observaron que la velocidad de inactivación bacteriana aumentaba con el uso de bajas concentraciones de TiO_2 suspendido en el agua en comparación con la desinfección solar [McLoughlin y cols., 2004]

Fernández y cols. en 2005 determinaron la alta eficacia del proceso fotocatalítico con reactores CPC en la inactivación de *E. coli* K-12 y radiación solar natural. Lograron inactivaciones de 3 log con 50 mg/L de TiO_2 suspendido con una dosis de radiación UV acumulada de 2,6 kJ/L [Fernández-Ibáñez y cols., 2005].

Rincón y cols. también desarrollaron experiencias en reactor CPC evaluando, entre otros parámetros, la eficiencia del proceso fotocatalítico con TiO_2 (40 mg/L) y $\text{TiO}_2/\text{Fe}^{3+}$ (40 mg/L y 0,3 mg/L, respectivamente) en la inactivación de *E. coli* bajo radiación solar natural y agua real del lago Lemán (Suiza). Encontraron que la aplicación del tratamiento fotocatalítico mejoraba la inactivación bacteriana con respecto al proceso de desinfección solar, observando incluso ausencia de recrecimiento bacteriano tras 24 h del tratamiento [Rincón y cols., 2007a; 2007b].

1.7.1.5. Dióxido de titanio inmovilizado

Un problema importante para el uso del TiO_2 en aplicaciones de desinfección de aguas es la necesidad de retirarlo del agua tras el tratamiento. Esto ha promovido una importante línea de investigación sobre el desarrollo de catalizadores eficientes inmovilizados. Sin embargo, en relación a la desinfección fotocatalítica, casi todos estos catalizadores inmovilizados presentan rendimientos muy limitados comparados con el TiO_2 en suspensión.

Uno de los primeros estudios en este campo lo llevaron a cabo Ireland y cols. quienes construyeron un fotoreactor compuesto por varios módulos fotocatalíticos, con una lámpara UV (300-400 nm) envuelta coaxialmente con TiO_2 fijado a una malla de fibra de vidrio conectada en serie [Ireland y cols., 1993]. Sunada y cols. propusieron un fotoreactor que iluminaba una delgada lámina de TiO_2 con luz negra (10 W/m^2) [Sunada y cols., 1998]. Belhácová y cols. emplearon un reactor de flujo con una placa de vidrio recubierta de TiO_2 para inactivar *E. coli* y el bacteriofago NM1149 [Belhácová y cols., 1999].

El TiO_2 ha sido inmovilizado en diversos materiales flexibles y resistentes, como cilindros, pastillas, mallas, vidrio, etc. Algunos estudios a escala de laboratorio

han demostrado eficiencias altas a la hora de inactivar microorganismos. Este es el caso del reciente estudio de Dunlop y cols. en 2010. Estos autores demuestran como el TiO_2 inmovilizado es eficaz en la inactivación de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Clostridium difficile*. Emplearon como reactor para el tratamiento fragmentos de vidrio de 1 cm^2 de superficie recubiertos con una lámina de TiO_2 e iluminados con lámparas UV-A. Observaron una mejora importante comparado con la desinfección solar [Dunlop y cols., 2010].

Sin embargo, el escalado del proceso de inmovilización del catalizador para utilizarlo en reactores de mayor volumen no ha arrojado resultados tan positivos comparados con el empleo de TiO_2 en suspensión. Fernández y cols. emplearon TiO_2 depositado en papel de Ahlstrom insertado en un fotoreactor tubular de un reactor solar CPC [Ahlstrom, 1999, Fernández-Ibáñez y cols., 2005] demostrando la mayor eficiencia de TiO_2 en suspensión para la inactivación bacteriana [Fernández-Ibáñez y cols., 2005]. Sichel y cols. utilizaron el mismo papel Ahlstrom para realizar experiencias de fotocatálisis solar con reactor CPC y TiO_2 inmovilizado. Observaron que utilizando este material se alcanzaba la completa inactivación de *E. coli* en 90 minutos y comprobaron que comparado con el proceso de photo-inactivación solar, el uso de catalizador inmovilizado reduce las concentraciones de bacterias de forma mucho más eficiente [Sichel y cols., 2007c].

Hasta la fecha, el catalizador inmovilizado no puede competir con el catalizador en suspensión para tratamiento de aguas, aun cuando requiera ser retirado del agua. Retirar el catalizador no implica tecnología avanzada, dado que el propio TiO_2 , por sus características físico-químicas sedimenta fácilmente al alcanzar su punto isoelectrico a pH 7 [Fernández-Ibáñez y cols., 2003]. De modo que el empleo de filtros tras el tratamiento de sedimentación daría solución al problema.

1.7.1.6. Dióxido de titanio modificado

Una limitación del TiO_2 es el rango de radiación que puede excitar este catalizador, el cual corresponde al rango de radiación UV-A. Con el objeto de ampliar ese rango al espectro visible se ha desarrollado en los últimos años una serie de trabajos de investigación para modificar las características del TiO_2 utilizando otros elementos como por ejemplo, hierro, plata, cobre, etc. [Armela y cols., 2007; Ditta y cols., 2008]. Algunos autores han observado resultados positivos modificando TiO_2 con elementos no metálicos. Yu y cols. desarrollaron nanopartículas de TiO_2 modificado con sulfuro, mostrando una fuerte actividad en el rango visible con

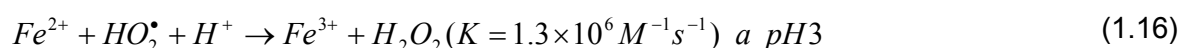
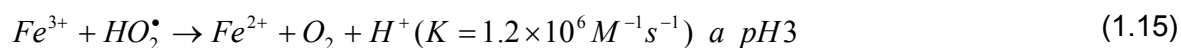
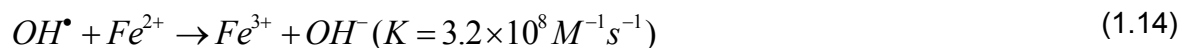
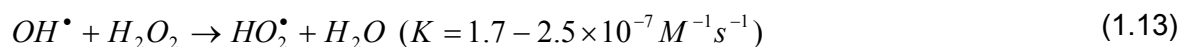
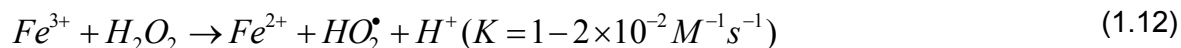
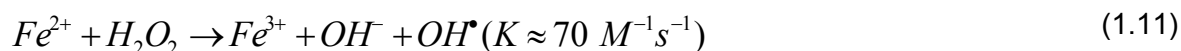
radiación solar para la inactivación de la bacteria Gram-positiva *Micrococcus lylae* [Yu y cols., 2005]. Otros estudios han demostrado los efectos positivos del Cu junto con el TiO_2 , los cuales generan radicales hidroxilo vía reacciones Fenton, observando efectos positivos sobre la inactivación de *E. coli* y el bacteriófago T4 [Ditta y cols., 2008]. El empleo de Ag produce resultados similares, como ocurre con *Staphylococcus epidermidis* y quistes de *Giardia intestinaleis* [Sheel y cols., 2008; Sökmen y cols., 2008]. Otros estudios se han realizado con TiO_2 modificado con carbono sobre *Acinetobacter baumannii* y *Shigella flexneri* [Cheng y cols., 2009], láminas de anatasa dopada con Pt para inactivar *Micobacterium smegmatis* [Kozlova y cols., 2010], y Pd- TiO_2 para inactivar el hongo *Sacchararomyces cerevisiae* [Erkan y cols., 2006]. A pesar de estos logros prometedores con TiO_2 modificado o combinado con elementos metálicos, los resultados más positivos para la descontaminación y desinfección del agua continúan siendo los descritos para el TiO_2 comercial Aeroxide P25 en suspensión [Herrmann, 2005; Malato y cols., 2009].

1.7.2. Fotocatálisis homogénea mediante foto-Fenton

1.7.2.1. Fundamento

La reacción de Fenton fue descubierta por Henry J. Fenton quien en 1894 demostró que el H_2O_2 podía ser activado por sales de Fe^{2+} para oxidar ácido tartárico [Fenton, 1894]. En 1934, Haber y Weiss propusieron que el oxidante activo generado mediante la reacción de Fenton era el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) [Haber y Weiss, 1934]. Más tarde, Barb y cols. revisaron el mecanismo original propuesto por Haber y Weiss para dar lugar a lo que actualmente se conoce como la reacción en cadena “clásica” o “vía radicales libres” de Fenton, en la que se considera como etapa clave del proceso la producción de radicales hidroxilo [Barb y cols., 1949; 1951a; 1951b]. La aplicación de la reacción de Fenton como proceso oxidante para la destrucción de sustancias orgánicas tóxicas comenzó a desarrollarse a mediados de los años 60 [Brown y cols., 1964].

El mecanismo propuesto por Barb para la descomposición del H_2O_2 en medio ácido, en la oscuridad y en ausencia de compuestos orgánicos, viene dado por las reacciones 1.11 a 1.17, las cuales representan las reacciones de Fenton térmicas [Rigg y cols., 1954; Pignatello y cols., 2006].



Algunos autores incluyen también la reacción 1.18, que normalmente se desestima ya que es extremadamente lenta comparada con otras reacciones en las que los radicales hidroperóxidos ($HO_2^\bullet$) están involucrados [Koppenol y cols., 1978]:



En ausencia de cualquier otra sustancia oxidable, la reacción que tiene lugar es la conversión de H_2O_2 a oxígeno molecular y agua catalizada por el hierro (Reacción 1.19). Esta reacción tiene lugar incluso cuando está presente en la mezcla un contaminante orgánico, constituyendo una pérdida importante de oxidante.



Dado que la reacción 1.12 es tres órdenes de magnitud más lenta que la reacción 1.11, se convierte en la etapa limitante en la generación de radicales hidroxilo. Sin embargo, el proceso de Fenton puede ser acelerado gracias a la irradiación con luz UV o visible [Pignatello, 1992; Oppenländer, 2003]. Este proceso se conoce como foto-Fenton, y en él los complejos de Fe^{3+} sufren una transferencia de carga ligando-metal, dando lugar a su disociación en Fe^{2+} y el ligando oxidado, L_{ox} [Pignatello y cols., 2006] (Reacción 1.20).



La fotoquímica del Fe^{3+} es beneficiosa para el proceso Fenton puesto que el hierro reducido puede entonces reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilo (Reacción 1.11).

El mecanismo más habitual por el que los radicales hidroxilo reaccionan con los compuestos orgánicos es la abstracción de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H u O-H, así como la adición a enlaces C=C, adición electrofílica por transferencia de electrones o adición a anillos aromáticos [Legrini y cols., 1993]. Tras la acción de los radicales hidroxilo, independientemente de su modo de acción sobre el compuesto orgánico, se generan radicales orgánicos ($R^{\bullet}$) que pueden seguir oxidándose mediante reacciones con peróxido de hidrógeno u oxígeno molecular. Como resultado, se generarán radicales hidroxilo o radicales peróxido, respectivamente.

Todas estas reacciones provocan la mineralización de los compuestos orgánicos a dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos. Al mismo tiempo, los radicales hidroxilo pueden formar de nuevo peróxido de hidrógeno (Reacción 1.21) [Duesterberg y cols., 2005] o reaccionar con éste para formar agua y radicales hidroperóxido ($HO_2^{\bullet}$) (Reacción 1.13). También se puede producir dimerización de dos radicales orgánicos (Reacción 1.22).



Los radicales hidroperóxido generados en la reacción 1.13 tienen un potencial de oxidación muy bajo y prácticamente no contribuyen a la degradación oxidativa de las sustancias orgánicas [Legrini y cols., 1993].

Dado que los iones Fe^{3+} generados durante el proceso de Fenton reaccionan con los iones hidróxido para formar complejos hidroxí-férricos [Walling y Kato, 1971; Lin y Lo, 1997], cuando la cantidad de hierro empleada en el tratamiento supera a la de H_2O_2 , se produce un efecto de coagulación química. Sin embargo, cuando ocurre al contrario (mayor cantidad de H_2O_2), tiende a producirse una oxidación química y en

grandes cantidades puede captar radicales $\text{OH}^\bullet$ según la reacción 1.13. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno puede actuar tanto como captador de radicales hidroxilo como iniciador de la oxidación [Neyens y Baeyens, 2003] y debe optimizarse para que el hierro se utilice de forma eficiente.

Uno de los mayores inconvenientes de este proceso es que la generación del radical hidroxilo por la reacción 1.11 produce una cantidad estequiométrica de Fe^{3+} que puede precipitar en forma de oxihidróxidos férricos cuando el pH varía de fuertemente ácido a neutro. El pH óptimo para evitar la precipitación es 2,8 [Tang y Huang, 1996; Kwon y cols., 1999]. A un pH inferior a 2,5, se forma el complejo $(\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O}))^{2+}$, el cual reacciona lentamente con el H_2O_2 , produciendo una menor cantidad de radicales hidroxilo [Gallard y cols., 1998]. Así mismo la precipitación de oxihidróxidos provoca una reducción en la eficiencia de la degradación [Pignatello y cols., 2006].

Los complejos de Fe^{3+} que se suelen formar en solución ácida son $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$, que absorben luz UV y visible (Figura 1.18).

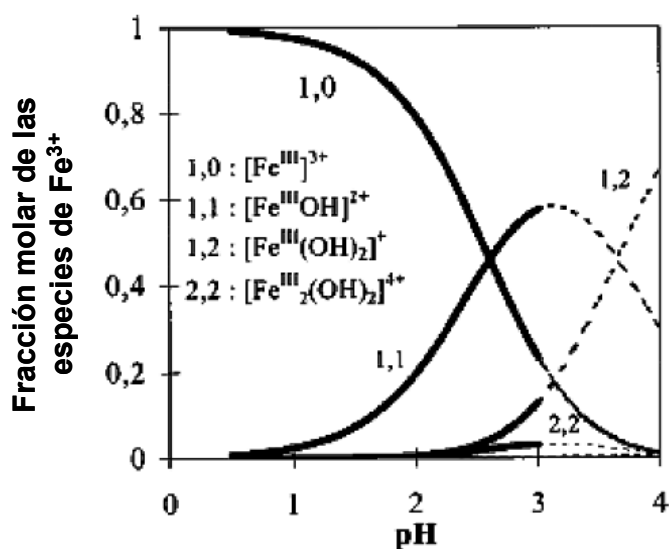


Figura 1.18. Diferentes especies de Fe^{3+} presentes en agua a una concentración de hierro total de 10^{-3} M, una fuerza iónica de 1 M y a 25 °C en función del pH. Las regiones con líneas de puntos están supersaturadas con respecto a los oxihidróxidos férricos [Pignatello y cols., 2006].

Estos complejos sufren una fotoreducción para dar lugar a radicales hidroxilo y Fe^{2+} (Reacción 1.23). La especie más importante es el complejo $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ debido a la combinación entre su alto coeficiente de absorción y su alta concentración relativa con respecto a otras especies de Fe^{3+} .



Diversos iones inorgánicos inhiben la oxidación de compuestos orgánicos mediante Fenton o foto-Fenton tales como el fosfato, sulfato, organosulfonato, fluoruro, bromuro y cloruro, dependiendo de la concentración de los mismos. La inhibición que provocan estas especies suele deberse a la precipitación del hierro (por ejemplo, el Fe^{3+} forma complejos insolubles con el ión fosfato en medio ácido o neutro), o a la formación de complejos de coordinación con Fe^{3+} que son menos reactivos. La inhibición de las reacciones Fenton por la presencia de altas concentraciones de iones cloruro (aguas salinas o concentraciones superiores a 0,01 M a pH 2,8 [Pignatello, 1992]) o bromuro, se debe a que estos iones reaccionan con los radicales hidroxilo, ya que estas especies actúan como ligandos débiles para el Fe^{2+} [Pignatello y cols., 2006]. Sin olvidar los carbonatos y bicarbonatos, cuya presencia determina una reducción del proceso por la sustracción de los radicales hidroxilo.

1.7.2.2. Desinfección de agua con foto-Fenton

Desde el punto de vista de degradación de compuestos orgánicos en agua mediante foto-Fenton, el número de aportaciones científicas es muy elevado [Malato y cols., 2009]. Sin embargo, relacionado con la desinfección de aguas, la aplicación del proceso Fenton o foto-Fenton es escasa pero acaba de despertar su interés en los últimos años. La primera aportación a la desinfección de agua con foto-Fenton la realizaron Rincón y Pulgarín. Estos autores demostraron la inactivación de *E. coli* en reactor “batch” y simulador solar con 10 mg/L de sales de hierro y 10 mg/L de H_2O_2 a pH neutro. Demostraron que la presencia de Fe^{3+} acelera la inactivación bacteriana por el efecto combinado de los complejos de hierro fotoactivos y la acción directa de la radiación sobre la bacteria. Sin embargo no se realizó un seguimiento de las concentraciones de hierro y H_2O_2 . Por tanto, es difícil saber la cantidad de hierro que permanecía en disolución en condiciones de pH neutro [Rincón y Pulgarín, 2005a].

Paspaltsis y cols. en 2009 lograron inactivar mediante foto-Fenton agentes infecciosos de naturaleza proteica o priones, que son extremadamente resistentes a los procesos de desinfección convencionales. Como fuente de fotones emplearon

lámparas UV-A y utilizaron muy bajas concentraciones de Fe^{3+} y H_2O_2 en medio ácido (pH 3) [Paspaltsis y cols., 2009].

La primera aplicación del tratamiento foto-Fenton a pH natural para desinfectar aguas reales con reactores solares CPCs la realizaron Moncayo-Lasso y cols. en 2009. Determinaron de forma simultánea la inactivación bacteriana y la degradación de materia orgánica en agua de río natural adicionando 10^5 – 10^6 UFC/mL de *E. coli* y utilizando como reactivos 0,6 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2 . Demostraron la alta eficiencia del proceso tanto para acelerar la desinfección solar de agua real como para la eliminación de materia orgánica, la cual puede ser precursora de subproductos de desinfección. Lograron alcanzar la inactivación completa sin observar recrecimiento tras 24 h de tratamiento así como una degradación del 55 % del carbono orgánico disuelto [Moncayo-Lasso y cols., 2009].

Nieto-Juarez y cols. en 2010 demostraron que los procesos de Fenton y foto-Fenton pueden ser tecnologías eficaces para la desinfección de virus. Evaluaron la inactivación del fago MS2 con sales de hierro y cobre. Estudiaron la influencia de la concentración de H_2O_2 (3-50 μM) y de los metales (1-10 μM), la producción de $\text{OH}^\bullet$, y la presencia de luz solar artificial. Observaron con respecto al H_2O_2 una cinética de primer orden, sin embargo la adición de cobre por encima de 2,5 μM en el sistema $\text{Cu}/\text{H}_2\text{O}_2$ no mejoraba la inactivación. También observaron que irradiar el sistema favoreció solamente al sistema $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$. Atribuyeron los buenos resultados a la producción de especies oxidativas generadas por las sales de hierro y cobre cercanas a las cápsidas víricas [Nieto-Juarez y cols., 2010].

Bandala y cols. utilizan un sistema de foto-Fenton a bajas concentraciones de Fe^{2+} (5-10 mmol/L) y H_2O_2 (140-280 mmol/L) para inactivar huevos de helmintos y el colorante naranja ácido 24 (AO24) para determinar la dosis de radiación requerida para conseguirlo. Los datos de inactivación siguieron el modelo cinético de Chick-Watson. La dosis de radiación requerida para inactivar más de 5 log de huevos de helmintos fue aproximadamente 140 kJ/L (con 10 mM Fe^{2+} y 280 mM H_2O_2 iniciales). La degradación completa del colorante se obtuvo a una dosis de 155 kJ/L con 0,7 mM de Fe^{2+} y 5 mM de H_2O_2 y lograron una inactivación de 6 log de *E. coli* y *P. aeruginosa* con una dosis inferior a 10 kJ/L. Los autores proponen los huevos de helmintos como indicador apropiado para evaluar la eficiencia del proceso de desinfección fotocatalítico solar por su elevada resistencia [Bandala y cols., 2011].

Spuhler y cols. han presentado recientemente un estudio muy detallado evaluando las vías de inactivación seguidas por el efecto de Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 y foto-

Fenton ($\text{Fe}^{2+} \text{ o } ^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/h\nu$). Utilizaron bajas concentraciones de reactivos (0,6 mg/L de hierro y 10 mg/L de H_2O_2) a un pH cercano a la neutralidad. Emplearon *E. coli* K-12 como indicador de la eficiencia del proceso en varios tipos de agua, agua desionizada, agua conteniendo iones minerales y agua desionizada enriquecida con resorcinol como modelo de materia orgánica natural (NOM, siglas en inglés) y como fuente de radiación un simulador solar. Además de las propiedades altamente bactericidas del proceso foto-Fenton a un pH casi neutro, mostraron un efecto bactericida positivo del Fe^{2+} solo y del Fe^{3+} bajo irradiación ($\text{Fe}^{3+}/h\nu$). Esto se explicó por la difusión y generación de reacciones Fenton de Fe^{2+} intracelulares, mientras que el efecto de $\text{Fe}^{3+}/h\nu$ se atribuyó a la absorción de Fe^{3+} en la pared celular bacteriana y fotosensibilización posterior de estos complejos de hierro, dando lugar a la oxidación directa de la membrana y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés) cerca de los microorganismos [Sphuler y cols., 2010].

Los Capítulos 5 y 6 presentan un estudio del proceso foto-Fenton aplicado a la inactivación de esporas de hongos empleando bajas concentraciones de reactivos y utilizando radiación solar natural como fuente de fotones.

1.7.3. Peróxido de hidrogeno y radiación solar

El H_2O_2 en los procesos de oxidación avanzada se ha utilizado con ozono, como reactivo en el proceso foto-Fenton o bien con lámparas UV-C [Malato y cols., 2009]. Su uso en dichas técnicas se debe a que la generación de radicales hidroxilo por la fotólisis de H_2O_2 se produce al ser irradiado por fotones de longitudes de onda inferiores a 300 nm de acuerdo con la reacción 1.24 [Jones, 1999; Goldstein y cols., 2007].



Dado que la radiación solar que alcanza la superficie de la Tierra contiene una pequeña fracción UV-B (280-320 nm) y la mayoría de UV-A (320-400 nm), la ausencia de fotones UV-C solares en la superficie terrestre impide que se produzca la reacción 1.24. Sin embargo, en la literatura existen evidencias experimentales del efecto letal cuando se combina el H_2O_2 con radiación UV-Vis sobre la viabilidad de varios microorganismos.

La primera evidencia de la sinergia letal de la luz solar con H_2O_2 fue descrita por Anathaswamy y cols. con el fago T7 [Anathaswamy y Eisenstark, 1976; 1977; Anathaswamy y cols., 1979]. El mismo grupo publicó más tarde un trabajo sobre el efecto bactericida del H_2O_2 y radiación UV cercana en *E. coli* K-12 [Hartman y Eisenstark, 1980]. Ambos trabajos atribuyen los resultados al estrés oxidativo generado por la formación de un cromóforo, un fotoproducto procedente de la irradiación del aminoácido L-triptófano [McCormick y cols., 1976; Hartman y Eisenstark, 1980]. Explican que este nuevo fotoproducto era tóxico para mutantes de *Salmonella typhimurium* [Yoakum y Eisenstark, 1972] y *E. coli* [Yoakum y cols., 1974; 1975a; Yoakum, 1975b].

Desde entonces y hasta hace relativamente pocos años no existía más literatura sobre la sinergia letal de la radiación UV-A y el H_2O_2 . Uno de los primeros trabajos en los que se estudia esta combinación lo realizan Rincón y Pulgarín en 2005. Ellos describen un aumento en la inactivación de *E. coli* en presencia de H_2O_2 y radiación solar, aunque este ensayo lo realizaron como un ensayo control en un estudio de desinfección fotocatalítica con foto-Fenton. Atribuyeron la inactivación a una elevada sensibilidad a la desinfección solar por la presencia de H_2O_2 [Rincón y Pulgarín, 2005a].

Sichel y cols. demostraron por primera vez el efecto sinérgico de muerte para esporas del hongo *F. solani* a bajas concentraciones de H_2O_2 (hasta 5 mg/L) y radiación solar natural. Estudiaron el efecto de diferentes concentraciones tanto en presencia de luz solar como en oscuridad [Sichel y cols., 2009].

Otros estudios más recientes también ponen de manifiesto el efecto bactericida del sistema H_2O_2 con radiación solar simulada. Sphuler y cols. emplearon este sistema y observaron la inactivación de *E. coli* con 10 mg/L de H_2O_2 describiendo la inactivación vía Haber-Weiss o Fenton interno favorecida por la entrada de este compuesto dentro de la célula [Spuhler y cols., 2010].

Sciacca y cols. en 2010 describieron el efecto benéfico que presenta la adición de 10 mg/L H_2O_2 a la desinfección solar (SODIS) en botellas PET para desinfectar aguas superficiales que contienen de forma natural hierro disuelto (0,3 mg/L) a pH neutro. Observaron que la desinfección solo solar no lograba la inactivación completa de *Salmonella* sp. y coliformes en 6 horas de irradiación solar y un post-tratamiento de 72 horas en oscuridad, mientras que la adición de 10 mg/L de H_2O_2 resultó en un fuerte aumento de la inactivación, sin observar recrecimiento de las bacterias tras el tratamiento. Estos autores, por su parte, defienden que

coliformes totales, incluida *E. coli*, no son indicadores adecuados para la vigilancia de la contaminación bacteriana en el agua en procesos de desinfección solar dada su baja resistencia [Sciacca y cols., 2010].

El uso de H_2O_2 para la inactivación de esporas de hongos en la reutilización de aguas para agricultura presenta la ventaja de que este reactivo no es tóxico a concentraciones inferiores a 50 mg/L. Sin embargo, la presencia de este reactivo puede ser tóxica por sí mismo o por la formación de productos de desinfección (debido a la presencia de materia orgánica en el agua) cuando su destino final es el consumo humano [Jones, 1999]

Comparado con otros oxidantes importantes, el peróxido de hidrógeno es barato, seguro, fácil de manejar y no representa una amenaza para el medio ambiente ya que se descompone fácilmente a agua y oxígeno, lo cual, sumado al fuerte efecto positivo generado sobre la inactivación microbiana, lo convierte en una alternativa a los procesos convencionales de desinfección.

En el Capítulo 4 se estudia el efecto germicida de concentraciones muy bajas de peróxido de hidrógeno combinado con radiación solar natural como sistema de desinfección para reutilización de agua contaminada con esporas de *Fusarium* sp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos: clasificación, características y generación

2.1.1. El género *Fusarium*

Las esporas del género *Fusarium* se utilizaron como modelo de spora fúngica para realizar los experimentos de fotocátalisis solar ya que son altamente resistentes a compuestos químicos y se encuentran ampliamente extendidos en suelo y sistemas de distribución de agua alrededor del mundo e incluso en hospitales [Anaissie y cols., 2001]. Algunas especies son patógenas de plantas y otras son agentes infecciosos oportunistas de humanos y animales [Nelson y cols., 1994]. *Fusarium* spp. se clasifica como hongo verdadero (División *Eumycota*), en un grupo especial denominado *Deuteromycetes*, donde se incluye un amplio y heterogéneo grupo de especies cuya reproducción asexual se basa en la conidiogénesis (formación de conidios por mitosis) y que han perdido o reducido su fase de reproducción sexual. Dentro de este grupo, *Fusarium* spp. (con más de 50 especies) pertenece al orden *Moniliales*, caracterizado por formar conidios hialinos, curvados, con varios septos transversales desarrollados en células especializadas denominadas fiálides. Estas células especializadas tienen forma

de botella alargada por cuya parte apical se van generando conidios por crecimiento de la pared interna de modo que los conidios quedan unidos de forma temporal. Las fiálides se sustentan en un filamento esporógeno especializado denominado conidióforo [Izco y cols., 1997]. Este género puede producir tres tipos diferentes de esporas denominadas microconidios, macroconidios y clamidosporas (Figura 2.1a-c).

Los microconidios (Figura 2.1a) (2-4 x 4-8 μm) se forman en largos y cortos conidióforos simples. Generalmente son unicelulares, lisos, hialinos, ovoides o cilíndricos, y dispuestos formando estructuras redondeadas también denominadas cabezas (ocasionalmente en cadenas). Los macroconidios (Figura 2.1b) (3-8 x 11-70 μm) están formados por dos o más células y son de pared gruesa, lisa y cilíndrica o de hoz (canao), cuyas células basales y distales pueden presentar formas distintas en las diferentes especies. Las clamidosporas (Figura 2.1c) (5-16 μm), son escasas y cuando aparecen, lo hacen en parejas, grupos o cadenas. Tienen paredes gruesas, hialinas, y son intercalares o terminales [Sutton y cols., 1998; De Hoog y cols., 2000; Larone, 2011].

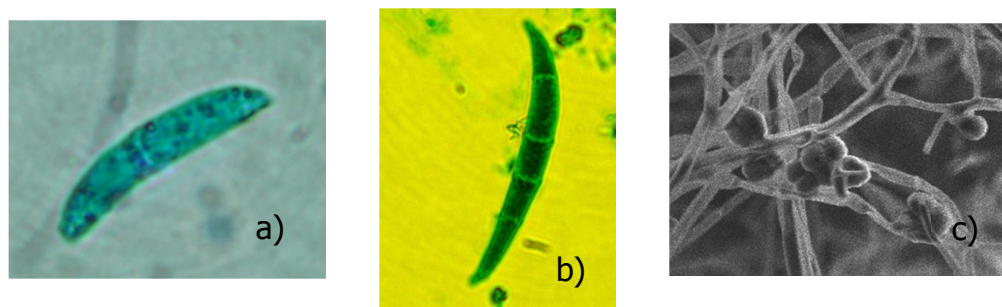


Figura 2.1. **a)** Microconidio de *F. solani* (F12). **b)** Macroconidio de *F. equiseti* (M2T1b) en suspensión acuosa teñido con verde malaquita y observado al microscopio óptico. **c)** Clamidosporas de *F. equiseti* (FE3) obtenida en microscopio electrónico de barrido, donde también se observa parte del micelio.

Las características microscópicas como la longitud y forma de los macroconidios, el número, forma de los microconidios, y la presencia o ausencia de clamidosporas son características clave para la diferenciación de las especies del género *Fusarium* [De Hoog y cols., 2000].

La tabla 2.1 muestra las cuatro especies de *Fusarium* sp. que se han utilizado en este estudio, así como la nomenclatura empleada para designarlas, el tipo de spora generada y la fuente de aislamiento de cada una de ellas. Estas especies silvestres fueron originalmente aisladas del medio natural, y pertenecen a la colección del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería (Almería, España).

Tabla 2.1. Características de las especies de *Fusarium* spp. empleadas en esta memoria.

Especies de <i>Fusarium</i>	Nomenclatura	Esporas generadas	Fuente de aislamiento
<i>F. equiseti</i>	M3T1b	Clamidosporas	Cultivo de Tomates (México)
<i>F. equiseti</i>	M2T1b	Macroconidios	Cultivo de Tomates (México)
<i>F. equiseti</i>	FE3	Macroconidios y clamidosporas	Río Andarax (Almería)
<i>F. solani</i>	FS12	Microconidios	Río Andarax (Almería)

El protocolo de generación empleado en este trabajo ha sido utilizado en numerosos trabajos anteriores [Sichel y cols., 2007a; Sichel y cols., 2007b]. Para la obtención de esporas de *Fusarium* spp., en primer lugar se debe transferir parte del micelio procedente de un cultivo puro a placas Petri con un medio de cultivo que favorece el proceso de esporulación. Este medio se basa en una mezcla de agar bacteriológico (5 g/L, Cultimed, España) y cloruro potásico (15 g/L, PANREAC, España). Este agar de esporulación constituye un ambiente químico muy pobre en nutrientes, y como respuesta al estrés generado por la falta de nutrientes, así como la exposición prolongada durante 15 días a UV-C con lámparas de mercurio (40 W) a 25 °C, se ve favorecido el crecimiento del micelio por la placa Petri originando una gran cantidad de esporas (formas de resistencia) en lugar de generar un micelio muy frondoso. Este paso facilita el proceso de extracción de esporas, que es la estructura fúngica que interesa para realizar los experimentos ya que, como se ha descrito anteriormente, son las que confieren la resistencia frente a los agentes ambientales. La concentración de esporas en placa obtenida según este procedimiento depende de la especie en cuestión, y en nuestro caso, la concentración varió entre 10^2 - 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por placa.

A continuación, se deben extraer las esporas del medio de cultivo. En el caso de microconidios y macroconidios, los cuales se forman sobre la superficie del agar, el procedimiento pasa por el suave raspado de la placa que contiene el micelio con agua destilada autoclavada y posterior recogida de la suspensión. Sin embargo, para obtener clamidosporas, se necesita triturar el agar, ya que estas esporas crecen tanto en superficie como dentro del agar. Para ello se utilizó una batidora robot 400 (400 W, Taurus Group, España) esterilizada para evitar contaminación. Una vez obtenida la suspensión de esporas, ésta se filtra a través de lana de roca. Este material permite el paso de las esporas pero retiene los largos filamentos que constituyen el micelio y, de este modo, se obtiene la suspensión de esporas con las que se evalúa el proceso de desinfección. La determinación de la concentración de esporas en la suspensión

obtenida se lleva a cabo mediante la técnica de recuento directo al microscopio, esta técnica se describe en la sección 2.2.2. La concentración inicial requerida para los experimentos fotocatalíticos fue ajustada mediante dilución del inóculo inicial en el reactor a una concentración aproximada de 10^2 - 10^3 UFC/mL.

2.1.2. El género *Phytophthora*

Este patógeno fue obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con la referencia *Phytophthora capsici*, CECT 126. Su interés como fitopatógeno se debe al gran impacto ocasionado en la agricultura como responsable de altas pérdidas de producción en cosechas y, como consecuencia, también de elevadas pérdidas económicas. Su clasificación a lo largo de la historia ha sido muy controvertida. El género *Phytophthora* fue descrito por primera vez por Anton de Bary en 1876. Este género fue clasificado inicialmente en el reino Fungi. Sin embargo, las técnicas moleculares han llevado en las últimas décadas a continuas y contradictorias revisiones y cambios sobre su clasificación.

Actualmente, se clasifica en el reino *Chromista*, Filo *Oomycota*, Clase *Oomycetes*, Orden *Peranosporales*, Familia *Pythiaceae*, Género *Phytophthora* (donde también se incluye el género *Phytium*). Esta clasificación se basa en distintas descripciones realizadas por varios autores, sin embargo esta clasificación no se considera como definitiva [Dick y cols., 1969; Cavalier-Smith y cols., 1986; Barr y cols., 1992]. Se cree que los hongos verdaderos y miembros del reino *Chromista* representan un claro ejemplo de evolución convergente [Cavalier-Smith, 1987]. En particular, los *Oomycetes* se relacionan filogenéticamente con el reino *Chromista* por diferentes motivos. Entre ellos destaca la generación de esporas heterocontas, es decir, esporas nadadoras o zoosporas que presentan dos flagelos de diferente tamaño, al igual que ocurre en algas heterocontas [Erwin y Ribeiro, 1996]. Otras evidencias se basan en semejanzas estructurales a nivel de la subunidad ribosomal pequeña (secuencias genéticas de ARN), las cuales a su vez difieren de las de los hongos verdaderos [Erwin y Ribeiro, 1996]. Sintetizan lisina a través del diaminopimelato mientras que los hongos sintetizan este aminoácido a través de una vía de alfa-amino-adipato [Tyler, 2001]. El micelio contiene celulosa y glucanos y es cenocítico, es decir, no presenta divisiones transversales. Una de las implicaciones prácticas de la divergencia entre *Oomycetes* y hongos verdaderos se asocia a su control químico, ya que los fungicidas tradicionales empleados para el control de hongos no son apropiados para el control de *Oomycetes*.

Las zoosporas generadas por *Phytophthora* spp. se caracterizan por ser biflageladas, presentan un largo flagelo dirigido hacia adelante y otro más corto hacia atrás. Los dos flagelos actúan como aparato locomotor, lo cual les permite el desplazamiento en medio acuoso para buscar una zona donde adherirse y germinar. Este movimiento está regulado por una elevada cantidad de quimiorreceptores en la superficie celular, por lo que su desplazamiento se basa en quimiotaxis. Además, en este género la reproducción asexual se lleva a cabo mediante otro tipo de espora más resistente llamada clamidospora [Dick, 1990, Barr y Desaulniers, 1990; Barr, 1992]. Por otra parte, la reproducción sexual se produce mediante la fusión de un oogonio (gametangio femenino) llamado oospora con un anteridio (gametangio masculino). Las oosporas son esporas de paredes gruesas. Los tres tipos de esporas se muestran en la figura 2.2.

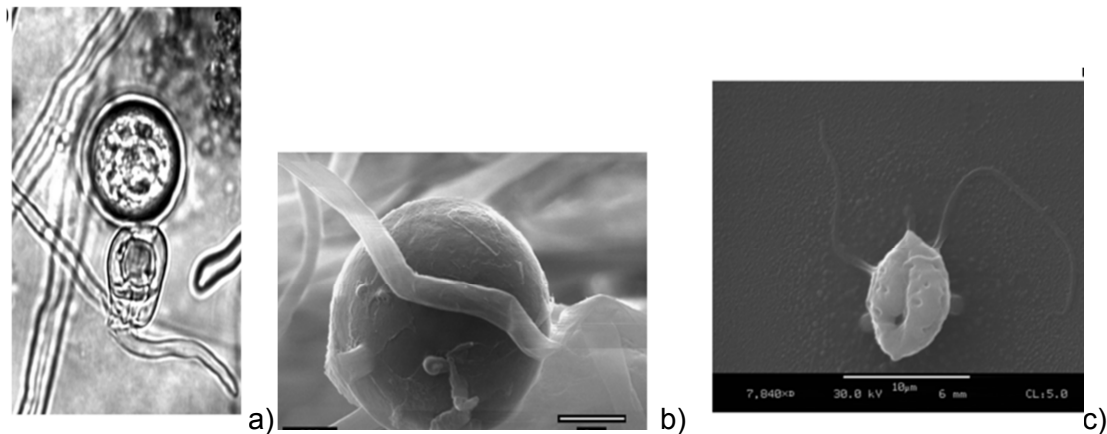


Figura 2.2. a) Oospora b) clamidospora y c) zoospora de *P. capsici* con flagelos de diferente tamaño.

En la experimentación se emplearon las esporas nadadoras o zoosporas, las cuales constituyen el primer mecanismo de dispersión en el medio ambiente de este microorganismo. Las zoosporas son generadas en estructuras denominadas esporangios y éstos, en ocasiones, tienen forma de limón. El proceso de diferenciación de zoosporas se produce especialmente en presencia de agua libre y a una temperatura de 10 °C por debajo de la temperatura ambiente. Las zoosporas pueden nadar durante horas pero con el tiempo pierden los flagelos o bien se retraen hacia el interior de la espore y en pocos minutos adquieren aspecto redondeado por la formación de la pared celular, pasando a denominarse quistes (Figura 2.3.a) [Bartnicki-García y Wang, 1983]. El enquistamiento además de producirse de forma natural al adherirse a una superficie

puede ser inducido por una agitación fuerte, o de forma natural por colisiones entre ellas [Erwin y Ribeiro, 1996].

En los esporangios, bajo condiciones ambientales favorables, pueden llegar a diferenciarse entre 20 y 40 zoosporas. El mecanismo por el que las esporas son expulsadas al medio no se conoce a la perfección. La principal hipótesis es que se trata de un mecanismo de presión generado en el interior del esporangio. La presión osmótica en el interior del esporangio (-6 bar) es menor que la externa (0 bar), de modo que el agua difunde al interior del esporangio incrementado la presión de turgor del mismo. La presión genera sobre la zona apical del esporangio la disolución de la misma (esta zona está constituida por material gelatinoso), de modo que las zoosporas se liberan al medio [Erwin y Ribeiro, 1996]. La figura 2.3.a muestra una foto realizada al microscopio óptico donde se observa una espora germinando, un esporangio típico en forma de limón (Figura 2.3.b), y una instantánea de la salida de zoosporas de un esporangio al medio (Figura 2.3.c).

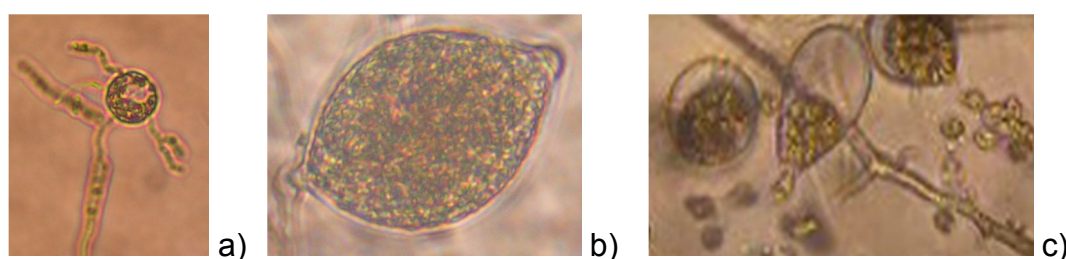


Figura 2.3. a) Zoospora enquistada y germinando en agua. b) Esporangio maduro en forma de limón conteniendo zoosporas. c) Esporangio liberando esporas nadadoras al medio.

El cultivo de este género requiere además de la presencia de agua, un pH neutro o ligeramente ácido (pH 6 a 7) y una fuente exógena de esteroides ya que no son capaces de generar metabólicamente este compuesto [Nes y cols., 1982]. Son microorganismos aerobios, por lo que la presencia de oxígeno es necesaria, aunque, bajo ciertas condiciones, se puede convertir en un factor limitante del crecimiento [Erwin y Ribeiro, 1996]. La formación de esporangios se puede suprimir cuando los niveles de dióxido de carbono se encuentran por encima de las condiciones ambientales [Mitchell y cols., 1978]. La luz también puede afectar a la producción de esporangios en ciertas especies. Como norma general requieren luz en la región del ultravioleta cercano (320-400 nm) o la región azul (430-500 nm) del espectro solar [Erwin y Ribeiro, 1996], aunque algunas especies pueden incluso esporular en oscuridad [Gooding y Lucas, 1959; Harnish, 1965; Ribeiro y cols., 1976].

Los esporangios pueden germinar directamente mediante la producción de tubos germinales o por la producción y liberación de zoosporas. La germinación mediante la formación de zoosporas está controlada por factores ambientales como la disminución de la temperatura y la disponibilidad de agua [Hemmes y Hohl, 1971; Barr y Desaulniers, 1990; Barr, 1992]. Cuando las condiciones ambientales son favorables, el citoplasma del esporangio se une alrededor de cada núcleo y se forman las zoosporas biflageladas que posteriormente saldrán al medio [Erwin y Ribeiro, 1996].

Generación de zoosporas de *P. capsici* en laboratorio

Para la obtención de esporas, en primer lugar se transfieren pequeños trocitos de micelio procedentes de un cultivo puro a placas que contienen medio de cultivo agar-jugo-V8. Las placas así preparadas se exponen a luz fluorescente (lámparas de mercurio a baja presión, Phillips 18W/840) durante una semana a 25 °C. El medio V8 está constituido por agar bacteriológico tipo Europeo (15 g/L, Panreac, España), 250 mL de zumo de tomate natural y 750 mL de jugo de verduras complementado con CaCO_3 (2 g/L, Merck, Alemania). A continuación, para inducir la producción de esporangios, se transfieren tiras del agar conteniendo el micelio a placas vacías y se cubren con una solución de nitrato de potasio (1 g/L, Merck, Alemania). Estas placas se incuban otros 7 días a 25 °C bajo la misma radiación fluorescente. La figura 2.4 muestra las dos fases de crecimiento del micelio y formación de esporangios en el laboratorio.

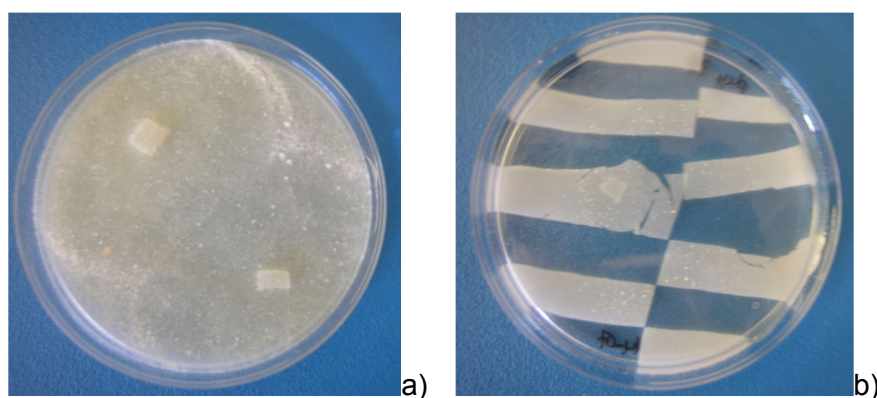


Figura 2.4. a) Micelio de *P. capsici* formado en medio V8. b) Aspecto de una placa Petri durante la fase de formación de esporangios tras cortar el micelio en tiras cubiertas con solución de nitrato potásico.

Tras el periodo de incubación, se retira el nitrato de potasio y se cubren las tiras de agar con agua destilada autoclavada. Estas placas se mantienen durante una hora a 4 °C. Tras 20 minutos a temperatura ambiente las zoosporas son expulsadas de los

esporangios (Figura 2.3.c). La concentración generada por placa Petri mediante esta técnica osciló entre 10^7 - 10^8 UFC. La suspensión obtenida se filtra en papel de Watman N° 1, separando de esta manera las zoosporas del resto de estructuras como micelio y esporangios.

La cuantificación de las esporas también se realiza en este caso mediante la técnica de recuento directo al microscopio con cámara Neubauer. Sin embargo, previo al recuento, la suspensión se agita vigorosamente durante 1 minuto en vórtex, ya que la agitación mecánica favorece el proceso de pérdida de flagelo, permitiendo así el conteo de las esporas. La concentración inicial requerida para los experimentos fotocatalíticos fue ajustada mediante dilución del inóculo inicial en el reactor a una concentración aproximada de 10^3 UFC/mL.

Los experimentos en los que se utilizaron estas esporas fueron llevados a cabo con las esporas sin flagelo ya que cuando portan el flagelo tienden a nadar para buscar una superficie a la que adherirse para germinar. Por tanto, para evitar la pérdida en el conteo de colonias debido a que se pudieran adherir a la superficie del reactor, se adicionan sin flagelo y en continua agitación (100 rpm). Por otro lado, la resistencia a los tratamientos no se ve modificada por el hecho de portar o no los flagelos [Ahonsi, 2010].

2.2. Técnicas de cuantificación de microorganismos

2.2.1. Recuento en placa

Una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de poblaciones microbianas es la técnica de recuento en placa. Se basa en la premisa de que cada célula microbiana crece y se divide de forma aislada para generar una colonia. Aunque esto no siempre es cierto, especialmente en el caso de bacterias, las cuales crecen normalmente formando cadenas o grupos. De modo que, a menudo, una colonia no se forma a partir de una sola bacteria sino de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Los recuentos en placa suelen expresarse en forma de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Esto también se da en el caso de estructuras esporuladas, por lo que igualmente en hongos se expresa el recuento en placa como UFC.

Para el uso de esta técnica es importante que crezca un número limitado de colonias en cada placa. Cuando coexisten demasiadas colonias juntas, éstas pueden solaparse y no desarrollarse, lo que puede originar errores. Para evitar estos problemas, el número apropiado de colonias que deben ser contadas en una sola placa debe oscilar entre 30 y

300 UFC. Cuando la concentración microbiana es superior a 300, la muestra debe ser diluida de acuerdo con un proceso de dilución seriada.

La técnica de recuento en placa se puede realizar mediante dos procesos diferentes; bien mediante placa vertida o bien por diseminación en superficie. La técnica de vertido en placa consiste en adicionar sobre una placa Petri la muestra y a continuación añadir el medio de cultivo semisólido sobre la placa, de modo que el medio termina de solidificar conjuntamente con la muestra. Para ello, el medio se mantiene en baño caliente a 50 °C, para evitar su solidificación. Tras agitar suavemente la placa y esperar que solidifique, se incuban las placas y finalmente se pueden contar las colonias que han crecido en el interior del agar. Esta técnica presenta algunos inconvenientes tales como el posible daño térmico ocasionado sobre las células microbianas. Por ello, la técnica de diseminación en superficie es más empleada para el recuento en placa. Ésta se basa en la adición sobre la superficie de una placa, conteniendo el agar previamente solidificado, de un determinado volumen de muestra (entre 50 y 500 microlitros) y se extienden suavemente empleando para ello un asa de vidrio o bien de plástico esterilizadas y desechables las cuales tienen una forma típica de “L”.

La concentración fúngica durante los experimentos de fotocátalisis solar se determinó mediante la técnica de recuento en placa y diseminación en superficie. Para ello, se toman volúmenes de muestra de 50, 250 y 500 microlitros y se siembran mediante extensión en placa. En el caso de *Fusarium* spp., el medio de cultivo utilizado fue agar malta acidificado (pH 4). Este medio está constituido por agar bacteriológico (20 g/L, Cultimed, Panreac, España) y extracto de malta (20 g/L, Cultimed, Panreac, España). Una vez autoclavado el medio y tras enfriarse hasta aproximadamente 40-50 °C, se adiciona ácido cítrico (0,25 g/L, Panreac, España). Este medio de cultivo favorece por un lado el crecimiento micelial de las esporas, lo que permite un correcto recuento de colonias en la placa y, por otra parte, la acidificación del mismo reduce el desarrollo de colonias de origen bacteriano. El límite de detección (LD), es decir, la mínima concentración microbiana que se puede detectar mediante esta técnica es de 2 UFC/mL pues la mínima concentración detectable es una colonia en 500 microlitros. Cada medida se realizó por triplicado, con la inoculación de tres muestras en tres placas. Las colonias formadas, se pueden visualizar y cuantificar tras dos días de incubación a 28 °C en oscuridad (Figura 2.5). Las colonias formadas por el género *Fusarium* en este tipo de medio de cultivo se caracterizan por un aspecto regular, algodonoso y opaco, de color blanquecino a marrón, líneas de crecimiento bien definidas y formas redondeadas.

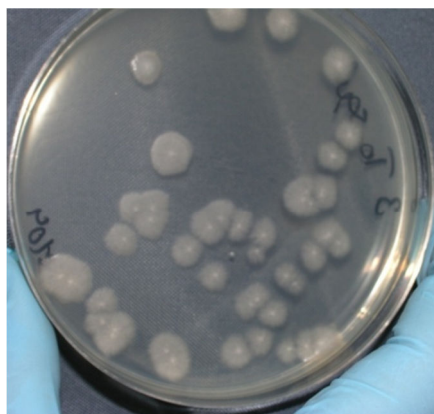


Figura 2.5. Placa Petri con colonias de *F. solani* en agar malta acidificado procedente de un experimento fotocatalítico tras dos días de incubación a 28 °C.

Para realizar los experimentos con *Fusarium* spp. se utilizaron dos medios de crecimiento distintos, agar de esporulación KCl y agar malta acidificado. El agar de esporulación KCl se utiliza para favorecer la esporulación por ser un medio de cultivo pobre en nutrientes. Se emplea para la generación de una gran cantidad de esporas y la posterior preparación de las suspensiones de los experimentos. Por otro lado, para la evaluación de la viabilidad de las esporas inoculadas en las muestras de agua durante los experimentos, se utiliza como medio de cultivo agar malta acidificado, en el cual crecen las colonias bien definidas y permite un recuento fiable.

El descenso de concentración de UFC durante el tratamiento fotocatalítico solar de *P. capsici* también se realizó mediante la técnica de recuento en placa por diseminación en superficie. En este caso, se utilizó agar malta como medio de cultivo tras realizar diferentes pruebas de crecimiento en otros medios como agar patata dextrosa (PDA) y agar malta acidificado. En estos medios, las colonias formadas no podían ser fácilmente detectables mientras que en agar malta, tras un día de incubación en oscuridad a 26 °C, las colonias sí podían ser cuantificadas. El protocolo seguido para la cuantificación de la inactivación microbiana en este caso fue similar al utilizado para *Fusarium* spp. Las colonias formadas por *P. capsici* se caracterizan por ser poco definidas y con límites de crecimiento poco regulares.

En todos los experimentos, los datos obtenidos en las mediciones se analizaron usando la herramienta del análisis de varianza de una variable ANOVA, $P < 0,05$, confianza $> 95 \%$ (Origin v7.0300, OriginLab Corp., Northampton, USA).

2.2.2. Recuento directo al microscopio

El método de recuento directo al microscopio es una técnica muy empleada para conteo de partículas utilizando un microscopio óptico y una cámara de recuento. Este método se utilizó para determinar la concentración de esporas obtenida en el proceso de extracción, y posibilitar el ajuste de la concentración inicial requerida para comenzar cada experimento mediante dilución de la suspensión fúngica en el reactor (10^2 - 10^3 UFC/mL).

En este caso se ha utilizado una cámara de recuento tipo Neubauer (Brand, Alemania). Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro de $0,1 \text{ mm}^3$ de volumen que tiene 4 grandes espacios cuadrados subdivididos a su vez en otros 16 más pequeños. Durante la observación al microscopio de la cámara se cuentan las partículas encontradas en el interior de los 4 recuadros grandes, de modo que el recuento final de las esporas permite obtener la densidad de partículas en la suspensión de origen utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Microorganismo}(\text{UFC} / \text{mL})] = \frac{\text{UFC}}{0.1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2} \times 1000 \text{ mm}^3 / \text{mL} \quad (2.1)$$

El microscopio óptico se utilizó para observar en campo claro la adsorción del TiO_2 sobre las esporas durante el tratamiento fotocatalítico. Se utilizó un microscopio óptico modelo Eclipse 50i, Nikon al que se le acopla una cámara Nikon Coolpix 8400 con la cual se realizaron fotos durante el procedimiento experimental. En determinadas ocasiones se tiñeron las suspensiones con verde de malaquita (50 mg/L) para favorecer la visualización de las estructuras fúngicas. Con la ayuda de la cámara Neubauer y el microscopio óptico se realizó de forma sistemática la cuantificación de esporas fúngicas antes de cada experimento. La figura 2.6 muestra una foto de la cámara Neubauer utilizada, el microscopio óptico empleado para el recuento de esporas y la imagen observada al microscopio de la cámara de recuento.

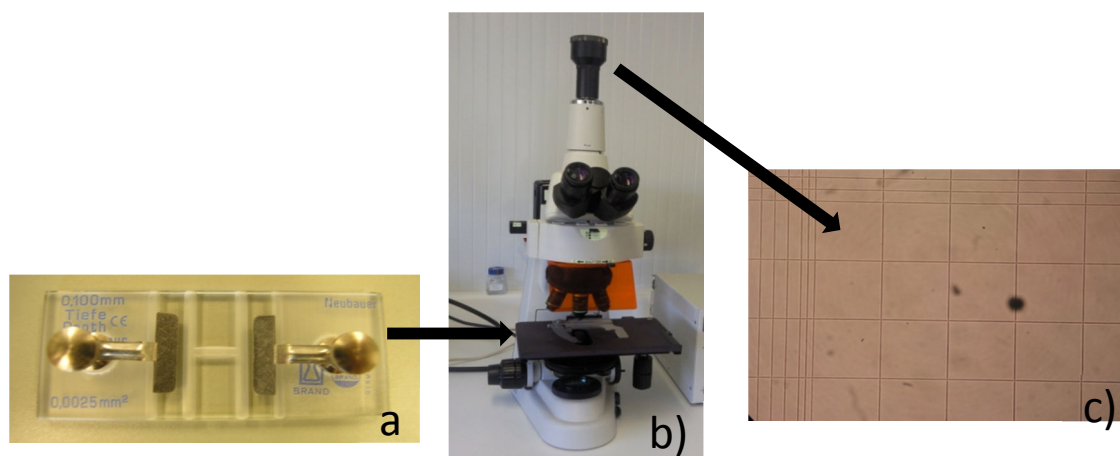


Figura 2.6. a) Cámara Neubauer. b) Microscopio óptico Nikon Eclipse 50i donde se coloca la cámara. c) Vista de la cámara Neubauer al microscopio (10x).

2.3. Tipos de agua utilizadas en el trabajo experimental

2.3.1. Agua destilada

El agua de referencia utilizada en este trabajo experimental fue agua destilada, evitando la influencia de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos presentes de forma natural en otros tipos de agua. En previas publicaciones se ha demostrado que el estrés osmótico generado por la falta de sales en el agua destilada no afecta a la viabilidad de las esporas en un periodo de tiempo de 5-6 h [Sichel y cols., 2007a]. El agua destilada utilizada se obtiene de una planta de destilación por ósmosis instalada en la PSA. Se obtiene mediante una etapa de pre-ósmosis donde se lleva a cabo una dosificación de hipoclorito, bisulfito y filtración por cartucho de 5 micras. A continuación pasa por una etapa de ósmosis inversa y finalmente por una etapa de electro-desionización para eliminar los sólidos disueltos que no se hayan eliminado durante la etapa de ósmosis inversa. Las principales características del agua destilada observadas durante el periodo experimental fueron: conductividad <10 mS/cm, carbono orgánico disuelto $< 0,5$ mg/L y una concentración de Cl^- de 0,7-0,8 mg/L y de NO_3^- de 0,5 mg/L, pH $\sim 5,5$.

2.3.2. Agua natural de pozo

Para acercar nuestros experimentos a un ambiente químico similar al agua de riego en agricultura, se escogió agua natural de pozo. El agua es extraída de un pozo situado en la PSA a una profundidad de aproximadamente 200 m. La concentración natural de organismos se determinó mediante la técnica de recuento en placa en medio Luria Bernati (LB, Panreac, España), medio general utilizado para el recuento

bacteriano, y agar malta acidificado, no detectándose la presencia de ninguna especie ni bacteriana ni fúngica. El agua de pozo no se esterilizó para evitar posibles cambios en su composición química. Los experimentos fueron realizados con lotes de 200 L de agua, evitando así las posibles variaciones en su composición. La tabla 2.2 muestra los parámetros físico-químicos de este tipo de agua medidos durante el periodo experimental. La principal característica de este tipo de agua es la alta concentración de carbonatos y bicarbonatos (221 mg/L) presentes en el agua, los cuales presentan elevada afinidad por los radicales hidroxilo generados durante la fotocatalisis provocando una disminución en la eficiencia del proceso. El pH de esta agua es aproximadamente 7,5.

Tabla 2.2. Caracterización de los diferentes tipos de agua utilizados en esta memoria.

	Agua de pozo	AsEDAR*	Efluente real EDAR
Cl ⁻ (mg/L)	394 ± 1	11,5 ± 0,1	290 ± 64
NO ₃ ⁻ (mg/L)	28 ± 0	9 ± 0	12 ± 15
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	339 ± 1	112 ± 26	115 ± 32
NH ₄ ⁺ (mg/L)	-	2 ± 1	35 ± 21
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	-	0,24 ± 0,05	6 ± 3
Na ⁺ (mg/L)	480 ± 2	33 ± 2	182 ± 11
Mg ²⁺ (mg/L)	94 ± 2	17,5 ± 0,5	27 ± 3
K ⁺ (mg/L)	10,9 ± 0,5	14 ± 1	24 ± 3
Ca ²⁺ (mg/L)	115 ± 2	28 ± 9	78 ± 3
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	660 ± 64	65 ± 1	85 ± 3
pH	7,48	8,15	7,31
Conductividad (µS/cm)	2228 ± 1	362 ± 11	1530 ± 152
Turbidez (UNF)	1 ± 0	1,5 ± 0,5	7,5 ± 4,5
Bacterias (UFC/mL)	0 ± 2	0 ± 2	10 ⁶ ± 100
COD (mg/L)	3,0 ± 2,5	26 ± 1	16 ± 3

*AsEDAR = Agua simulada de salida de EDAR

2.3.3. Agua simulada de salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)

El agua simulada de efluente de depuradora municipal (Simulated Municipal WasteWater Treatment Plant Efluent, SMWWTPE o SMWWE en inglés) se utilizó como modelo de efluente real con una concentración de carbono orgánico disuelto (COD) de 25 mg/L. Este agua contiene 96 mg/L de NaHCO₃, 7 mg/L de NaCl, 60 mg/L de

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mg/L de Urea, 60 mg/L de MgSO_4 , 4 mg/L de KCl, 4 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 32 mg/L de peptona, 2 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 22 mg/L de extracto de carne [Klamert y cols., 2010]. La tabla 2.2 muestra los parámetros físico-químicos de esta agua medidos durante los experimentos. Todos estos compuestos se mezclaron en agua destilada autoclavada para evitar la contaminación del agua. Este tipo de agua fue utilizada como modelo de agua de salida de depuradora municipal para evaluar el efecto del tratamiento fotocatalítico solar sobre la inactivación de esporas, evitando así las fluctuaciones naturales que se dan en cuanto a contenido en componentes orgánicos e inorgánicos derivados de los influentes que llegan a la depuradora.

2.3.4. Efluente real de una EDAR

El agua real de salida de depuradora municipal se obtuvo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) El Bobar localizada en la ciudad de Almería. La tabla 2.3 muestra los análisis efectuados al agua de entrada y salida de la planta en el mes de Marzo de 2011 en las instalaciones de El Bobar.

Esta planta trata aguas residuales urbanas de la ciudad de Almería con una capacidad de 100000 habitante-equivalentes, con un volumen de producción de 11594704 m³/año de agua tratada. La EDAR El Bobar está diseñada para el tratamiento de las aguas residuales generadas en el término municipal de Almería desde la recepción hasta un nivel secundario. La línea de agua consta de las etapas de recepción y pretratamiento (desbaste, desarenado y desengrasado), adición de reactivos químicos para control de olores en decantación primaria, decantación primaria, tratamiento biológico mediante fangos activados a media carga y decantación secundaria.

Tabla 2.3. Parámetros medidos en los efluentes de la EDAR El Bobar en marzo de 2011

Parámetro	Unidad	Entrada	Salida	Rendimiento
pH		7,77	7,66	----
Conductividad	μS/cm	1970	1717	----
DBO ₅	mg/L	452	15	96 %
DQO	mg/L	1215	78	93 %
Sólidos Suspensión	mg/L	415	14	96 %
Sólidos Sedimentados	mg/L	243	4	98 %

En la tabla 2.2 se muestra la media de todos los valores analizados en la PSA para los tres tipos de agua utilizados en este trabajo experimental. El análisis de los iones presentes de forma natural en el agua de pozo, agua simulada y agua real se realizó por cromatografía iónica (CI). Para los aniones se utilizó un cromatógrafo modelo DX-600 (Dionex Corporation, Sunnyvale, California) y para los cationes un modelo DX-120. El Carbono Orgánico Disuelto (COD) y el Carbono Total (CT) fueron analizados usando un TOC-5050 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). La turbidez se midió con un turbidímetro (modelo 2100N, Hach, USA). No se observó la presencia de hierro en el agua mediante técnica espectrofotométrica (medidas UV-VIS, límite de detección de 0,05 mg/L). Todas estas técnicas analíticas empleadas para la caracterización del agua se describen a continuación.

2.4. Técnicas analíticas

2.4.1. Cromatografía iónica (CI). Determinación de aniones y cationes inorgánicos

Descripción del equipo y fundamento teórico

La cromatografía iónica (CI) es una técnica eficaz de separación y determinación de iones, que se basa en el uso de columnas cromatográficas que contienen resinas de intercambio iónico. Esta técnica analítica se emplea para la determinación de aniones y cationes en una determinada muestra de agua, tales como Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} .

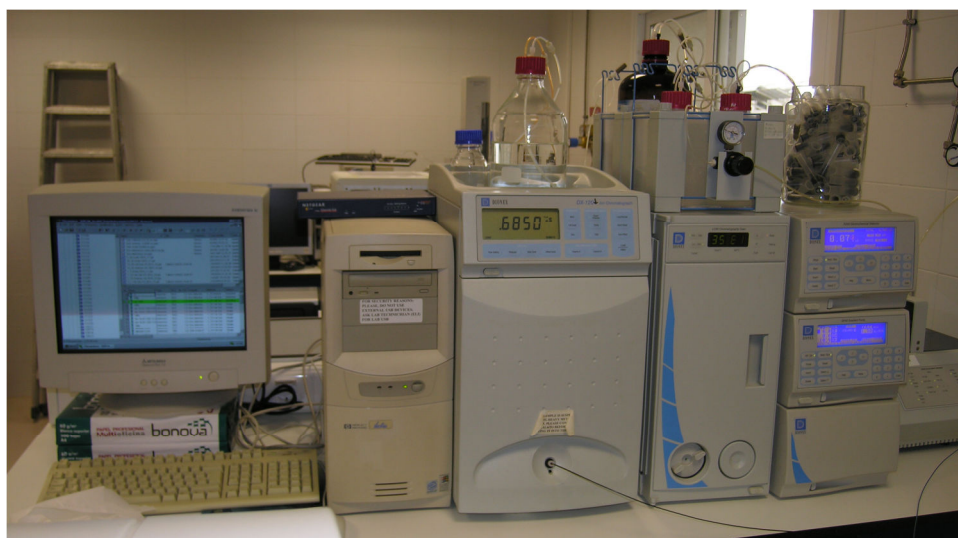


Figura 2.7. Cromatógrafos iónicos Dionex utilizados en el procedimiento experimental.

El cromatógrafo iónico empleado para la detección de aniones es un Dionex DX-600 formado por un muestreador automático (Dionex AS40), una bomba cuaternaria de gradiente (Dionex GP50), un horno termostatzado (Dionex LC30) y un detector de conductividad (Dionex ED50). En primer lugar la fase móvil pasa a través de una trampa de aniones (Dionex Ionpac ATC-3), que garantiza la pureza de la misma, para fluir a continuación a través de la pre-columna (Dionex Ionpac AG11-HC 4 x 50 mm), la columna cromatográfica (Dionex Ionpac AG11-HC 4 x 250 mm), una supresora (Dionex ASRS- Ultra II 4mm) y la celda de conductividad eléctrica. Esta supresora trabaja usando programas de gradiente y en el modo de operación que se conoce como "AutoSuppression Recycle Mode", en el que el flujo a la salida del detector se introduce en un bote cerrado y completamente lleno que alimenta de nuevo a la supresora, permitiendo proporcionar a la misma una solución regeneradora de composición estable.

El cromatógrafo iónico usado en la detección de cationes es un equipo Dionex DX-120 que consta de un muestreador automático (Dionex AS40), una bomba cuaternaria, una pre-columna (Dionex Ionpac CG-12A 4 x 50 mm), una columna cromatográfica (Dionex Ionpac CS12A 4 x 250 mm), una supresora (Dionex CSRS-Ultra 4 mm) y una celda de conductividad eléctrica. A la salida de la celda, el efluente se introduce en el puerto de regeneración de la supresora, de forma que ésta trabaja en la configuración estándar con programas isocráticos.

La señal emitida por el detector genera un pico cuya área se evalúa mediante una calibración interna. La respuesta del detector de conductividad no es lineal en todo el rango de medida, por lo que se realizan varias rectas de calibrado dentro de los rangos en los que la respuesta es lineal: 0-1 mg/L, 1-10 mg/L y 10-50 mg/L (tanto para aniones como para cationes). Para el caso del amonio, las curvas de calibrado se ajustan a un polinomio de segundo grado debido a que el grado de disociación de ácidos débiles a bases débiles a pH neutro se ve afectado por su concentración. La desviación estándar de ambos equipos es aproximadamente del 3 %. La rutina de funcionamiento del cromatógrafo iónico así como la evaluación y adquisición de los datos se lleva a cabo mediante el software Chromeleon®.

Procedimiento

Las muestras son filtradas directamente sobre los propios viales proporcionados por Dionex a través de un filtro de PTFE (politetrafluoroetileno o teflón) con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore Millex® GN). Las condiciones de operación de los dos equipos y de detección de los iones inorgánicos se muestran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Fase móvil y condiciones de detección en los Cromatógrafos Iónicos

Equipo	Iones	Caudal bomba	Fase móvil (porcentajes)
Dionex DX-120	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}	1,2 mL/min	H_2SO_4 20 mN (isocrático)
Dionex DX-600	Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}	1,5 mL/min	H_2O / NaOH 100 mM (80/20): 0-8 min H_2O / NaOH 100 mM (65/35): 8-15 min (Gradiente)

El buen funcionamiento de ambos equipos así como su correcta calibración se comprueba mediante la inyección diaria de disoluciones patrón de 10 mg/L de cada uno de los iones que se van a medir.

2.4.2. Carbono Orgánico Disuelto (COD)

Descripción del equipo y fundamento teórico

La determinación del COD permite evaluar el grado de mineralización de compuestos químicos orgánicos durante el proceso fotocatalítico. Para ello se ha empleado un Analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu modelo TOC-5050^a (Figura 2.8), equipado con un muestreador modelo ASI-5000A. Este analizador mide el Carbono Total (CT) y el Carbono Inorgánico Total (CIT) disueltos en agua, la diferencia entre ambas medidas proporciona el Carbono Orgánico Disuelto (COD).

**Figura 2.8.** Analizador de Carbono Orgánico Total utilizado en el procedimiento experimental.

El análisis de CT se lleva a cabo mediante la combustión de las muestras en un tubo relleno de un catalizador de platino soportado sobre bolas de alúmina, a una temperatura de 680° C. El CT presente en la muestra se oxida dando lugar a CO₂ que es arrastrado por aire de alta pureza (flujo de 150 mL/min), enfriado y secado mediante un deshumidificador. A continuación, el CO₂ es analizado mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR), generando un pico cuya área es proporcional a la cantidad de carbono presente en la muestra y es integrada por un procesador de datos.

En la medida de CIT, la muestra se introduce en un recipiente de reacción en el que se burbujea aire en presencia de ácido fosfórico (25 % p/V). La descomposición de los carbonatos y bicarbonatos (CIT) presentes en la muestra generan CO₂, que es arrastrado por el aire de alta pureza y procesado en el NDIR, de la misma forma que el CT.

La relación lineal existente entre el área calculada por el procesador de datos y la concentración correspondiente de CT y CIT permite una cuantificación basada en rectas de calibración. Estas rectas se elaboran utilizando disoluciones estándar preparadas en agua ultra pura (sistema Milli-Q), de hidrogeno ftalato de potasio para la determinación del CT y una disolución de carbonatos en la que la mitad de carbonos procede de carbonato sódico y la otra mitad de bicarbonato sódico para la determinación del CIT. Los rangos correspondientes a las cinco rectas de calibración realizadas para el CT y el CIT respectivamente, son los siguientes: 1-10, 10-50, 50-250, 250-1000 y 1000-4000 mg/L, y 0,5-5, 5-20 y 20-200 mg/L. En todas ellas los coeficientes de regresión lineal obtenidos fueron próximos a 1. La desviación estándar del equipo es del 2 %.

Procedimiento

La medida del COD requiere un tratamiento previo de la muestra, consistente en la filtración de unos 12 mL de la misma a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore Millex® GN) antes de introducirla en el muestreador del equipo. De esta forma se retiran los sólidos en suspensión presentes en la muestra que puedan dañar al sistema. A continuación se produce la inyección automática de la muestra y se realiza la medida de COD por diferencia entre el CT y el CIT, tal y como se detalla arriba. La comprobación del correcto funcionamiento y calibración del equipo se llevan a cabo mediante la medida periódica de disoluciones patrón.

2.4.3. Turbidez del agua

La turbidez es la cuantificación de la dispersión y absorción de luz a 90° al pasar a través de una muestra de agua. La turbiedad en el agua puede ser causada por la presencia de partículas suspendidas y disueltas de gases, líquidos y sólidos tanto orgánicos como inorgánicos, con un ámbito de tamaños desde el coloidal hasta partículas macroscópicas.

La turbidez da una idea poco precisa de la calidad de un agua, cuanto más turbia sea un agua menor será su calidad. Según la OMS, la turbidez del agua para consumo nunca debe superar 5 UNF (Unidades Nefelométricas de Formacina) y de forma ideal debe hallarse por debajo de 1 UNF.

La turbidez se expresa en Unidades Nefelométricas de Formacina (UNF) o en inglés Nephelometric Turbidity Units (NTU). Se mide utilizando un turbidímetro, que determina la intensidad de la luz dispersada a 90° cuando un haz de luz pasa a través de la muestra. El turbidímetro utilizado es el modelo 2100AN de Hach (USA) que se muestra en la figura 2.9.



Figura 2.9. Turbidímetro modelo 2100AN utilizado en el procedimiento experimental.

La calibración del equipo es fundamental para realizar medidas adecuadas. Para lo cual, previo a las medidas de turbidez de las muestras, se realizaron calibraciones con el kit de calibración para Hach 2100AN (IS Stablcal[®] Stabilized Formazin standards). La formacina es una suspensión compuesta por la mezcla de sulfato de hidracina (5 g/L) y de hexametenetetramina (50 g/L) en agua ultrapura. La suspensión resultante es estable, reproducible y produce un valor de turbidez de 4000 UNF. El kit utilizado consiste en diferentes patrones de formacina que varían desde $<0,1$ UNF a 4000 UNF [APHA, 1975].

Procedimiento

Se llena la cubeta de vidrio borosilicatado del turbidímetro con la muestra a analizar. Se limpia la célula para evitar variaciones en la dispersión de la luz ajenas a las condiciones de turbiedad de la muestra. Se homogeneiza con una suave agitación antes de introducirla procurando que en la cubeta no queden burbujas de aire y a continuación se inserta en el compartimento de la cubeta del turbidímetro. Por norma general se establece que si la turbidez es superior a 40 UNF se debe diluir la muestra convenientemente con agua destilada.

2.4.4. pH, Oxígeno disuelto (OD), temperatura y conductividad

Las medidas de pH y oxígeno disuelto (OD) se realizaron directamente en las muestras experimentales tomadas tanto en el caso del reactor de botella como el reactor solar CPC de 14 L, utilizando para ello un medidor multi-parámtrico que consta de una sonda de OD y otra de pH (multi720, WTW, Alemania). La temperatura también se midió directamente en el reactor mediante termómetros portátiles (Checktemp, Hanna instruments, España). Para la determinación de la conductividad se utilizó un conductímetro (GLP31, CRISON, España).

En el caso del reactor solar CPC de 60 L, estas medidas se toman directamente en el reactor mediante sondas insertadas en el propio circuito (Sección 2.5.3).

2.4.5. Hierro en muestras de agua (ISO 6332)

El hierro interviene como catalizador en el ciclo fotocatalítico de las reacciones Fenton y foto-Fenton en fase homogénea en presencia de H_2O_2 . La determinación de la cantidad de hierro en forma de Fe^{2+} o Fe^{3+} resulta imprescindible para conocer el funcionamiento del tratamiento mediante foto-Fenton. Para realizar experimentos de foto-Fenton se utilizaron dos sales de hierro, sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PANREAC, España) y nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, PANREAC, España) como fuente de Fe^{2+} y Fe^{3+} respectivamente.

El ión ferroso disuelto forma un complejo de color rojo al reaccionar con tres moléculas de 1,10-fenantrolina. La formación de este complejo se da en un intervalo de pH comprendido entre 2 y 9, aunque éste es suficientemente amplio, para asegurar la formación cuantitativa del complejo es necesario mantener el pH entre 3 y 3,5, con lo que la medida se lleva a cabo en una solución tampón de ácido acético/acetato. La absorbancia del complejo Fe^{2+} con 1,10-fenantrolina medida a 510 nm es proporcional a

la concentración de ión ferroso. Haciendo uso de esta propiedad se analizan las muestras de agua para determinar su concentración en Fe^{2+} .

Por otro lado, en el proceso de foto-Fenton, en presencia de H_2O_2 , el ión ferroso (Fe^{2+}) se oxida rápidamente a férrico (Fe^{3+}), con lo que en el agua y en la mayoría de las muestras el hierro se encuentra en forma de Fe^{3+} . Para determinar la concentración de Fe^{3+} , se procede a reducir todo el Fe^{3+} a Fe^{2+} mediante la adición de ácido ascórbico, de manera que éste reacciona con 1,10-fenantrolina. Así, todo el hierro presente en la muestra se cuantifica como hierro total y por diferencia entre la concentración de hierro total y Fe^{2+} medidas de la misma muestra de agua se puede determinar la concentración de Fe^{3+} .

Procedimiento

Para la medida del ión Fe^{2+} , se toman 4 mL de muestra previamente filtrada a través de un filtro de PTFE con un tamaño de poro de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore Millex® GN), y se añade 1 mL de solución 1,10-fenantrolina (1 g/L) y 1 mL de solución tampón (250 g/L de acetato amónico y 700 mL/L de ácido acético en agua destilada). Después de 1 minuto se mide la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y cubeta de un 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro (Unicam-II). Se utiliza agua destilada como muestra de referencia en el espectrofotómetro para todas las medidas.

En cuanto a la medida de hierro total, se añade a la mezcla de muestra filtrada, fenantrolina y solución tampón, una cantidad aproximada de 15 mg de ácido ascórbico (suficiente para superar el equilibrio estequiométrico) de forma que el ión férrico se reduzca a ión ferroso y se pueda medir la absorbancia del complejo Fe^{2+} -fenantrolina a 510 nm. Este mismo procedimiento se aplica a la referencia (agua destilada). Consecuentemente, la concentración de Fe^{3+} presente en la muestra se puede obtener por diferencia entre el hierro total y el Fe^{2+} .

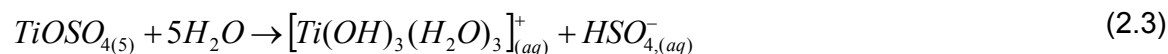
A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se calcula la concentración de hierro utilizando una recta de calibrado realizada para un rango de concentraciones de 0,01 a 10 mg/L de ión ferroso (Ecuación 2.2). Si la concentración esperada de hierro total o Fe^{2+} es superior a 10 mg/L se efectúa la correspondiente dilución de la muestra.

$$C_{\text{Fe}^{2+}} (\text{mg} / \text{L}) = (7.15 \times \text{Abs.} - 0.036) \times \text{Factor dilución} ; R^2 = 0.99 \quad (2.2)$$

La presencia de agentes oxidantes (como el peróxido de hidrógeno) en solución interfieren en este método analítico, puesto que oxidan el ión ferroso a férrico, que no forma complejo con la fenantrolina. Por otro lado, existen diversos metales pesados que forman complejos también con la fenantrolina, como son Cr^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , y otros que precipitan con ella: Ag^{2+} , Bi^{3+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , MoO_4^{2-} . Además el color que pueden presentar las muestras de agua supone también una interferencia importante a tener en cuenta, ya que se trata de un método espectrofotométrico. Existen publicaciones sobre diferentes procedimientos que se aplican para la eliminación de estas interferencias [APHA, 1998]. En este trabajo de investigación las principales interferencias que se encuentran son las debidas a la presencia de peróxido de hidrógeno. En nuestro caso, la medida de ión ferroso se realizó inmediatamente después de tomar la muestra, ya que al proceder de un experimento de foto-Fenton, el peróxido de hidrógeno presente en la muestra oxida todo el Fe^{2+} a Fe^{3+} , con lo que el equilibrio entre ambas especies se puede ver afectado. La concentración inicial de ión ferroso fue medida tras la primera adición de H_2O_2 (muestra a tiempo 0) en todos los casos. Sin embargo, cuando la intención es medir el hierro total disuelto para comprobar que no se han producido pérdidas por precipitación a lo largo del tratamiento, no es necesario realizar la medida inmediatamente.

2.4.6. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en muestras de agua

La determinación cuantitativa del peróxido de hidrogeno se ha llevado a cabo mediante espectrofotometría con el reactivo titanium(IV)oxysulfate (Riedel de Haën, Alemania) de acuerdo con el método DIN 38402H15. Se trata de un método basado en la formación de un complejo estable de color amarillo formado por la combinación de H_2O_2 con el TiOSO_4 , tal y como indican las siguientes reacciones:



El complejo $[\text{Ti}(\text{O}_2)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]_{(aq)}^+$ presenta un máximo de absorción a 410 nm [Muñoz y cols., 1990]. El método presenta un límite inferior de detección de 0,1 mg/L y un rango lineal desde 0,1 mg/L a 100 mg/L donde se realizó una recta de calibrado para la determinación de las concentraciones de H_2O_2 en muestras acuosas.

Procedimiento

El procedimiento para la medición del peróxido de hidrogeno se realiza filtrando la muestra con un filtro de PTFE 0,22 micras (Millipore Millex® GN). A continuación se mezclan 5 mL de la muestra filtrada con 0,5 mL del reactivo titanium (IV) oxysulfate (TiOSO_4). La reacción es instantánea y estable al menos durante 10 horas. El máximo de absorción de este complejo se obtiene a 410 nm. Para medir absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Unicam-II tomando como referencia agua destilada. Del dato de absorbancia se puede obtener la concentración de H_2O_2 en la muestra mediante la ecuación 2.5. Si la concentración esperada de H_2O_2 es superior a 100 mg/L se efectúa la correspondiente dilución de la muestra.

$$H_2O_2(\text{mg} / \text{L}) = -0.024 + (51.731 \times A); \quad R^2 = 0.999 \quad (2.5)$$

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno empleadas en los distintos tratamientos solares para inactivar esporas fúngicas en agua variaron entre 5 y 20 mg/L. Tales cantidades de peróxido de hidrogeno no comprometen la viabilidad de las esporas, es decir, el peróxido de hidrógeno no debe considerarse como tóxico para las esporas evaluadas a dichas concentraciones. Por tanto, no fue necesario eliminar el H_2O_2 de las muestras para evitar perturbaciones en la determinación de la cantidad de UFC.

2.4.7. Dióxido de titanio

El dióxido de titanio es un óxido metálico semiconductor con propiedades fotocatalíticas cuando se encuentra en presencia de luz ultravioleta ($\lambda \leq 390 \text{ nm}$). En este trabajo se utilizará siempre en suspensión acuosa.

El dióxido de titanio utilizado en el trabajo experimental es el producto comercial TiO_2 Aeroxide P25 (Evonik, Degussa Corporation, Alemania) y se usó tal y como se recibe del proveedor. Hasta hace pocos años era conocido como Degussa P25 y también era un producto comercial. Se ha seleccionado este tipo de semiconductor porque la aplicación final en esta investigación consiste en la purificación de aguas donde se utilizarían grandes cantidades de fotocatalizador en instalaciones a escala industrial o en aplicaciones piloto para comunidades aisladas. Además, este fotocatalizador es el más estudiado en el campo de la fotocatálisis para aplicaciones de tratamiento y purificación de aguas. Su eficiencia fotocatalítica en agua suele ser superior a la de muchos otros materiales de laboratorio para la degradación de un gran

número de compuestos orgánicos y microorganismos. Por ello, en los últimos años se ha convertido en un referente frente a otros materiales nuevos en la fotocátalisis heterogénea. De este modo, se seleccionó este material por ser efectivo como fotocatalizador, fácil de dispersar en agua y por tener un coste asequible.

Este TiO_2 presenta un ancho de banda (diferencia de energías entre la banda de valencia y la de conducción) de 3,2 eV, con lo cual, la fotoexcitación del semiconductor y la separación pares electrón-hueco se producirá cuando los fotones incidentes sobre la superficie del mismo tengan una energía superior a los 3,2 eV, lo que significa que toda la radiación UV de longitud de onda igual o inferior a 387 nm tendrá energía suficiente para excitar el catalizador. Su área específica (área superficial por unidad de masa) es de $55 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$. Su tamaño medio de partícula en la muestra seca varía de 20 a 40 nm, aunque en presencia de agua forma agregados cuyo radio hidrodinámico varía de 100 nm a 3000 nm dependiendo de la concentración, del tipo de iones en el medio y del pH [Fernández-Ibáñez, 2004].

El punto de carga nula de este TiO_2 es $6,8 \pm 0,2$, lo que quiere decir que a $\text{pH} > 7$ los agregados de TiO_2 presentan una carga neta superficial negativa y tanto mayor cuanto más elevado sea el pH del medio. De forma inversa, a $\text{pH} < 7$ el catalizador forma agregados de partículas de mayor carga neta superficial positiva cuanto más ácido sea el medio [Fernandez-Ibáñez y cols., 2003].

Conocidas las propiedades coloidales y ópticas de este catalizador comercial, se pueden estimar las concentraciones de catalizador ideales para tener un máximo aprovechamiento de la radiación UV-A solar para los procesos de fotocátalisis desde el punto de vista de la extinción de luz en la suspensión acuosa de TiO_2 y de las dimensiones y configuración geométrica del reactor.

Aunque el objetivo de este trabajo no es evaluar la pérdida de radiación dentro de la suspensión, este efecto resulta ser uno de los más importantes a la hora de interpretar los resultados. Cuando la concentración de catalizador es muy elevada, la extinción de luz impide que la radiación atraviese la suspensión más allá de una cierta distancia en el interior del reactor. El porcentaje de fotones absorbidos y dispersados por las partículas de TiO_2 es un problema difícil que, muy a menudo no puede resolverse experimentalmente pero que puede ser estimado.

Cassano y Alfano determinaron experimentalmente los coeficientes de dispersión y de absorción de dichas suspensiones a longitudes de onda entre 275 nm y 405 nm. La suma de ambos coeficientes resulta en el coeficiente de extinción de la suspensión [Cassano y Alfano, 2000]. Teniendo en cuenta este coeficiente y la concentración del

catalizador, se puede determinar de forma aproximada el recorrido máximo de los fotones UV dentro de la suspensión. Para ello hay que tener en cuenta además la dependencia del coeficiente de extinción con la longitud de onda en el rango donde el catalizador es fotoactivo.

Se define el parámetro L_{99} como la longitud de paso óptico que ha de tener un reactor para que un 99 % de la radiación incidente sea aprovechada por la suspensión de una concentración definida. En este caso, el reactor ofrecería las mejores condiciones posibles de aprovechamiento de la radiación desde el punto de vista óptico. La concentración de catalizador que extingue el 99% de la intensidad radiante se puede estimar teniendo en cuenta la relación entre la concentración de catalizador ($[TiO_2]$, mg/L), la longitud de paso óptico L_{99} y el coeficiente de extinción en el rango UV ($\beta^* = 51305 \text{ cm}^2/\text{g}$) según la ecuación 2.6 [Fernandez-Ibáñez, 2004]:

$$L_{99} = -\frac{10.606}{[TiO_2] \cdot \beta^*(\lambda)} \quad (2.6)$$

Esta concentración se estimó en 35 mg/L para el reactor de botella [Sichel y cols., 2007a] y 83 mg/L para un reactor CPC de 14 L y de 60 L [Fernández-Ibáñez y cols., 2009]. Para obtener estos resultados se impuso la condición $L_{99} =$ diámetro del reactor si no se usa CPC y $L_{99} =$ radio del tubo del reactor si se utiliza CPC, ya que éste hace que la radiación llegue desde todas las posibles direcciones. El reactor de botella tiene un diámetro interno de 5,6 cm; y el reactor CPC tiene un radio interno de tubo de 2,32 cm.

Procedimiento

Para estimar la concentración de TiO_2 en una suspensión se utiliza la medida de extinción luminosa a una longitud de onda de 800 nm mediante espectrofotometría. Se utiliza esta longitud de onda por ser un valor para el cual la absorbancia de las muestras se debe únicamente a la concentración de TiO_2 en suspensión y no a fenómenos de absorción de luz debido a sus características como semiconductor [Fernández Ibáñez, 2004]. A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro (Unicam-II) se calcula la concentración de TiO_2 utilizando una recta de calibración externa realizada para un rango de concentraciones de 0 a 300 mg/L (Ecuación 2.7).

$$[TiO_2](\text{mg} / \text{L}) = (191 \pm 5) \times Abs - (2 \pm 4) \quad R^2 = 0.99 \quad (2.7)$$

2.5. Reactores solares

Los experimentos de desinfección fotocatalítica se han realizado utilizando tres reactores diferentes. Los estudios preliminares se realizaron en reactores solares de botella (escala de laboratorio) con un volumen de agua de 200 mL. El siguiente reactor empleado en la experimentación es un reactor tipo CPC con un volumen total de 14 L. Finalmente, los tratamientos a volúmenes mayores se han realizado en una nueva planta piloto tipo CPC con un volumen total de 60 L.

2.5.1. Reactor de botella

Los estudios experimentales preliminares de los diferentes tratamientos fotocatalíticos sobre la inactivación de esporas fúngicas se llevaron a cabo a escala de laboratorio utilizando para ello reactores de mezcla perfecta consistentes en una botella de 250 mL DURAN-vidrio (Schott, Alemania) dispuestos sobre un agitador magnético y al que se le denomina en este documento como reactor de botella. El empleo de este tipo de reactor permite la utilización simultánea de varios reactores idénticos al mismo tiempo, lo que agiliza la realización de ensayos por triplicado de forma simultánea, evitando así dispersión de resultados debida a cambios en los factores medioambientales. Aunque este reactor no posee las condiciones de diseño y geometría idóneas para realizar ensayos fotocatalíticos solares, presenta la gran ventaja de utilizar volúmenes suficientemente pequeños como para realizar de forma cómoda experimentos sin necesidad de consumir grandes cantidades de esporas con el consiguiente ahorro económico y de tiempo que esto supone. Además su transmisividad en el rango de fotoactividad de los procesos evaluados es suficientemente elevada, 90 %. Este reactor se ha utilizado en este trabajo para la demostración experimental de nuevos fenómenos, evitando grandes volúmenes en reactores de intemperie donde ciertas condiciones experimentales son difíciles de controlar. Otros trabajos anteriores también utilizan este reactor con fines similares [Rincón y Pulgarín, 2003; 2004a; 2004b; Sichel y cols., 2007a; 2007b; Sphuler y cols., 2010].

Este sistema consta de una botella de 250 mL de volumen total dispuesta sobre un agitador magnético cuya función es mantener el sistema homogenizado asegurando así que la mezcla recibe la misma cantidad de energía solar durante todo el tratamiento. La agitación se mantiene durante todo el tiempo a 100 revoluciones por minuto (rpm), lo que asegura la correcta homogenización de las suspensiones sin afectar negativamente a la viabilidad de las esporas. Las botellas se cubren con un vaso de vidrio para permitir

la entrada de radiación solar al reactor desde todas las direcciones tal y como se puede observar en la figura 2.10.

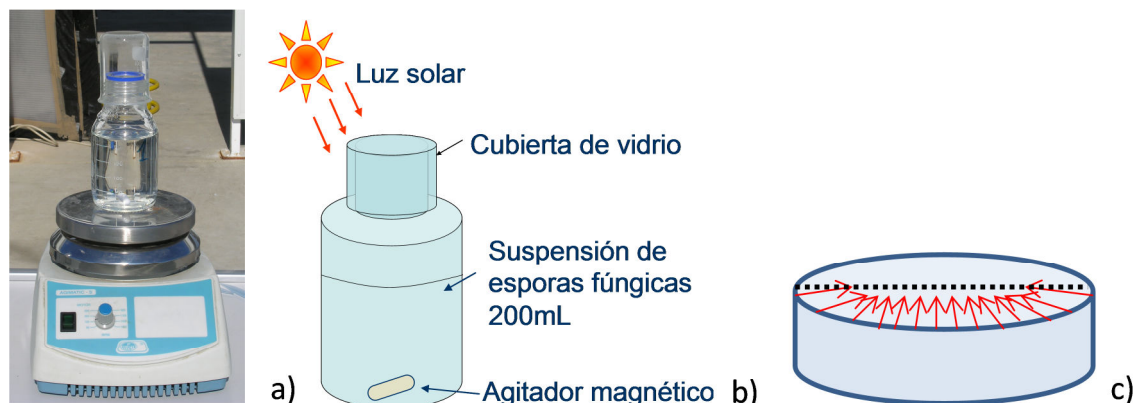


Figura 2.10. a) Imagen de un reactor de botella agitado magnéticamente durante un experimento de desinfección fotocatalítica. b) Ilustración del reactor de botella de vidrio de 250 mL (volumen iluminado de agua: 200 mL). c) Ilustración de un corte transversal de una botella y la dirección de los rayos solares hacia el interior de la botella.

Las especificaciones técnicas de este reactor solar se resumen en la tabla 2.5. El volumen total analizado es 200 mL y todo el sistema está continuamente iluminado. El área iluminada se obtiene como el producto de la altura de la botella (5,5 cm) por el radio interno de la botella (2,75 cm), obteniéndose una superficie iluminada de $0,0095 \text{ m}^2$.

El vidrio de la botella empleada en este trabajo permite la entrada de un 90% de la radiación solar en el rango UV-A; otros materiales tales como el metacrilato actúan como pantalla evitando la entrada de radiación UV-A en el interior del sistema, lo cual va en detrimento de las reacciones de fotocátalisis y especialmente con TiO_2 . La figura 2.11 muestra la transmitancia de diferentes materiales susceptibles de ser empleados como material para reactores solares. Se observa como el vidrio borosilicatado es el mayor transmisor de radiación UV en esta comparación.

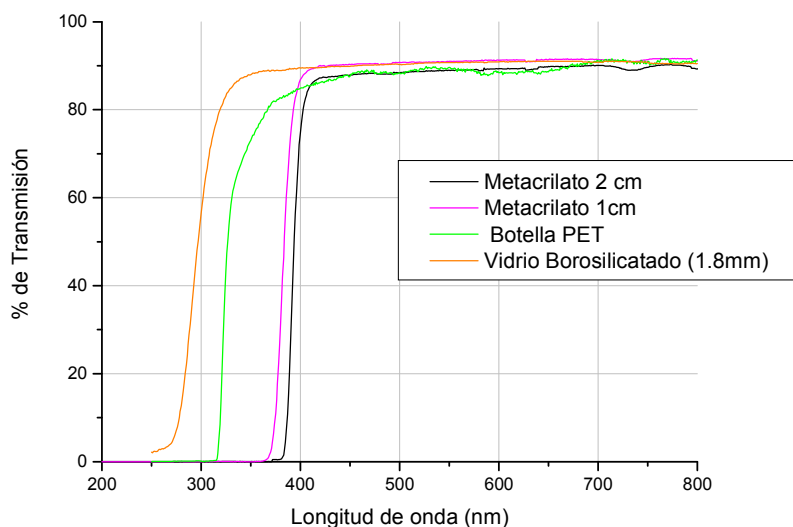


Figura 2.11. Comparación de espectros de transmitancia de distintos materiales: PET, metacrilato y vidrio borosilicatado [Ubomba-Jaswa y cols., 2010].

2.5.2. Reactor solar CPC de 14 L

El primer reactor CPC utilizado en este trabajo experimental fue construido por AO SOL (Lisboa, Portugal). Este sistema consta de 2 tubos de vidrio borosilicatado dispuestos en el centro de dos espejos CPC. El volumen del fotoreactor es de 14 L, el volumen iluminado de 4,7 L, siendo la relación volumen iluminado a volumen total de 33,5 %. La superficie de captador irradiada es de 0,4 m². La tabla 2.5 muestra las características generales del fotoreactor. El agua es bombeada desde los tubos hasta un tanque de mezcla y re-oxigenación mediante una bomba centrífuga (10 Watts, Modelo NH-200PS PanWorld, U.S.A). De esta manera se favorece un flujo turbulento en el interior del sistema lo que beneficia al tratamiento fotocatalítico. El caudal utilizado en los experimentos de fotocátalisis con esporas fúngicas fue de 20 L/min. Tanto los tubos como los espejos CPC se hallan sobre una estructura soporte de aluminio inclinada 37° sobre el plano horizontal, lo cual permite incrementar la cantidad de radiación solar sobre el tubo de vidrio. La figura 2.12 muestra una foto del reactor descrito instalado en la PSA así como un diagrama del mismo. Como se puede observar en la figura 2.12.a, la configuración de este sistema permite la realización de dos experimentos de forma simultánea en 2 reactores solares CPC.

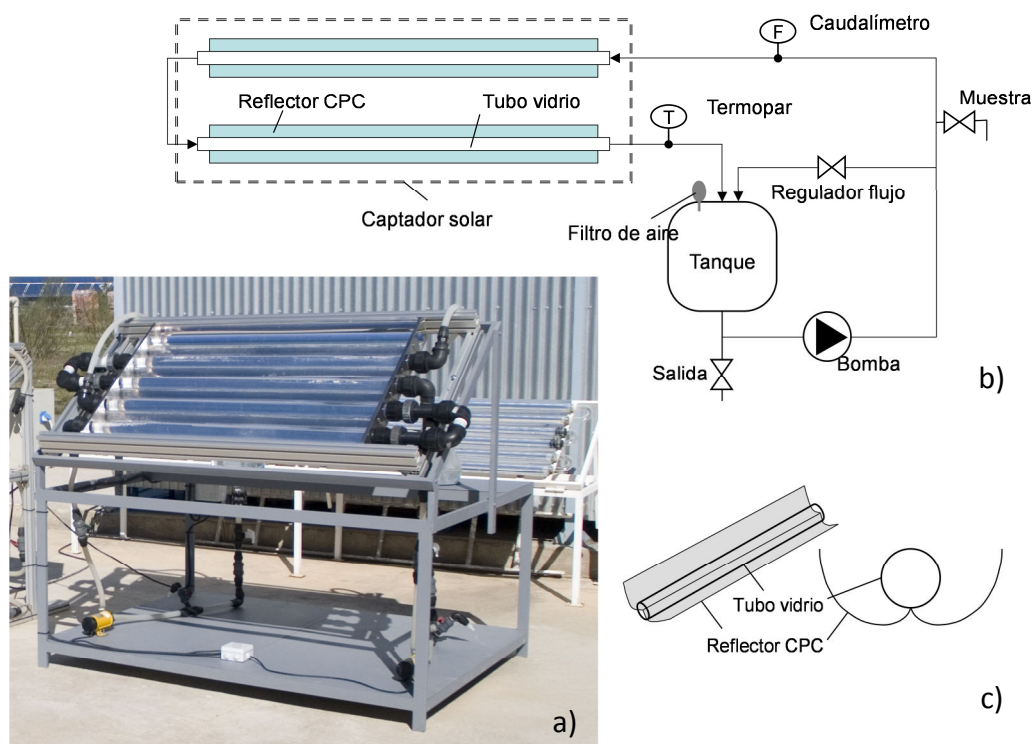


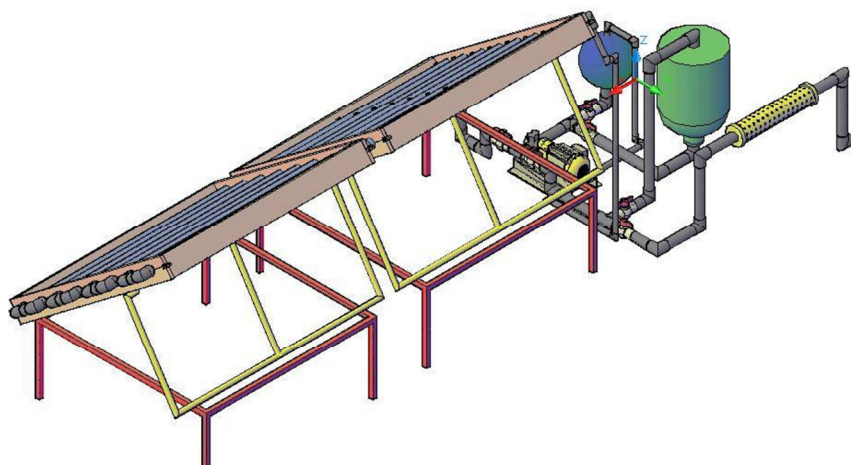
Figura 2.12. a) Imágenes de dos fotoreactores CPC idénticos de 14 L. b) Diagrama de flujo de uno de los reactores CPC. c) Diagrama de espejo CPC.

2.5.3. Prototipo de foto-reactor solar CPC de 60 L

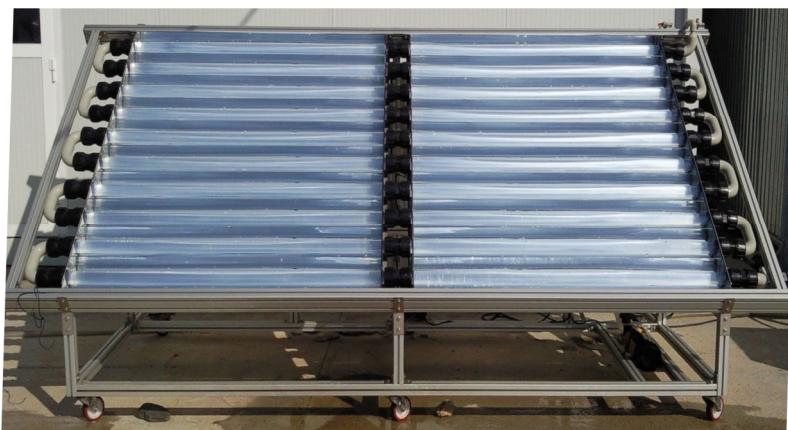
El reactor empleado en los experimentos de mayor escala en volumen de agua a tratar fue construido por Ecosystem S.A., Environmental Services (Barcelona, España). La figura 2.13 muestra dos fotos y un diagrama del foto-reactor en las instalaciones de la Plataforma Solar de Almería (PSA). Sus características técnicas principales se resumen en la tabla 2.5. El foto-reactor consta de dos componentes, un reactor CPC solar y una planta piloto de post-tratamiento dispuestos en una plataforma de aluminio anodizado inclinada 37° (latitud local).

El reactor solar consiste en dos módulos de espejos CPC, cada uno con diez tubos de vidrio borosilicatado de 1500 mm de longitud, 2,5 mm de grosor y 50 mm de diámetro interno (Schott-Duran, Dureza 3,3). El vidrio borosilicatado transmite un 90 % en el rango del UV-A. La geometría del espejo CPC MIROSUN (aluminio anodizado de alta reflectividad, Alanod, Alemania) tiene un factor de concentración de uno. El espejo tiene una superficie que cubre el rango completo de reflectividad especular y radiación difusa del 95 %. La relación existente entre el volumen de agua irradiada (45 L) y el volumen total de agua (60 L) es del 75 %. La superficie irradiada del captador es de $4,5 \text{ m}^2$. El agua circula a través de los tubos hasta un tanque de 60 L, impulsada por

una bomba centrífuga (150 Watts, Modelo NH-200PS PanWorld, U.S.A.). El sistema tiene un rotámetro (Comaquina, 0-40 L/min) que permite medir y ajustar el caudal.



a)



b)



c)

Figura 2.13. a) Diagrama de flujo del sistema, b) foto del reactor solar CPC de 60 L en la PSA (Almería, España) vista frontal y c) foto del reactor vista trasera.

El sistema tiene un sensor de pH (modelo 5331, CRISON, España), otro de oxígeno disuelto (OD) y temperatura (modelo 6050, CRISON, España) insertados en la parte oscura de los tubos. Los datos se registran a través de un software de adquisición de datos (PROASIS, DESIN Instruments, S.A.).

Tabla 2.5. Características físicas de los fotoreactores solares usados en la experimentación.

	Reactor de botella	Reactor CPC 14 L	Reactor CPC 60 L
Número total de tubos/botellas	1	2	20
Longitud total	0,15 m	1,5 m	1,5 m
Longitud irradiada	0,12 m	1,4 m	1,4 m
Diámetro externo	0,05 m	0,05 m	0,05 m
Espesor de la pared	0,004 m	0,0025 m	0,0025 m
Transmisión UV-A del borosilicato	90% (longitud de onda de corte 280 nm)		
Volumen total del tratamiento	0,2 L	14 L	60 L
Volumen total irradiado	0,2 L	4,7 L	45 L
Superficie iluminada	0,0095 m ²	0,4 m ²	4,5 m ²
Caudal/Velocidad agitación	100 rpm	20 L/min	30 L/min
Velocidad lineal	0,24 m/s	0,31 m/s	0,34 m/s
Agitación	Agitador magnético	Bomba centrífuga	
Irradiación (días soleados)	Luz solar natural	Luz solar natural captada por un CPC FC= 1	

La planta piloto de post-tratamiento de agua consiste en un tanque de 100 L de capacidad. Esta planta fue desarrollada con el objetivo de separar las partículas de TiO₂ del agua tras el tratamiento fotocatalítico para la posterior reutilización del mismo. La principal dificultad cuando se utilizan suspensiones de TiO₂ es la necesidad de separar las partículas de catalizador después del tratamiento. Fernández-Ibáñez y cols. estudiaron el comportamiento coloidal de suspensiones de TiO₂ y encontraron que la velocidad de sedimentación de las partículas de TiO₂ es máxima cuando el catalizador alcanza el punto isoelectrico (pH 7) [Fernández-Ibáñez y cols., 2000]. En las condiciones de punto isoelectrico, el dióxido de titanio se deposita rápidamente (minutos) en el fondo del tanque, permitiendo recuperar el TiO₂ para su reúso y dejando el agua libre de catalizador.

2.6. Medida y evaluación de la radiación UV solar

Para evaluar e interpretar resultados en sistemas de reactores solares se utiliza el parámetro Q_{UV} . Esa magnitud estima la energía UV acumulada en el reactor por unidad de volumen de agua tratada para periodos de tiempo dados durante el experimento. La irradiancia solar UV se mide con un piranómetro de UV-A global (componentes directa y difusa) modelo CUV3 de Kipp&Zonen (Holanda) con una

sensibilidad típica de 264 $\mu\text{V/W/m}$ en un rango de 300 a 400 nm, montado sobre una plataforma inclinada 37° (Figura 2.14).



Figura 2.14. Foto de un radiómetro en las instalaciones de la PSA inclinado 37° sobre el plano horizontal.

Para los experimentos realizados en reactor de botella, existe otro piranómetro de iguales características pero en posición horizontal. El piranómetro proporciona datos en términos de W_{UV}/m^2 incidente para longitudes de onda de 300 a 400 nm. Esta medida de energía media incidente por unidad de superficie es una aproximación válida cuando los tiempos empleados en los experimentos son suficientemente largos en comparación con los que se producen en las fluctuaciones de radiación.

El parámetro Q_{UV} permite evaluar y comparar resultados de experimentos llevados a cabo en diferentes días con diferentes condiciones meteorológicas, se calcula según la ecuación 2.8, donde t_n es el tiempo experimental para la muestra n , $\overline{UV}_{n-1}$ es la media de la irradiancia UV-A solar medida durante el período $(t_n - t_{n-1})$, A_r es la superficie iluminada del captador solar y V_t es el volumen total del reactor.

$$Q_{UV} = \sum_n \overline{UV}_{n-1} \frac{A_r}{V_t} (t_n - t_{n-1}) \quad (2.8)$$

Cuando se utiliza el parámetro Q_{UV} , la velocidad de reacción de desinfección se expresa en términos de descenso de concentración de esporas (expresada en UFC) por cantidad de energía UV-A (en J o kJ) que alcanza la superficie del captador durante el tratamiento [Fernández-Ibáñez y cols., 2000; Malato y cols., 2007; Fernández-Ibáñez y cols., 2009]. En este estudio, además de Q_{UV} , el tiempo experimental también se ha utilizado para mostrar los resultados experimentales, ya que es importante para dar una idea práctica de la efectividad y de los tiempos de tratamiento.

2.7. Procedimiento Experimental

2.7.1. Ensayos solares

El procedimiento experimental seguido ha sido el mismo para todos los experimentos de fotocátalisis solar. En primer lugar se llena el reactor de botella (200 mL), el reactor CPC de 14 L o la planta piloto CPC de 60 L con el correspondiente agua a evaluar (agua destilada, agua natural de pozo, agua simulada de salida de EDAR o efluente real procedente la EDAR El Bobar). A continuación, se adiciona la concentración deseada de los reactivos en función del tratamiento fotocatalítico utilizado (TiO_2 , H_2O_2 , $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$). Finalmente se adiciona la suspensión de esporas cuya inactivación es objeto de estudio. La preparación de la suspensión de esporas se realiza el mismo día del experimento, excepto para los experimentos en reactor solar 60 L. En este caso, dado el alto volumen de placas necesarias para obtener una concentración adecuada para el tratamiento, la preparación de la suspensión se realiza el día anterior al experimento, y se mantiene a una temperatura de 4 °C, para la que la viabilidad y la concentración de las esporas no se ve comprometida. En ningún caso, la suspensión de esporas se mantuvo más de 18 h a esta temperatura.

La homogenización del sistema es crucial para el tratamiento, por lo que la adición de reactivos y suspensiones microbianas se realiza en oscuridad para evitar cualquier efecto que pueda tener la radiación solar sobre la mezcla durante la homogenización. En el caso del reactor de botella este paso se realiza en el laboratorio y una vez que el sistema está preparado para iniciar el experimento, inmediatamente las botellas se ponen sobre los agitadores magnéticos dispuestos previamente en el exterior del laboratorio, expuestos a la luz del sol en ausencia de sombras durante el transcurso de los ensayos. En el caso de los reactores CPC, la homogenización se realiza directamente en el propio reactor previamente cubierto por una lámina opaca que evita la entrada de luz en el fotoreactor. Estos sistemas operan en modo discontinuo, alcanzándose una completa homogenización de la mezcla una vez transcurridos 15 minutos.

Tras la homogenización se toma la primera muestra para determinar la concentración inicial de esporas. Seguidamente, el reactor se destapa y se expone a la radiación solar durante 5 h, desde las 11:00 a las 16:00 h (hora local) en días completamente soleados. Independientemente del tipo de tratamiento fotocatalítico, la frecuencia de toma de muestras en todos los ensayos para la cuantificación de la concentración fúngica fue de 15 minutos durante las dos primeras horas y de 30 minutos o una hora desde la segunda hora hasta la quinta del tratamiento. Transcurrido este

tiempo, la primera muestra tomada del reactor (almacenada en el laboratorio a 20 °C y en oscuridad) es analizada de nuevo como una muestra de “control”. Se trata de un control interno del propio experimento para conocer la viabilidad del microorganismo en ausencia de los factores que afectan al tratamiento en el fotoreactor. Esta muestra se procesa y evalúa de la misma forma que el resto de las muestras y, transcurrido el tiempo de incubación, la concentración debe ser similar a la muestra inicial. En caso contrario, indicaría la pérdida de viabilidad de esporas por la presencia en el agua de algún elemento tóxico o porque el stock de esporas no estuviese en perfectas condiciones, y por tanto, la inactivación microbiana obtenida durante el tratamiento solar podría no deberse al tratamiento fotocatalítico, por lo que el experimento quedaría invalidado.

La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto se midieron en todos los experimentos. Estas medidas se realizaron introduciendo directamente en la botella y en el reactor CPC de 14 L un termómetro, un pH-metro y una sonda de OD portátiles. Mientras que en el caso del reactor CPC de 60 L, estos parámetros se miden directamente en el sistema haciendo uso de las sondas en línea instaladas en el reactor.

En todos los experimentos se evaluó el recrecimiento o recuperación de esporas tras el tratamiento, para lo cual se mantuvieron las dos últimas muestras de cada experimento en el laboratorio en oscuridad y a temperatura ambiente (20-22 °C) durante una semana. Tras este periodo, las muestras se sembraron de nuevo en placa según el método descrito en la sección 2.2.2. Y en ningún caso se observó recrecimiento de esporas tras alcanzarse el límite de detección.

Todos los resultados mostrados en esta memoria son el resultado de experiencias realizadas por triplicado, independientemente del reactor solar utilizado, especie microbiana objeto de estudio y tipo de agua evaluados.

De forma simultánea a la cuantificación de esporas, la concentración de los reactivos utilizados en el tratamiento fotocatalítico también fueron analizados a lo largo del experimento solar. Para ello se siguieron las técnicas descritas en la sección 2.3 para la determinación analítica de COD, concentración de TiO_2 , Fe y H_2O_2 , en los casos en los que estos parámetros estaban presentes en el tratamiento.

La limpieza de la planta piloto también es crucial en experiencias de desinfección de agua, dado que si la planta no se encuentra perfectamente libre de microorganismos o de restos de catalizador (especialmente TiO_2), el resultado puede no ser válido por competencia de fauna microbiológica o por efectos de otros catalizadores que de forma residual coexisten en el sistema. Para una correcta limpieza de la planta, tras cada

tratamiento se adiciona una alta concentración de peróxido de hidrogeno (unos 50 mL de H_2O_2 30% p/v en el reactor de 60 L), lo cual asegura la muerte de los posibles microorganismos presentes en el agua. Tras mantener la planta en recirculación por un periodo de tiempo mínimo de una hora, ésta se lava tres veces con agua destilada. Tras el lavado, se toma una muestra del agua y se evalúa inoculando 250 microlitros en agar malta siguiendo la técnica de extensión en placa. De esta manera se determina si el agua está libre de microorganismos antes de realizar un nuevo experimento. La aparición de contaminación en esta muestra conlleva la invalidación del experimento.

2.7.2. Ensayos de control en oscuridad

El efecto de las condiciones físico-químicas del agua a las que son sometidas las esporas microbianas durante los tratamientos fotocatalíticos solares debe ser evaluado antes del propio tratamiento para excluir un efecto negativo sobre la viabilidad de las esporas que no sea debido al propio tratamiento solar. Para ello, los microorganismos son sometidos a las mismas condiciones experimentales que van a sufrir bajo radiación solar, excepto que en este caso se realizan en oscuridad. En el caso de los reactores de botella, esto se lleva a cabo cubriendo las botellas con papel de aluminio de modo que se impide la entrada de radiación solar. En el caso de los reactores solares, se tapan mediante una gruesa cubierta opaca, de la misma manera que durante la homogenización del sistema previa a la exposición solar.

De esta forma se han observado los efectos de la agitación mecánica durante los ensayos (en régimen de flujo turbulento), de los reactivos empleados en los diversos tratamientos solares sobre la viabilidad de la espora y el efecto térmico. Las esporas son estructuras muy resistentes y las condiciones del tratamiento fotocatalítico utilizadas en este trabajo experimental no han generado efectos negativos sobre la viabilidad de las esporas. No obstante, se pudo determinar, gracias al desarrollo de experiencias en oscuridad con TiO_2 , que era necesario incrementar el caudal de 20 a 30 L/min en el reactor CPC de 60 L para no tener una pérdida de esporas y catalizador por sedimentación.

2.7.3. Evaluación del efecto germicida de la radiación solar

Otro tipo de ensayos necesarios para poder realizar una adecuada evaluación de la eficiencia del tratamiento fotocatalítico solar son los experimentos realizados únicamente con radiación solar. Estos experimentos se llevan a cabo para conocer el

efecto de la radiación solar sobre los microorganismos en ausencia de catalizadores y reactivos. Para desarrollar estos experimentos, se realiza el mismo procedimiento experimental pero sin adición de catalizador o reactivos (en adelante foto-inactivación solar).

Por norma general, la adición de reactivos o catalizadores debe provocar una mejora en el resultado de inactivación microbiana. Sin embargo, cuando las concentraciones utilizadas o las condiciones del sistema no son adecuadas, el resultado final puede ser peor que en el caso de utilizar solo radiación solar. Por ello, en paralelo a todos los ensayos fotocatalíticos se han realizado los ensayos de inactivación por irradiación solar.

2.8. Modelos cinéticos y ajuste estadístico de los datos

2.8.1. Descripción de los modelos de inactivación por radiación UV

En la literatura se han propuesto diferentes modelos cinéticos para explicar los procesos de desinfección microbiana, entre ellos el de desinfección mediante radiación ultravioleta (UV-C) y más recientemente el de fotocatálisis solar.

Los modelos cinéticos descritos para la desinfección por radiación ultravioleta se basan en el modelo de Chick-Watson, que propuso un modelo de primer orden según la siguiente ecuación [Chick, 1908]:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-K \times I \times t} \quad (2.9)$$

Donde N es la concentración de organismos viables después de la exposición a la luz UV (UFC/100mL), N_0 es la concentración de organismos viables antes de la exposición a la luz UV (UFC/100mL), K es la constante cinética de primer orden (cm^2/mJ), I es la intensidad ultravioleta (mW/cm^2) en el tiempo t (segundos) y $I \times t$ es la dosis UV (mJ/cm^2). Este modelo supone una susceptibilidad uniforme a la radiación UV de todos los microorganismos presentes en el agua, pero en condiciones reales este comportamiento puede presentar desviaciones de tipo hombro ("shoulder") y más frecuentemente de tipo cola ("tailing").

Más tarde Qualls y cols. en 1983, describieron otro modelo para explicar el fenómeno según el cual las bacterias pueden esconderse o protegerse de la radiación UV por la presencia en el agua de partículas. La ecuación de primer orden original se

modificó teniendo en cuenta ese efecto, pasando a describirse de acuerdo con la siguiente ecuación [Qualls y cols., 1983]:

$$N = N_0 \times e^{-K \times I \times t} + N_p \quad (2.10)$$

Donde N es la concentración inicial de organismos (UFC/100mL) y N_p es la concentración de organismos agregados al material particulado después de la exposición a la luz UV (UFC/100mL). Este modelo presupone un flujo pistón perfecto en el reactor, sin dispersión axial y con un tiempo de exposición único e idéntico para todos los elementos del fluido. Sin embargo, estas condiciones ideales no coinciden con la realidad, donde la dispersión axial y los gradientes de velocidad que se generan en los grandes reactores causan una distribución de los tiempos de residencia, el cual es función del coeficiente de dispersión del reactor [USEPA, 1986; Salcedo y cols., 2007]

En 1997, Cerf propuso una hipótesis para explicar el fenómeno del “*tailing*” basada en dos conceptos diferentes. El primero es un concepto vitalista según el cual los individuos dentro de una población no son idénticos y están agrupados en poblaciones. Esto explicaría las diferentes resistencias a la radiación UV de los microorganismos. El segundo es un concepto mecanicista, que supone que los procesos de inactivación son análogos a las reacciones químicas, que pueden ocurrir en diferentes rutas [Cerf, 1977]. Este modelo bifásico, consiste en una cinética de doble primer orden que se ajusta muy bien a un tipo de curva con cola [Cerf, 1977; Geeraerd y cols., 2005]. La primera reacción en este modelo es muy rápida y tiene una constante cinética muy alta, mientras que la segunda fase se ajusta a la cola y es muy lenta. La ecuación para este modelo viene dada por la siguiente ecuación:

$$\log(N_t) = \log(N_0) + \log((1-f) \times e^{-K_{max1} \times t} + f \times e^{-K_{max2} \times t}) \quad (2.11)$$

Siendo N_t la concentración bacteriana a tiempo t , N_0 es la concentración inicial de microorganismos (UFC/100mL), t es el tiempo, f es la fracción de la población inicial que sigue la reacción rápida y $(1-f)$ es la fracción de la población inicial que sigue la segunda fase de la reacción, donde k_{max1} y k_{max2} (1/tiempo) son constantes específicas de las dos reacciones respectivamente [Geeraerd y cols., 2005].

Otros modelos cinéticos intentan explicar el fenómeno de hombro y cola encontrados en los procesos de desinfección térmica a temperaturas medias o bajas. En

esta línea, Geerard y cols. (2000) propusieron un modelo cinético que contempla varios casos como la cinética con hombro inicial seguido de una cinética de primer orden (Ecuación 2.12); la cinética de primer orden seguida de una cola final (Ecuación 2.13); con hombro seguido de primer orden y cola (Ecuación 2.14); y con dos cinéticas de primer orden de constantes diferentes (modelo bifásico) [Geeraerd y cols., 2000]:

$$N = N_0 \times \exp(-k_{max} \times t) \times (\exp(k_{max} \times Sl)) / (1 + (\exp(k_{max} \times Sl) - 1) \times \exp(-k_{max} \times t)) \quad (2.12)$$

$$N = (N_0 - N_{res}) \times \exp(-k_{max} \times t) + N_{res} \quad (2.13)$$

$$N = (N_0 - N_{res}) \times \exp(-k_{max} \times t) \times ((\exp(k_{max} \times Sl)) / (1 + (\exp(k_{max} \times Sl) - 1) \times \exp(-k_{max} \times t))) + N_{res} \quad (2.14)$$

Donde k_{max} es la constante cinética en la fase de primer orden, Sl es la longitud del hombro y N_{res} es la concentración de microorganismos residual que queda al final del tratamiento y dan lugar a la forma de cola en la gráfica.

Recientemente, Marugán y cols. han desarrollado un modelo paramétrico para la interpretación de cinéticas de desinfección fotocatalítica con TiO_2 [Marugán y cols., 2008]. Basados en trabajos de inactivación de *E. coli* con suspensiones de TiO_2 en un reactor de laboratorio, estos autores también describen cinéticas de desinfección con una región inicial tipo hombro, seguida de otra lineal y finalmente de una tipo cola. Sus ecuaciones son similares a las ya descritas en este apartado, pues describen un comportamiento similar. Según estos autores, la zona tipo hombro de la cinética obedece al tiempo de adsorción de la bacteria a la superficie del catalizador. El hombro también se atribuye al tiempo que tarda la suspensión microbiana en acusar los efectos negativos del tratamiento desinfectante bien porque el microorganismo ofrezca cierta resistencia al tratamiento, o bien porque el método de detección y enumeración de colonias no es tan sensible como para acusar daños microbianos desde el momento en que éstos se producen. La cola se interpreta como la concentración final de colonias que permanecen resistentes al tratamiento.

2.8.2. Aplicación de los modelos a las cinéticas experimentales

En el proceso fotocatalítico, la expresión general de la ecuación de Chick-Watson se puede modificar para nuestras condiciones experimentales, donde el tiempo es sustituido por la cantidad de energía UV-A solar recibida durante el experimento por unidad de volumen (Q_{UV}) para hacer posible la comparación con resultados obtenidos en otros reactores solares:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k' \cdot Q_{UV} \quad (2.15)$$

Donde $\frac{N}{N_0}$ es la reducción en la concentración de microorganismos, k' es la constante cinética de desinfección y Q_{UV} es la dosis de radiación UV-A recibida en el sistema por unidad de tiempo y de volumen.

La modificación al modelo Chick-Watson que hemos utilizado para interpretar las cinéticas que mostraban poblaciones residuales tras una etapa log-lineal es la siguiente:

$$N = (N_0 - N_{res}) \cdot \exp(-k'' \cdot Q_{UV}) + N_{res} \quad (2.16)$$

Donde N_0 es la concentración inicial, N_{res} es la concentración residual de microorganismos (región de la cola de la gráfica) y k'' es la velocidad de reacción en la zona lineal.

Cuando la cinética presenta un hombro en su etapa inicial seguido por un comportamiento lineal hasta la desinfección total, se ha utilizado otra modificación a la ecuación de Chick-Watson [Marugán y cols., 2008]:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \begin{cases} 0 & ; \quad Q_{UV} \leq Q_1 \\ a - k''' \cdot Q_{UV} & ; \quad Q_{UV} > Q_1 \end{cases} \quad (2.17)$$

Donde Q_1 es el valor de Q_{UV} para el cual el proceso de inactivación no ha comenzado. Representa la longitud en el eje x del hombro de la cinética Q_1 , lo cual podría

interpretarse como la energía necesaria para que los microorganismos empiecen a acusar el fenómeno de degradación e inactivación. Este valor, depende fundamentalmente del tratamiento empleado y de la naturaleza del microorganismo. Los parámetros a y k'''' corresponden a los parámetros del ajuste en la zona lineal y representan respectivamente el logaritmo de concentración normalizada de microorganismo en el punto de inflexión de la curva y la constante cinética en el tramo lineal.

La modificación que hemos utilizado para interpretar las cinéticas que mostraban un hombro inicial, un tramo lineal y una cola residual es la siguiente:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \begin{cases} 0 & ; Q_{UV} \leq Q_1 \\ a - k'''' \cdot Q_{UV} & ; Q_{UV} > Q_1 \\ b & ; Q_{UV} \geq Q_1 \end{cases} \quad (2.18)$$

Donde b es el logaritmo de la concentración inicial de microorganismos (N_0) dividido por la concentración residual de microorganismos (N_{res}) (región de la cola de la gráfica) y k'''' es la velocidad de reacción en la zona lineal.

Los resultados cinéticos se han avaluado conforme a los modelos de desinfección descritos con el objeto de dar una interpretación lo más completa posible a los resultados obtenidos y de compararlos con otros estudios. Aunque el estudio cinético de los procesos de desinfección podría utilizarse para elaborar un modelo predictivo y obtener herramientas de diseño y optimización de nuevos foto-reactores, esta no es la finalidad de este trabajo experimental.

Junto a los valores de los parámetros obtenidos, se obtienen también los errores estadísticos (desviación estándar) de los valores de los parámetros y la suma de errores cuadrados.

3. DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA CON DIÓXIDO DE TITANIO

Este capítulo estudia la eficiencia del tratamiento fotocatalítico solar con TiO_2 en diferentes reactores solares: reactor de botella (200 mL), reactor solar CPC (14 L) y el nuevo prototipo de reactor CPC (60 L). El estudio se ha centrado en la búsqueda de las mejores condiciones de caudal en el reactor así como en determinar la adecuada concentración de catalizador en suspensión. Durante este estudio también se ha evaluado la eficiencia fotocatalítica en la desinfección de agua destilada y agua natural de pozo contaminadas con esporas del género *Fusarium*. Además se ha analizado la resistencia a la inactivación fotocatalítica de cada una de las esporas generadas por *Fusarium* spp.

3.1. Evaluación del proceso de inactivación de *F. solani* en reactor de botella y CPC de 14 L

3.1.1. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor de botella con agua destilada

Los estudios preliminares de desinfección fotocatalítica solar con TiO_2 se llevaron a cabo en reactores de botella de 200 mL y en presencia de radiación solar natural a diferentes concentraciones de catalizador en suspensión (0, 10, 20, 35, 50 y 100 mg/L)

en agua destilada y esporas de *F. solani* (F12). Las mismas condiciones de trabajo se aplicaron en los ensayos en oscuridad como controles del tratamiento y, aunque no se muestran los resultados, cabe destacar que la concentración fúngica se mantuvo constante a lo largo del tiempo experimental (5 h), demostrando que el TiO_2 no tiene ningún efecto negativo sobre la viabilidad de las esporas estudiadas. Por otro lado, los resultados obtenidos en oscuridad ponen de manifiesto que el efecto de inactivación con TiO_2 en presencia de luz solar natural se debe única y exclusivamente al proceso fotocatalítico.

La figura 3.1 muestra la susceptibilidad fotocatalítica de una suspensión de esporas de *F. solani* a las concentraciones de TiO_2 mencionadas anteriormente así como durante la foto-inactivación solar.

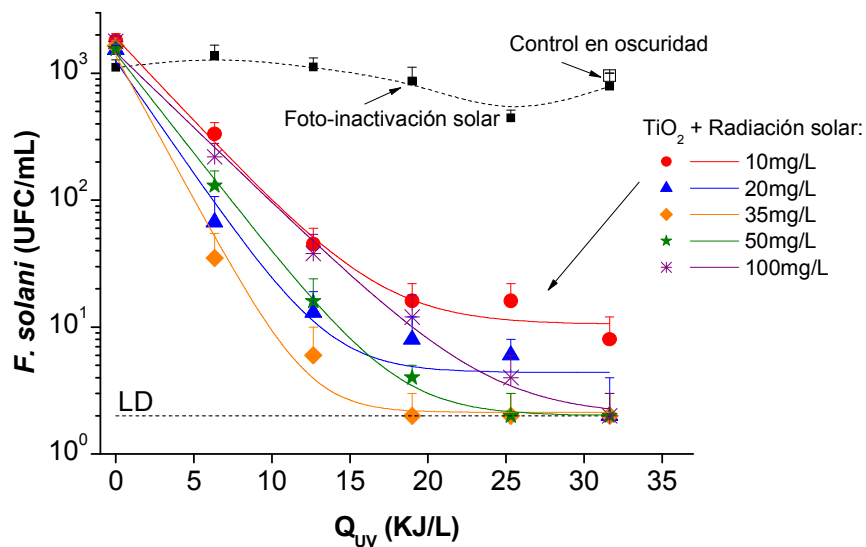


Figura 3.1. Inactivación de esporas de *F. solani* en agua destilada bajo luz solar natural en presencia de TiO_2 y foto-inactivación solar en reactor de botella. Las líneas continuas muestran el ajuste cinético de los datos experimentales. La media de radiación UV-A solar es $37(\pm 2) \text{ W/m}^2$. LD es el límite de detección (2 UFC/mL).

Se puede observar que la foto-inactivación solar, es decir, el mero efecto de la radiación solar no afecta de forma negativa a la concentración de esporas ya que ésta permanece constante. Sin embargo, la adición de catalizador genera una fuerte reducción de la concentración fúngica de 3 log, desde 10^3 UFC/mL hasta alcanzar el límite de detección ($\text{LD} = 2 \text{ UFC/mL}$) en 5 h de exposición solar, excepto en las concentraciones de TiO_2 de 10 y 20 mg/L en los que no se alcanza el LD.

El proceso de foto-inactivación solar produce sobre los microorganismos una serie de efectos negativos que pueden provocar la muerte de los mismos. Este efecto se

ha estudiado en numerosos microorganismos de origen bacteriano, tales como *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Salmonella* spp., etc., en los cuales se observa una elevada susceptibilidad a este proceso [Boyle y cols., 2008; Ubomba-Jaswa y cols., 2010]. Los daños producidos por el efecto de la radiación solar varían en función del tipo de microorganismo presente en el sistema. Cuando el microorganismo objeto de inactivación es muy resistente, como es el caso de las esporas, al ser expuesto a la misma dosis UV solar, los daños son menores y, por tanto, el efecto de muerte es menos agresivo. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que la acción de la radiación solar no es tan eficiente en la desinfección de aguas contaminadas con esporas de hongos que en la desinfección de suspensiones bacterianas [Sichel y cols., 2007a; 2007b]. Las esporas, a diferencia de las células vegetativas, son estructuras de resistencia y supervivencia cuya arquitectura biológica está diseñada para soportar factores medioambientales adversos. Por este motivo las esporas evaluadas en este trabajo experimental no acusan un marcado efecto de muerte durante el tratamiento de foto-inactivación solar.

Los principales mecanismos que conllevan a la muerte celular en el proceso de inactivación bajo radiación solar natural son:

- (i) La acumulación de mutaciones en el ADN provocadas por radiación UV-A. Las principales lesiones en el ADN se producen por la formación de dímeros ciclobutano-pirimidina (CPDs). Estos son los dímeros más abundantes y citotóxicos formados tras una exposición a radiación UV [Shina y Häder, 2002]. También pueden ser generados los conocidos como fotoproductos 6-4 (6-4 PPs, aductos de pirimidina) los cuales pueden incluso ser más letales y mutagénicos que los CPD. Ambos tipos de productos distorsionan la hélice de ADN y, si las lesiones no son reparadas, un solo CPD es suficiente para inhibir un gen y parar el proceso de transcripción y replicación celular impidiendo la lectura del código genético causando mutaciones y eventualmente la muerte celular [Shina y Häder, 2002].
- (ii) El daño en las células ocurre también por el ataque oxidativo de las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo, etc. Estos son generados a bajos niveles de radiación UV y afectan tanto al ADN como a otras moléculas presentes en las células [Miller y cols., 1999; Merwald y cols., 2005; Imlay, 2008; Ubomba-Jaswa y cols., 2009]. Cuando las ROS interaccionan con el ADN, producen rupturas, alteraciones de la secuencia de bases en la cadena de ADN así como modificaciones en las bases nitrogenadas que pueden tener consecuencias letales y mutagénicas.

(iii) La radiación UV también induce la oxidación de proteínas. Entre ellas destacan las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD), las cuales se encargan de eliminar las ROS generadas por el metabolismo aerobio de los microorganismos [Miller y cols., 1999]. Este proceso se describirá en detalle en el Capítulo 4.

(iv) Otra de las posibles vías de generación de especies radicales se debe a la presencia de hierro y H_2O_2 en el interior celular. Estos al reaccionar generan radicales hidroxilo que, dada su baja especificidad, atacan cualquier componente celular generando lesiones graves que pueden conducir a la muerte [Sphuler y cols., 2010]. Este proceso también se describirá en mayor detalle en el Capítulo 4.

No obstante, a pesar de todos los posibles efectos que puede producir la radiación UV-A solar, estos no son suficientes para generar un daño significativo en las esporas estudiadas en este trabajo experimental. A pesar de todo, y aunque no se trata de las vías principales de inactivación de esporas fúngicas, no se pueden descartar ya que se pueden dar en cualquier experimento solar.

El proceso de fotocátalisis, sin embargo, tiene un fuerte efecto germicida sobre las esporas de *Fusarium* spp. Esto demuestra que el tratamiento es muy efectivo para la inactivación de microorganismos resistentes. El mecanismo de acción del dióxido de titanio es diferente al de foto-inactivación por radiación solar. Este se basa en la generación de radicales hidroxilo cuyo ataque, en primer lugar, a los componentes de la pared celular de las esporas produce la oxidación de lípidos [Nadtochenko y cols., 2004; Kiwi y Nadtochenko, 2005] y proteínas alterando la funcionalidad de la pared, lo cual conduce a la muerte celular. Además, la radiación UV solar por si sola puede causar daños letales y mutagénicos tal y como se ha mencionado anteriormente debido a la acumulación de lesiones en el ADN y otros componentes celulares [Favre, 1977; Moan y Peak., 1989; Wondrak y cols., 2006]. Todos estas vías provocan una rápida pérdida de viabilidad de los microconidios de *F. solani* tal y como se observa en los resultados preliminares realizados en reactor de botella de 200 mL.

Los datos cinéticos de inactivación de los tratamientos fotocatalíticos mostrados en la figura 3.1 se ajustaron estadísticamente de acuerdo con los modelos descritos en el capítulo 2 y los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 3.1. Se utilizó el modelo log-lineal (Ecuación 2.15) y el modelo modificado de la ecuación log-lineal para ajustes cinéticos que muestran una cola al final del proceso, de acuerdo con la ecuación 2.16. De este modelo se obtiene una constante de inactivación (k) y una concentración residual de microorganismo, en este caso, esporas (N_{res}).

Tabla 3.1. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos fotocatalíticos con TiO_2 realizados en el reactor de botella y en agua destilada

$\text{TiO}_2(\text{mg/L})$	$k (\text{L/kJ})$	$\text{Log } (N_{\text{res}})$	R^2	Modelo cinético
10	$0,04 \pm 0,10$	$2,3 \pm 0,1$	0,99	Log-lineal+ Cola
20	$0,10 \pm 0,20$	$2,9 \pm 0,2$	0,98	Log-lineal+ Cola
35	$0,30 \pm 0,40$	-	0,96	Log-lineal
50	$0,25 \pm 0,20$	-	0,97	Log-lineal
100	$0,30 \pm 0,20$	-	0,98	Log-lineal

Los resultados experimentales de inactivación confirman que la mayor eficiencia del proceso se alcanza con una concentración de TiO_2 de 35 mg/L. Este resultado coincide con la concentración de catalizador estimada de forma teórica, calculada mediante la ecuación 2.6 para la configuración experimental del reactor de botella. La coincidencia entre el valor experimental y el teórico pone de manifiesto que el comportamiento de la luz incidente en el reactor juega un papel principal en el proceso fotocatalítico y que otros factores como la temperatura, pH, OD, etc., son menos relevantes a la hora de buscar la más alta eficiencia en el proceso de desinfección fotocatalítica con TiO_2 .

El patrón de inactivación fúngica muestra una última etapa marcada por una fuerte atenuación de la velocidad de inactivación, especialmente en los experimentos con una concentración de catalizador inferior a 35 mg/L. En los casos de 10 y 20 mg/L de TiO_2 se puede observar que la concentración de esporas viables de *F. solani* disminuye desde 10^3 UFC/mL hasta 10 UFC/mL durante las primeras 2,5 a 3 h de tratamiento fotocatalítico (dependiendo de la concentración de catalizador) mientras que en las últimas 2,5 a 3 h finales del mismo decrecen muy lentamente. Esta variación se puede deber a varios factores. En primer lugar, es posible que se produzca una competencia entre las esporas muertas, los bio-productos generados durante el proceso y las esporas todavía viables por el catalizador, la luz y los radicales hidroxilo. Y, por otro lado, existe una menor probabilidad de que los radicales hidroxilo entren en contacto con las esporas viables de *F. solani* al final del tratamiento.

3.1.2. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor solar CPC de 14 L con agua destilada

El primer escalado para el tratamiento de un mayor volumen de agua aplicado a la desinfección fotocatalítica de esporas de *Fusarium* spp. se llevó a cabo utilizando un foto-reactor CPC de 14 L. Antes de comenzar con los ensayos fotocatalíticos solares, se realizaron experiencias en oscuridad para determinar el efecto del catalizador sobre la viabilidad de las esporas y determinar el caudal de trabajo adecuado del reactor. Dado

que el reactor es un sistema cerrado cuya homogenización depende del flujo turbulento creado en el interior del mismo, un caudal de trabajo inadecuado puede generar la sedimentación del catalizador, así como de las esporas, generando errores en la cuantificación de la inactivación fúngica durante el tratamiento. Por este motivo, tanto el caudal utilizado para llevar a cabo los experimentos como el posible efecto tóxico del catalizador sobre las esporas estudiadas se evaluaron mediante ensayos en oscuridad en el reactor CPC y en presencia de 250 mg/L de TiO_2 .

En los experimentos desarrollados en este reactor con esporas fúngicas a un caudal de 10 L/min bajo las condiciones mencionadas, se observó una elevada pérdida por sedimentación de partículas de TiO_2 junto con un descenso en la concentración de esporas. Se necesitó un caudal de 20 L/min para mantener en suspensión tanto el catalizador como las esporas y conseguir eliminar el efecto de sedimentación. Por tanto, los experimentos en el reactor CPC se realizaron a 20 L/min de manera que toda la inactivación de esporas bajo luz solar y en presencia de TiO_2 se debe al proceso de desinfección fotocatalítico, y no a procesos de sedimentación y pérdidas en oscuridad. Bajo estas condiciones de trabajo, la supervivencia de las esporas durante 5 h de tratamiento demuestra que el caudal en el reactor y el contacto con el catalizador no generan un efecto negativo en la viabilidad fúngica tal y como se observa en la figura 3.2.

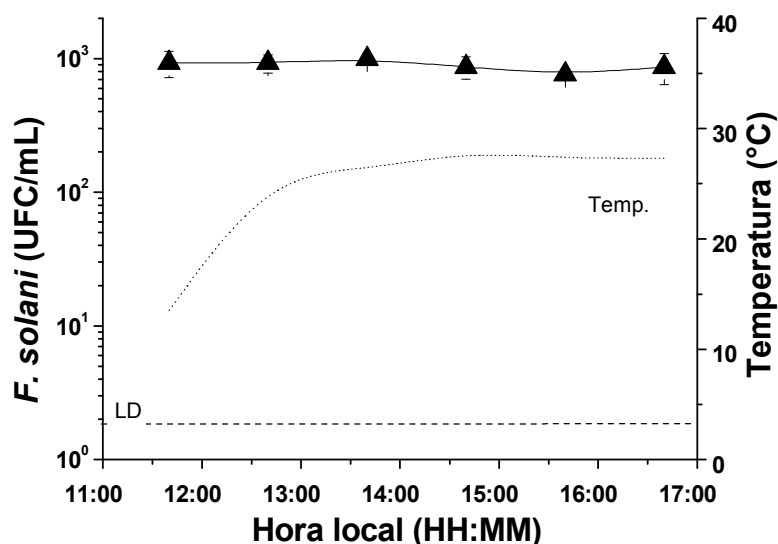


Figura 3.2. Viabilidad de esporas de *F. solani* en presencia de TiO_2 en reactor CPC de 14 L a un caudal de 20 L/min durante 5 h de tratamiento en oscuridad.

La figura 3.3 muestra los resultados de inactivación de microconidios de *F. solani* obtenidos durante experimentos de desinfección fotocatalítica con diferentes concentraciones de TiO_2 y un experimento de foto-inactivación solar en agua destilada y en foto-reactor CPC de 14 L con radiación solar natural y un caudal de recirculación de 20 L/min. Se evaluaron diferentes concentraciones de catalizador con el objetivo de obtener la mayor eficiencia en la inactivación fúngica, las concentraciones estudiadas fueron 10, 50, 100, 250 y 500 mg/L de TiO_2 . Se observa en la figura 3.3 que el proceso de foto-inactivación solar con una irradiancia UV media de 38 W/m^2 no genera ningún efecto negativo en la viabilidad fúngica, ya que la concentración inicial de esporas permanece constante durante las 5 h de tratamiento.

En este caso, al igual que con el reactor de botella, la adición de catalizador mejora la inactivación fúngica con todas las concentraciones de TiO_2 estudiadas. De forma general, conforme la concentración de catalizador aumenta también aumenta la eficiencia de inactivación fúngica, alcanzando su máximo a una concentración de TiO_2 de 100 mg/L. En este caso, la concentración de esporas de *F. solani* desciende desde 2000 UFC/mL hasta el límite de detección en 3 h de tratamiento fotocatalítico. Sin embargo, alcanzado este punto, incrementar la concentración de TiO_2 no mejora los resultados sino que, por el contrario, la eficiencia decrece como se observa en las figuras 3.1 y 3.3.

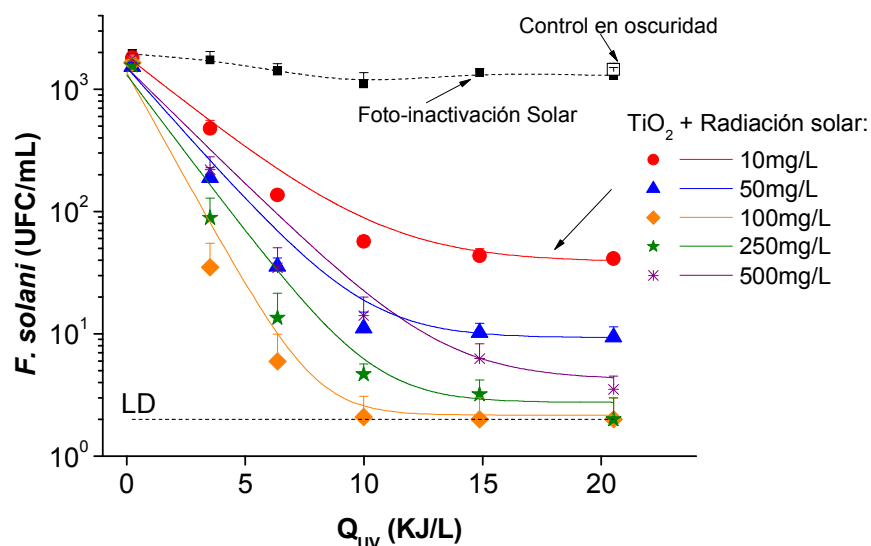


Figura 3.3. Inactivación de esporas de *F. solani* en agua destilada en presencia de diferentes concentraciones de TiO_2 y foto-inactivación solar en el reactor CPC de 14 L. Las líneas continuas muestran el ajuste cinético de los datos experimentales. Radiación UV-A media = $38(\pm 3) \text{ W/m}^2$. LD = 2 UFC/mL.

Este efecto se debe a que en la fotocatalisis solar con TiO_2 , las velocidades de degradación son directamente proporcionales a la cantidad de catalizador empleado. Sin embargo, por encima de ciertas concentraciones, esta velocidad es independiente de la cantidad de catalizador. El límite en el que se alcanza la máxima eficiencia depende de la geometría y de las condiciones de trabajo del reactor, y coincide con la concentración en la cual todas las partículas de TiO_2 están correctamente iluminadas. Los resultados obtenidos de forma experimental en este caso, al igual que en el reactor de botella, concuerdan con la estimación teórica de una concentración óptima de TiO_2 de 83 mg/L calculada mediante la ecuación 2.6, para el reactor CPC y 35 mg/L para el reactor de botella, en función de la longitud de paso óptico en cada caso. Por encima de estas concentraciones, la suspensión sólo permite que la radiación penetre una cierta distancia (inferior a su paso óptico) en el foto-reactor. Esto supone que una determinada concentración de catalizador, en el interior del foto-reactor no esté iluminada y, por tanto, disminuye su eficiencia fotocatalítica. Por el contrario, cuando la concentración de catalizador es inferior a dicha concentración óptima, cierta proporción de radiación incidente sale del foto-reactor sin ser absorbida por las partículas de TiO_2 , por lo que no se obtiene el máximo rendimiento. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la radiación solar entrante en el reactor para lograr buenos resultados de desinfección fotocatalítica.

Comparando los resultados de inactivación obtenidos en el reactor de botella y en el prototipo CPC, se puede observar que el uso del reactor CPC mejora el proceso fotocatalítico ya que es necesaria una menor cantidad de radiación UV acumulada en el sistema para tratar un determinado volumen de agua. Esto se debe a que el sistema CPC usa de forma más eficiente la radiación incidente en el reactor, siempre y cuando se trabaje con la concentración de TiO_2 adecuada. El uso de la configuración de espejos CPC en foto-reactores es muy efectiva para aplicaciones fotocatalíticas solares en el tratamiento de contaminantes en aguas [Malato y cols., 2009] y de desinfección [Navntof y cols., 2008]. Este beneficio procede de la capacidad de iluminación completa del foto-reactor, de manera que el aumento de los fotones entrantes en el sistema (procedentes tanto de la radiación difusa como de la directa) favorece las reacciones fotocatalíticas.

Los datos obtenidos del ajuste cinético se presentan en la tabla 3.2, muestran igualmente como la constante cinética de inactivación aumenta con la concentración de catalizador hasta alcanzar el valor máximo en el caso de 100 mg/L de TiO_2 y a partir de aquí, la velocidad de inactivación vuelve a disminuir.

Tabla 3.2. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos fotocatalíticos con TiO_2 realizados en el reactor CPC de 14 L con agua destilada.

TiO_2 (mg/L)	k (L/kJ)	$\text{Log} (N_{\text{res}})$	R^2	Modelo cinético
10	$0,01 \pm 0,08$	$1,64 \pm 0,02$	0,99	log-lineal + Cola
50	$0,05 \pm 0,15$	$2,20 \pm 0,05$	0,98	log-lineal + Cola
100	$0,30 \pm 0,40$	-	0,95	log-lineal
250	$0,15 \pm 0,25$	$2,30 \pm 0,09$	0,97	log-lineal + Cola
500	$0,06 \pm 0,00$	$2,10 \pm 0,10$	0,99	log-lineal + Cola

3.1.3. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor solar CPC de 14 L con agua natural de pozo

La figura 3.4 muestra el efecto fotocatalítico de diferentes concentraciones de TiO_2 (50, 100 y 250 mg/L) en la inactivación de esporas de *F. solani* con el sistema CPC de 14 L durante experimentos desarrollados con agua natural de pozo. Los resultados de desinfección con TiO_2 muestran que no se alcanzó el límite de detección en ninguna de las concentraciones evaluadas: 50, 100 y 250 mg/L. Se puede observar que el rendimiento de desinfección es mayor cuanto mayor es la concentración de catalizador añadido, desde una inactivación de 1,2 log con 50 mg/L a 2,5 log de reducción en la concentración fúngica a 100 mg/L de catalizador. Por el contrario, y siguiendo la misma tendencia que en el caso del agua destilada, cuando la concentración aumenta de 100 mg/L a 250 mg/L de TiO_2 , el efecto en la inactivación de esporas se reduce de 2,5 log a 1,9 log. Las concentraciones de 50, 100 y 250 mg/L muestran que, en efecto, el proceso de desinfección está siguiendo la tendencia esperada en cuanto a la concentración de catalizador, alcanzando el rendimiento de desinfección más alto con 100 mg/L de TiO_2 .

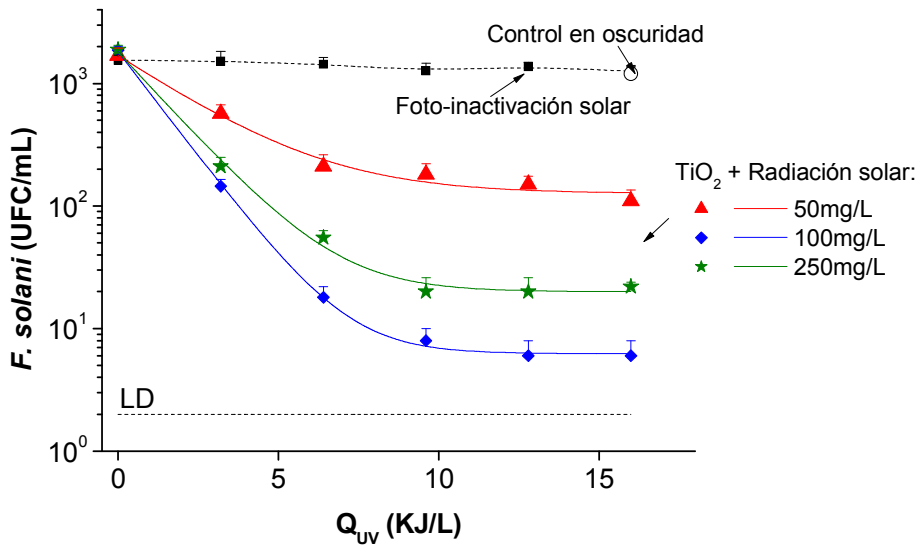


Figura 3.4. Inactivación de esporas de *F. solani* en agua natural de pozo en presencia de TiO_2 y foto-inactivación solar en reactor CPC de 14 L. Las líneas continuas muestran el ajuste cinético de los datos experimentales. La radiación UV-A solar media es $32(3\pm) \text{ W/m}^2$. LD = 2 UFC/mL.

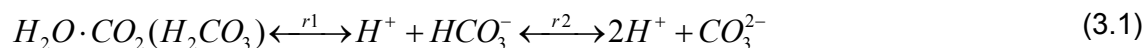
Al igual que en los casos anteriores (Figura 3.1 y 3.3), las últimas etapas de inactivación fotocatalítica están fuertemente atenuadas y como consecuencia, el ajuste de los datos obtenidos se acerca más al modelo cinético que describe una curva de inactivación de tipo log-lineal seguida de una cola. Los datos de este ajuste se muestran en la tabla 3.3. Según las constantes cinéticas de velocidad de inactivación, la mayor eficiencia se alcanza cuando se utilizan 100 mg/L de catalizador, al igual que en el caso del agua destilada.

Tabla 3.3. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos fotocatalíticos con TiO_2 realizados en el reactor CPC de 14 L y en agua de pozo.

TiO_2 (mg/L)	k (L/kJ)	$\text{Log}(N_{\text{res}})$	R^2	Modelo cinético
50	$0,20\pm 0,15$	$1,18\pm 0,05$	0,92	Log-lineal + Cola
100	$0,34\pm 0,30$	$2,50\pm 0,02$	0,94	Log-lineal + Cola
250	$0,14\pm 0,15$	$1,90\pm 0,05$	0,98	Log-lineal + Cola

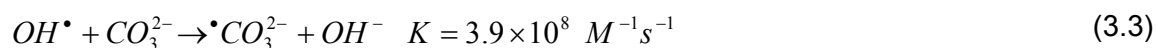
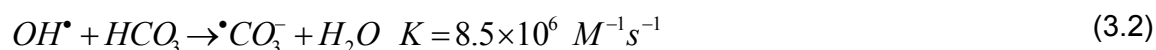
Los valores de velocidad inicial de inactivación de las tres concentraciones de TiO_2 estudiadas en el caso del agua de pozo son más bajos que los obtenidos en el caso del agua destilada. Una de las razones de esta menor eficiencia de inactivación en el agua del pozo es la presencia de una alta concentración de especies químicas inorgánicas, en particular, los carbonatos y bicarbonatos (Tabla 2.3).

La principal especie inorgánica presente en una solución a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5 (el agua de pozo tiene un pH comprendido entre 7,5-8), es el bicarbonato (HCO_3^-) el cual representa un 95 % a pH 7,8, debido a las $pK_{r1} = 6,37$ y $pK_{r2} = 10,25$ de la reacción 3.1.



A pH inferior a 6, la especie predominante es el CO_2 , que por normal general se escapa de la solución acuosa en forma de gas. Por último, la especie dominante a $pH > 9$ es el carbonato (CO_3^{2-}).

En aguas naturales y aguas residuales sujetas a procesos de oxidación-reducción, la oxidación de contaminantes iniciada por CO_3^{2-} está siempre en competición con la oxidación por radicales hidroxilo [Canonica y cols., 2005]. Por tanto, para alcanzar una buena eficiencia, la formación de CO_3^{2-} no puede exceder la formación de radicales hidroxilo. El principal captador de ambos radicales es la materia orgánica natural disuelta en el agua y, si está presente, el peróxido de hidrogeno. Sin embargo, el agua de pozo evaluada en este trabajo no presenta valores significativos de materia orgánica disuelta (Tabla 2.3) ni peróxido de hidrogeno. El alto contenido de carbonatos y bicarbonatos presentes en el agua de pozo es un factor limitante para el proceso fotocatalítico al reaccionar con el radical hidroxilo de acuerdo con las ecuaciones 3.2 y 3.3 [Buxton y cols., 1988].



Como consecuencia de estas reacciones se genera el radical anión carbonato. Este radical muestra un amplio rango de reactividad con moléculas orgánicas pero es principalmente un reactivo electrofílico selectivo, y su reacción es más lenta que la de los $OH^\bullet$.

Por otro lado, los bicarbonatos presentan una pequeña foto-absorción que protege a los microorganismos de la luz solar. Este efecto pantalla puede limitar la penetración de luz en la suspensión bacteriana [Rincón y cols., 2004a]. Sin embargo, los

carbonatos no se pueden considerar los únicos responsables de la inhibición del proceso de desinfección.

En fuentes de agua turbia, el sombreado causado por las partículas en suspensión y por la absorción y dispersión de luz de la materia disuelta puede hacer que el rendimiento de desinfección sea menor en experimentos realizados con agua natural de pozo comparado con agua destilada. El agua de pozo utilizada en este trabajo experimental presentó una turbidez de 5 NTU, que siendo baja, comparada con el agua destilada, puede generar un efecto negativo. El conjunto de los efectos mencionados limita el ataque de los radicales $\text{OH}^\bullet$ a la pared celular de la espora y disminuye la eficiencia de inactivación comparada con los resultados obtenidos en agua destilada.

Por su parte, la concentración de oxígeno disuelto en ambos sistemas (botella y reactor CPC) en todos los experimentos se mantuvo cercana a la concentración de saturación en agua por lo que este factor no influye en los resultados experimentales.

3.2. Influencia del tipo de espora en el tratamiento TiO_2 /Solar

En este estudio se llevaron a cabo una serie de experimentos para demostrar que las diferentes esporas del género *Fusarium* presentan distintas resistencias al tratamiento fotocatalítico. Previamente Sichel y cols. en la PSA desarrollaron un trabajo experimental sobre la susceptibilidad fotocatalítica de distintas especies del género *Fusarium*. Aunque demostraron que todas ellas eran susceptibles al tratamiento fotocatalítico, también observaron diferentes patrones de inactivación según el tipo de *Fusarium* spp. empleado, lo cual podía deberse a las esporas de las especies evaluadas [Sichel y cols., 2007a]. Este género fúngico desarrolla tres tipos distintos de esporas, microconidios, macroconidios y clamidosporas (Capítulo 2, Sección 2.1.1). Aquí se investiga la influencia del tipo de espora en la fotocatálisis con TiO_2 en reactor de botella.

La figura 3.5 muestra los resultados obtenidos en el tratamiento con 35 mg/L de TiO_2 y *F. equiseti* (cepa FE3). Esta especie se caracteriza por desarrollar principalmente macroconidios aunque también aparecen algunas clamidosporas. Se constata de nuevo que la acción directa de la luz solar tiene un efecto fungicida muy débil sobre la espora mientras que el efecto fotocatalítico del TiO_2 es más agresivo dando lugar a una mayor eficiencia de inactivación. El tratamiento fotocatalítico con TiO_2 provoca un descenso de 3 log (desde 1200 (± 120) UFC/mL al límite de detección) mientras que en el experimento de foto-inactivación solar se obtuvo una reducción de 0,3 log en la concentración de esporas tras 5 h de tratamiento. La suspensión fúngica en contacto

con el TiO_2 se inactivó completamente en 5 h de irradiación solar. Esta figura muestra el mismo patrón de inactivación observado por Sichel y cols. en 5 especies diferentes del género *Fusarium* [Sichel y cols., 2007a]. También se observa que la velocidad de desinfección desciende al final del tratamiento, cuando la concentración de microorganismos comienza a ser muy baja, otro patrón de comportamiento observado en los resultados anteriores (Sección 3.1).

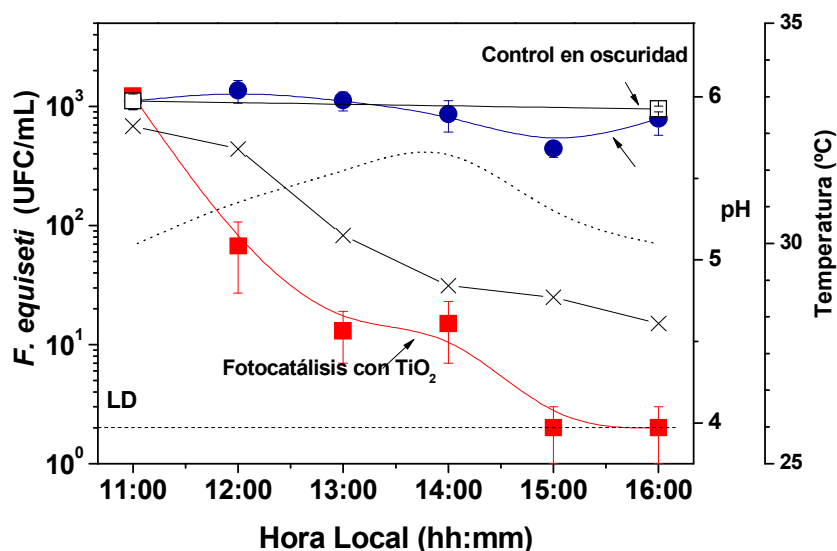


Figura 3.5. Viabilidad de esporas de *F. equiseti* (macroconidios, FE3) representado frente al tiempo experimental durante fotocátalisis con 35 mg/L de TiO_2 (—■—) y foto-inactivación solar (—●—) bajo radiación solar natural. La muestra de control en oscuridad fue evaluada en presencia de la misma concentración de TiO_2 (—□—). Evolución de temperatura (línea punteada) y pH (—×—) durante el tratamiento. LD = 2 UFC/mL. Media de UV-A solar durante el ensayo (de 11:00 a 16:00 hora local): 30 (± 3) W/m^2 .

Por otro lado, cuando se tratan de forma independiente clamidosporas producidas por *F. equiseti* (cepa M3T1b) y macroconidios de *F. equiseti* (cepa M2T1b) mediante fotocátalisis solar con TiO_2 (35 mg/L), la curva de inactivación obtenida es diferente (Figura 3.6). Se puede observar que la inactivación de los macroconidios fue más eficiente que la inactivación de clamidosporas. Tras 6 h de exposición solar en presencia de TiO_2 se obtuvo un descenso de macroconidios desde 2950(± 40) UFC/mL al límite de detección (2 UFC/mL), mientras que la concentración de clamidosporas descendió de 2200(± 30) UFC/mL a 50(± 10) UFC/mL, no alcanzándose el límite de detección.

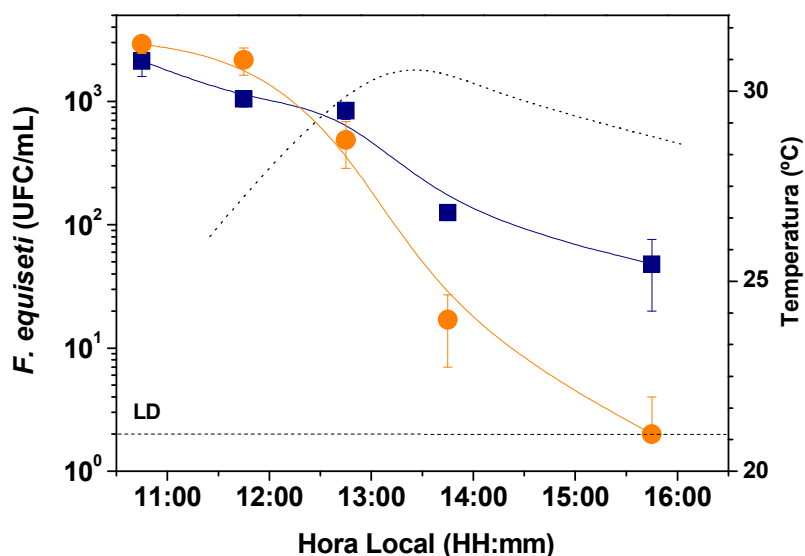


Figura 3.6. Inactivación fotocatalítica de clamidosporas (—■—) y macroconidios (—●—) de *F. equiseti* (cepas M3T1b y M2T1b, respectivamente) con 35 mg/L de TiO_2 . Evolución de la temperatura (línea punteada) durante el tratamiento fotocatalítico. Media de UV-A solar durante el ensayo (10:45- 15:45): $27(\pm 4) \text{ W/m}^2$.

Los datos de pH, temperatura, OD y Q_{UV} medidos en estos ensayos se muestran en la tabla 3.4. En los experimentos de las figuras 3.5 y 3.6, el pH de la solución descendió de 6 a 4, aunque permanece constante en el caso de la foto-inactivación solar. Este descenso puede ser atribuido a los compuestos generados durante la degradación de los ácidos de la pared celular fúngica debido al ataque del TiO_2 [Augugliaro y cols., 2006], ya que este efecto no se debe a la reacción del TiO_2 con el agua [Fernández-Ibáñez y cols., 2000]. Cuanto mayor es la liberación de productos de degradación, más bajo será el pH. Dado que el cambio de pH se observa en ambos casos, este efecto no es crucial para explicar las diferencias de inactivación.

Tabla 3.4. Datos medidos durante los tratamientos fotocatalíticos con TiO_2 en reactor de botella y diferentes cepas del género *Fusarium*.

Figura	Especie	TiO_2 (mg/L)	OD_i (mg/L)	OD_f (mg/L)	$T_{\min}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	pH _i	pH _f	Q_{UV} (kJ/L)	LD
Fig. 3.4	FE3	0	9,41	8,25	30	32,5	5,82	4,61	7	NO
Fig. 3.4	FE3	35	9,13	7,98	30	32,5	5,82	4,61	7	SI
Fig. 3.5	M3T1b	*35-C	9,37	8,41	25	31,4	6,11	4,2	6,4	NO
Fig. 3.5	M2T1b	*35-M	9,22	8,50	25	31,4	6,08	4,4	6,4	SI

*35-C: experimento realizado con clamidosporas y 35 mg/L de TiO_2 .

*35-M: experimento realizado con macroconidios y 35 mg/L de TiO_2 .

Q_{UV} = energía UV-A recibida por unidad de volumen durante el experimento.

LD = Límite de detección (2 UFC/mL) alcanzado al final del experimento: SI ó NO.

Los tres tipos de esporas generadas por *Fusarium* spp. se diferencian principalmente por su pared celular. *F. equiseti* se caracteriza por no desarrollar microconidios [Gerlach y cols., 1982; Leslie y Summerell, 2006], mientras que los macroconidios y las clamidosporas son comunes en esta especie [Nelson y cols., 1983]. Los macroconidios tienen paredes gruesas y están fuertemente septados [Schippers y van Eck., 1981; Nelson y cols., 1983]. La composición química de las paredes celulares de macroconidios y clamidosporas es similar y presentan principalmente glucosaminas, glucosa, manosa, galactosa, aminoácidos y ácido glucorónico aunque en diferentes proporciones [Schippers y van Eck, 1981]. Durante la formación de clamidosporas, se deposita en las paredes celulares un material electro denso que contiene melanina como sustancia resistente a la lisis [Klotz, 1994]. Este material mejora la resistencia a la oxidación y a la penetración de la luz en las capas internas de la clamidospora. Las clamidosporas de *F. oxysporum* tienen una densa capa microfibrilar en el interior de la pared hifal que se desarrolla durante su formación. Se ha demostrado mediante técnicas de difracción de rayos X que estas microfibrillas orientadas al azar son microfibrillas de quitina embebidas en una matriz de carbohidratos y proteínas, que constituyen la mayor parte de la pared [Schippers y van Eck, 1981]. El espesor de las paredes de las clamidosporas parece ser un factor importante para la supervivencia en suelos naturales en ausencia de hospedadores [Warcup, 1955]. Por tanto, se deduce que la suspensión de clamidosporas es más resistente a la fotocatalisis gracias al grosor y composición de su pared celular, lo que se refleja en una inactivación más lenta.

3.2.1. Estudio de la interacción entre espora y catalizador

Tanto las muestras de clamidosporas como de macroconidios procedentes de los tratamientos fotocatalíticos se examinaron al microscopio óptico (campo claro) sometiéndolas a un proceso de tinción con verde malaquita. Algunas de las imágenes observadas al microscopio se muestran en la figura 3.7 (a-e).

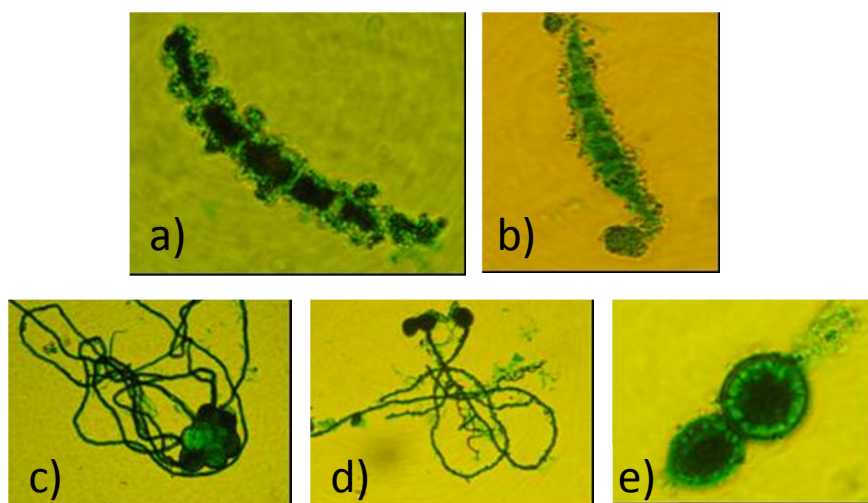


Figura 3.7. Macroconidio de *F. equiseti* (a, b) y clamidosporas (c, d, e) teñidas con verde malaquita un día después del tratamiento fotocatalítico (x1000).

Las figuras 3.7.a y 3.7.b muestran macroconidios de *F. equiseti* rodeados por agregados de TiO_2 , mientras las figuras 3.7.c y 3.7.d son imágenes de clamidosporas germinadas, y la figura 3.7.e es una clamidospora inactivada sin germinar.

De la observación al microscopio de muestras de agua cabe destacar la presencia de catalizador adsorbido sobre la superficie de la espora (Figuras 3.7.a y 3.7.b). Este efecto también se observó en suspensiones de esporas de *P. capsici* expuestas en oscuridad a 100 mg/L de TiO_2 durante 5 h en reactor de botella y constante agitación. En la figura 3.8 se muestran imágenes tomadas al microscopio óptico de la suspensión del catalizador y las esporas de *P. capsici* en agua. Estas imágenes muestran claramente el aumento del número de partículas de TiO_2 sobre la superficie de esporas de *P. capsici* a medida que se prolonga el tiempo de contacto entre esporas y catalizador.

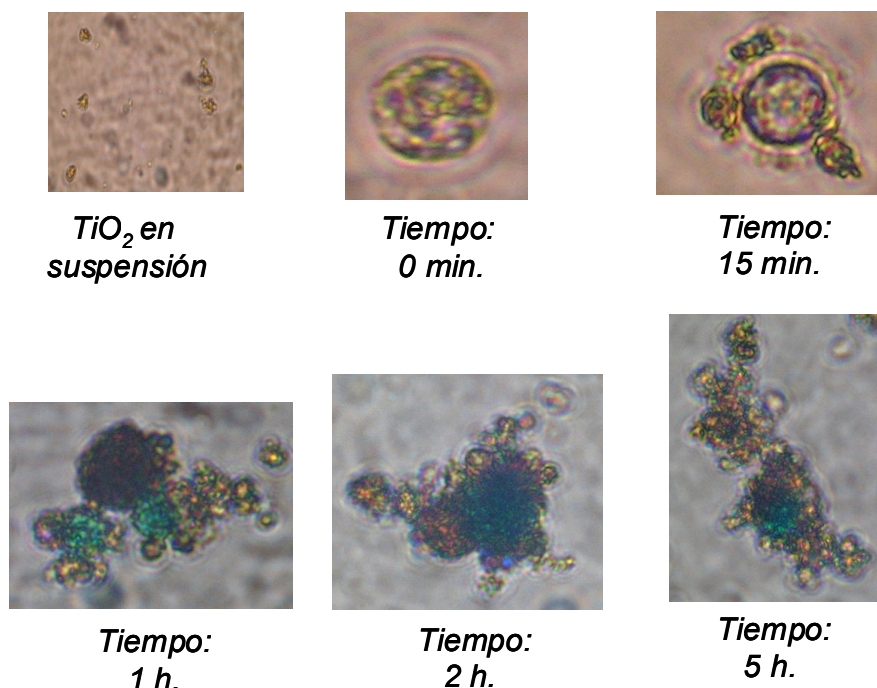


Figura 3.8. Zoosporas de *P. capsici* enquistadas en presencia de 100 mg/L de TiO_2 en suspensión durante 5 h en oscuridad teñidas con verde malaquita (x1000).

La agregación de partículas de catalizador sobre las esporas se produce debido a que éstas suelen tener una carga superficial negativa. Se sabe que la membrana citoplasmática bacteriana tiene carga neta superficial negativa, la cual está constituida por proteínas, lípidos, ácidos y lipopolisacáridos [Szumski y cols., 2005]. Otros estudios ponen de manifiesto las propiedades superficiales de la esporas de diferentes especies de hongos, como por ejemplo *Paecilomyces fumosoroseus* que presenta carga superficial negativa [Dunlap y cols., 2005], las conidiosporas de *A. nidulans* presentan hidrofobicidad [Dynesén y Nielsen, 2003], y se ha observado también interacciones electrostáticas en la superficie de *Candida albicans* y otras *Candida* sp. [Klotz, 1994].

Las partículas de dióxido de titanio en agua presentan también carga superficial variable dependiendo del pH de la suspensión acuosa. La figura 3.9 muestra un esquema del efecto del pH de la suspensión acuosa sobre el efecto de agregación entre catalizador y espora.

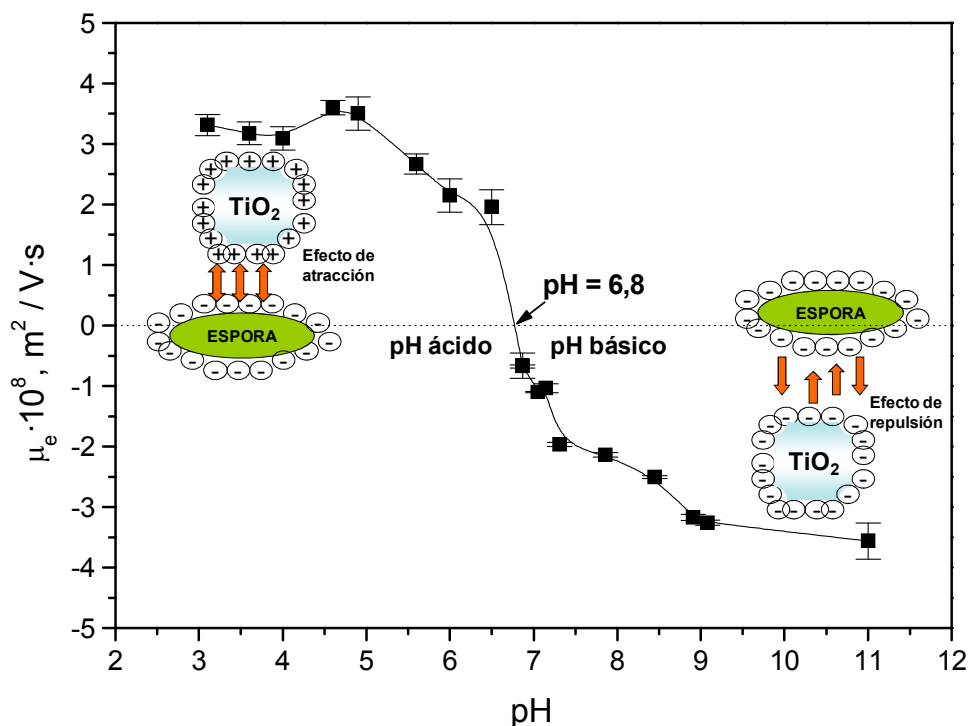


Figura 3.9. Diagrama de interacción entre partículas de catalizador en suspensión y esporas en función del pH y de la carga superficial del catalizador [Adaptado de Fernández-Ibáñez, 2004].

Las partículas de TiO_2 tienen carga negativa a un pH básico y conforme el pH de la solución acuosa va descendiendo, la carga superficial negativa disminuye hasta alcanzar un valor igual a cero (este punto se conoce como punto de carga nula, en el caso de suspensiones de TiO_2 es igual a 7). Por debajo de este pH, la presencia de H^+ hace que la superficie de la partícula de catalizador adquiera una carga positiva, mayor cuanto más ácido es el medio. En los experimentos llevados a cabo en este trabajo, el pH del agua destilada se mantuvo entre los valores 5,8 y 6, en estas condiciones las partículas de TiO_2 presentan carga neta superficial positiva [Fernández-Ibáñez y cols., 2000, 2003]. Debido a que la carga eléctrica superficial de las esporas es de signo opuesto, se observa un fuerte efecto de hetero-agregación entre ambos durante los experimentos de fotocátalisis (Figuras 3.7.a, 3.7.b y 3.8). Un aspecto positivo de este efecto es que la reacción fotocatalítica se lleva a cabo de forma más eficiente al adsorberse los elementos que van a ser degradados (en este caso esporas) a la superficie del catalizador [Herrmann, 2005] ya que los radicales hidroxilo, de vida media extremadamente corta, se generan directamente sobre la superficie del microorganismo.

No obstante, el efecto opuesto ocurrirá cuando el pH de la suspensión acuosa tenga un valor de pH superior a 7, tal y como ocurre en el caso del agua de pozo (Sección 3.1.3). Este tema ha sido investigado por Gummy en 2006 demostrando con

E. coli y el mismo catalizador que el empleado en este trabajo, que no se observan diferencias significativas en las cinéticas de desinfección fotocatalítica al variar el pH de la suspensión. Además demostraron con otros tipos de TiO_2 , que existe una correlación entre punto isoelectrico y actividad catalítica, a menor punto isoelectrico se observó menor actividad bactericida [Gumy y cols., 2006]. Sin embargo, un estudio con *E. coli* como modelo de microorganismo para la desinfección está marcado por la alta sensibilidad de la bacteria a los tratamientos, por lo que no se pueden observar en algunas ocasiones efectos especiales de parámetros debido a su rápida inactivación.

3.3. Escalado del proceso de desinfección fotocatalítica con TiO_2 a reactor CPC de 60 L

La técnica de desinfección fotocatalítica de agua para su uso y re-uso en irrigación, tiene interés especialmente a escalas mayores que las evaluadas hasta el momento. La configuración del foto-reactor CPC permite el escalado a volúmenes de agua mayores mediante el acople de varios módulos CPC. Aunque a priori pudiese parecer que este proceso es sencillo, los cambios que conlleva aumentar el volumen de agua acarrearán ciertas complicaciones que conducen a una baja eficacia del proceso si éste no se estudia con cuidado y se seleccionan las condiciones de operación apropiadas, ya que éstas en el reactor de menor volumen no tienen por qué coincidir con las idóneas para otro de mayor volumen. Por ello es necesario estudiar y optimizar los parámetros de diseño y operación del nuevo sistema CPC de 60 L desarrollado con el objetivo de aumentar el volumen de agua para su desinfección fotocatalítica.

3.3.1. Parámetros de cálculo utilizados para el diseño del reactor fotocatalítico solar de 60 L

El diseño de este nuevo reactor CPC de 60 L está basado en los conocimientos adquiridos durante los últimos años en la PSA sobre el tratamiento de desinfección fotocatalítica del agua. Los parámetros clave para diseñar una nueva planta piloto son el volumen de agua iluminado y el área de captación de la radiación solar. Sin embargo existen otros parámetros que son necesarios determinar para el diseño de la planta piloto, tal y como se describen a continuación.

Volumen iluminado

El uso de un reactor CPC de 14 L ha demostrado tener (Sección 3.1) una mayor eficiencia fotocatalítica que el reactor de botella. Sin embargo, este reactor CPC presenta algunas desventajas tales como contar con un volumen total de exposición solar de sólo 4,7 L de un total de 14 L de volumen de agua, esto significa que un 66,5 % del volumen total se encuentra en oscuridad (en el sistema de tuberías y tanque de recirculación). En el nuevo prototipo de reactor CPC (60 L) se mejora esta relación de volumen iluminado a volumen total. El volumen iluminado del foto-reactor se determina aplicando la siguiente fórmula:

$$V_{ilum} = \frac{\pi \cdot (D - 2\delta)^2}{5} L_{tub} \times N_{tub} \quad (3.4)$$

Donde V_{ilum} es el volumen iluminado en m^3 , D es el diámetro exterior del tubo (m), δ es el espesor del tubo (m), L_{tub} es la longitud de cada tubo (m), y N_{tub} es el número de tubos. En este caso, el volumen iluminado de este reactor es de 38 L y el volumen muerto es del 36 %.

Área de captación

Asociado al aumento del volumen iluminado, se debe aumentar la superficie de captación de radiación UV solar con el objetivo de aumentar la cantidad de fotones en el sistema. El área iluminada viene dada por la expresión 3.5:

$$A_{ilum} = \left(0.158 \frac{D}{5}\right) \cdot N_{tub} \times L_{tub} \quad (3.5)$$

Donde D es el diámetro exterior del tubo (m), L_{tub} es la longitud de cada tubo (m), y N_{tub} es el número de tubos. El área de captación de este reactor es de 4,74 m^2 .

Número de Reynolds

Un aspecto importante del diseño para aplicaciones fotocatalíticas es que el fluido dentro del sistema debe circular en régimen de flujo turbulento. La correcta homogenización del fluido es imprescindible para asegurar que el catalizador y los microorganismos interaccionen perfectamente. A su vez, este flujo debe conseguir mantener el catalizador en suspensión, especialmente en el caso del TiO_2 (densidad de masa = $3,5 \text{ g/cm}^3$).

El número de Reynolds (Re) es un coeficiente adimensional utilizado en mecánica de fluidos, diseño de reactores y fenómenos de transporte para caracterizar el movimiento de un fluido. El valor de Re define el régimen laminar ($\text{Re} < 2000$) o turbulento ($\text{Re} > 4000$) de un fluido en movimiento. Para el buen funcionamiento del reactor CPC, el flujo debe ser turbulento con un $\text{Re} > 10000$ (expresión 3.6):

$$\text{Re} = \frac{\rho D_x V}{\mu} \quad (3.6)$$

Donde ρ es la densidad en kg/m^3 , μ es la viscosidad dinámica del agua en Ns/m^2 ($0,00089$ a 25°C), D_x es el diámetro interior del tubo (m) y V es la velocidad lineal media del fluido en la tubería en m/s. Esta velocidad se calcula de acuerdo con la siguiente expresión:

$$V = \frac{Q}{\frac{\pi \cdot D_x^2}{4}} \quad (3.7)$$

Donde Q es el caudal (m^3/s) y D_x es el diámetro interior del tubo (m). En este caso, para un caudal de 30 L/min , se obtiene una velocidad lineal del fluido en el foto-reactor de $0,34 \text{ m/s}$ y un Re de 16634 .

Pérdida de carga

La pérdida de carga en el tramo lineal de tubería se calcula según la ecuación 3.8.

$$h_f = f \frac{L V^2}{D 2g} \quad (3.8)$$

Donde h_f es la pérdida de carga por fricción (m), L es la longitud total de la tubería (m), D es el diámetro interno de la tubería (m), V es la velocidad lineal en m/s, y g es la aceleración de la gravedad (m/s^2).

El parámetro f (adimensional) denominado factor de fricción o de Darcy es función del número de Reynolds y de la rugosidad relativa (ϵ_r) de la tubería. Para el cálculo de este parámetro existen múltiples ecuaciones, pero dado que los tubos utilizados para la construcción del reactor son tubos de vidrio borosilicatado, se ha utilizado la expresión de f dada por Blasius en 1911. Este autor propone una expresión en la que el factor de fricción viene dado en función del número de Reynolds, válida para tubos lisos, en los que ϵ_r no afecta al flujo al tapar las irregularidades con una subcapa laminar y válida para $\text{Re} < 100000$. Esta expresión se define como $f = 0.3164 \cdot \text{Re}^{-0.25}$.

Además de las pérdidas de carga lineales también se producen pérdidas de carga en codos, ramificaciones, válvulas, etc. Normalmente son pequeñas comparadas con las lineales, salvo que se trate de válvulas casi cerradas. Las pérdidas de carga en el reactor CPC se deben a la presencia de codos y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$h_b = K \frac{V^2}{2g} \text{ (m)} \quad (3.9)$$

Donde h_b es la pérdida de carga en la singularidad, que se considera proporcional a la energía cinética promedio del flujo y K es el coeficiente de pérdidas singulares. Este coeficiente se obtiene a partir de tablas que permiten estimar las longitudes equivalentes para los casos de elementos más comunes en función del diámetro de la tubería. La longitud equivalente depende del coeficiente de fricción, pero este no se suele contemplar en las aproximaciones empleadas [Comisión Nacional del Agua, 2007].

La pérdida de carga total en el reactor se obtiene mediante la suma de la pérdida de carga por fricción más la sumatoria de la pérdida de carga de todas las singularidades de acuerdo con la siguiente expresión:

$$h_{total} = h_f + \sum h_b \quad (m) \quad (3.10)$$

La pérdida de carga debida a la fricción para este sistema es $f = 0,02786$, mientras que $h_f = 0,05673$ m. Cada codo de 90° y un diámetro de 5 cm ($K = 0,9$), presenta una pérdida de carga $h_b = 0,005437$ m. Las contribuciones de todos los codos dan la siguiente pérdida total de carga $\sum h_b = 0,07612$ m. Y la pérdida total de carga h_{total} es 0,14 m.

Potencia de la bomba

Para seleccionar la potencia de la bomba hay que determinar la carga dinámica total (CDT) del sistema. El cálculo de la carga total de bombeo consiste en determinar la energía requerida para impulsar el líquido desde el nivel de succión hasta el nivel de descarga, venciendo la resistencia que ofrecen las tuberías y los accesorios al paso del fluido. La carga dinámica total de bombeo se define como la suma total de resistencias del sistema correspondientes a la carga estática total, a la pérdida de carga por fricción en la tubería de succión y descarga, y a la pérdida de carga por singularidades. Estas variables se relacionan en la CDT de acuerdo con la siguiente expresión:

$$CDT = H_{reactor} + h_f + \sum h_b + h_{presion} \quad (m) \quad (3.11)$$

Donde $H_{reactor}$ es la carga estática, $h_{presion}$ es la pérdida por presión y se estima en un 10 % de la suma de los otros tres componentes, h_f es la pérdida de carga por fricción (m) y h_b es la pérdida de carga en la singularidad. De acuerdo con esta expresión, la CDT determinada para el foto-reactor CPC es de 1,968 m ≈ 2 m. Para calcular la potencia de la bomba se emplea la siguiente expresión:

$$P(W) = \frac{Q \cdot CDT}{6.131 \cdot \eta} \quad (3.12)$$

Donde $P(W)$ es la potencia de la bomba (W), Q es el caudal (L/min), CDT es la carga dinámica total (m), y η es 0,5 para bombas con potencia < 1,5 kW. Para un caudal de 30 L/min y un CDT de 2 m se recomienda una bomba con una potencia mínima de 20 W.

3.3.2. Evaluación de la capacidad fotocatalítica del reactor CPC de 60 L

La eficiencia del reactor CPC en la aplicación del tratamiento fotocatalítico con TiO_2 se investiga utilizando tres especies del género *Fusarium* que desarrollan de forma individualizada cada una de las esporas características de este género. Se utiliza *F. solani* (F12) como productor de microconidios, *F. equiseti* (M2T1b) como productor de macroconidios y *F. equiseti* (M3T1b) como productor de clamidosporas. En este estudio experimental se utilizaron dos tipos de agua: agua destilada y agua natural de pozo y se evaluaron distintas concentraciones de TiO_2 en suspensión con el objetivo de determinar bajo qué condiciones de operación se alcanza la máxima eficiencia fotocatalítica en el nuevo reactor CPC de 60 L.

3.3.2.1. Selección del caudal de operación

Con el objetivo de evaluar el caudal de trabajo adecuado en el nuevo prototipo de reactor solar CPC de 60 L se llevaron a cabo ensayos con esporas de *F. solani* (F12) y 100 mg/L de TiO_2 en oscuridad durante 5 h. Los ensayos se realizaron a dos caudales distintos, 20 L/min por similitud con el foto-reactor de 14 L y 30 L/min que es el máximo suministrado por la bomba. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.10 donde se puede observar un débil descenso en la concentración de esporas a 20 L/min, coincidente con la pérdida de catalizador durante el tratamiento. Esto se debe a la formación de agregados entre partículas de catalizador y esporas ya que, como se mencionó anteriormente, a pH 5,5 (pH del agua destilada), la superficie del catalizador tiene carga superficial positiva [Fernández-Ibáñez y cols., 2003], mientras que la pared celular fúngica presenta carga superficial negativa [Old y Schippers, 1973]. Las cargas superficiales de distinto signo inducen a la formación de agregados entre las esporas y el catalizador. Si el caudal del reactor donde se forman estos agregados es demasiado

bajo, estos pueden sedimentar debido al incremento de su peso y, por tanto, los resultados de desinfección podrían estar enmascarados.

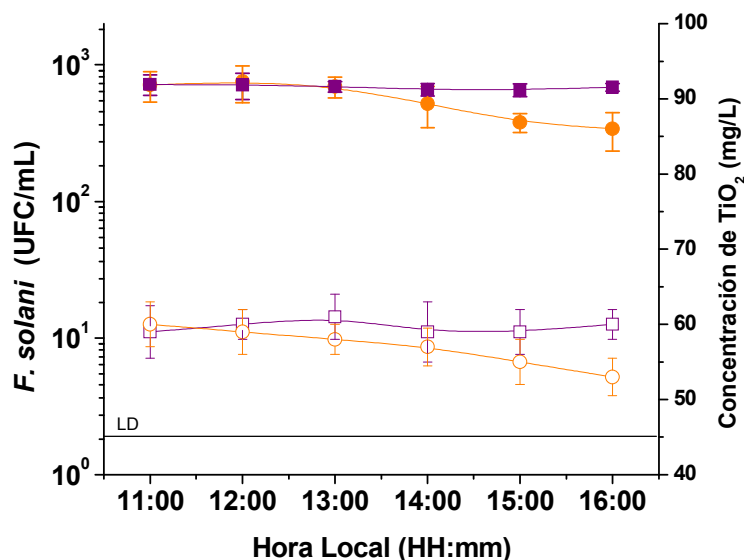


Figura 3.10. Concentración de esporas de *F. solani* en oscuridad en el foto-reactor CPC en presencia de TiO_2 a 20 L/min (—○—) y 30 L/min (—■—) (Eje-Y izquierdo), y concentración de TiO_2 a 20 L/min (—○—) y 30 L/min (—□—) (Eje-Y derecho).

Con el caudal de 30 L/min, la concentración de esporas y de TiO_2 en suspensión permanecen constantes a lo largo del tiempo tal y como se observa en la figura 3.10. Bajo estas condiciones, la viabilidad y la concentración de esporas no se ven afectadas negativamente ni por el caudal ni por la presencia del catalizador, por tanto, la inactivación de esporas durante la exposición solar puede ser exclusivamente atribuida al tratamiento fotocatalítico solar. Estas condiciones se mantienen para cada uno de los tipos de esporas evaluados, es decir, microconidios, macroconidios y clamidosporas.

3.3.2.2. Inactivación de microconidios en agua destilada y en agua natural de pozo

La figura 3.11 muestra la inactivación de microconidios de *F. solani* (cepa FS12) a diferentes concentraciones de TiO_2 (0, 50, 100 y 250 mg/L) en agua destilada. El pH, temperatura y OD de cada experimento se muestran en la tabla 3.5. Como se puede observar, el límite de detección se alcanzó tras 5 h en todos los casos excepto a la concentración de 250 mg/L de TiO_2 , donde la concentración de esporas descendió desde 1100(±300) UFC/mL a 9(±3) UFC/mL.

El ensayo de foto-inactivación solar muestra que la concentración de microconidios de *F. solani* se redujo de $1100(\pm 200)$ UFC/mL hasta el límite de detección tras 5 h de exposición con una energía UV-A solar acumulada (Q_{UV}) de 52 kJ/L. La inactivación de esporas de *F. solani* más efectiva se obtuvo a una concentración de 100 mg/L de TiO_2 descendiendo la concentración de esporas desde $1000(\pm 200)$ UFC/mL hasta alcanzar el límite de detección tras 3 h de exposición solar con un $Q_{UV} = 30$ kJ/L. El límite de detección también se alcanzó tras 3 h de tratamiento con 50 mg/L de TiO_2 , aunque con una energía acumulada (Q_{UV}) de 41,8 kJ/L. Esto significa 11,8 kJ/L más de energía UV solar por unidad de volumen necesaria para alcanzar el mismo resultado en el caso de 50 mg/L que en el caso de 100 mg/L de TiO_2 .

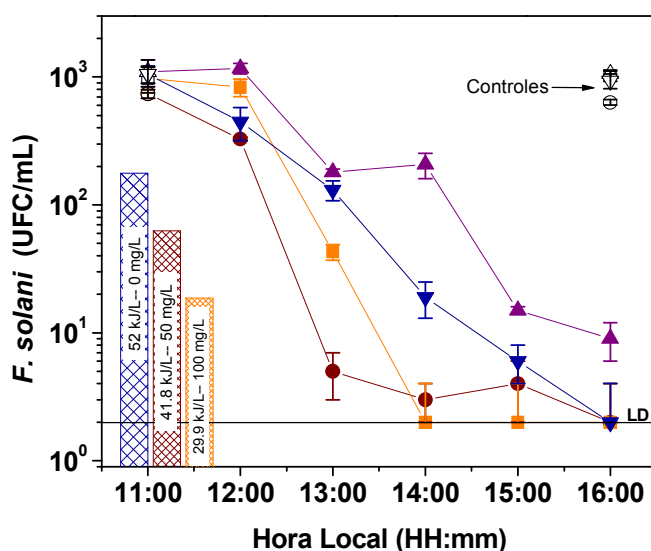


Figura 3.11. Viabilidad de microconidios de *F. solani* en función del tiempo en agua destilada con luz solar natural en presencia de 0 (∇), 50 ($\bullet$), 100 ($\square$) y 250 ($\blacktriangle$) mg/L de TiO_2 en el reactor solar CPC de 60 L. Los símbolos huecos corresponden a los controles en oscuridad. Las barras representan el Q_{UV} necesario para alcanzar el límite de detección en cada concentración de TiO_2 . LD = 2 UFC/mL.

El efecto germicida de la radiación solar en ausencia de TiO_2 es muy alto en este nuevo prototipo de reactor CPC, lo cual juega un papel muy importante en la desinfección (Figuras 3.11 a 3.14). La eficiencia del tratamiento de foto-inactivación solar observada en todos los experimentos realizados puede ser atribuida al elevado y continuado tiempo de iluminación, ya que el nuevo reactor CPC tiene una mayor relación de volumen de agua irradiado con respecto al volumen total de agua. Este fuerte efecto fungicida de la radiación solar en ausencia de catalizador no había sido previamente observado en otros reactores tipo CPC [Sichel y cols., 2007a]. De la

misma forma, la inactivación de *Fusarium* spp. con todas las concentraciones de TiO_2 estudiadas también mejora respecto a los resultados obtenidos en el reactor CPC de 14 L y en el reactor de botella, ya que el nuevo reactor CPC recoge 2,3 y 6 veces más energía UV-A solar por unidad de volumen tratado que el reactor CPC de 14 L y el reactor de botella, respectivamente.

En cuanto a la degradación fotocatalítica de esporas de *F. solani* (cepa FS12) en agua natural de pozo se evaluaron tres concentraciones de TiO_2 : 0, 50 y 100 mg/L de TiO_2 (Figura 3.12). Concentraciones superiores a 100 mg/L de catalizador no se evaluaron dado que ya se ha demostrado que no favorecen el proceso de inactivación. Tras 5 h de exposición solar, la concentración de esporas en el experimento de foto-inactivación solar no alcanzó el límite de detección. El ensayo con 100 mg/L de TiO_2 muestra que la concentración de esporas alcanza el LD desde una concentración inicial de esporas de $490(\pm 90)$ UFC/mL tras 4 h de tratamiento fotocatalítico con un Q_{UV} de 41,5 kJ/L. En el caso de 50 mg/L de TiO_2 también se alcanzó el límite de detección tras 4 h con un Q_{UV} prácticamente igual, de 41,2 kJ/L. El pH, temperatura y oxígeno disuelto se muestran en la tabla 3.5.

Como se ha podido observar, la inactivación en todos los casos es más lenta en el agua de pozo que en el agua destilada debido a los altos niveles de carbonatos y bicarbonatos presentes en este tipo de agua (Tabla 2.3). Estas especies, como se comentó en la sección 3.1.3, reducen la actividad fotocatalítica y son los mayores responsables de la pérdida de eficacia de la fotocatálisis heterogénea y, en este caso, de la lenta inactivación de las esporas. No obstante, en este caso a diferencia del reactor CPC de 14 L, el límite de detección se alcanza en todos los experimentos fotocatalíticos, lo cual demuestra la mayor eficiencia del nuevo prototipo de reactor CPC.

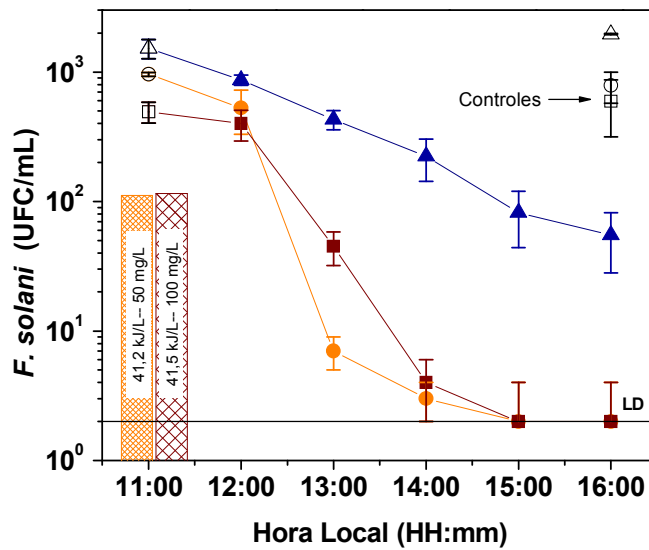


Figura 3.12. Concentración de microconidios de *F. solani* en función del tiempo en agua natural de pozo, condiciones de radiación solar reales y en presencia de 0 (—▲—), 50 (—●—) y 100 (—■—) mg/L de TiO_2 en el reactor solar CPC de 60 L. Las barras representan el Q_{UV} necesario para alcanzar el límite de detección en cada concentración de TiO_2 . LD = 2 UFC/mL.

Tabla 3.5. Valores de oxígeno disuelto (OD), temperatura (T), pH y energía acumulada (Q_{UV}) durante los ensayos de fotocatalisis con TiO_2 en el reactor CPC 60 L con microconidios de *F. solani* en agua destilada y agua natural de pozo.

Figura	TiO_2 (mg/L)	OD _i (mg/L)	OD _f (mg/L)	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	pH _i	pH _f	Q_{UV} (kJ/L)	LD
Agua destilada									
Fig. 3.11	0	9,28	7,80	21,8	36,7	6,25	6,32	52,1	SI
Fig. 3.11	50	9,84	8,34	18,1	30,9	6,01	6,16	41,8	SI
Fig. 3.11	100	9,43	7,80	20,9	36,3	6,02	6,35	29,9	SI
Fig. 3.11	250	9,24	7,52	21,8	37,9	5,82	5,81	43,9	NO
Agua de pozo									
Fig. 3.12	0	10,01	9,67	10,1	21,6	7,93	7,98	38,9	NO
Fig. 3.12	50	9,21	7,57	21,8	38,4	7,99	7,99	41,2	SI
Fig. 3.12	100	9,79	7,75	17,5	34,0	7,99	7,99	41,5	SI

LD = Límite de detección (2 UFC/mL) alcanzado al final del experimento: SI ó NO.

El rendimiento más alto de desinfección para este reactor y longitud de paso óptico (50 mm) se extrae de los resultados experimentales de *F. solani* (cepa FS12) en agua destilada (Figura 3.11) y agua de pozo (Figura 3.12), donde se puede observar que el patrón de desinfección con 50 mg/L es muy similar al de 100 mg/L de TiO_2 . Desde el punto de vista fotocatalítico, podemos asumir que la concentración de 50 mg/L presenta un mejor rendimiento en el estado inicial del proceso mientras que la de 100 mg/L muestra un mejor rendimiento de desinfección al final del tratamiento. Esto

probablemente se debe a las limitaciones de transferencia de masa cuando la concentración de esporas es demasiado baja. Sin embargo, dado que con 100 mg/L de catalizador en agua destilada se obtiene una sensible mejora en el resultado al final del tratamiento, concluimos que esta concentración de TiO_2 en suspensión, es la más adecuada para la inactivación de esporas de *Fusarium* spp. en este nuevo reactor solar CPC de 60 L.

Desde el punto de vista de eficiencia del tratamiento como función de la concentración de TiO_2 , el patrón de desinfección obtenido a las diferentes concentraciones de catalizador es similar al observado en el reactor CPC de 14 L y el reactor de botella, donde la eficiencia fotocatalítica aumenta hasta alcanzar un valor óptimo (que es función de la radiación solar entrante en el sistema) y a partir de este valor, la eficiencia decrece a medida que aumenta la concentración de TiO_2 .

3.3.2.3. Inactivación de macroconidios en agua destilada y agua natural de pozo

La figura 3.13 muestra la inactivación de macroconidios de *F. equiseti* (cepa M2T1b) en agua destilada y agua de pozo con 100 mg/L de TiO_2 en condiciones de radiación solar natural. La concentración inicial de macroconidios en todos los experimentos es aproximadamente 10^2 UFC/mL. Esta concentración inicial es más baja que la de microconidios de *F. solani* debido a que estas esporas se generan en menor cantidad y, por tanto, su presencia en agua también será menor.

Se puede observar que el límite de detección se alcanza en todos los casos. La mayor eficiencia de inactivación fúngica se obtuvo en agua destilada, donde las esporas disminuyeron desde $84(\pm 14)$ UFC/mL hasta el límite de detección tras 3 h de fotocatálisis solar con un Q_{UV} de 28,5 kJ/L. Con agua de pozo, el descenso se produjo desde $84(\pm 7)$ UFC/mL al límite de detección con un Q_{UV} de 30,4 kJ/L. Por otro lado, la foto-inactivación solar redujo las esporas al límite de detección partiendo de una concentración de $48(\pm 8)$ UFC/mL tras 4 h, pero necesitó una mayor energía UV solar acumulada ($Q_{UV} = 39,4$ kJ/L).

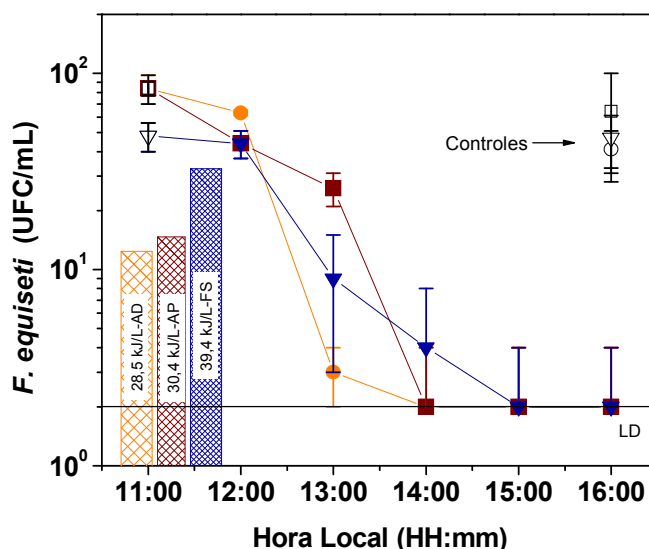


Figura 3.13. Concentración de macroconidios viables de *F. equiseti* en función del tiempo en agua de pozo, AP(—■—) y agua destilada, AD (—●—) en presencia de 100 mg/L de TiO_2 y foto-inactivación solar, FS (—▼—) en condiciones de radiación solar natural en el reactor CPC de 60 L. Las barras representan el valor de Q_{UV} necesario para alcanzar el límite de detección en cada concentración de TiO_2 evaluada. LD = 2 UFC/mL.

La temperatura más alta alcanzada durante las sesiones experimentales fue 41,4 °C (Tabla 3.6). La viabilidad de esporas de *Fusarium* spp. no se ve afectada por esta temperatura ya que el punto de muerte térmica en suelos, definida como la temperatura más baja requerida para inactivar todos los microorganismos del medio en 10 minutos, es de 60 °C para *F. oxysporium* [Bollen, 1969]. Además, en estudios de viabilidad térmica en medio acuoso realizados en agua con *Fusarium* sp., se necesitaron 45 °C durante 3 h para alcanzar la muerte fúngica, mientras que con 40 °C las esporas permanecen estables durante 5 h. Por otro lado, el límite de detección en estos experimentos se obtuvo antes de que en el sistema se alcanzaran 41,4 °C por lo que se puede descartar que esta temperatura cause algún efecto negativo en la viabilidad de las esporas.

Estos resultados demuestran que los macroconidios son susceptibles a la fotocatalisis solar con suspensiones de TiO_2 en agua destilada y agua natural de pozo, aunque los macroconidios de *F. equiseti* (cepa M2T1b) requieren más tiempo y energía para alcanzar el límite de detección que los microconidios de *F. solani* (cepa FS12).

Tabla 3.6. Valores de oxígeno disuelto (OD), temperatura (T), pH y energía acumulada (Q_{UV}) durante los ensayos de fotocátalisis con TiO_2 en el reactor CPC 60 L con macroconidios de *F. equiseti* en agua destilada (AD) y agua natural de pozo (AP).

Figura	TiO_2 (mg/L)	OD_i (mg/L)	OD_f (mg/L)	$T_{\min}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	pH _i	pH _f	Q_{UV} (kJ/L)	LD
Fig. 3.13	0- AD	9,26	7,66	23,0	35,7	6,06	6,06	39,4	SI
Fig. 3.13	100- AD	8,84	7,56	24,6	36,6	6,28	6,66	28,5	SI
Fig. 3.13	100- AP	9,34	7,32	20,6	38,5	7,98	7,99	30,4	SI

LD = Límite de detección (2 UFC/mL) alcanzado al final del experimento: SI ó NO.

3.3.2.4 Inactivación de clamidosporas en agua destilada y agua natural de pozo

La degradación fotocatalítica solar de clamidosporas de *F. equiseti* (cepa M3T1b) se llevó a cabo en agua de pozo y agua destilada con 100 mg/L de TiO_2 a un caudal de 30 L/min en días completamente soleados. Los resultados obtenidos de estos ensayos se muestran en la figura 3.14. La concentración de clamidosporas se redujo de 111 (± 12) UFC/mL hasta el límite de detección tras 4 h con 36,4 kJ/L de energía UV acumulada en el caso del agua destilada. En agua de pozo, el límite de detección se alcanzó tras 4 h, y la concentración de esporas descendió desde 164 (± 11) UFC/mL al LD, con un Q_{UV} de 37,2 kJ/L. Sin embargo, el proceso de foto-inactivación solar necesita 5 h de tratamiento para alcanzar el mismo resultado, con una irradiancia acumulada (Q_{UV}) de 45,3 kJ/L. Esto confirma que la inactivación fotocatalítica de clamidosporas es también más eficiente en agua destilada. El pH, temperatura y OD de cada experimento se muestra en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Valores de oxígeno disuelto (OD), temperatura (T), pH y energía acumulada (Q_{UV}) durante los ensayos de fotocátalisis con TiO_2 en el reactor CPC 60 L con clamidosporas de *F. equiseti* en agua destilada (AD) y agua natural de pozo (AP).

Figura	TiO_2 (mg/L)	OD_i (mg/L)	OD_f (mg/L)	$T_{\min}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	pH _i	pH _f	Q_{UV} (kJ/L)	LD
Fig. 3.14	0- AD	9,49	8,20	21,4	33,0	6,13	5,0	45,3	SI
Fig. 3.14	100- AD	9,29	7,57	22,4	39,2	6,13	5,7	36,4	SI
Fig. 3.14	100- AP	9,27	7,43	22,2	41,4	7,99	8,0	37,2	SI

LD = Límite de detección (2 UFC/mL) alcanzado al final del experimento: SI ó NO.

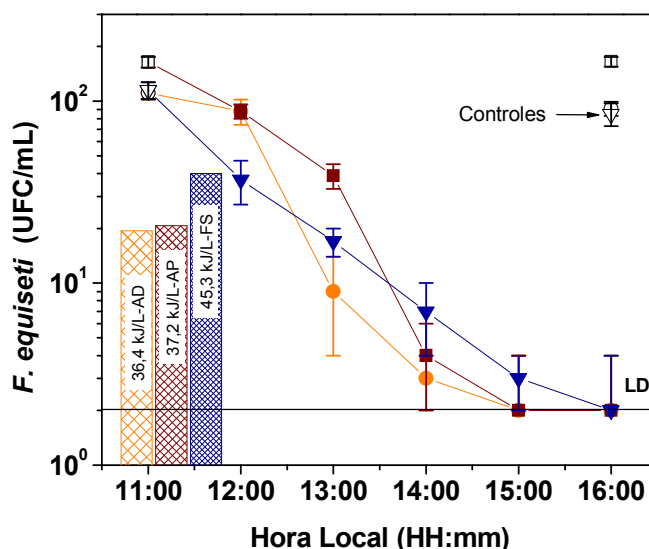


Figura 3.14. Concentración de clamidosporas viables de *F. equiseti* en función del tiempo en agua natural de pozo, AP (—■—) y agua destilada, AD (—●—) en presencia de 100 mg/L de TiO_2 y un experimento de foto-inactivación solar, FS (—▼—) en condiciones de radiación solar natural y en reactor solar CPC de 60 L. Las barras representan el Q_{UV} necesario para alcanzar el límite de detección en cada concentración de TiO_2 . LD = 2 UFC/mL.

Los resultados obtenidos con clamidosporas demuestran que este tipo de esporas son más resistentes que microconidios y macroconidios al tratamiento fotocatalítico. Estos resultados concuerdan con los observados en reactor de botella. La composición de la pared celular y estructura de clamidosporas las hacen más resistentes a los factores físico-químicos y, por tanto, también al tratamiento fotocatalítico solar. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en el reactor de botella, con el reactor CPC de 60 L es posible inactivar clamidosporas tras 4 h de exposición solar con suspensiones de TiO_2 . En la foto-inactivación solar también se alcanza el límite de detección tras 5 h con una mayor energía UV acumulada por litro, lo cual no se había observado previamente (Figura 3.6).

3.3.3. Ajuste cinético de los resultados de desinfección en el reactor CPC de 60 L

El ajuste cinético de los resultados obtenidos en este trabajo experimental se muestra en la tabla 3.8 donde se describe el modelo utilizado y los valores de las constantes cinéticas (k) de inactivación, longitud del hombro y concentración de esporas residual dependiendo del modelo cinético utilizado. La elección de un modelo u otro se basa en el mejor ajuste en función del método de los errores cuadráticos. Como se puede observar en la tabla 3.8, el modelo utilizado en los experimentos evaluados varía

dependiendo de los resultados de inactivación, pues el patrón de inactivación varía. No obstante el modelo que mejor describe el comportamiento de inactivación experimental, de manera general, es el modelo de fase 'log-lineal' precedida de un 'hombro' (Ecuación 2.18). En el caso de foto-inactivación solar, el modelo cinético más utilizado es el modelo log-lineal descrito por la ecuación 2.15.

Tabla 3.8. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos fotocatalíticos realizados en el reactor CPC de 60 L en agua destilada (AD) y agua de pozo (AP) con los tres tipos de esporas de *Fusarium* spp. evaluadas.

TiO_2 (mg/L)	k (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	$\text{Log } (N_{\text{res}})$	R^2	Modelo cinético
Microconidios. Agua destilada					
0	$0,05 \pm 0,02$	-	-	0,99	Log lineal
50*	-	-	-	-	-
100	$0,10 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,04$	-	0,99	Hombro + Log lineal
250	$0,05 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,20$	$2,08 \pm 0,01$	0,99	Hombro + Log lineal
Microconidios. Agua de pozo					
0	$0,05 \pm 0,08$	-	-	0,99	Log lineal
50	$0,07 \pm 0,01$	-	-	0,99	Log lineal
100	$0,09 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,00$	-	1,00	Hombro + Log lineal
Macroconidios. Agua destilada y agua de pozo					
0-AD	$0,04 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,20$	-	0,99	Hombro + Log lineal
100-AD	$0,07 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,60$	-	0,99	Hombro+ Log lineal
100-AP	$0,05 \pm 0,01$	-	-	0,94	Log lineal
Clamidosporas. Agua destilada y agua de pozo					
0	$0,03 \pm 0,07$	-	-	0,99	Log-lineal
100-AD	$0,05 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,30$	-	0,99	Hombro + Log lineal
100-AP	$0,05 \pm 0,01$	-	-	0,99	Hombro+ Log lineal

* No hay datos cinéticos suficientes para realizar un ajuste estadísticamente significativo.

De los resultados cinéticos podemos destacar que la constante cinética más elevada corresponde a 100 mg/L de catalizador en el caso de microconidios y agua destilada. Los microconidios se inactivan más rápidamente en agua destilada que en agua de pozo a similares concentraciones de TiO_2 . Esto se cumple como norma general en todos los tipos de esporas según los datos de la tabla 3.8.

Se observa además que las clamidosporas tienen una velocidad de inactivación ligeramente más baja que la de los macroconidios, y éstos presentan un valor de k menor que el caso de los microconidios. Los valores de la constante k concuerdan con los resultados de inactivación fúngica en función del tiempo de exposición solar y dosis de radiación UV acumulada en el sistema.

3.4. Post-tratamiento del TiO_2 para su recuperación

La idoneidad de utilizar el dióxido de titanio para el tratamiento de aguas es un tema actualmente controvertido por la polémica que suscita la posible toxicidad del mismo en el ecosistema. Sin embargo, es una realidad que el dióxido de titanio está presente en multitud de productos de uso común tales como pinturas, papel, cosméticos y medicinas. Según diversos estudios, el TiO_2 está clasificado como biológicamente inerte para humanos y animales [Ophus y cols., 1979; Lindenschmidt y cols., 1990]. Sin embargo cuando se presenta como nanopartículas (partículas de tamaño inferior a 100 nm) pueden tener también efectos tóxicos sobre el ser humano ya que podrían producir estrés oxidativo en presencia de luz UV-A causando daños celulares, genotoxicidad, inflamación, respuestas inmunológicas, etc. [Skocaj y cols., 2011]. No obstante, tal y como se demuestra en nuestros ensayos realizados en oscuridad, el TiO_2 no produce efectos negativos al menos sobre la viabilidad de las esporas.

Otro aspecto muy importante en este tipo de tratamiento fotocatalítico con TiO_2 en suspensión es su posterior retirada del agua y recuperación para un posible reuso y, consecuentemente, su retirada del agua antes de ser utilizada, especialmente en el caso de agua destinada al consumo humano. Para que la fotocatálisis con dióxido de titanio pueda ser aplicada como método de tratamiento de aguas, los costes de operación deben reducirse al máximo posible, a lo que contribuye la recuperación del catalizador. El proceso de recuperación del catalizador se debe realizar mediante un método que sea rápido, eficiente y barato. Diversos autores [Li y Zhao, 1999; Xi y Geisen, 2001] proponen el acompañamiento de sistemas de filtración al de tratamiento de aguas mediante fotocatálisis con suspensiones. Otros autores [Watts y cols., 1995; Gustafsson y cols., 2003] proponen como técnica complementaria a la fotocatálisis el post-tratamiento con agentes coagulantes como sales metálicas (sulfato ferroso, cloruro férrico, sulfato de aluminio), surfactantes, etc. Estos sistemas no siempre se ajustan a los requisitos de bajo coste. Fernández-Ibáñez y cols. describen un método de recuperación de catalizador post-tratamiento mediante sedimentación [Fernández-Ibáñez, 2004]. Este método se basa en modificar el pH del medio hasta alcanzar el punto isoeléctrico del TiO_2 (punto de carga nula), que es pH 7 en el caso del tipo TiO_2 utilizado en este trabajo. A este pH, las partículas de catalizador tienen carga neta superficial nula y se produce un fenómeno de agregación rápida de las partículas que provoca un aumento radical en el tamaño medio de los agregados desde 660 ± 50 nm (obtenido para partículas dispersadas mediante simple agitación mecánica) hasta alcanzar diámetros de 2-4 micrómetros, que sedimentan muy rápidamente (pocos segundos).

La planta piloto de tratamiento fotocatalítico evaluada en este trabajo experimental consta, además de un foto-reactor CPC de 60 L, de una pequeña planta de recuperación del catalizador tras el tratamiento. Esta planta consta de un tanque para la sedimentación con una capacidad de 80 L, una bomba centrífuga que manda el agua desde el foto-reactor al tanque y una salida para el agua una vez terminado el proceso de sedimentación. Tras el tiempo requerido para la sedimentación del catalizador, éste forma una fina capa en el fondo del tanque y el sobrenadante es el agua tratada prácticamente libre de catalizador. No obstante, para asegurar una completa ausencia de partículas de TiO₂, se recomienda que el agua sea filtrada por microfiltración antes de ser vertida o reutilizada. El proceso de separación del catalizador supone una pequeña pérdida del mismo correspondiente a lo que se pierde en el proceso de filtración y ésta se estima en valores inferiores al 5% de la concentración inicial de catalizador añadido [Fernández-Ibáñez, 2004]. No obstante, no es objeto de este trabajo experimental evaluar en profundidad la recuperación y el reuso del catalizador.

4. DESINFECCIÓN DE AGUA MEDIANTE H_2O_2 Y RADIACIÓN SOLAR

En este capítulo se estudia la capacidad germicida del proceso combinado de radiación solar natural y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en esporas de *F. equiseti* (M3T1b) en varios tipos de agua: agua destilada, agua natural de pozo y agua simulada de salida de EDAR. Las experiencias preliminares se llevaron a cabo en el reactor de botella de 200 mL. A continuación, se estudió el mismo tratamiento en el reactor solar CPC de 60 L bajo las mismas condiciones que en el reactor de botella, observándose la elevada capacidad de este sistema para la inactivación de esporas fúngicas. En este capítulo se analiza también la influencia de la biología de la espora en el efecto germicida del tratamiento H_2O_2 /Solar.

4.1. Evaluación de la autodescomposición del H_2O_2

Antes de comenzar con el estudio de la inactivación de esporas mediante H_2O_2 /Solar, se llevó a cabo una evaluación de la descomposición del peróxido de hidrógeno en cada uno de los tipos de agua utilizados, es decir, agua destilada, agua de

pozo y agua simulada de salida de EDAR en presencia de radiación solar natural y en oscuridad durante un tiempo experimental de 5 h.

En este estudio se mide la disminución de la concentración de H_2O_2 tanto en el reactor de botella como en el reactor solar CPC (60 L) en ausencia de esporas fúngicas. La concentración inicial de H_2O_2 utilizada es de 10 mg/L, esta concentración se eligió de acuerdo con experiencias previas llevadas a cabo en la PSA en las que se observó que esta concentración provoca, en presencia de luz solar, un marcado efecto germicida sobre las esporas mientras que en oscuridad no afecta a su viabilidad [Sichel y cols., 2009]. A lo largo del tiempo de experimentación (5 h) tanto bajo exposición solar como en oscuridad, se midió la concentración de H_2O_2 , el pH, el oxígeno disuelto (OD), la temperatura del agua y se determinó la energía UV-A acumulada en el sistema (Q_{UV}). Todos los valores medidos durante los experimentos se muestran en la tabla 4.1.

De forma general, el descenso en la concentración de peróxido de hidrógeno es más acusado bajo radiación solar que en oscuridad. En el reactor de botella y bajo iluminación solar natural el descenso de H_2O_2 es de 1,87 mg/L para el agua destilada mientras que en oscuridad es prácticamente nulo. En el agua de pozo la bajada de H_2O_2 es de 2,91 mg/L en presencia de luz solar y 0,79 mg/L en oscuridad. En agua simulada de salida de EDAR, el consumo de H_2O_2 fue de 3,58 mg/L bajo radiación solar natural y de 2,21 mg/L en oscuridad. Durante estos ensayos no se observaron cambios significativos en el pH del agua, excepto en las medidas realizadas en el agua de pozo, donde el pH aumentó aproximadamente de 7,5 a 8,7 tanto en presencia de luz solar como en oscuridad. El OD no mostró ningún cambio significativo en ninguno de los tipos de agua evaluados. Dado que todos los reactores de botella se expusieron de forma simultánea el mismo día, la única diferencia entre los descensos de H_2O_2 en cada tipo de agua observados en oscuridad y bajo radiación solar se puede atribuir al efecto de la radiación solar obtenido tras 5 h de exposición ($Q_{UV} = 27,1$ kJ/L) (Tabla 4.1).

En el reactor CPC de 60 L se obtuvo un comportamiento similar al observado en reactor de botella. Sin embargo, la pérdida de peróxido de hidrógeno es más alta en el reactor CPC tanto en oscuridad como en presencia de luz solar. En agua destilada, el descenso de H_2O_2 que se observa es de 3,75 mg/L, mientras que en oscuridad es de 2,42 mg/L. En el caso del agua de pozo, de 3,97 mg/L de H_2O_2 cuando estuvo expuesta a la luz solar y de 2,35 mg/L en oscuridad. Y en agua simulada de salida de EDAR la bajada en la concentración de peróxido observada es de 5,96 mg/L y 2,47 mg/L en oscuridad (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Descenso de la concentración de H₂O₂ en cada tipo de agua, pH, OD (valores iniciales y finales), temperatura máxima y mínima, y Q_{UV} de los experimentos en oscuridad y bajo radiación solar.

	Agua destilada Luz solar	Agua destilada Oscuridad	Agua de pozo Luz solar	Agua de pozo Oscuridad	Agua simulada Luz solar	Agua simulada Oscuridad
Reactor de botella (200 mL)						
H ₂ O ₂ (mg/L)*	1,87	0,09	2,91	0,79	3,58	2,21
pH _i /pH _f	6,7/6,7	6,2/6,2	7,5/8,5	7,6/8,7	8,1/8,2	8,2/8,3
OD _i /OD _f (mg/L)	7,9/7,6	7,6/7,3	7,5/7,3	7,4/7,6	7,5/6,8	7,4/7,0
T ^a _{min} /T ^a _{max} (°C)	22,8/31,5	22/25	22,5/30,9	22/25	23,6/31,9	22,3/26,0
Q _{UV} (kJ/L)	27,1	0	27,1	0	27,1	0
Reactor CPC (60 L)						
H ₂ O ₂ (mg/L)*	3,75	2,42	3,97	2,35	5,96	2,47
pH _i /pH _f	5,8/5,7	6,6/7,1	7,9/8,0	8,0/8,0	8,0/8,1	8,0/8,0
OD _i /OD _f (mg/L)	7,2/7,4	10,0/8,6	9,5/9,5	10,0/7,5	9,4/8,3	9,9/8,5
T ^a _{min} /T ^a _{max} (°C)	22,5/35,2	18,3/38,2	26,1/37,9	16,1/41,8	25,8/38,3	20,5/36,6
Q _{UV} (kJ/L)	44,5	0	34,5	0	31,8	0

*Descenso de concentración de H₂O₂ de un total de 10 mg/L

De acuerdo con los resultados obtenidos en reactor de botella y CPC, el orden en el descenso de concentración de peróxido de hidrógeno obtenido fue el siguiente: Agua simulada de salida de EDAR > Agua de pozo > Agua destilada. Estos valores se observan siempre mayores en el reactor CPC.

El H₂O₂ se auto-descompone en agua y oxígeno de acuerdo con la reacción 4.1 [Jones, 1999]:



Este proceso se ve influenciado principalmente por el efecto de la temperatura, la alcalinidad del medio acuoso y la presencia de compuestos químicos:

(i) La temperatura determina que la descomposición del H₂O₂ aumente 2,3 veces por cada 10 °C de incremento de temperatura [Jones, 1999]. Este efecto se puede observar en los datos registrados en la tabla 4.1. La descomposición del H₂O₂ en el reactor CPC tanto iluminado como en oscuridad es considerablemente más alta que la alcanzada en el reactor de botella.

(ii) El pH del medio afecta al H₂O₂ en su ionización. El peróxido de hidrógeno es un ácido débil que se ioniza según la reacción 4.2. Esta reacción se ve favorecida en medio alcalino [Phibbs y Giguere, 1951]:



Como se observa en ambos tipos de reactores, la descomposición del H_2O_2 es mayor para el agua de pozo y el agua simulada de salida de EDAR. Estos tipos de agua se caracterizan por un pH de 7-8,7, mientras que el agua destilada tiene un pH en torno a 6,5 lo cual puede influir en la degradación observada para los diferentes tipos de agua.

(iii) Otro de los factores que afectan a la descomposición del H_2O_2 es la presencia de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos en el agua tales como ácidos húmicos, taninos, compuestos ligninolíticos, cianuros, formaldehído, carbonatos, sulfatos, tiosulfatos, nitratos, cloruros y fosfatos [Jones, 1999]. No obstante, en el agua simulada de salida de EDAR no existen compuestos orgánicos complejos como los ácidos húmicos, taninos, etc. y principalmente son los compuestos inorgánicos los que pueden influir en la descomposición del H_2O_2 .

También se realizó un espectro de absorbancia de cada solución acuosa preparada tanto en presencia como en ausencia de 10 mg/L de H_2O_2 (Figura 4.1). Como era de esperar, se observan mayores valores de absorbancia a longitudes de onda inferiores a 300 nm, siendo éstos mayores en el caso del agua simulada de salida de EDAR que en agua destilada y agua de pozo para todas las longitudes de onda. Esto se debe a la presencia de cierta cantidad de materia orgánica e inorgánica en este tipo de agua.

En todos los tipos de agua estudiados, se produce un aumento significativo de la absorbancia en presencia de H_2O_2 siendo éste más acusado en el agua simulada de salida de EDAR. Este efecto se debe a que en este tipo de agua se favorece la ionización del H_2O_2 dando lugar al ión OOH^- en una alta proporción según la reacción 4.2 y el coeficiente de absorción de luz del ion OOH^- es aproximadamente 10 veces mayor que el del propio H_2O_2 [Phibbs y Giguere, 1951].

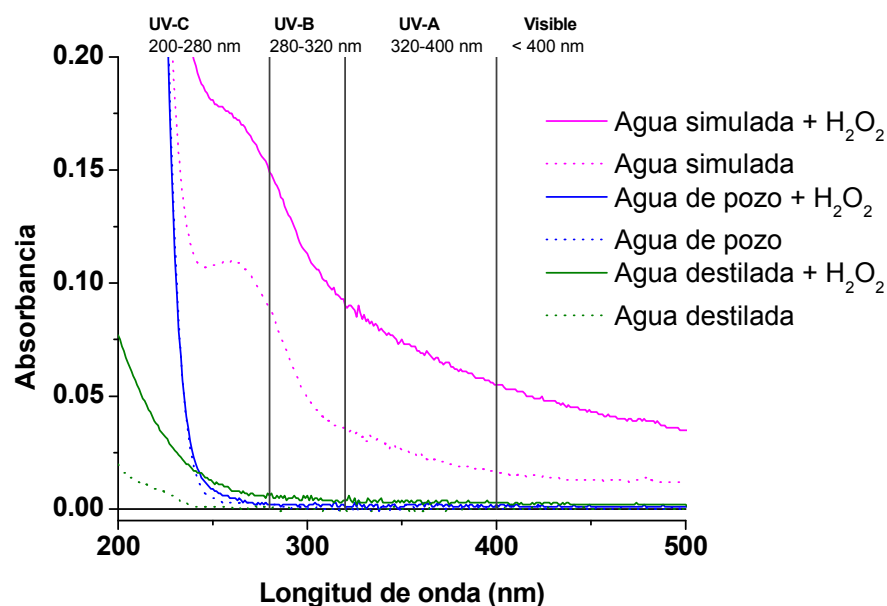


Figura 4.1. Espectro de absorción del agua destilada, agua de pozo y agua simulada de salida de EDAR en presencia y ausencia de H_2O_2 (10 mg/L).

El máximo de absorbancia del peróxido de hidrógeno se alcanza en el rango UV, comenzando aproximadamente a los 400 nm. Phibbs y Giguere estudiaron el espectro de absorción UV del H_2O_2 y encontraron que el coeficiente de extinción molar en $M^{-1}cm^{-1}$ para el H_2O_2 es de 1,0 a 300 nm; 25,0 a 250 nm; 90,0 a 220 nm; 132 a 210 nm y 179 a 200 nm [Phibbs y Giguere, 1951].

Los resultados de absorbancia de los diferentes tipos de agua permiten explicar los descensos de H_2O_2 observados en los reactores solares, donde tanto en oscuridad como en presencia de luz, el mayor consumo de H_2O_2 se observa en el caso del agua simulada de salida de EDAR. Este consumo se debe a la propia química del peróxido de hidrógeno en agua y al aumento de temperatura que se produce en condiciones de exposición solar.

Por tanto, bajo radiación solar, el H_2O_2 se auto-descompone más rápidamente que en oscuridad y será necesario añadir la cantidad de H_2O_2 al agua del reactor solar que garantice la presencia de una determinada concentración de reactivo constante durante los ensayos de desinfección. Por ello, concentraciones inferiores a 10 mg/L no pueden garantizar la eficiencia del tratamiento especialmente en el caso del agua simulada de salida de EDAR donde el descenso en la concentración de peróxido de hidrógeno en presencia de luz solar natural es de casi 6 mg/L (Tabla 4.1).

4.2. Inactivación de esporas de *F. equiseti* mediante H₂O₂/Solar en reactor de botella

La eficiencia del tratamiento de radiación solar con H₂O₂ para la desinfección fúngica del agua se investigó inicialmente mediante estudios preliminares en reactor de botella con un volumen total de 200 mL. Se evaluó el efecto germicida del tratamiento solar con 10 mg/L de H₂O₂ en diferentes tipos de agua: agua destilada, agua natural de pozo y agua simulada de salida de EDAR.

La concentración de peróxido de hidrogeno utilizada en estos experimentos (10 mg/L) no produce efectos nocivos sobre la viabilidad de las esporas. Sichel y cols. demostraron que el efecto tóxico del H₂O₂ en oscuridad para las esporas de *F. solani* se da a una concentración de H₂O₂ igual o superior a 50 mg/L, a dicha concentración de H₂O₂ se observa la reducción de 0,4 log en la concentración de esporas tras 5 h de exposición a este agente oxidante [Sichel y cols., 2009]. En este caso se evalúan las clamidosporas de *F. equiseti*, de mayor resistencia que los microconidios (Capítulo 3). Se determinó en oscuridad el posible efecto tóxico del peróxido de hidrogeno sobre su viabilidad. Para ello se mantuvieron las suspensiones acuosas de esporas en presencia de 10 mg/L de H₂O₂ durante 5 h en oscuridad. Los resultados mostraron que la concentración de esporas viables se mantenía constante durante el tiempo que duró el ensayo. Por ello, la inactivación de esporas observada en presencia de H₂O₂ a 10 mg/L y luz solar se debe al efecto sinérgico entre radiación solar y H₂O₂ y no a un efecto perjudicial del propio peróxido de hidrógeno.

Los resultados de inactivación de clamidosporas de *F. equiseti* durante el tratamiento con radiación solar natural en presencia de 10 mg/L de H₂O₂ durante 5 horas en el reactor de botella con agua destilada, agua de pozo y agua simulada de salida de EDAR se muestran en la figura 4.2. El efecto de la radiación solar sin peróxido sobre las mismas esporas y durante el mismo tiempo de tratamiento se muestra en la misma gráfica.

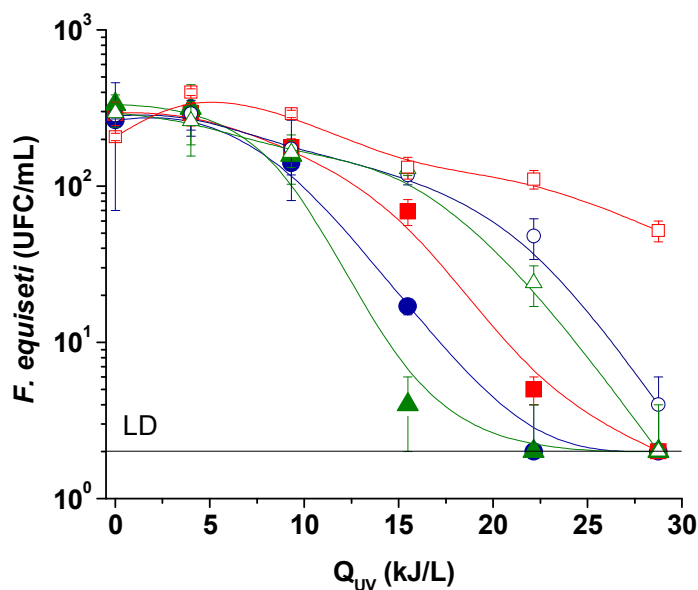


Figura 4.2. Inactivación de esporas de *F. equiseti* durante el tratamiento de radiación solar natural con 10 mg/L de H_2O_2 en el reactor de botella (200 mL) en agua destilada (—●—), agua de pozo (—▲—), y agua simulada de salida de EDAR (—■—). Los símbolos huecos corresponden al tratamiento de foto-inactivación solar en agua destilada, (—○—), agua de pozo (—△—), y agua simulada de salida de EDAR (—□—).

Los resultados obtenidos del proceso de foto-inactivación solar muestran que una larga exposición a la radiación no siempre produce suficientes daños en las esporas como para que la concentración de las mismas alcance el límite de detección. La concentración de esporas descendió de 295(±20) UFC/mL al LD en el agua de pozo, de 284(±14) a 4(±2) UFC/mL en el caso del agua destilada, y de 400(±30) a 52(±8) UFC/mL en el caso del agua simulada de salida de EDAR.

En el caso de radiación solar con 10 mg/L de H_2O_2 se alcanzó el límite de detección en todos los casos evaluados. Los experimentos con agua destilada y agua de pozo alcanzaron el LD desde 300(±200) UFC/mL y 333(±50) UFC/mL respectivamente tras 3 h de exposición solar con una energía UV-A por unidad de volumen acumulada de 22,2 kJ/L. Sin embargo, en el agua simulada de salida de EDAR, partiendo de una concentración inicial de 300(±50) UFC/mL, se necesitó una mayor energía UV-A solar acumulada por unidad de volumen ($Q_{UV} = 28,8$ kJ/L, en 4 h) para alcanzar el LD.

En la tabla 4.2 se presentan los datos de descenso de H_2O_2 así como el pH, OD, T^a y Q_{UV} . Las diferencias observadas en el descenso de H_2O_2 entre los ensayos de exposición solar realizados en ausencia y en presencia de esporas (Tablas 4.1 y 4.2) son pequeñas. Se deben a la influencia conjunta de una serie de factores: la evolución

de la temperatura, la irradiancia UV-A solar, la composición química del agua y la presencia de las esporas.

Tabla 4.2. Descenso de la concentración de H₂O₂, valores inicial y final de pH y OD, temperatura mínima y máxima y energía acumulada Q_{UV} tras 5 h de tratamiento con luz solar y H₂O₂ (10 mg/L) en el reactor de botella en los tres tipos de agua.

	Agua destilada	Agua de pozo	Agua simulada
H ₂ O ₂ (mg/L)	2,5	2,6	5,0
pH _i /pH _f	6,6/6,0	7,7/8,4	8,21/8,2
OD _i /OD _f (mg/L)	7,1/7,0	7,1/6,5	7,1/6,8
T ^a _{min} /T ^a _{max} (°C)	22,2/28,8	22,1/29,7	19,8/29,3
Q _{UV} (kJ/L)	28,7	28,7	28,7

Varios autores describen el daño en estructuras intracelulares producido por el peróxido de hidrógeno debido a su difusión hacia el interior de la célula. Hartman demostró el efecto bactericida producido por la combinación sinérgica de la radiación UV-A (300 - 400 nm) y el H₂O₂ (6×10^{-3} - 6×10^{-1} M) sobre células vegetativas de *E. coli* en agua [Hartman y Eisenstark, 1978]. Rincón y Pulgarín estudiaron el efecto de los tratamientos Fe³⁺/UV-Vis y H₂O₂/Fe³⁺/UV-Vis en agua contaminada con *E. coli*. Los ensayos de control de este trabajo se llevaron a cabo con el tratamiento H₂O₂/UV-Vis y se observó que la inactivación de esta bacteria en agua mejoraba notablemente por la adición de H₂O₂ (10 mg/L) respecto al mero efecto de la radiación solar. Los autores atribuyeron el aumento de la eficiencia de desinfección a la propiedad oxidativa del peróxido de hidrógeno sobre las células bacterianas, haciéndolas más débiles y sensibles a la radiación solar [Rincón y Pulgarín, 2005a].

Recientemente se ha dado una nueva explicación del mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno combinado con luz solar presenta un fuerte efecto germicida sobre diversos microorganismos, se le atribuye a la generación de radicales hidroxilo vía reacciones de Fenton internas durante este proceso. Spuhler y cols. atribuyeron este efecto a reacciones tipo Haber-Weiss en el interior de las células [Spuhler y cols., 2010]. Estas reacciones son las mismas que intervienen en el tratamiento de foto-Fenton (Ecuaciones 1.11-1.20), dando cuenta de la generación de radicales hidroxilo que son los causantes del daño oxidativo sobre las células.

Esta hipótesis se basa en el hecho de que las reacciones de Fenton (y tipo-Fenton) en el interior de los sistemas biológicos ocurren de forma natural, ya que tanto el H₂O₂ y el hierro así como otros metales de transición como el cobre están presentes en el interior celular y pueden dar lugar a este tipo de reacciones [Halliwell y Aruoma, 1991]. Las reacciones de tipo Fenton son la clave de los procesos de oxidación de los

principales componentes celulares [Prousek, 1995]. Los radicales hidroxilo son responsables de la iniciación de una cascada de reacciones en las que se liberan radicales que son citotóxicos para la célula y que pueden conducir a la muerte de la misma [Jones, 1999]. Cualquier componente celular (proteínas, lípidos y ADN) es susceptible al ataque de un $OH^\bullet$. Minotti y Aust demostraron que la presencia de hierro en la célula conduce a la iniciación de la peroxidación lipídica [Minotti y Aust, 1987]. Las partes más sensibles al ataque de los radicales oxidantes en la molécula de ADN son las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) especialmente la timina, que puede dar lugar a la formación de dímeros, y los enlaces C-H presentes en los anillos de la molécula de desoxirribosa que constituye la base de la doble hélice del ADN [Halliwell y Aruoma, 1991]. El principal producto generado por el ataque de un $OH^\bullet$ a las bases del ADN es el 8-hidroxiguanina, producido por la oxidación de las bases de guanina. Otros productos generados son 8-hidroxiadenina (adenina), aunque las bases pirimidínicas (citosina y timina) también son susceptibles del ataque oxidativo [Halliwell y Aruoma, 1991; Imlay, 2008].

Debido a la vida extremadamente corta de los radicales hidroxilo (10^{-9} segundos) [Pastor y cols., 2000], éstos producirán daños en la molécula de ADN sólo si se generan con iones metálicos unidos o muy cerca de la cadena de ADN [Halliwell y Aruoma, 1991]. La espora fúngica como estructura eucariota presenta una pared celular interna para proteger y separar el ADN del resto de los orgánulos del citoplasma. Por lo tanto, la formación interna de $OH^\bullet$ por reacciones Fenton en el núcleo celular sólo es posible en presencia del hierro o cobre que están presentes en los cromosomas [Halliwell y Aruoma, 1991].

El peróxido de hidrógeno es una molécula pequeña, habitualmente presente en el interior de la célula que se forma como consecuencia del metabolismo aerobio [Fridovich, 1986]. Todas las especies del oxígeno son pequeñas moléculas que no pueden ser excluidas de sitios activos, y en contacto con cofactores de menor potencial redox producen reacciones de transferencia de electrones (Figura 4.3). Estas reacciones dan cuenta de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) [Imlay, 2008]. El estrés oxidativo sobre las células deriva de la presencia de especies parcialmente reducidas del oxígeno que son más reactivas que el propio oxígeno.

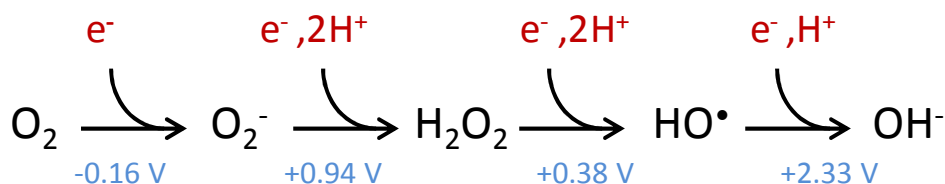


Figura 4.3. Estado redox del oxígeno con sus potenciales de reducción estándar a una concentración de oxígeno de 1 M (peróxido de hidrógeno: H₂O₂; superóxido: O₂⁻) [Imlay, 2008].

El efecto germicida en el tratamiento solar en presencia de H₂O₂ está favorecido por la difusión del H₂O₂ a través de las membranas citoplasmáticas. De este modo, el H₂O₂ extracelular se suma al H₂O₂ intracelular. El incremento de H₂O₂ intracelular favorece las reacciones de Fenton y/o foto-Fenton con el hierro presente de forma natural en el interior celular catalizando la producción de radicales hidroxilo que atacan de forma no selectiva cualquier componente estructural o enzimático, generando la muerte celular [Mello Filho y Meneghini, 1984; Imlay y cols., 1988a; Imlay y Linn, 1988b; Keyer y Imlay, 1996]. El oxígeno puede difundir a través de las membranas libremente, por lo que su concentración intracelular es equivalente a la que se encuentra fuera de la célula [Imlay, 2007]. Del mismo modo, el peróxido de hidrógeno, es una especie sin carga que puede difundir libremente a través de membranas. Por tanto, la presencia de H₂O₂ extracelular genera un aumento del estrés oxidativo por entrada del mismo hacia el interior celular. De forma natural, los daños producidos por el estrés oxidativo son reparados por los propios mecanismos de defensa de la célula. Las enzimas peroxidasa y catalasa eliminan el exceso de H₂O₂ de acuerdo con las siguientes reacciones [Imlay, 2008]:



Su actividad está directamente relacionada con la concentración de ROS en el interior de la célula. Otras enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) eliminan el superóxido (O₂⁻), el cual, a diferencia del O₂ y el H₂O₂, no difunde libremente a través de membranas. No obstante, estas enzimas son sensibles a la radiación UV-A y se pueden inactivar bajo la exposición a la radiación solar [Imlay, 2008]. Por lo que durante el tratamiento de radiación solar en presencia de H₂O₂ el estrés oxidativo intracelular

aumenta debido al incremento de la concentración de H_2O_2 en el interior celular y, por otro lado, las enzimas que se encargan de la defensa de la célula frente a este agente oxidante son inactivadas por los fotones UV-A, especialmente la catalasa y la SOD.

Con respecto al hierro, su presencia en la célula está ampliamente demostrada. Este elemento realiza funciones vitales para el mantenimiento de la homeostasis celular. Dada la complejidad de la química del hierro y la necesidad por parte de la células de este elemento químico, éstas presentan métodos para controlar sus niveles de hierro intracelulares [Tyrrell y Reeve, 2006; Andriopoulos y cols., 2007; Varghese y cols., 2007] e incluso han desarrollado mecanismos de absorción de hierro del medio. En 1976, Jacobs propuso el depósito lábil de hierro celular (LIP) como un modelo contenedor de hierro celular en sus diferentes formas [Jacobs, 1976]. Éste se define como hierro quelado en forma de Fe^{2+} y Fe^{3+} [Vile y Tyrrell, 1993]. Cuanto mayor es la cantidad de hierro quelado en la célula mayor es la disponibilidad de éste para que se produzcan reacciones de tipo Fenton [Minotti y Aust, 1987].

La obtención de hierro extracelular mediante compuestos quelantes de hierro o sideróforos parece ser una de las mayores fuentes de LIP en la célula [Kruszewski, 2003]. La presencia de hierro en las esporas fúngicas puede estar asociada, aunque no exclusivamente, a la existencia de sideróforos biosintetizados o sideróforos transportadores [Kruszewski, 2003]. Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro secretados por microorganismos al medio exterior. Los sideróforos fúngicos son moléculas de naturaleza peptídica de tipo hidroxamato donde se diferencian las familias coprógenos, fusarininas (presentes en el género *Fusarium*) y ferricromos [Van der Helm y Wilkelmann, 1994]. La función de estos quelantes de hierro es disolver el Fe^{3+} (insoluble en condiciones aeróbicas) a complejos de Fe^{3+} , los cuales pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo al interior celular.

Algunos trabajos recientes describen un aumento del hierro en las células tras ser expuestas a estrés oxidativo por reacciones entre los ROS y proteínas reguladoras de hierro-azufre como m-aconitasa. Los ataques de ROS a proteínas sensibles puede favorecer la liberación directa de átomos de hierro o aumentar indirectamente estos niveles, causando cambios en la regulación transcripcional del hierro [Beinert y cols., 1996; Kiley y Beinert, 2003; Varghese y cols., 2007]. Por tanto, el daño de las proteínas que contienen hierro provocado por la radiación UV-A y la posterior liberación intracelular de hierro hace que éste pueda estar disponible en mayor proporción para las posibles reacciones de Fenton internas.

Aunque empíricamente no se ha demostrado que se generen $OH^\bullet$ como consecuencia de la difusión del H_2O_2 hacia el interior de la célula y su posterior reacción con hierro durante el tratamiento H_2O_2 /Solar, las evidencias experimentales llevan a la conclusión de que éste efecto es altamente probable.

Según lo expuesto, los principales mecanismos de acción oxidativa de este proceso se pueden resumir de la siguiente forma:

- (i) La generación de ROS por la acción directa de la radiación solar que pueden inducir mutaciones en el ADN. Estas vías sólo producen una leve reducción en la concentración de esporas como se observa en la figura 4.2.
- (ii) La participación de las reacciones Fenton internas que generan radicales hidroxilo. Este mecanismo está favorecido por la difusión de H_2O_2 hacia el interior de la célula, ya que no tiene carga y puede difundir libremente a través de las membranas celulares. Un aumento de la concentración de H_2O_2 intracelular favorece su reacción con el hierro presente en la célula a partir de fuentes de hierro como son los cúmulos de azufre, proteínas como la enterobactina o ferritina y sideróforos biosintetizados o sideróforos transportadores de hierro. La interacción del H_2O_2 y el hierro disponible genera $OH^\bullet$ que finalmente producen la muerte celular.
- (iii) El estrés producido por la radiación UV-A provoca la inactivación de las enzimas catalasa y SOD, lo cual favorece la sobrecarga de peróxido de hidrógeno en la célula ayudando al proceso de inactivación.

Todos estos mecanismos (Figura 4.4) actúan de forma conjunta cuando se utiliza la radiación solar con H_2O_2 , lo cual explica el aumento de la inactivación de microorganismos durante este tratamiento comparado con la inactivación por foto-inactivación solar.

Otro aspecto muy importante en este trabajo es que el microorganismo utilizado es una espora, con una estructura biológica diferente a la célula bacteriana. Las esporas son estructuras microbiológicas destinadas a sobrevivir bajo fuertes factores de estrés ambiental. Se caracterizan por tener una gruesa pared externa impermeable y diferente composición química que les confiere la resistencia a esos factores ambientales. Por tanto, los mecanismos descritos pueden ocurrir rápidamente en células metabólicamente activas como las bacterias, sin embargo en las esporas, la difusión del H_2O_2 solo puede ocurrir una vez que la espora ha iniciado su germinación.

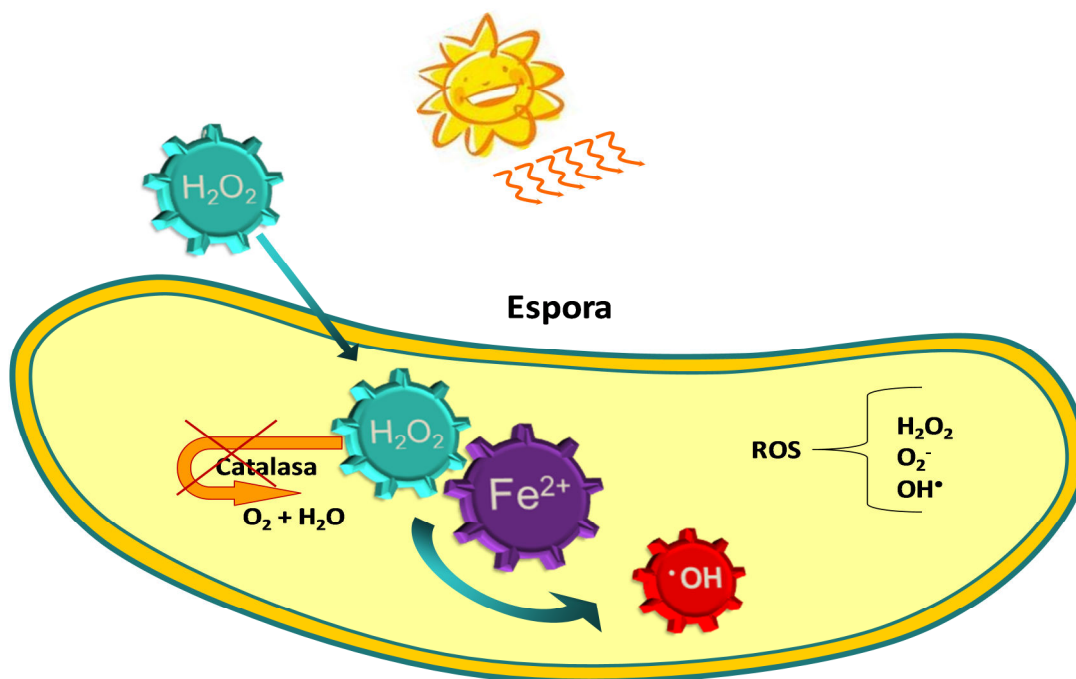


Figura 4.4. Diagrama de las principales vías de inactivación generadas durante el tratamiento de radiación solar en presencia de H_2O_2 en una suspensión acuosa de esporas fúngicas.

Las esporas son estructuras que deben completar su ciclo de vida mediante la germinación y el crecimiento micelial. El paso de la germinación sólo se produce bajo condiciones ambientales favorables de temperatura, exposición a la luz solar y presencia de agua que contenga sustratos orgánicos como fuente de carbono (azúcares, alcoholes, aminoácidos) y sales inorgánicas que proporcionan un ambiente favorable para la germinación [Cochrane y cols., 1963; Marchant y White, 1967; Griffin, 1970; Palmero Llamas y cols., 2008b]. Durante la germinación, las esporas aumentan su permeabilidad y como resultado, aumentan su tamaño y activan su maquinaria enzimática y metabólica. Finalmente, el micelio de los hongos crecerá a través de la formación del tubo germinativo. Este proceso ampliamente estudiado [Marchant, 1966; Chitarra y cols., 2005] se muestra de forma esquemática en la figura 4.5.

El primer paso de la germinación de las esporas denominado etapa de hinchado (en inglés "swelling") se inicia tras un cierto período de exposición a la luz solar tras el cual, el agua y algunos compuestos disueltos en el agua entran en la espora por difusión. El desarrollo de esta etapa explicaría cómo el peróxido de hidrógeno puede entrar en la espora y así producirse los mecanismos oxidativos que justificarían el buen comportamiento desinfectante del proceso de exposición solar en presencia de H_2O_2 .

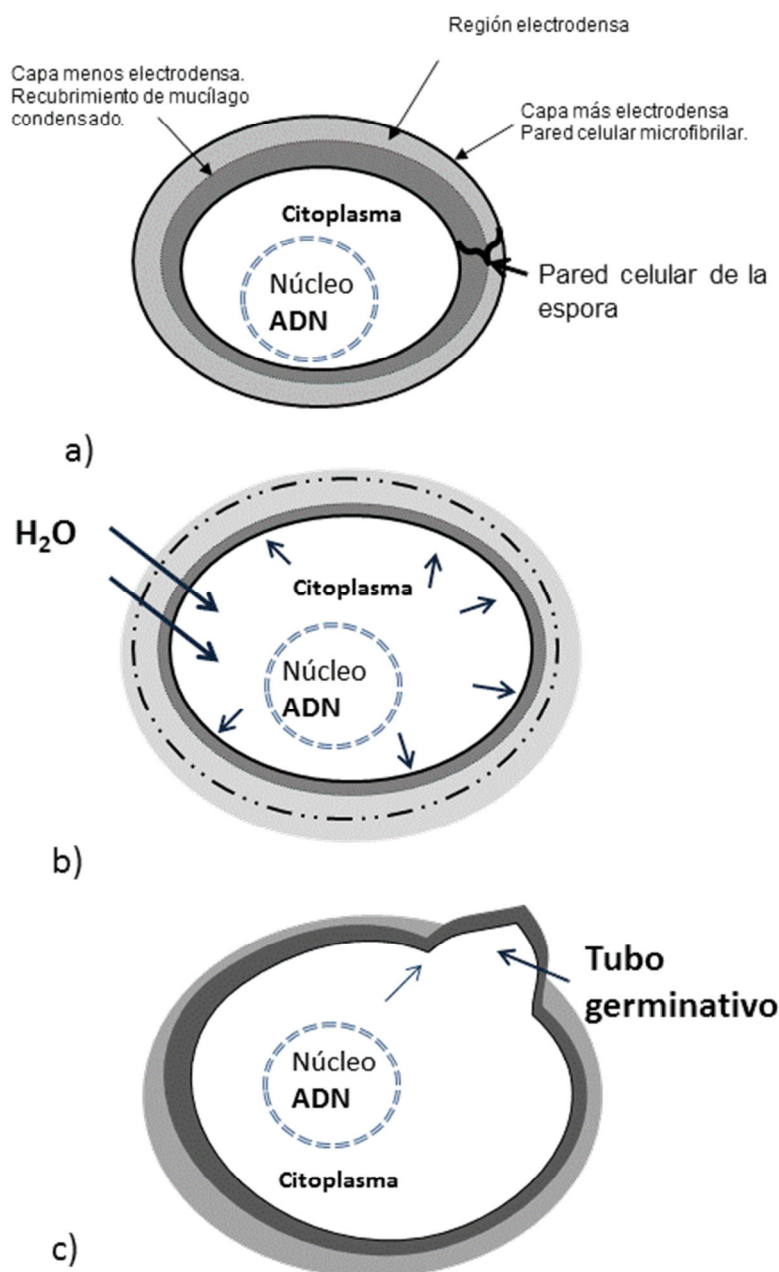


Figura 4.5. Diferentes etapas de germinación de las esporas. **a)** Conidios no germinados [adaptado de Marchant, 1966]. **b)** Primera etapa de la germinación de la espora: donde se observa el aumento de tamaño por entrada de agua en el interior celular. **c)** Desarrollo del tubo germinativo [adaptado de Chitarra y cols., 2005].

A diferencia de las células vegetativas, en todos los casos evaluados en este trabajo experimental, la inactivación no comienza hasta que las esporas inician este proceso de germinación. Una de las sospechas que hace pensar que la espora no es susceptible al efecto germicida del sistema H_2O_2 /Solar al inicio del tratamiento es el patrón de inactivación observado en los resultados. Estos presentan dos fases claramente diferenciadas tal y como se observa en la figura 4.2 (y posteriormente en la figura 4.11 se observará el mismo patrón con los resultados del mismo proceso

obtenidos en un reactor solar CPC de 60 L de volumen total). La primera fase corresponde aproximadamente a las 2 primeras horas de tratamiento, en las que la concentración de esporas se mantiene constante. La segunda fase corresponde a un descenso exponencial de dicha concentración hasta alcanzar el límite de detección. Por tanto, se cree que las esporas no inician el proceso de germinación hasta aproximadamente las dos horas de exposición solar donde ocurre la brusca inactivación fúngica por los mecanismos anteriormente descritos.

4.2.1. Confirmación del proceso foto-Fenton en el interior de las esporas

Con el objeto de correlacionar experimentalmente el inicio de la germinación con la inactivación por el tratamiento H_2O_2 /Solar se realizó un ensayo exponiendo a la radiación solar natural diferentes reactores de botella de manera simultánea que contenían esporas de *F. equiseti* y 10 mg/L de H_2O_2 . En la figura 4.6, se observa el resultado de inactivación producido por el efecto de la adición de 10 mg/L de H_2O_2 sobre las suspensiones de esporas fúngicas tras ser expuestas en reactores solares de botella a tiempos cada vez mayores de exposición solar, es decir, tras 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. A dichos tiempos se adicionó el peróxido de hidrógeno y se mantuvieron los reactores bajo radiación hasta completar 180 minutos de tratamiento. Además, se llevó a cabo un experimento de foto-inactivación solar. Estos resultados muestran que el tratamiento de foto-inactivación solar generó un ligero descenso en la concentración de esporas (como era de esperar), y que la inactivación con H_2O_2 añadido desde el inicio de la exposición solar (en el tiempo 0) da lugar al patrón típico de inactivación de las esporas que se ha observado previamente (Figura 4.2). La adición de H_2O_2 en los tiempos 30 y 60 minutos da lugar a un patrón semejante al obtenido cuando el peróxido de hidrógeno se añadió a tiempo 0. Sin embargo se observa que la adición de H_2O_2 a los 90, 120 y 150 minutos produce una reducción inmediata en la concentración de esporas desde el momento de la adición de H_2O_2 . Por ejemplo, el experimento de adición a tiempo 0 requiere más de una hora hasta que se inicia el descenso de la viabilidad fúngica. Esto significa que a los 90 minutos el H_2O_2 tiene la posibilidad de difundir al interior de la espora de forma inmediata, comenzando las reacciones tipo Fenton interno y provocando la inactivación rápida de las esporas. Esto no ocurre en el caso de 0, 30 y 60 minutos, porque en esos casos las esporas aún no son permeables al agua del medio externo. Cabe destacar que, una vez iniciado el proceso de inactivación de las esporas, las pendientes de inactivación son muy similares en todos los casos.

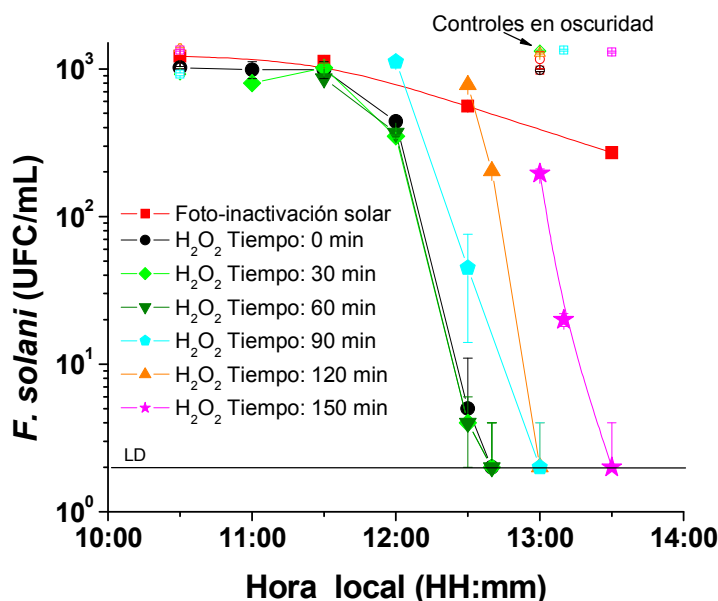


Figura 4.6. Efecto sobre la inactivación de las esporas de *F. solani* por la adición de 10 mg/L de H_2O_2 a diferentes tiempos de exposición a la radiación solar en reactores de botella.

Se podría argumentar que en los tiempos 90, 120 y 150 minutos las esporas pueden haber acumulado daños producidos por la radiación solar. Sin embargo, como se puede observar en la figura 4.6, la respuesta de las esporas a la adición del H_2O_2 a esos tiempos provoca una inactivación mucho más rápida que la observada en la foto-inactivación solar.

Hasta el momento se ha atribuido la inactivación de esporas en el tratamiento H_2O_2 /Solar a la sucesión de reacciones de Fenton internas. De ser así, estas reacciones se producirían también en oscuridad. Por tanto, habría que discriminar si las reacciones que llevan a la inactivación celular ocurren únicamente en presencia de luz solar. Para demostrarlo se desarrolló un experimento de inactivación de esporas de *F. equiseti* en reactor de botella en agua destilada y en presencia de 10 mg/L de H_2O_2 durante 5 h. De este reactor se tomaron muestras de agua a distintos tiempos de exposición a la radiación solar: 90, 120 y 150 minutos. Una vez fueron retiradas de la luz, se mantuvieron en oscuridad en el laboratorio y a 25 °C y se evaluaron hasta completar las 5 h. Los tiempos escogidos se han basado en los resultados obtenidos en la figura 4.6. Tiempos inferiores a 90 minutos han demostrado que no producen un daño directo en la espora, y dado que la entrada de H_2O_2 al interior celular comienza a observarse a los 90 minutos se tomaron como tiempos representativos del proceso los 90, 120 y 150 minutos de exposición a la radiación solar.

La figura 4.7 muestra los resultados de viabilidad de las esporas de este ensayo. Se observa que durante un periodo de irradiación de 5 horas se produce una bajada paulatina de la viabilidad hasta alcanzar el límite de detección (típico patrón de inactivación en tratamiento H_2O_2 /Solar). En aquellas muestras en las que las esporas estuvieron expuestas a la radiación solar durante un periodo de 150 minutos, se produce una ligera bajada en la concentración de esporas viables, la cual permanece estable cuando se interrumpe la iluminación durante el tiempo que queda hasta completar las 5 horas del ensayo. Sin embargo, las suspensiones de esporas expuestas a tiempos de iluminación solar inferiores no acusan ninguna bajada significativa en la concentración de esporas viables después de la exposición solar.

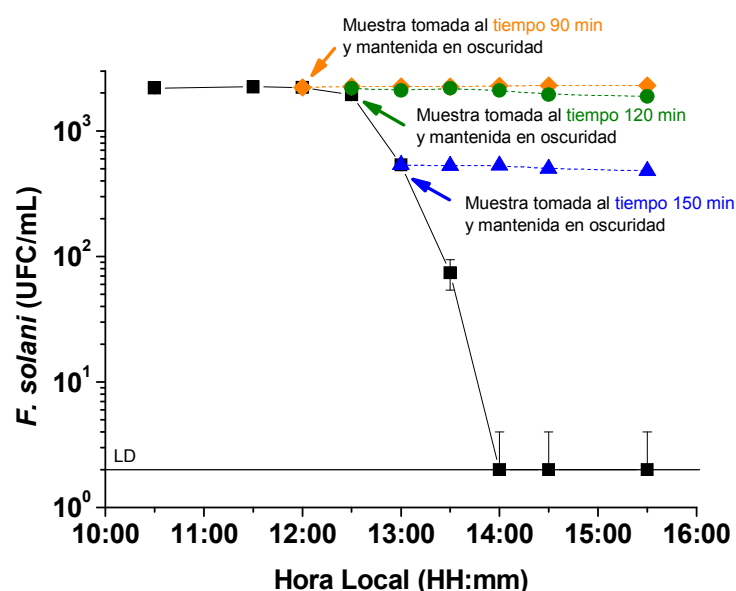


Figura 4.7. Efecto de la radiación solar sobre la inactivación de esporas fúngicas durante el tratamiento H_2O_2 /Solar con 10 mg/L de H_2O_2 (-■-) en 180 minutos. Efecto sobre la viabilidad fúngica al trasladar muestras del tratamiento H_2O_2 /solar a condiciones de oscuridad y temperatura ambiente a diferentes tiempos del tratamiento solar: 90 (-♦-), 120 (-●-) y 150 minutos (-▲-).

Por tanto, las esporas sometidas al estrés oxidativo producido por este tratamiento, lo acusan con una pérdida de viabilidad durante la exposición solar (siendo ésta suficiente). En el momento en que desaparece la radiación solar, mantienen su concentración de esporas viables, mientras que las que continúan bajo la acción de la radiación solar acaban por inactivarse por completo (hasta el límite de detección). Estos resultados demuestran que sin luz solar no se producen daños oxidativos que provoquen la inactivación de las esporas, y que es necesaria la presencia de fotones

para que el tratamiento con H_2O_2 tenga un efecto desinfectante sobre el agua. Por ello, las reacciones que podrían explicar la inactivación celular necesitan de fotones y de peróxido de hidrógeno, por lo que las reacciones de tipo foto-Fenton serían probablemente la causa de la inactivación observada en estos ensayos, tal y como apuntan estos estudios.

Por otra parte, en todo tratamiento fotocatalítico, como es el caso del TiO_2 y del foto-Fenton, los radicales hidroxilo formados en el sistema generan, por un lado la inactivación o muerte de microorganismos y, por otro, cuando en el medio existen compuestos orgánicos, producen la degradación de materia orgánica, que se observa como reducción de la concentración de COD, tal y como ocurre en los resultados presentados en los Capítulos 5 y 6. Esto se debe a la baja especificidad del $OH^\bullet$ y, por tanto, este radical oxida allá donde se forma.

La figura 4.8 muestra la evolución del COD en el reactor de botella y en el reactor solar CPC durante sendos ensayos tras 5 h de exposición solar del efluente simulado de EDAR en presencia de 10 mg/L de H_2O_2 . Se observa que incluso en el reactor CPC, donde la cantidad de fotones entrantes es muy superior a la que entra en el reactor de botella, no se produce una reducción significativa del COD. Por tanto, y como era de esperar, la presencia de fotones solares y peróxido de hidrógeno no produce un efecto oxidativo sobre la materia orgánica, por tanto los procesos de inactivación observados con las esporas no se pueden atribuir al ataque oxidativo externo sino a otro tipo de procesos que tendrán lugar en el interior celular.

Por ello, esta evidencia experimental soporta la teoría de que la inactivación microbiana en el tratamiento H_2O_2 /Solar se ha de producir por un ataque oxidativo intracelular, ya que el carbono orgánico total disuelto (COD) no sufre degradación alguna durante el tiempo de tratamiento.

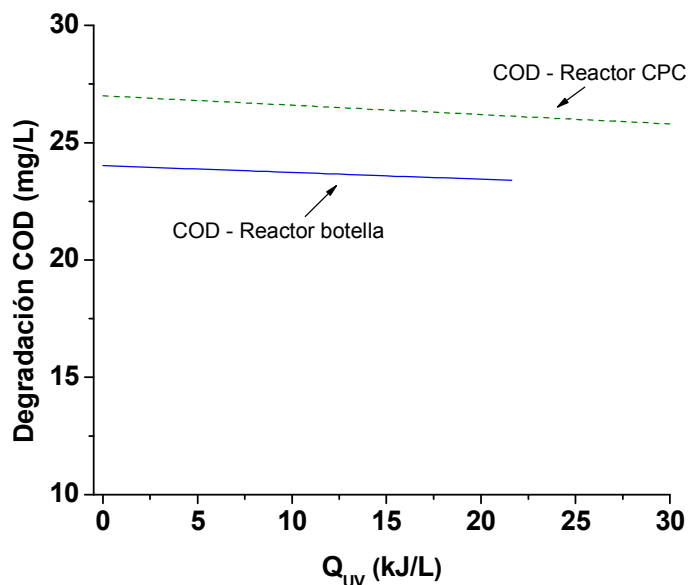


Figura 4.8. Evolución del COD medido a lo largo del periodo experimental en reactor de botella y reactor solar CPC en agua simulada de salida de EDAR y 10 mg/L de H_2O_2 .

4.3. Efecto de la radiación visible y UV-A en el tratamiento H_2O_2 /Solar

Con objeto de discriminar el efecto separado de las componentes UV-A y visible del espectro solar en el proceso de inactivación de esporas durante el tratamiento H_2O_2 /Solar, se utilizó un filtro de radiación UV-A. El filtro utilizado es una lámina de metacrilato que tiene una longitud de onda de corte de 370 nm, por lo que absorbe casi toda la intensidad de luz por debajo de 370 nm, mientras que por encima de 370 nm la intensidad de radiación no se ve afectada (Figura 2.11).

Se realizaron ensayos de desinfección de esporas de *F. equiseri* con y sin filtro de UV-A. Los experimentos se llevaron a cabo simultáneamente en agua destilada con 10 mg/L de H_2O_2 y con la misma concentración inicial de esporas (~300 UFC/mL). Los resultados (Figura 4.9) muestran que la eficiencia de inactivación para el sistema con filtro es menor que en el sistema sin filtro, aunque las diferencias entre ambos sistemas no son muy elevadas. Durante estos experimentos la temperatura máxima alcanzada en ambos casos fue 39,3 °C. El OD varió de 7,1 a 5,5 mg/L, y se consumieron 2,4 mg/L de H_2O_2 en el experimento sin filtro UV-A y 1,6 mg/L en presencia del filtro.

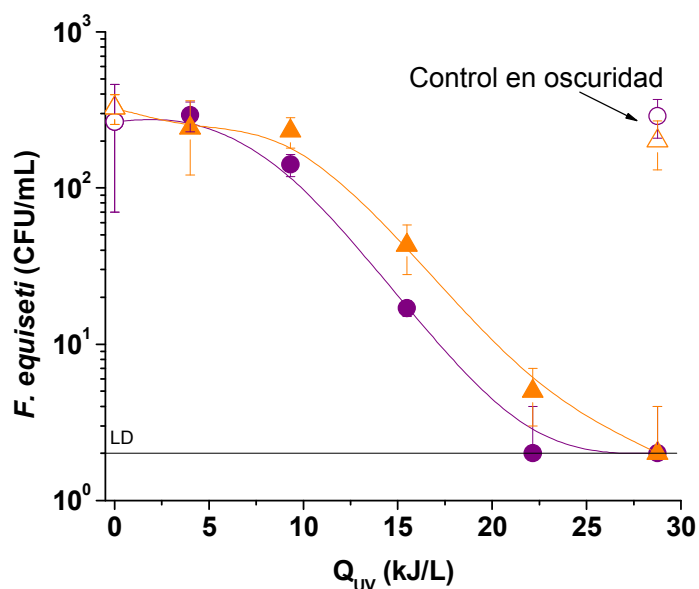


Figura 4.9. Inactivación de esporas de *F. equiseti* bajo radiación solar natural y H₂O₂ (10 mg/L) en reactor de botella y agua destilada con (—▲—) y sin (—●—) filtro de luz UV-A (corte = 370 nm). Los símbolos huecos representan controles en oscuridad.

Los resultados de inactivación obtenidos en el caso de utilizar el filtro muestran que no solo los fotones del UV-A lejano son importantes en este proceso, sino que la radiación UV-A cercana y parte de la radiación visible del espectro solar también influyen en el proceso. Hartman y Eisenstark investigaron el efecto bactericida de la radiación UV cercana (300-420 nm) y H₂O₂ sobre varias cepas de *E. coli* K-12. A bajas concentraciones de H₂O₂ (de 6×10^{-6} a 6×10^{-4} M) observaron el efecto sinérgico de los fotones con el peróxido de hidrógeno en todas las cepas excepto aquellas que portaban una mutación en el gen *recA* (gen relacionado con el sistema de respuesta a daño oxidativo en el ADN). A mayores concentraciones de H₂O₂ ($> 6 \times 10^{-4}$ M) junto con radiación UV-cercana, todas ellas, incluyendo las mutantes *recA*, fueron susceptibles al tratamiento y murieron [Hartman y Eisenstark, 1978].

Feuerstein y cols. estudiaron el efecto antibacteriano de la sinergia entre la luz visible y el H₂O₂ sobre *Streptococcus mutans* para lo cual utilizaron luz azul (450 - 490 nm) y bajas concentraciones de H₂O₂ ($0,3 - 30 \times 10^{-3}$ M). Según estos autores la fotólisis del peróxido de hidrógeno para formar OH• no juega un papel dominante y sugirieron que el efecto sinérgico se debía a la formación de radicales hidroxilo vía reacciones de tipo foto-Fenton con el Fe²⁺ presente en la bacteria. Esto permite que los OH• ataquen a la célula y se produzca una pérdida del hierro quelado. Además, la presencia de H₂O₂ puede aumentar la permeabilidad de la membrana de las células

dañándolas sub-letalmente por la exposición a la luz. De este modo se daría una mayor permeabilidad al H₂O₂ resultando en un daño oxidativo de los componentes intracelulares [Feuerstein y cols., 2006].

Mamane y cols. investigaron la inactivación de *E. coli*, esporas de *Bacillus subtilis*, y los fagos MS2, T4 y T7 utilizando un tratamiento de UV/H₂O₂. Como parte de este trabajo, estudiaron el efecto de la radiación con longitudes de onda superiores a 295 nm (UV-A y visible), con y sin H₂O₂. El tratamiento UV/H₂O₂ (25 mg/L de H₂O₂) no tuvo ningún efecto añadido comparado con la radiación UV en el virus T4 en 15 minutos. En el caso del virus T7, obtuvieron una mayor reducción en la concentración vírica con el tratamiento UV/H₂O₂ que con el mero efecto de la radiación UV (aproximadamente 1 log de diferencia entre ambos tratamientos). En el caso de *E. coli* no se observaron diferencias significativas entre la utilización del tratamiento UV/H₂O₂ (10 mg/L) y solo radiación UV. Aunque en los primeros 7,5 minutos de tratamiento observaron un ligero efecto de inactivación de *E. coli* en el caso de UV/H₂O₂ (25 mg/L) no pudiendo observar diferencias en un tiempo de reacción prolongado dado que la concentración de bacterias se acercaba al límite de detección en un periodo de tiempo muy corto. El virus MS2 dio el mejor resultado de inactivación con el proceso UV/H₂O₂ (con más de 25 mg/L) donde se alcanzó una reducción de 2 log mientras que la radiación UV por si sola produjo una reducción de 0,3 log. Sin embargo, las esporas de *B. subtilis* no mostraron ninguna inactivación en ninguno de los tratamientos empleados (H₂O₂, UV > 295 nm, y UV/H₂O₂) [Mamane y cols., 2007].

4.4. Inactivación de *F. equiseti* mediante H₂O₂/Solar en reactor CPC de 60 L

El tratamiento de radiación solar en presencia de bajas concentraciones de H₂O₂ también se estudia en el reactor CPC de 60 L. La viabilidad de las esporas fúngicas en agua destilada con 20 mg/L de H₂O₂ en el reactor CPC se evaluó en oscuridad durante 5 h, mostrando que no existe ningún efecto negativo significativo sobre la viabilidad de las esporas (Figura 4.10). Se utilizó una concentración superior a la utilizada en los ensayos solares con el objeto de cubrir una mayor concentración de reactivo y asegurar que no se produciría ningún efecto tóxico sobre las esporas. La temperatura aumentó de 25 °C a 45 °C durante las 5 h que duró el experimento y, aunque en este rango de temperaturas no se produce una inactivación térmica, el incremento en la temperatura puede favorecer la eficiencia del proceso aumentando las velocidades de inactivación, tal y como ocurre en la gran mayoría de los procesos de desinfección de aguas, como en SODIS o en UV-C, si bien cada caso depende del tratamiento desinfectante y de los microorganismos presentes en el agua a tratar.

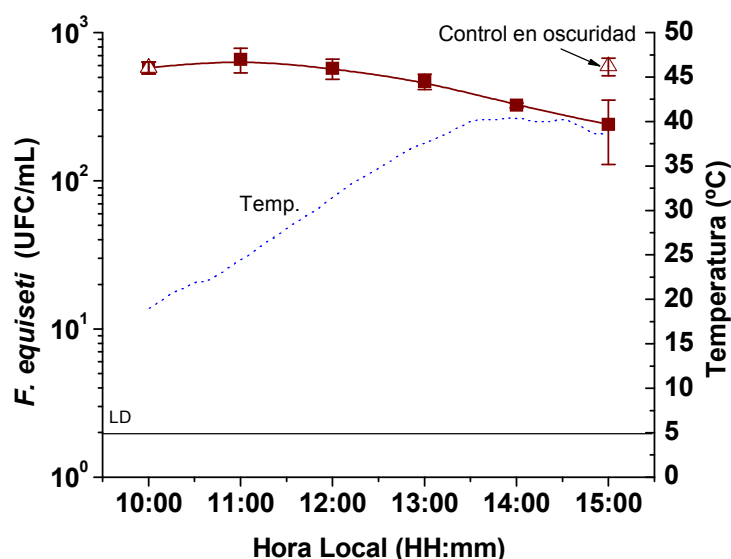


Figura 4.10. Viabilidad de esporas de *F. equiseti* en reactor CPC de 60 L con 20 mg/L de H_2O_2 en oscuridad. La línea discontinua muestra el perfil térmico durante el tratamiento.

Los ensayos de desinfección de clamidosporas de *F. equiseti* en el reactor solar CPC se hicieron con agua destilada, agua de pozo y agua simulada de salida de EDAR bajo radiación solar natural y con 10 mg/L de H_2O_2 (Figura 4.11). La concentración de clamidosporas de *F. equiseti* alcanzó el límite de detección desde 180(±50) UFC/mL en agua destilada tras recibir una energía UV-A (Q_{UV}) de 14,9 kJ/L y durante este proceso se produjo un consumo de 5,6 mg/L de peróxido de hidrogeno. Los valores máximos de temperatura medidos durante estos experimentos variaron entre 35,7 y 38,7 °C. En el caso del agua de pozo, la concentración de esporas se redujo 1,8 log, de 570(±40) a 5(±2) UFC/mL, con un Q_{UV} de 28,7 kJ/L. En este caso, el consumo de H_2O_2 fue de 4,2 mg/L. En el caso del agua simulada, el límite de detección se alcanzó con una concentración inicial de 330(±30) UFC/mL tras recibir un Q_{UV} de 29,7 kJ/L y consumirse un total de 3,99 mg/L de H_2O_2 . Los valores de temperatura, pH y OD inicial y final así como la pérdida de H_2O_2 en estos experimentos se resumen en la tabla 4.3.

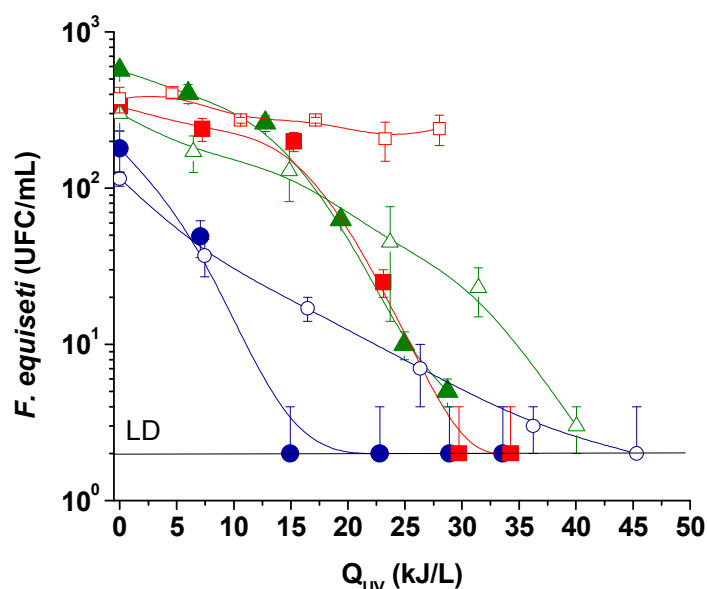


Figura 4.11. Inactivación de esporas de *F. equiseti* bajo radiación solar natural y 10 mg/L de H₂O₂ en el reactor solar CPC de 60 L con agua destilada (—●—), agua de pozo (—▲—), y agua simulada de salida de EDAR (—■—). Los símbolos huecos corresponden al tratamiento de foto-inactivación solar en agua destilada (—○—), agua de pozo (—△—) y agua simulada de salida de EDAR (—□—).

Tabla 4.3. Consumo de H₂O₂ en experimentos de desinfección con luz solar y H₂O₂ (10 mg/L) en el reactor solar CPC de 60 L para cada tipo de agua. También se muestran el pH, OD (valores inicial y final), temperatura mínima y máxima y Q_{UV}.

	Agua destilada	Agua de pozo	Agua simulada
H ₂ O ₂ (mg/L)	6,1	4,6	4,9
pH _i /pH _f	6,0/5,1	8,0/8,6	8,1/9,0
OD _i /OD _f (mg/L)	8,8/7,8	9,6/8,7	9,0/8,2
T ^a _{min} /T ^a _{max} (°C)	26,0/38,7	23,8/35,7	27,9/35,9
Q _{UV} (kJ/L)	33,5	28,7	29,7

Al comparar los resultados de inactivación obtenidos mediante iluminación solar con y sin H₂O₂ (Figura 4.11) se puede observar que la adición de bajas concentraciones de peróxido de hidrogeno mejora la inactivación de esporas en todos los casos. Especialmente en el agua simulada de salida de EDAR, donde la radiación solar (foto-inactivación solar) es responsable por sí sola de un leve descenso de la concentración de esporas de 370(±70) a 240(±50) UFC/mL, con un Q_{UV} de 28 kJ/L. Mientras que con el tratamiento H₂O₂/Solar sí se alcanza el límite de detección con una energía solar acumulada de 29 kJ/L. Estos resultados demuestran la elevada capacidad de este tratamiento en la inactivación de esporas fúngicas con cualquiera de los tipos de agua estudiados.

Finalmente y con objeto de determinar si una mayor concentración de peróxido de hidrógeno llevaría a un incremento en la eficiencia de la inactivación, se estudió la adición de una concentración de H_2O_2 superior a 10 mg/L. Para ello se añadieron 15 mg/L de H_2O_2 en el reactor solar CPC y agua simulada de salida de EDAR. Los resultados no muestran una mejora significativa sobre la eficiencia de desinfección (Figura 4.12).

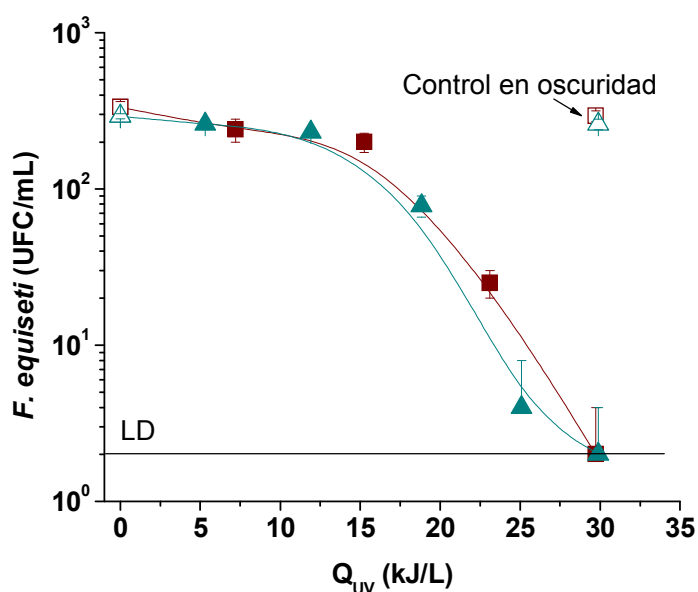


Figura 4.12. Inactivación de esporas de *F. equiseti* en agua simulada de salida de EDAR bajo radiación solar natural con 10 mg/L (—■—) y 15 mg/L (—▲—) de H_2O_2 en el reactor solar CPC de 60 L. Los símbolos huecos corresponden a los controles en oscuridad.

Otros autores apuntan el hecho de que un exceso de peróxido de hidrógeno reduce la velocidad de oxidación, ya que el H_2O_2 puede actuar como capturador de radicales hidroxilo [Benítez y cols., 1996; Ku y cols., 1998]. Además, al ser este un proceso que se produce por la difusión del peróxido de hidrógeno al interior de la célula, una mayor concentración de H_2O_2 extracelular no revierte en una mayor eficacia de las reacciones de foto-Fenton interno ya que éstas estarán limitadas por la disponibilidad de hierro “libre” en el interior de la célula.

4.5. Cinéticas de desinfección del tratamiento H₂O₂/Solar

El ajuste cinético de los resultados obtenidos en reactor de botella con 10 mg/L de H₂O₂ se muestra en la tabla 4.4. En todos los casos el modelo cinético más acorde con los resultados es el modelo 'log-lineal' precedido por un hombro al inicio del tratamiento (Ecuación 2.17).

Las constantes cinéticas obtenidas en agua destilada y agua natural de pozo son similares. La diferencia fundamental entre ambos tipos de agua es la presencia de una elevada concentración de especies carbonato y bicarbonato en el agua de pozo. Aunque los resultados indican que la presencia de los mismos en el agua de pozo no afecta de forma significativa a la eficiencia del tratamiento. Por otro lado, la velocidad de inactivación más baja se obtiene en el caso del agua simulada de salida de EDAR.

Tabla 4.4. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos realizados mediante el tratamiento H₂O₂/Solar en el reactor de botella con esporas de *Fusarium* spp.

H ₂ O ₂	<i>k</i> (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	Log (N _{res})	R ²	Modelo cinético
AD	0,12±0,01	0,60±0,20	-	0,95	Hombro+Log-lineal
AP	0,13±0,03	0,60±0,40	-	0,95	Hombro+Log-lineal
AsEDAR	0,09±0,01	0,55±0,20	-	0,97	Hombro+Log-lineal

AD=Agua Destilada; AP= Agua de Pozo; AsEDAR= Agua simulada de salida de EDAR.

Los resultados de los ajustes cinéticos de la inactivación fúngica en el caso del reactor CPC de 60 L se muestran en la tabla 4.5. Se puede observar que las velocidades de inactivación no variaron significativamente de un tipo de agua a otro. La mayor velocidad de inactivación se obtiene con agua destilada, con un valor de *k* de 0,13±0,02 L/kJ, mientras que en el caso del agua de pozo y el agua simulada de salida de EDAR, los valores de la constante cinética son inferiores a éste y muy similares entre sí.

Los modelos cinéticos a los que se ajustan los datos experimentales son distintos. Esto puede deberse a varios factores: (i) diferentes condiciones ambientales que afecten al tratamiento tales como radiación solar y temperatura del agua; y (ii) presencia de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos.

Otro aspecto importante en los ajustes cinéticos es el parámetro que determina la longitud del hombro. No hay que olvidar que el mecanismo de inactivación de las esporas de hongos con el tratamiento H₂O₂/Solar depende del inicio de la germinación,

y parte de la longitud del hombro se debe al tiempo requerido para que se inicie el proceso de germinación de la espora.

Tabla 4.5. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos realizados mediante el tratamiento H_2O_2 /Solar en el reactor solar CPC de 60 L con clamidosporas de *F. equiseti*.

Tipo de agua	k (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	$\log(N_{res})$	R^2	Modelo cinético
10 mg/L H_2O_2					
AD	0,13±0,02	-	-	0,97	Log-lineal
AP	0,08±0,01	0,60±0,20	2,05±0,02	0,97	Hombro + Log lineal + cola
AsEDAR	0,10±0,01	0,80±0,50	-	0,93	Hombro + Log-lineal
10 mg/L versus 15 mg/L H_2O_2					
AsEDAR (10 mg/L)	0,10±0,01	0,80±0,50	-	0,93	Hombro + Log-lineal
AsEDAR (15 mg/L)	0,10±0,01	0,80±0,40	-	0,94	Hombro + Log-lineal

AD=Agua Destilada; AP= Agua de Pozo; AsEDAR= Agua simulada de salida de EDAR.

Los resultados obtenidos en el reactor CPC para el agua destilada no presentan hombro, lo cual indica que el proceso de inactivación se inició antes que en los otros casos en los que sí aparece un hombro. Si nos centramos en la longitud del hombro de los resultados en el reactor de botella, donde las condiciones ambientales fueron similares en cuanto a temperatura y radiación, la única diferencia entre los resultados es la composición química del agua. En todo caso, se observa una ligera mejora en el caso del agua simulada de salida de EDAR (0,55±0,20 L/kJ) con respecto al agua destilada (0,60±0,20 L/kJ) probablemente debido al efecto positivo de la composición química del agua en el inicio de la germinación.

Por otro lado, las diferencias entre las constantes cinéticas del tratamiento con 10 y 15 mg/L de H_2O_2 son despreciables, por lo que no se observa una mejora al utilizar una concentración mayor de H_2O_2 (Figura 4.12).

5. DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA MEDIANTE FOTO-FENTON SOLAR

Los resultados experimentales mostrados en este capítulo se centran en el estudio del proceso de foto-Fenton solar para la inactivación de esporas fúngicas. Para ello, en primer lugar se estudia el efecto del pH sobre la eficiencia de inactivación de esporas de *F. solani* (FS12) y, en segundo lugar se lleva a cabo la optimización de las concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno con objeto de alcanzar los mejores resultados de desinfección posibles en las condiciones experimentales empleadas utilizando zoosporas de *P. capsici* como microorganismo objeto de estudio. En ambos estudios se incluyen también experimentos de foto-inactivación solar, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$ y $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{Solar}$ (considerados como blancos) con el objeto de discernir el efecto que cada reactivo y condición de operación empleados puedan tener sobre la eficiencia del foto-Fenton solar, así como para determinar la sinergia observada entre dichos parámetros. Estos estudios forman parte de un acercamiento preliminar del proceso foto-Fenton a la inactivación fúngica y, por ello, se realizaron en reactor de botella de 200 mL.

Como se pondrá de manifiesto a lo largo de este capítulo, el pH juega papeles diferentes en el proceso de inactivación mediante foto-Fenton solar. Este estudio no se había realizado antes y, además, los pocos trabajos de desinfección realizados hasta la fecha con foto-Fenton se han llevado a cabo con bacterias, siendo éstas muy susceptibles al pH, especialmente ácido. Por otro lado se estudia también el efecto de dos sales de hierro: sulfato ferroso y nitrato férrico como fuentes de Fe^{2+} y Fe^{3+} , respectivamente. Aunque el uso de una sal de hierro u otra parezca indistinto en el ciclo de foto-Fenton ya que se trata de reacciones en las que el hierro pasa de una forma a otra siempre que no exista limitación de H_2O_2 ni de luz solar, se pueden observar diferencias entre ambas con respecto a la eficiencia del proceso de inactivación fúngica.

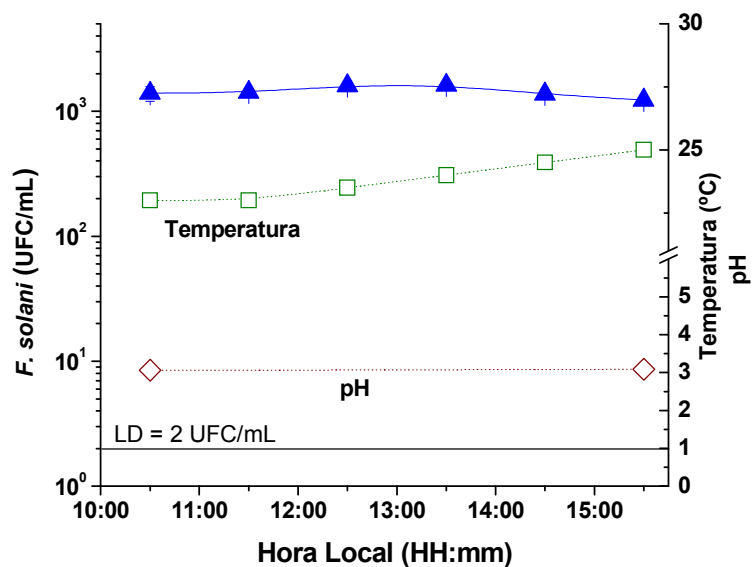
5.1. Efecto del pH en el proceso foto-Fenton solar, H_2O_2 /Solar y foto-inactivación solar en la inactivación de microconidios de *F. solani*

5.1.1. Influencia del proceso de Fenton en la viabilidad fúngica

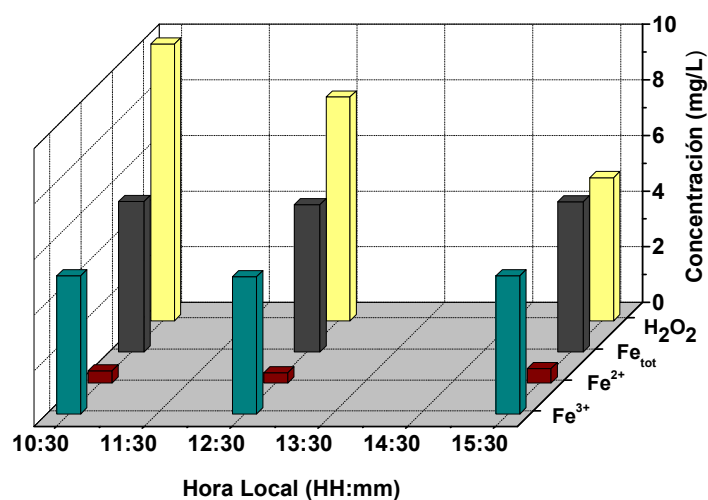
Inicialmente y con objeto de conocer el impacto de los reactivos utilizados en el proceso foto-Fenton sobre la viabilidad de las esporas de *F. solani*, se realizó un estudio en oscuridad y bajo las mismas condiciones químicas que las utilizadas con radiación solar natural (proceso Fenton). Se utilizaron 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 y el pH de la solución se ajustó a 3. El agua utilizada fue agua simulada de salida de EDAR.

Las esporas en estas condiciones se mantuvieron durante 5 h en oscuridad y se tomaron muestras cada hora para evaluar todos los parámetros (concentración de esporas viables, pH, temperatura, oxígeno disuelto, concentración de hierro disuelto, de peróxido de hidrógeno y de carbono orgánico disuelto). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.1.a. La concentración inicial de microconidios (10^3 UFC/mL) se mantuvo constante durante todo el tratamiento demostrando que la reacción de Fenton en oscuridad no produce un efecto negativo en la viabilidad de la espora, ni tampoco el pH ácido del agua ni la temperatura, la cual se mantuvo entre 23 °C y 25 °C. La viabilidad fúngica no se ve afectada por temperaturas inferiores a 40 °C [Bollen, 1969], por tanto, se descarta la inactivación térmica de las esporas durante los experimentos solares.

El pH del agua se mantuvo constante durante el periodo experimental en un valor de 3. El OD permaneció invariable durante el tratamiento, descendiendo ligeramente desde 7,3 a 7,1 mg/L. El COD descendió un 8 %, desde 26,0 ($\pm 0,5$) mg/L a 23,9 ($\pm 0,7$) mg/L.



a)



b)

Figura 5.1. a) Concentración de microconidios de *F. solani* en agua simulada de salida de EDAR en oscuridad durante 5 h de tratamiento Fenton con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 (—▲—). LD = 2 UFC/mL. **b)** Evolución de la concentración de H_2O_2 , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe^T durante el experimento.

Las concentraciones de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^T y H_2O_2 medidos a lo largo del experimento se muestran en la figura 5.1.b. El hierro disuelto total (Fe^T) medido fue de 5 mg/L (la concentración añadida inicialmente) y se mantuvo estable y en disolución durante las 5 h del ensayo, durante las que se consumieron 4,8 mg/L de H_2O_2 . Este resultado muestra que los radicales hidroxilo generados durante las reacciones de Fenton (Ecuación 1.11-1.19) no son efectivos a la hora de inactivar los microconidios de *F. solani*. La principal reacción del proceso Fenton involucrada en la generación de $\text{OH}^\bullet$

es la reacción 1.11, donde el Fe^{2+} reacciona con el H_2O_2 y es rápidamente oxidado a Fe^{3+} . Esta rápida reacción aumenta la concentración de Fe^{3+} en el agua y es responsable del rápido consumo de los $\text{OH}^\bullet$ durante el proceso. Esto justifica que la mayor parte del Fe^T medido en el agua se encuentre en forma Fe^{3+} (Figura 5.1.b). La ausencia de luz limita la regeneración del hierro a la forma Fe^{2+} (Reacción 1.20). Puesto que las concentraciones de hierro empleadas en los tratamientos de desinfección deben ser muy pequeñas, el ciclo de reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} catalizado por la radiación, resulta imprescindible para obtener una adecuada eficiencia en la inactivación. Por esta razón, el proceso Fenton no resulta apropiado como método de desinfección a concentraciones de hierro y H_2O_2 tan bajas. Sin embargo, la reacción de Fenton es ampliamente utilizada en la degradación de contaminantes orgánicos con altas concentraciones de Fe^{2+} , así como a altas temperaturas y en ocasiones en sistemas a presión.

5.1.2. Influencia del pH en la foto-inactivación solar

Como parte de este estudio, se hacen ensayos de control de foto-inactivación solar de las esporas en agua para los pHs a los que se llevarán a cabo los experimentos de foto-Fenton solar. El efecto del pH en la inactivación de microconidios de *F. solani* mediante foto-inactivación solar no se conocía con anterioridad. Los experimentos se hicieron al pH natural del agua simulada de salida de EDAR, pH 8 y a dos valores de pH ácido (pH 3 y 4).

Como se puede observar en la figura 5.2, la radiación solar provocó un efecto muy similar para los tres valores de pH con una reducción parcial de la concentración de esporas. Ésta disminuyó de 1000 UFC/mL a 134(± 5) UFC/mL, a 111(± 17) UFC/mL y a 152(± 13) UFC/mL, tras 5 h de exposición solar con 21,1 kJ/L de Q_{UV} para los casos de pH 3, 4 y 8, respectivamente.

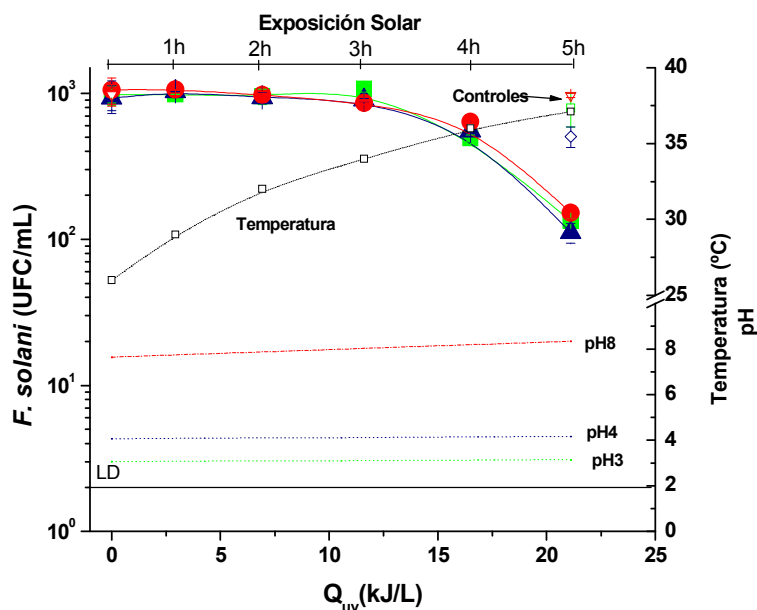


Figura 5.2. Inactivación de microconidios de *F. solani* en agua simulada de salida de EDAR por foto-inactivación solar a pH 3 (—■—), pH 4 (—▲—) y pH 8 (—●—) en función de Q_{UV} . Las líneas discontinuas muestran la temperatura a cada pH. LD = 2 UFC/mL.

El COD permaneció sin cambios en estos experimentos, tal y como era de esperar. Los valores de los principales parámetros seguidos durante el proceso se presentan en la tabla 5.1. La temperatura más alta alcanzada durante el tiempo experimental fue 37,6 °C y el pH se mantuvo constante.

Tabla 5.1. Valores medidos de pH, OD y COD inicial (i) y final (f) en los experimentos de foto-inactivación solar a diferentes valores de pH y Q_{UV} .

	pH _i	pH _f	COD _i , mg/L	COD _f , mg/L	OD _i , mg/L	OD _f , mg/L	Q_{UV} , kJ/L	LD
pH8	7,8	8,3	26,5±0,1	26,6±0,1	6,9	6,9	21,1	NO
pH4	4,1	4,2	26,5±0,1	26,5±0,1	6,7	7,1	21,1	NO
pH3	3,1	3,1	26,5±0,1	26,6±0,1	6,8	7,2	21,1	NO

LD indica si en el experimento se alcanzó (SI) o no (NO) el límite de detección

Cabe destacar que estas esporas son muy resistentes a valores de pH ácidos (por ejemplo, permanecen cultivables a valores de pH cercanos a 2 y condiciones de alta salinidad), así como al cloro e incluso a la radiación UV-C [Sichel y cols., 2009]. El efecto del pH 3 por sí solo no compromete la viabilidad de las esporas tras 5 h en oscuridad (Figura 5.1). Por tanto, se puede concluir que la inactivación fúngica bajo

radiación solar natural se debe solamente al efecto sinérgico entre la temperatura y la radiación solar.

Como se ha ido observando en este trabajo, la inactivación de las esporas del género *Fusarium* es menos eficiente cuando se utiliza el reactor de botella en los experimentos de foto-inactivación solar. Sichel y cols. describieron el proceso de foto-inactivación solar de las esporas de diferentes especies del género *Fusarium*; encontraron que los resultados de inactivación estaban fuertemente influenciados por la dosis de luz solar acumulada durante el experimento, y demostraron que para alcanzar el límite de detección en agua destilada era necesaria una dosis UV solar de 8 kJ/L [Sichel y cols., 2007a; Sichel y cols., 2007b]. Sin embargo, en nuestros resultados experimentales con agua simulada de efluente de EDAR no se alcanza el LD incluso con dosis de radiación UV-A solar acumulada más altas. Esto podría deberse a que en agua destilada las esporas están sometidas a un mayor estrés osmótico que las puede hacer más sensibles al efecto de la radiación que en un agua rica en iones y nutrientes como el agua simulada de salida de EDAR.

5.1.3. Influencia del pH en el tratamiento H_2O_2 /Solar

Los valores de pH estudiados fueron 3, 4 y 8. Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 5.3 y la tabla 5.2. Se observa una ligera tendencia a mejorar el perfil de inactivación a medida que baja el pH de 8 a 3. A pH 3 se produce una bajada en la concentración de esporas viables de *F. solani* desde de 936($\pm$ 194) UFC/mL hasta el LD tras recibir una energía acumulada de 11,9 kJ/L. En este caso se consumieron 3 mg/L de H_2O_2 . La dosis de energía UV-A acumulada en el reactor requerida para alcanzar el LD aumentó a 16,9 kJ/L en el caso del pH 4 y pH 8, y se consumieron, 2,3 y 1,9 mg/L de H_2O_2 respectivamente.

Independientemente del pH inicial, el COD permaneció prácticamente sin cambios tras 5 h de tratamiento así como el valor del pH. La temperatura aumentó de 26 °C a 38,4 °C. Dado que la viabilidad de las esporas de *Fusarium* spp. no se ve afectada por la temperatura a valores inferiores a 40 °C [Shlevin y cols., 2004; Sichel y cols., 2007a] y las temperaturas más altas se alcanzaron una vez que las esporas ya habían sido inactivadas, se puede descartar el efecto térmico como factor responsable de la inactivación fúngica.

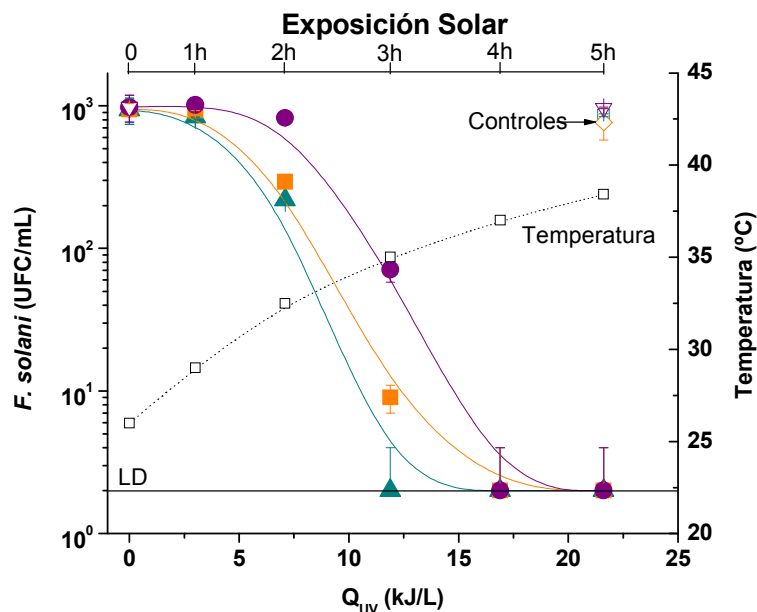


Figura 5.3. Inactivación de esporas de *F. solani* bajo radiación solar natural con 10 mg/L de H_2O_2 a pH 3 (—▲—), pH 4 (—■—) y pH 8 (—●—) en agua simulada de salida de EDAR en función de Q_{UV} . La línea discontinua muestra la temperatura. LD = 2 UFC/mL.

Tabla 5.2. Valores medidos de pH, OD y COD inicial (i) y final (f) en los experimentos de H_2O_2 /Solar a diferentes valores de pH y Q_{UV} .

	pH _i	pH _f	COD _i , mg/L	COD _f , mg/L	OD _i , mg/L	OD _f , mg/L	Q_{UV} , kJ/L	LD
pH8	8,2	8,5	26,6±0,4	27,1±0,5	7,1	7,1	16,9	SI
pH4	3,8	3,9	23,6±0,1	22,8±1,2	7,3	7,2	16,9	SI
pH3	3,1	3,1	24,0±0,1	23,4±0,9	7,3	6,3	11,9	SI

LD indica si en el experimento se alcanzó (SI) o no (NO) el límite de detección

A pH 3 la inactivación fúngica es más eficiente en el tratamiento H_2O_2 /Solar. La evolución de la concentración de H_2O_2 durante la inactivación de las esporas al pH natural del agua (pH 8) es inferior que a pH 3 aunque requiere una dosis UV-A superior.

El efecto bactericida de este tratamiento ha sido demostrado para otros microorganismos tales como *E. coli* [Hartman y Eisenstark, 1978; Imlay y cols., 2008; Sphuler y cols., 2010] y más recientemente en *Salmonella* sp. [Sciacca y cols., 2010]. Las principales vías de inactivación se producen por la generación de ROS que producen mutaciones en el ADN debido a (i) la acción directa de la radiación solar, (ii) la generación de radicales hidroxilo vía reacciones foto-Fenton interno gracias a la difusión del H_2O_2 al interior celular y su interacción con el hierro presente de forma natural en la célula y (iii) la inactivación de la maquinaria enzimática de defensa contra ROS como

son las enzimas catalasa y SOD [Imlay, 2008; Sphuler y cols., 2010]. Este proceso de inactivación se describe en detalle en el Capítulo 4, sección 4.2.

La velocidad de descomposición del H_2O_2 se ve afectada por diferentes factores como la temperatura, irradiancia UV-A, la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos y el pH de la solución [Jones, 1999]. Como todos los experimentos de desinfección con H_2O_2 /Solar se realizaron de manera simultánea, el único factor variable entre todos ellos es el pH, ya que tanto la temperatura como la dosis de radiación UV-A solar fueron idénticas. La descomposición del H_2O_2 en agua no se ve afectada por los cambios de pH en el rango de valores de 1 a 9 [Liao y cols., 2001], por lo tanto, las diferencias en el consumo de H_2O_2 registrados en el intervalo de pH 3-8 puede no estar relacionado con el pH. Sin embargo, el pH inicial puede afectar a la composición química del agua y, en consecuencia, a la descomposición del peróxido de hidrógeno por sus reacciones con los compuestos presentes. Por ejemplo, el H_2O_2 puede reaccionar con especies químicas como los carbonatos en condiciones alcalinas de acuerdo con la reacción 5.1 [Liao y cols., 2001]:



Esta reacción es probable a pH 8. Sin embargo, a pH ácido (3 ó 4), el equilibrio del carbono inorgánico en el agua se desplaza hacia la formación de CO_2 , que se escapa del sistema en forma de gas. Además de la presencia de carbonatos y bicarbonatos, el agua contiene otros aniones tales como sulfatos, nitratos, cloruros y fosfatos que parcialmente podrían reaccionar con el H_2O_2 , lo que explicaría las discrepancias en su consumo durante el tratamiento solar a diferentes valores de pH.

Otro efecto que puede tener el pH en el sistema estudiado es su influencia sobre la espora, por ejemplo sobre la germinación. El crecimiento y germinación de las esporas del género *Fusarium* se ven favorecidos a pH ácido. De hecho, el medio de cultivo utilizado para la cuantificación de las esporas durante los tratamientos se acidifica hasta un pH 4 o inferior (Capítulo 2, Sección 2.2.1). Por ello, es probable que en los ensayos a pH 3 y 4 se active la germinación de las esporas de forma temprana. Puede ocurrir (i) la germinación precoz, permitiendo una difusión temprana del H_2O_2 al interior de la espora, y (ii) una acidificación del pH interno de las esporas (pH 6-7) [Chitarra y cols., 2005] al entrar agua del exterior con la consiguiente formación de

radicales hidroxilo por reacciones de foto-Fenton interno. Ambos efectos podrían explicar la mayor eficiencia del proceso a pH 3, seguida por pH 4 y finalmente pH 8.

5.1.4. Influencia del pH en el foto-Fenton solar

La figura 5.4.a muestra el efecto del pH (3, 4, 5 y 8) en la inactivación de esporas de *F. solani* durante el proceso foto-Fenton solar con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 . Las figuras 5.4.b-c-d-e muestran la evolución de las concentraciones de hierro y H_2O_2 durante los tratamientos fotocatalíticos. No se han realizado experimentos específicos a pH 5 de los tratamientos de H_2O_2 /Solar y foto-inactivación solar porque este pH no afecta negativamente ni a la química del proceso ni al microorganismo. Obviamente este pH si debe tenerse en cuenta en el estudio experimental de foto-Fenton solar. En todos los casos, excepto a pH 8, se alcanzó el límite de detección en menos de 5 h de tratamiento. La tabla 5.3 resume los principales parámetros medidos durante el tratamiento de foto-Fenton solar en cada caso.

5.1.4.1. Foto-Fenton solar a pH 8

La concentración de microconidios de *F. solani* durante el foto-Fenton solar a pH 8 descendió desde 1060($\pm$ 120) UFC/mL al límite de detección (2 UFC/mL) con un Q_{UV} de 21,1 kJ/L (Figura 5.4.a). Aunque la concentración de sulfato ferroso añadido a la solución fue de 5 mg/L inicialmente, la concentración de Fe^T disuelto medida fue de tan solo 0,8 mg/L como muestra la figura 5.4.b. Esta pérdida se debe a la precipitación del hierro por la formación de hidróxidos férricos debido al pH ligeramente alcalino [Pignatello y cols., 2006]. La concentración de H_2O_2 consumido tras 5 h de tratamiento es de 7,7 mg/L y la temperatura máxima alcanzada durante el proceso fue de 36,2 °C. El COD varió ligeramente, de 25,2($\pm$ 0,1) mg/L a 22,3($\pm$ 0,3) mg/L, lo cual supone aproximadamente un 12 % de mineralización.

5.1.4.2. Foto-Fenton solar a pH 5

Para este caso, el límite de detección se alcanzó tras 4 h de exposición solar, con una concentración inicial de 1060($\pm$ 70) UFC/mL y una energía UV-A acumulada de 19,3 kJ/L (Figura 5.4.a). La figura 5.4.c muestra que el H_2O_2 se consume prácticamente en su totalidad durante las dos primeras horas de tratamiento. La concentración inicial de Fe^T disuelto en el agua a este pH es 2,9 mg/L, superior al medido a pH 8 (Figura 5.4.b). Al final del tratamiento, todo el hierro disuelto se encuentra en forma de

Fe^{2+} . Esto se debe al consumo total del H_2O_2 en las primeras etapas del proceso limitándose el ciclo catalítico de foto-Fenton de acuerdo con la reacción 1.11. Todo el hierro en forma de Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} en presencia de radiación solar (Reacción 1.20). La temperatura máxima fue 35 °C, el pH varía de 4,9 a 4,4 y el COD desciende de 25,5($\pm$ 0,5) mg/L a 20,9($\pm$ 0,5) mg/L, lo que corresponde a una reducción del 18 %.

5.1.4.3. Foto-Fenton solar a pH 4

La figura 5.4.a muestra una inactivación completa de esporas mediante foto-Fenton a pH 4, desde 930($\pm$ 170) UFC/ml hasta alcanzar el límite de detección con 17,4 kJ/L de Q_{UV} . En la figura 5.4.d se muestra como el Fe^T disuelto inicialmente medido en el agua es de 4,6 mg/L, y el H_2O_2 desaparece en las 2 primeras horas de tratamiento solar. La concentración de Fe^{3+} disminuye durante las últimas 3 h debido a su reducción a Fe^{2+} cuando el H_2O_2 ya no está presente en el medio al igual que ocurre a pH 5. En estas condiciones, la inactivación se produce más rápidamente que a pH 5 y 8. El COD descendió de un valor de 27,1($\pm$ 0,5) mg/L a 21,9($\pm$ 0,8) mg/L al final del experimento, lo que significa un 19 % de reducción.

5.1.4.4. Foto-Fenton solar a pH 3

La reacción de foto-Fenton solar a pH 3 muestra un descenso de la concentración de esporas desde 1000($\pm$ 200) UFC/mL al LD tras 4 h de exposición solar con 17,1 kJ/L de Q_{UV} . Aunque el perfil de inactivación observado a pH 3 es similar al de pH 4, el primero muestra una reducción sustancialmente mayor del COD, de 27($\pm$ 1) mg/L a 17($\pm$ 2) mg/L, un 35 % de reducción. Este resultado se atribuye a la elevada concentración de hierro disuelto durante el experimento a pH 3 (Figura 5.4.e). El H_2O_2 se consume totalmente durante las dos primeras horas del experimento, por tanto, la mayor parte de la mineralización ocurre en los primeros estadios del proceso. La concentración inicial de Fe^T se mantiene constante durante el experimento a pH 3, a diferencia de a pH 4 y superiores.

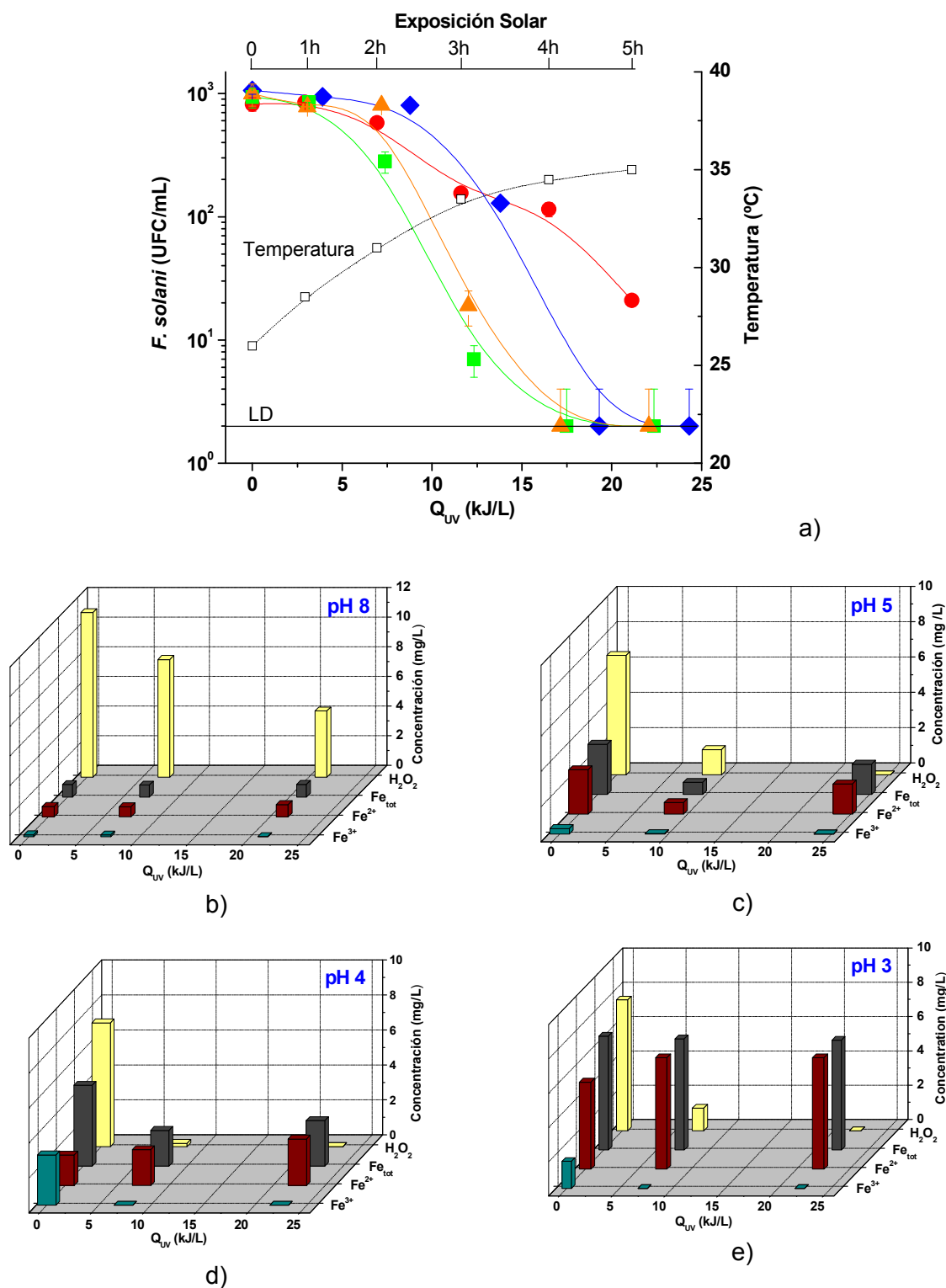


Figura 5.4. a) Inactivación de microconidios de *F. solani* durante el tratamiento de foto-Fenton solar con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 en agua simulada de salida de EDAR a pH 3 (—▲—), pH 4 (—■—), pH 5 (—◆—) y pH 8 (—●—), en función de Q_{UV} . La línea discontinua muestra la evolución de la temperatura. LD = 2 UFC/mL. **b)** Evolución de la concentración de H_2O_2 , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe^T durante los experimentos a pH 8; **c)** pH 5; **d)** pH 4 y **e)** pH 3.

Tabla 5.3. Valores medidos de pH, OD y COD inicial (i) y final (f) en los experimentos de foto-Fenton solar (5 mg/L Fe^{2+} - 10 mg/L H_2O_2) a diferentes valores de pH y Q_{UV} .

	pH _i	pH _f	COD _i , mg/L	COD _f , mg/L	Reducción COD (%)	OD _i , mg/L	OD _f , mg/L	Q_{UV} , kJ/L	LD
pH8	7,3	8,2	25,2±0,1	22,3±0,3	11,8	7,30	6,32	21,1	NO
pH5	4,9	4,4	25,5±0,5	21,0±0,5	17,8	7,30	6,87	19,3	SI
pH4	4,0	3,9	27,0±0,5	22,0±0,5	19,0	7,33	6,85	17,4	SI
pH3	3,1	3,2	26,5±0,1	17,0±2,0	35,5	7,03	6,55	17,1	SI

LD indica si en el experimento se alcanzó (SI) ó no (NO) el límite de detección

La generación de radicales hidroxilo aumenta cuando el Fe^T se disuelve en su totalidad, de modo que a igual concentración inicial, la mayor velocidad de reacción se obtiene cuando la concentración de hierro disuelto es mayor. La solubilidad del hierro en agua depende del pH del medio acuoso, y en el caso del proceso de foto-Fenton el pH más apropiado es 2,8 [Pignatello y cols., 2006].

Otro factor que afecta negativamente a la eficiencia fotocatalítica es la presencia de especies químicas inorgánicas tales como carbonatos y bicarbonatos, ya que estas especies actúan como “scavengers” o secuestradores de $\text{OH}^\bullet$ de acuerdo con las ecuaciones 3.2-3.3 [Jones, 1999; Klamerth y cols., 2010].

En algunas ocasiones la presencia de materia orgánica puede tener un efecto positivo en la cinética de inactivación microbiana. De acuerdo con Spuhler y cols. la presencia de resorcinol durante la reacción de foto-Fenton mejora el proceso de inactivación de *E. coli*. Estos autores sugieren que la presencia de complejos foto-activos que se forman entre el resorcinol y el Fe^{3+} o Fe^{2+} pueden favorecer el proceso de inactivación [Spuhler y cols., 2010]. Algunos compuestos orgánicos generan ácidos carboxílicos y dicarboxílicos que forman complejos con el hierro dando lugar a radicales ligando [Pignatello y cols., 2006; Malato y cols., 2009; Spuhler y cols., 2010]. Además, tanto el Fe^{2+} como otros radicales pueden reaccionar con el O_2 formando nuevas ROS. Estos mecanismos pueden ser especialmente interesantes a pH superior a 3, donde el Fe^{3+} tiende a precipitar, y los complejos orgánicos formados con el Fe^{3+} juegan un papel importante en la eficiencia del sistema de foto-Fenton a un pH cercano a la neutralidad [Spuhler y cols., 2010]. Por otro lado, la materia orgánica presente también puede reaccionar con los $\text{OH}^\bullet$ generados y establecer una relación de competencia por los mismos frente a las esporas fúngicas.

Aunque la materia orgánica natural puede beneficiar el proceso de foto-Fenton para la desinfección, esto ocurre en presencia de ciertas moléculas como ácido oxálico, ácidos carboxílicos y otros intermediarios. El agua simulada de salida de EDAR utilizada

en este estudio no contiene este tipo de compuestos y, por tanto, en nuestro caso no se espera un efecto positivo en la cinética de inactivación microbiana ni que la materia orgánica juegue un papel principal en el proceso. De hecho, los mejores resultados de desinfección fúngica mediante foto-Fenton solar se observan a un pH cercano al óptimo (2,8), a pH 3 y 4 (Figura 5.4.a).

Aunque no se ha demostrado experimentalmente que la principal causa de inactivación de microorganismos mediante foto-Fenton es la generación de radicales hidroxilo, por su conocida capacidad de degradar compuestos orgánicos se admite que, en el proceso de inactivación, los componentes orgánicos de la pared celular son susceptibles de ataque oxidativo y se genera la muerte celular. Obviamente, cuanto más favorecida está la formación de estos radicales más rápida será la oxidación de compuestos orgánicos y, por extensión, la inactivación microbiana.

El patrón de inactivación obtenido en el proceso foto-Fenton solar (Figura 5.4.a) muestra dos fases bien diferenciadas. La fase 1 corresponde al inicio del tratamiento (aproximadamente hasta los 5 kJ/L); durante esta fase y debido a la alta constante de la ecuación 1.11, el H_2O_2 se consume muy rápidamente a pH ácido (Figura 5.4.c, d y e) por lo que la formación de $\text{OH}^\bullet$ está garantizada (Figura 5.5). Por otra parte, si nos centramos en los resultados de reducción de COD, es evidente que la mayor eficiencia ocurrió a pH 3. Esto se debe a que el H_2O_2 se utiliza en primer lugar en la degradación del carbono orgánico presente en el medio acuoso, por lo que la posibilidad de difusión al interior de la espora puede estar limitada. Por lo tanto, en la fase 1 el principal daño generado por los $\text{OH}^\bullet$ se produce sobre la pared externa de la espora durante las primeras 2 h de exposición solar. La fase 2 comienza tras la segunda hora de exposición solar (Figura 5.4.a) hasta el final del experimento. Esta fase se caracteriza por el descenso exponencial de la concentración fúngica, durante la cual no queda H_2O_2 para la reacción de foto-Fenton. Por tanto, en esta fase el Fe^{3+} está totalmente reducido a Fe^{2+} (Figura 5.4.c-d-e).

Los buenos resultados de inactivación de esporas observados en esta fase son consecuencia de los daños producidos durante la fase 1. De forma general los procesos de desinfección solar (foto-inactivación solar, fotocátalisis con TiO_2 y H_2O_2 /Solar) producen daños que se van acumulando en los microorganismos de modo que la muerte se produce o se observa tras un determinado periodo de tiempo. Este periodo varía en función de la agresividad del tratamiento y de los lugares de la célula o espora afectada. No obstante, durante la fase 2 puede ocurrir otro efecto importante que es la difusión del Fe^{2+} al interior celular [Imlay y Linn, 1988b; Tyrrell y cols., 2000] y la generación de radicales hidroxilo que producen daños internos vía reacciones de foto-

Fenton con el H_2O_2 presente en el interior de la célula [Spuhler y cols., 2010]. Además, en este proceso también influyen los daños provocados por las ROS generadas durante el proceso de foto-inactivación solar.

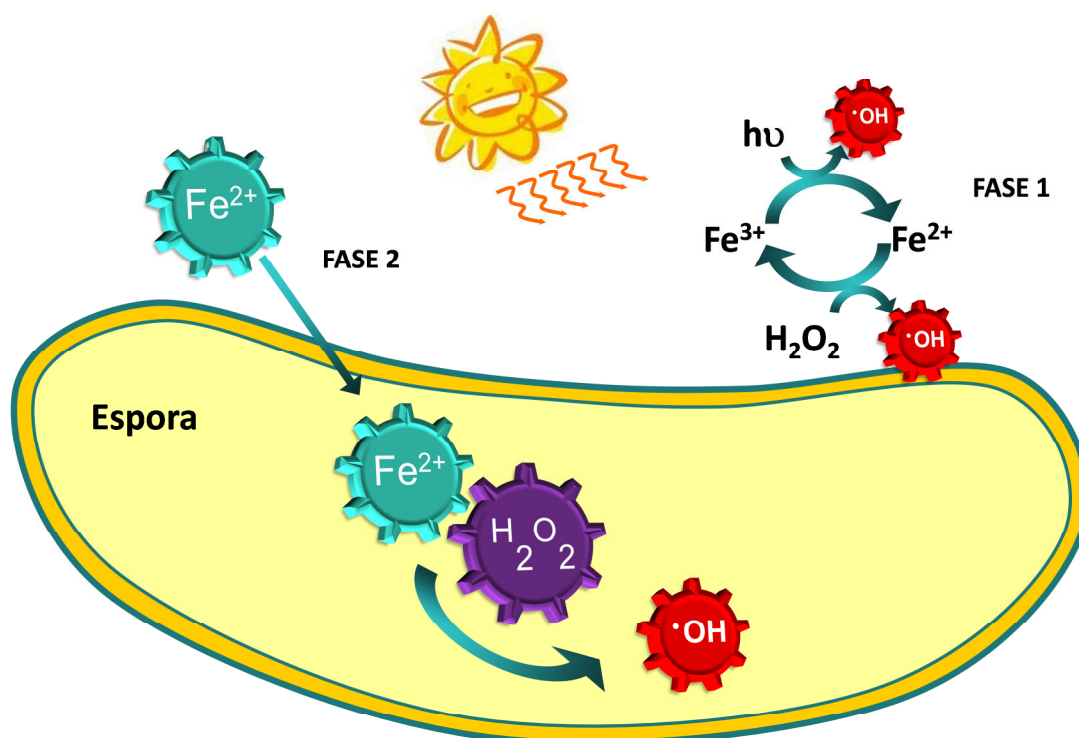


Figura 5.5. Diagrama de las dos fases en las que se produce la inactivación fúngica observada en la figura 5.4.a durante el tratamiento de foto-Fenton solar. La fase 1 representa la formación de radicales hidroxilo en el medio externo; y la fase 2 representa la difusión del Fe^{2+} al interior celular y su posterior reacción con el H_2O_2 metabólico generando a su vez $\text{OH}^\bullet$.

5.1.5. Influencia de la concentración de reactivos en el foto-Fenton solar

Para evaluar el efecto del aumento en la concentración de reactivos (hierro y peróxido de hidrógeno) sobre el rendimiento del proceso de foto-Fenton solar, se realizaron experimentos con una concentración de 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 a pH 3, 4 y 5. Los resultados obtenidos durante estos ensayos se resumen en la figura 5.6 y en la tabla 5.4. Este aumento en las concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno tiene un efecto benéfico en la reducción del COD, ya que aumenta hasta un 76 % en 5 h de tratamiento a pH 3 frente al 35 % obtenido a concentraciones más bajas. Sin embargo, desde el punto de vista de inactivación fúngica, el tratamiento no es efectivo ya que la concentración de esporas se mantiene casi constante al final del tratamiento. Una competencia por los radicales hidroxilo entre los compuestos orgánicos

y las esporas explicaría que el proceso de desinfección sea más lento y aumente la reducción del COD. Por tanto, un aumento en la producción de radicales hidroxilo no mejora el proceso de inactivación en presencia de cierta concentración de compuestos orgánicos.

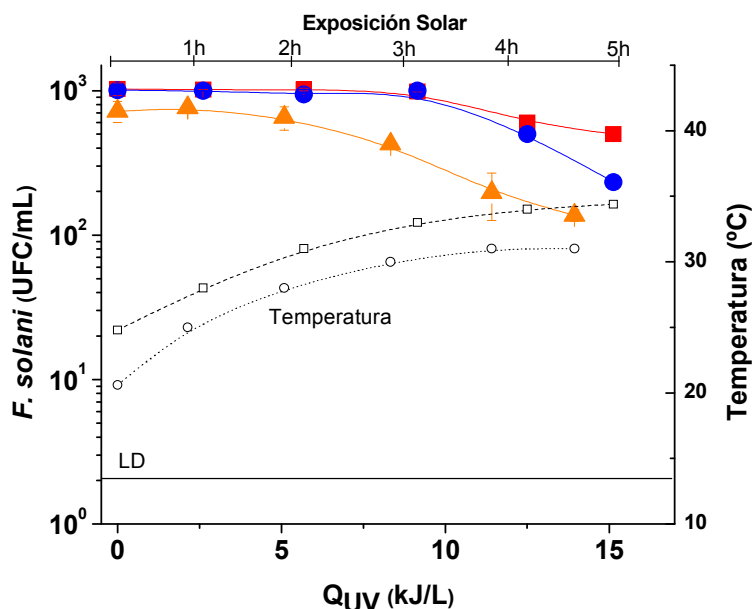


Figura 5.6. Inactivación de microconidios de *F. solani* con tratamiento de foto-Fenton solar (10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2) en agua simulada de salida de EDAR a pH 5 (—■—), pH 4 (—●—) y pH 3 (—▲—) en función de Q_{UV} . Las líneas discontinuas muestran la evolución de la temperatura en el experimento de pH 5 y pH 4 (··□··) y pH 3 (··○··). LD = 2 UFC/mL.

Tabla 5.4. Valores medidos de pH, OD y COD inicial (i) y final (f) en los experimentos de foto-Fenton solar con 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 a diferentes valores de pH y Q_{UV} .

	pH _i	pH _f	COD _i , mg/L	COD _f , mg/L	Reducción COD (%)	OD _i , mg/L	OD _f , mg/L	Q_{UV} , kJ/L	LD
pH5	4,9	3,8	26,0±0,5	18,0±0,5	30,2	7,08	7,01	15,1	NO
pH4	4,0	3,6	26,0±0,5	17,0±0,5	34,8	7,13	6,98	15,1	NO
pH3	3,1	3,3	22,5±0,5	5,4±0,5	75,9	6,56	5,88	13,9	NO

LD indica si en el experimento se alcanzó (SI) o no (NO) el límite de detección.

5.1.6. Comparación de H_2O_2 /Solar y foto-Fenton a pH 3

La figura 5.7 muestra una comparativa entre el tratamiento H_2O_2 /Solar (10 mg/L de H_2O_2) y foto-Fenton (5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2) a pH 3 en términos de inactivación de esporas y mineralización del COD. El límite de detección se alcanza en ambos casos, aunque el proceso H_2O_2 /Solar necesitó menos energía UV-A solar

acumulada ($Q_{UV} = 11,9 \text{ kJ/L}$) que el proceso foto-Fenton ($Q_{UV} = 17,1 \text{ kJ/L}$). Por el contrario, este último alcanzó una sustancial reducción del COD del 35 % tras 5 h de tratamiento, mientras que en el tratamiento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$ no se obtuvo mineralización.

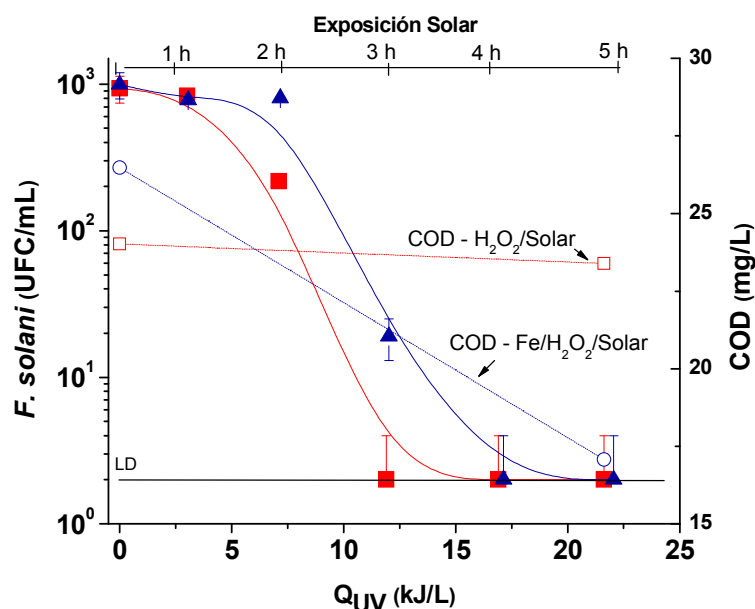


Figura 5.7. Inactivación de microconidios de *F. solani* en agua simulada de salida de EDAR bajo radiación solar natural con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 (—▲—) y sólo 10 mg/L de H_2O_2 (—■—) a pH 3 en función del Q_{UV} . Los símbolos huecos representan la evolución de COD.

Estos resultados destacan la importancia de conocer los mecanismos que se producen durante la inactivación de esporas y la degradación de materia orgánica. En el caso del tratamiento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$, el H_2O_2 penetra y difunde en la célula donde induce reacciones de foto-Fenton interno generando especies reactivas capaces de producir la muerte celular. Mientras que en el caso de foto-Fenton solar, parece que la mayor parte del H_2O_2 genera rápidamente radicales hidroxilo que preferentemente atacan la materia orgánica y, en segundo lugar, a las esporas. Esta competición tiene un efecto que hace que, por un lado se reduzca levemente la eficiencia de inactivación pero por otro lado aumenta el grado de mineralización de la materia orgánica.

Este comportamiento no ha sido descrito previamente, ya que el proceso de foto-Fenton se ha utilizado mayoritariamente para la degradación de compuestos orgánicos y más recientemente en la inactivación de bacterias como *E. coli*. Esta bacteria presenta una menor resistencia a factores de estrés y a condiciones ambientales, por lo que estos efectos no llegan a percibirse de forma clara en los trabajos con *E. coli* debido a su rápida pérdida de viabilidad [Mamane y cols., 2007; García-Fernández y cols., 2012].

5.1.7. Cinéticas de inactivación

Los resultados del ajuste cinético de los datos obtenidos en los experimentos a diferentes pHs y tratamientos se muestran en la tabla 5.5. Se hicieron los cálculos estadísticos para determinar el modelo cinético descrito mediante las ecuaciones 2.17 y 2.18 (Capítulo 2, Sección 2.8.2) que daba el coeficiente de mínimos cuadrados más alto posible en cada curva de inactivación. Como resultado, el modelo de ajuste más apropiado fue distinto para cada caso.

Respecto a los resultados cinéticos de inactivación con foto-inactivación solar, se observa que no existen diferencias significativas entre pH 3, 4 y 8. El mejor modelo de ajuste es el 'log-lineal' precedido por un hombro y seguido de una cola que corresponde a una concentración de esporas "residual" que queda al final del experimento en el que no se alcanza el límite de detección. Como era de esperar, en la foto-inactivación se obtienen constantes de inactivación muy bajas comparadas con las constantes del resto de los tratamientos evaluados.

En el tratamiento H₂O₂/Solar se observa que la constante cinética de inactivación más alta se alcanza al pH más ácido (pH 3), siendo la menor constante la obtenida a pH 4. El modelo utilizado en los resultados de este tratamiento es el modelo log-lineal precedido de un hombro.

Tabla 5.5. Datos cinéticos obtenidos de los experimentos realizados mediante el tratamiento de foto-inactivación solar, H₂O₂/Solar y foto-Fenton en el reactor de botella con agua simulada de salida de EDAR y microconidios de *F. solani*.

H ₂ O ₂	k (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	Log (N _{res})	R ²	Modelo cinético
Foto-inactivación solar					
pH 3	0,08±0,01	1,10±0,30	0,90±0,01	0,97	Hombro + Log lineal + Cola
pH 4	0,09±0,05	1,20±0,50	0,90±0,02	0,95	Hombro + Log lineal + Cola
pH 8	0,07±0,05	0,90±0,50	0,85±0,01	0,92	Hombro + Log lineal + Cola
H₂O₂/Solar					
pH 3	0,30±0,10	1,10±0,70	-	0,96	Hombro + Log lineal
pH 4	0,20±0,02	0,70±0,30	-	0,98	Hombro + Log lineal
pH 8	0,25±0,05	1,90±0,30	-	0,99	Hombro + Log lineal
Foto-Fenton solar (5 mg/L Fe²⁺ - 10 mg/L H₂O₂)					
pH 3	0,25±0,05	1,65±0,50	-	0,98	Hombro + Log lineal
pH 4	0,20±0,05	0,70±0,40	-	0,97	Hombro + Log lineal
pH 5	0,25±0,05	2,20±0,70	-	0,98	Hombro + Log lineal
pH 8	0,08±0,01	0,40±0,20	1,60±0,10	0,97	Hombro + Log lineal + Cola
Foto-Fenton solar (10 mg/L Fe²⁺ - 20 mg/L H₂O₂)					
pH 3	0,08±0,01	0,50±0,20	0,70±0,05	0,98	Hombro + Log lineal + Cola
pH 4	0,10±0,01	1,00±0,10	0,60±0,02	0,99	Hombro + Log lineal + Cola
pH 5	0,05±0,01	0,40±0,10	0,30±0,10	0,98	Hombro + Log lineal + Cola

Las constantes cinéticas obtenidas para el proceso de foto-Fenton solar con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 a los diferentes pH son las más altas de todos los casos analizados. Se observa claramente cómo acidificar el medio mejora el resultado de inactivación, ya que se obtiene un aumento del valor de la constante desde $0,08 \pm 0,01$ L/kJ a pH 8 hasta $0,25 \pm 0,05$ L/kJ en el caso de pH 3.

Por último se observó como incrementar la concentración de reactivos en el tratamiento de foto-Fenton solar no mejora los resultados de inactivación según los valores de las constantes cinéticas obtenidas a cualquiera de los pH evaluados.

5.2. Efecto de los parámetros de operación sobre el foto-Fenton solar en la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

5.2.1. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de zoosporas de *P. capsici*

Previo al estudio de los diferentes tratamientos solares es necesario evaluar el efecto térmico y del pH (especialmente ácido) sobre la viabilidad de las zoosporas de *P. capsici* en agua con el objeto de conocer qué parte de la inactivación observada durante los tratamientos solares será debida al aumento de la temperatura y al pH.

La inactivación térmica de zoosporas de *P. capsici* en agua destilada se evaluó a diferentes temperaturas, 35, 40, 45 y 50 °C. Para ello se realizaron ensayos de 5 h de duración en oscuridad a cada temperatura en el reactor de botella (Figura 5.8) y para lo cual se utilizó un incubador agitador programado a la temperatura requerida. A 35 °C la concentración permanece estable, mientras que a 40 °C decrece casi 0,6 log tras las 5 horas de exposición. La mayor sensibilidad se observa a 45 y 50 °C, donde la concentración medida en la primera hora de tratamiento se reduce de 10^3 UFC/mL al límite de detección.

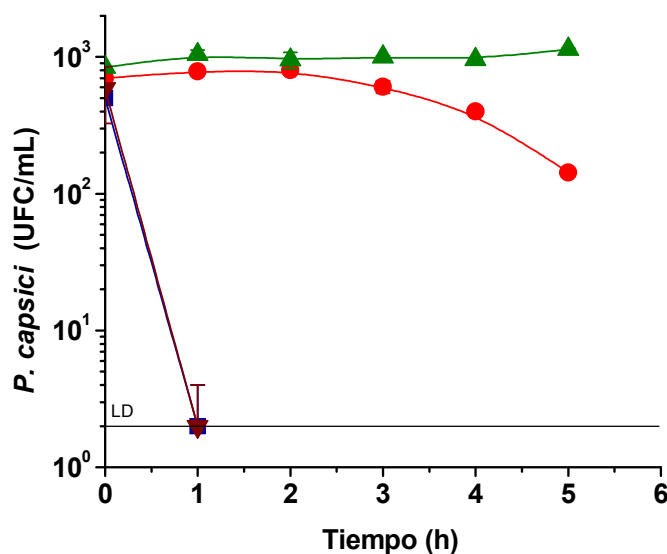


Figura 5.8. Evolución de la concentración de zoosporas de *P. capsici* a 35 °C (▲-), 40 °C (●-), 45 °C (■-) y 50 °C (▼-) durante 5 h en oscuridad. LD= 2 CFU/mL.

Varios autores han descrito resultados similares a los obtenidos aquí con otras especies de *Phytophthora*. Juárez-Palacios y cols. encontraron que un aislado de *P. megasperma* tolerante a altas temperaturas sobrevive 30 minutos a 45 °C; sin embargo, *P. cinnamomi* y otros termotolerantes de *P. megasperma* no sobreviven a 45 °C durante 20 minutos [Juárez-Palacios, 1991]. Bollen indica que diferentes tipos de propágulos tienen diferentes sensibilidades a altas temperaturas. Las oosporas de *P. capsici* son más termotolerantes que el micelio, mientras que las oosporas sobreviven durante 30 minutos a 50 °C, el micelio muere a temperaturas de 42.5 a 45 °C en 30 minutos [Bollen, 1985]. Coelho y cols. describen la inactivación de clamidosporas de *P. Nicotinae* a diferentes temperaturas. Estos autores observan la muerte de esporas a un número constante por unidad de tiempo a temperaturas inferiores a 47 °C; a una temperatura media de 47 °C, una proporción constante de la población muere por unidad de tiempo; y una gran parte de la población se inactiva rápidamente al comienzo de la exposición a temperaturas más elevadas (50-53 °C) [Coelho, 2000]. Los resultados obtenidos con *P. capsici* (Figura 5.8) muestran un patrón similar al descrito por Coelho y cols. En nuestro caso se produce un efecto moderado a 40 °C y fuerte a más de 45 °C. Durante los ensayos realizados para evaluar los tratamientos solares de agua contaminada con *P. capsici* no se alcanzaron temperaturas superiores a 35 °C en ningún caso, por lo que la inactivación térmica se puede descartar como causa de la pérdida de viabilidad de las esporas observada durante estos tratamientos.

5.2.2. Efecto del pH sobre la viabilidad de zoosporas de *P. capsici*

El pH es uno de los parámetros más importantes que influyen en la producción de esporangios y en la germinación, especialmente en las zoosporas ya que son más vulnerables al estrés provocado por el pH que las clamidosporas y oosporas. A diferencia de las esporas mencionadas, las zoosporas móviles no tienen pared celular y las que ya han perdido el flagelo y se han enquistado poseen una pared muy fina [Kong y cols., 2009]. Por ello se estudió la influencia del pH ácido (pH 2, 3 y 4) sobre la viabilidad de zoosporas de *P. capsici* (Figura 5.9). Estos ensayos se realizaron en oscuridad y en reactor de botella. Para acidificar el agua hasta obtener el pH requerido se añadió H_2SO_4 .

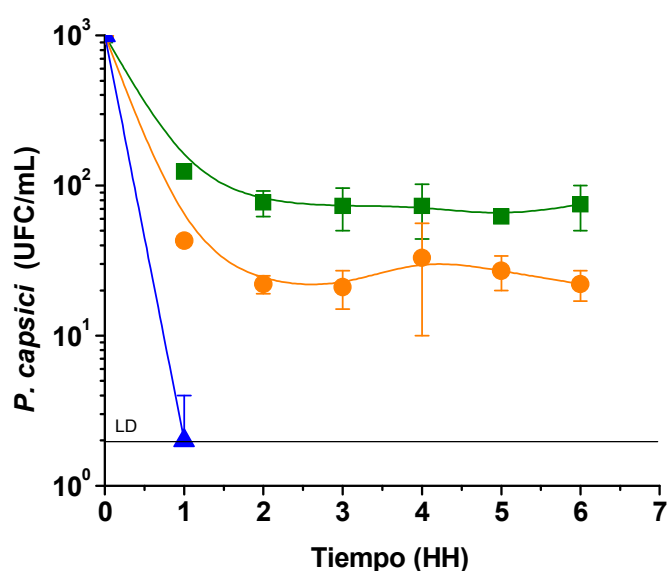


Figura 5.9. Evolución de la concentración de zoosporas de *P. capsici* a pH 2 (-▲-), 3 (-●-) y 4 (-■-) durante 6 h en oscuridad. LD = 2 UFC/mL.

Se observa que la concentración de zoosporas viables desciende a medida que transcurre el tiempo en mayor proporción conforme se acidifica el medio. Este efecto es muy acusado a pH 2, donde la viabilidad de las esporas se reduce de 10³ UFC/mL al límite de detección (2 UFC/mL) en menos de una hora de exposición. A pH 3 la viabilidad se reduce 1,5 log en 2 h, pero permanece constante durante las 3 h restantes del experimento. De la misma manera, a pH 4 la viabilidad desciende de 10³ UFC/mL a 10² UFC/mL en 2 h y se mantiene constante durante las 3 h restantes. En ambos casos, tras una bajada inicial, se mantiene un porcentaje de esporas viables con capacidad de supervivencia de al menos 5 h a esos valores de pH.

Kong y cols. demostraron que bajo condiciones desfavorables, las zoosporas móviles se transforman en quistes o lisan, incluso algunos quistes terminan muriendo por lisis. Estos autores evaluaron el efecto del pH 3 en *P. citrophthora* y *P. megasperma* utilizando como modelo de agua una solución de Hoagland, un fertilizante modelo utilizado en semilleros con una conductividad de 430 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Observaron un rápido enquistamiento de ambas especies seguido de algunas pérdidas por lisis. Los quistes germinaban rápidamente, aunque los tubos germinativos resultantes crecían de forma anormal [Kong y cols., 2009]. Sin embargo, en los experimentos de viabilidad llevados a cabo en este trabajo con zoosporas de *P. capsici* (Figura 5.9) se observa una reducción del 50 % a pH 3. Esta reducción puede deberse a que el medio acuoso utilizado en nuestro estudio es agua destilada en lugar de una solución rica en nutrientes, lo cual produce en las esporas un mayor estrés osmótico y puede generar una mayor pérdida de viabilidad.

Durante los ensayos realizados para evaluar los tratamientos solares de agua contaminada con *P. capsici* no se registraron valores de pH inferiores a 3,5 en ningún caso, por lo que la inactivación debida a pH ácido (lisis) se puede descartar como causa de la pérdida de viabilidad de las esporas observada durante estos tratamientos. Sin embargo, conociendo el posible efecto perjudicial del pH ácido sobre la supervivencia de las zoosporas de *P. capsici*, se mantuvo el reactor de botella en oscuridad durante 20 minutos antes de comenzar cada ensayo como tiempo de adaptación de las esporas a las condiciones del tratamiento. De esta manera, en la concentración inicial de cada ensayo solo se tiene en cuenta la concentración de las esporas que sobreviven. Por otro lado y dado que el posible efecto del pH sobre las esporas que sobreviven es un crecimiento anormal del micelio, este efecto no se tiene en cuenta en nuestro estudio ya que el objetivo de este trabajo experimental es la inactivación de las esporas.

5.2.3. Tratamiento H_2O_2 /Solar para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

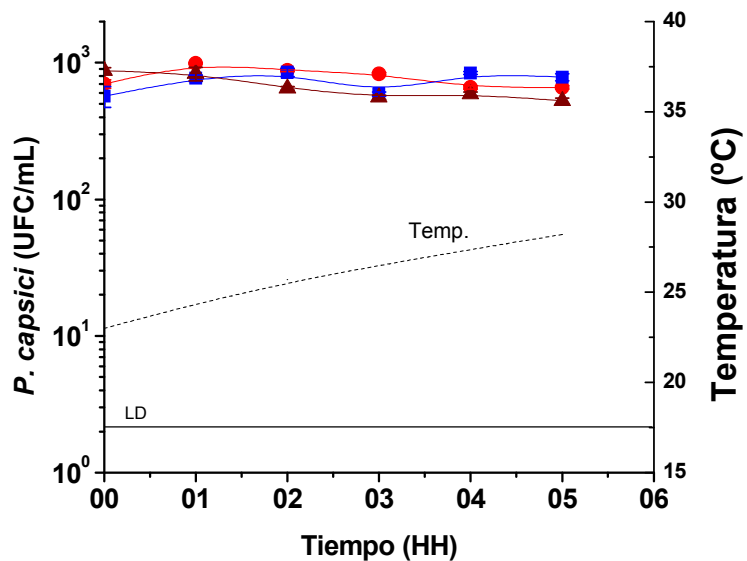
Antes de evaluar la capacidad desinfectante de la radiación solar en presencia de H_2O_2 sobre las esporas de *P. capsici*, se realizaron varios ensayos de viabilidad en presencia sólo de H_2O_2 en oscuridad para descartar el efecto tóxico de las concentraciones utilizadas en este estudio, 2,5, 5 y 10 mg/L (Figura 5.10.a). Se observó que la concentración de zoosporas se mantiene constante durante 5 h para todas las concentraciones de H_2O_2 evaluadas. La temperatura más alta alcanzada fue 28,2 °C y el pH se mantuvo prácticamente constante durante todo el experimento. El descenso de

H₂O₂ fue de 0,6, 0,7 y 0,6 mg/L para los experimentos con 2,5, 5 y 10 mg/L de H₂O₂, respectivamente (Tabla 5.6).

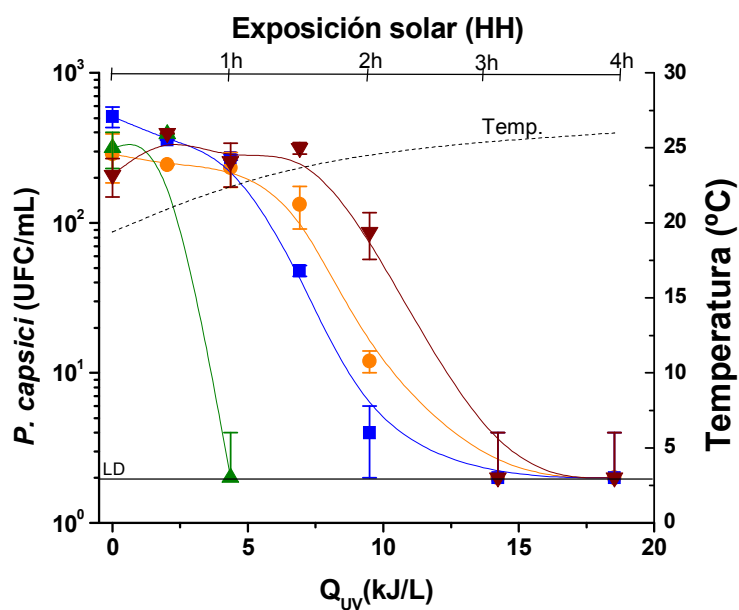
La figura 5.10.b muestra la inactivación de zoosporas con las mismas concentraciones de H₂O₂ (2,5, 5 y 10 mg/L) bajo radiación solar natural durante 4 h de tratamiento. El límite de detección se alcanza en todos los casos partiendo de unas concentraciones iniciales de esporas de 290(±100) UFC/mL, 510(±80) UFC/mL y 320(±90) UFC/mL, respectivamente. Se observa un aumento en la eficacia del proceso a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ y, en todo caso, se mejora el proceso de foto-inactivación solar, que siendo más lento también alcanza el límite de detección con una concentración inicial de 209(±60) UFC/mL. Aunque existen ligeras diferencias en los resultados cinéticos, para los casos de 2,5, 5 mg/L de H₂O₂ y para la foto-inactivación solar se alcanzó el límite de detección tras 3 h de exposición solar, con una energía UV-A solar recibida (Q_{UV}) de 14,2 kJ/L, mientras que para el caso de 10 mg/L de H₂O₂, solo se necesitó una hora de tratamiento, con un valor de Q_{UV} de 4,3 kJ/L. La concentración de H₂O₂ consumido al final del experimento es muy similar en todos los casos, 0,41, 0,31 y 0,52 mg/L de H₂O₂ para las adiciones de 2,5, 5 y 10 mg/L, respectivamente. Este consumo, a su vez, es similar al obtenido en oscuridad aunque los resultados de desinfección son claramente buenos y muestran el efecto sinérgico germicida del peróxido de hidrógeno en presencia de la radiación solar. La temperatura máxima durante estos experimentos fue de 26 °C, y el pH permaneció constante (en torno a 6) (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Valores de pH y temperatura inicial y final, consumo de H₂O₂ durante el tratamiento H₂O₂/Solar y Q_{UV} necesario para alcanzar el LD (2 CFU/mL).

H ₂ O ₂ (mg/L)	pH _i /pH _f	T ^a _{min/ max} (°C)	H ₂ O ₂ (mg/L)	Q_{UV} (kJ/L)	LD
OSCURIDAD					
2,5	6,1/6,1	23,0/27,4	0,6	-	NO
5	6,1/6,3	22,5/28,2	0,7	-	NO
10	6,1/6,2	23,0/28,0	0,6	-	NO
RADIACIÓN SOLAR					
2,5	6,2/6,5	19,4/25,5	0,41	14,2	SI
5	6,3/6,5	19,5/25,9	0,31	14,2	SI
10	6,3/6,4	19,3/26,0	0,52	4,3	SI



a)



b)

Figura 5.10. a) Concentración de zoosporas de *P. capsici* en presencia de 2,5 mg/L (●-), 5 mg/L (■-) y 10 mg/L (▲-) de H_2O_2 durante 5 h en oscuridad. La línea discontinua representa la temperatura. **b)** Inactivación de zoosporas de *P. capsici* en presencia de 2,5 mg/L (●-), 5 mg/L (■-) y 10 mg/L (▲-) de H_2O_2 durante 4 h bajo radiación solar natural y foto-inactivación solar (▼-). La línea discontinua muestra el perfil térmico.

Los mecanismos que explican la inactivación de microorganismos mediante este proceso se describieron en el Capítulo 4. La inactivación se debe principalmente a la formación de radicales hidroxilo dentro de la célula mediante las reacciones Fenton y foto-Fenton producidas por la difusión del H_2O_2 extracelular al interior de la célula reaccionando allí con el hierro intracelular.

El mecanismo de germinación de las zoosporas difiere del proceso de germinación de las esporas de *Fusarium* spp. Estas esporas presentan dos flagelos que les permiten nadar y dispersarse por el medio acuático y se caracterizan por la ausencia de pared celular [Erwin y Ribeiro, 1996]. Tras la adhesión a una superficie y la pérdida del flagelo, se forma rápidamente una pared celular amorfa y las zoosporas pasan a denominarse quistes. Estudios a nivel ultra-estructural de estas zoosporas muestran que las vesículas periféricas de la membrana descargan su contenido y se inicia la formación de una pared celular en 30 segundos tras el enquistamiento. La pared celular se forma por completo en minutos y consiste en una fina pared de microfibrillas entrelazadas y orientadas al azar. Los quistes comienzan a germinar en los 30 minutos siguientes y el tubo germinativo se forma en 2-3 h [Erwin y Ribeiro, 1996]. La concentración de zoosporas comienza a decrecer en la primera hora de tratamiento solar. Por tanto, es posible justificar que en este momento (1 h de tratamiento) las zoosporas inician su proceso de germinación y, por tanto, comienza el influjo de H_2O_2 al interior celular iniciándose el proceso de muerte ya que en este estudio experimental se añadieron las zoosporas al reactor en forma de quistes. De manera que se observa una concordancia entre el tiempo de germinación de la espora enquistada (1 h) y la cinética de inactivación obtenida. Por otro lado, las diferencias de inactivación obtenidas en las concentraciones de H_2O_2 evaluadas (2,5, 5 y 10 mg/L) puede deberse a las diferentes presiones osmóticas generadas a las distintas concentraciones de H_2O_2 , de modo que, en el caso de 10 mg/L, la difusión del H_2O_2 al interior celular es más rápida. Si se tiene en cuenta que el resto de los factores que pueden tener influencia sobre el proceso son iguales en todos los casos, es decir, no se observan diferencias de temperatura, pH, consumo de H_2O_2 o dosis de energía UV-A solar, la diferencia de presión osmótica generada por las distintas concentraciones de H_2O_2 puede explicar la diferente inactivación entre las concentraciones evaluadas.

5.2.4. Tratamiento Fe^{2+} /Solar para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

La figura 5.11.a muestra el efecto en oscuridad de 1, 2,5 y 5 mg/L de Fe^{2+} sobre la viabilidad de zoosporas de *P. capsici* en agua y en reactor de botella de 200 mL. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de estas concentraciones de hierro tan pequeñas no produce efectos negativos sobre la viabilidad de las zoosporas. Se puede observar que la concentración inicial de zoosporas sufre una ligera reducción tras 4 h de tratamiento, obteniéndose el mayor efecto negativo a una concentración de 5 mg/L de Fe^{2+} , donde la pérdida de esporas viables alcanzada es de 0,3 log. En el caso de las concentraciones de 1 y 2,5 mg/L de Fe^{2+} , la concentración de zoosporas se mantiene

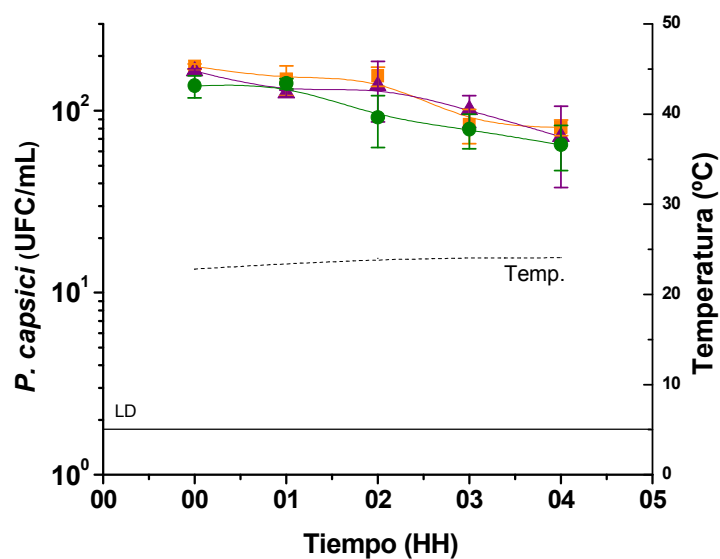
casi constante durante 4 h. La temperatura máxima medida durante estos experimentos fue 24,1 °C. El hierro inicial añadido permanece constante durante todo el tiempo que duró el experimento (Tabla 5.7).

Bajo radiación solar natural y en presencia de Fe^{2+} (Figura 5.11.b) se alcanza el límite de detección en todos los casos y no se observan diferencias significativas entre las concentraciones de hierro evaluadas. La inactivación completa de esporas se alcanza también con foto-inactivación solar con un Q_{UV} de 14 kJ/L, logrando bajar de 367($\pm$ 50) UFC/mL al LD. Mientras que a 1, 2,5, y 5 mg/L de Fe^{2+} se requiere menos energía UV-A, tan solo 11 kJ/L de Q_{UV} para obtener el mismo resultado. Por lo que la adición de Fe^{2+} en pequeñas cantidades acelera de forma considerable la inactivación fúngica.

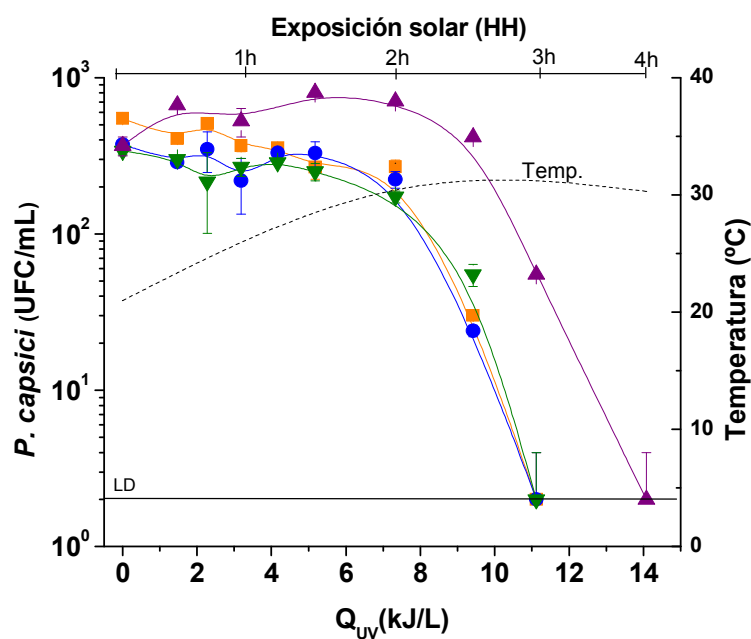
La tabla 5.7 muestra los valores de pH, temperatura y concentraciones de hierro medidas durante el experimento. La temperatura más alta alcanzada fue de 30 °C, y el pH descendió desde 6,17 a 5,46 con 5 mg/L de Fe^{2+} . Un comportamiento similar se observa para el resto de las concentraciones de hierro; mientras que en el ensayo de foto-inactivación solar el pH es constante durante todo el tiempo experimental. El Fe^{2+} inicialmente añadido a la suspensión desciende ligeramente tras 4 h de exposición solar. Todo el hierro disuelto se mantiene en forma de Fe^{2+} , dado que no hay H_2O_2 y, por tanto, no hay reacciones que favorezcan el paso de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Reacción 1.11). Por lo que la formación de $\text{OH}^{\bullet}$ se hallará limitada. No obstante, la inactivación de zoosporas bajo radiación solar natural y Fe^{2+} demuestra que existe un efecto sinérgico entre el Fe^{2+} y la luz solar.

Tabla 5.7. Valores de pH, temperatura inicial (i) y final (f) y medidas de hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^T) durante el tratamiento Fe^{2+} /Solar en el reactor de botella.

Fe^{2+} (mg/L)	pH _i /pH _f	T ^a _{min/max} (°C)	$\text{Fe}^{2+}_i/\text{Fe}^{2+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^{3+}_i/\text{Fe}^{3+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^T_i/\text{Fe}^T_f$ (mg/L)	Q_{UV} (kJ/L)	LD
OSCURIDAD							
1	5,73/5,61	22,4/24,1	1,10/0,95	0,02/0,10	1,12/1,06	-	NO
2,5	5,72/5,39	23,1/23,9	2,43/2,09	0,10/0,47	2,53/2,56	-	NO
5	5,68/5,25	22,7/23,9	4,58/4,48	0,18/0,25	4,76/4,73	-	NO
RADIACIÓN SOLAR							
1	6,33/5,90	21,0/29,4	0,87/0,60	0,07/0,07	0,94/0,68	11	SI
2,5	6,37/5,84	21,0/29,2	1,69/1,34	0,02/0,00	1,72/1,32	11	SI
5	6,17/5,46	22,0/30,0	4,38/4,06	0,05/0,00	4,44/3,92	11	Si



a)



b)

Figura 5.11. a) Viabilidad de zoosporas de *P. capsici* en presencia de 1 mg/L (—■—) 2,5 mg/L (—▲—) y 5 mg/L (—●—) de Fe^{2+} en oscuridad. b) Inactivación de zoosporas de *P. capsici* en presencia de 1 mg/L (—■—), 2,5 mg/L (—●—), y 5 mg/L (—▼—) de Fe^{2+} bajo radiación solar natural y foto-inactivación solar (—▲—). La línea discontinua muestra el perfil térmico.

La inactivación observada se puede explicar por la difusión del Fe^{2+} al interior de las esporas durante la primera hora de exposición solar, dada su capacidad de difundir a través de las membranas celulares [Spuhler y cols., 2010]. Cuando la concentración

interna de hierro aumenta, se pueden generar $\text{OH}^\bullet$ vía reacciones de Fenton interno que tienen lugar en presencia del H_2O_2 intracelular, formado durante el metabolismo aerobio (respiración celular). El hierro por su parte, puede contribuir directa o indirectamente a la oxidación de lípidos, proteínas, azúcares y ADN [Halliwell y Gutteridge, 1984]. La siguiente reacción muestra la interacción del Fe^{2+} con lípidos hidroperóxidos:



Estas reacciones pueden ocurrir en oscuridad, y probablemente explican el ligero descenso de zoosporas observado en la figura 5.11.a. Por otro lado, en presencia de radiación solar, además de producirse reacciones de foto-Fenton y oxidación, también se puede producir el bloqueo y retardo de los sistemas de defensa celulares tales como las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, lo que favorecería aún más el proceso de inactivación. Sin olvidar que la acción directa de la radiación solar también genera ROS que producen daños celulares.

5.2.5. Tratamiento de Fe^{3+} /Solar para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

La figura 5.12.a muestra el descenso de zoosporas de *P. capsici* en oscuridad con 1, 2,5 y 5 mg/L de Fe^{3+} en el reactor de botella. El límite de detección no se alcanza en ninguno de los casos aunque se observa un descenso similar al obtenido para el caso de Fe^{2+} en oscuridad. El mayor descenso observado se produce en el caso de 5 mg/L de Fe^{2+} , correspondiente a 1 log. La temperatura más alta durante el tratamiento fue de 24,9 °C. Si estos resultados se comparan con los del Fe^{2+} , el pH alcanza valores más bajos a iguales concentraciones, 4,27, 4,14 y 3,71 para 1, 2,5 y 5 mg/L de Fe^{3+} , respectivamente (Tabla 5.8). Esta diferencia se debe a que se utilizó nitrato férrico como fuente de Fe^{3+} produciendo una mayor acidificación del medio que el sulfato ferroso utilizado en el caso del Fe^{2+} . Por otro lado, la concentración de hierro que permanece disuelta en el sistema es menor en el caso de Fe^{3+} (~ 1 mg/L) comparada con el Fe^{2+} (Tablas 5.7 y 5.8). Esta diferencia produce diferencias significativas entre ambos sistemas en cuanto a la inactivación de esporas.

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental concuerdan con los descritos por Byrt y cols. Estos autores estudiaron el efecto de diferentes cationes y aniones en el enquistamiento y lisis de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi*. Demostraron que una concentración de 15 μM de Fe^{3+} induce el enquistamiento de las

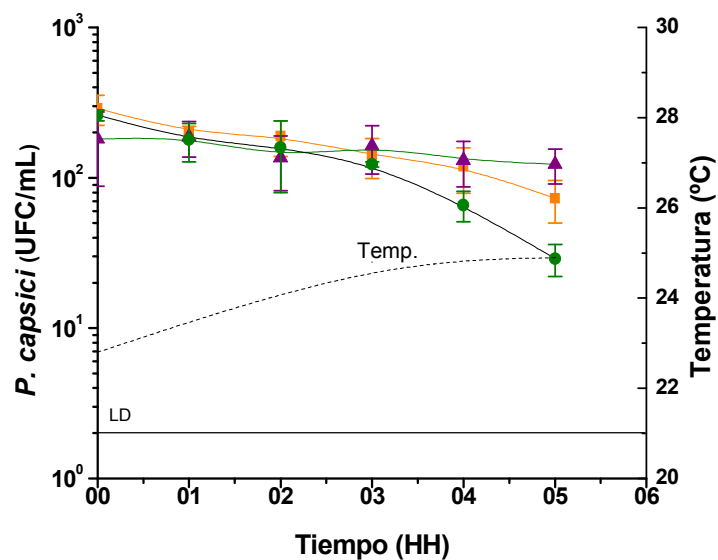
zoosporas y genera una reducción del 20 % en su concentración en tan solo 30 minutos [Byrt y cols., 1982].

La figura 5.12.b muestra la inactivación de zoosporas de *P. capsici* con 1, 2,5 y 5 mg/L de Fe^{3+} bajo radiación solar natural. Se puede observar que el límite de detección se alcanza en todos los casos evaluados. La inactivación más eficiente se observa con 5 mg/L de Fe^{3+} donde se alcanza el LD partiendo de 500($\pm$ 50) UFC/mL con 5,46 kJ/L de Q_{UV} . En el caso de 2,5 mg/L de Fe^{3+} se baja de 470($\pm$ 50) UFC/mL al LD con un Q_{UV} de 6,74 kJ/L. En el experimento con 1 mg/L de Fe^{3+} se obtiene un descenso de esporas desde 490($\pm$ 180) UFC/mL al LD con 12,5 kJ/L. La tabla 5.8 muestra los valores de pH, temperatura y concentraciones de hierro medidos durante el tratamiento. La temperatura más alta alcanzada fue de 32,2 °C. Como se esperaba, a mayor concentración de Fe^{3+} , más ácido fue el pH. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en oscuridad. Al final del experimento con radiación solar natural todo el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} de acuerdo con la reacción 1.20 generando radicales hidroxilo.

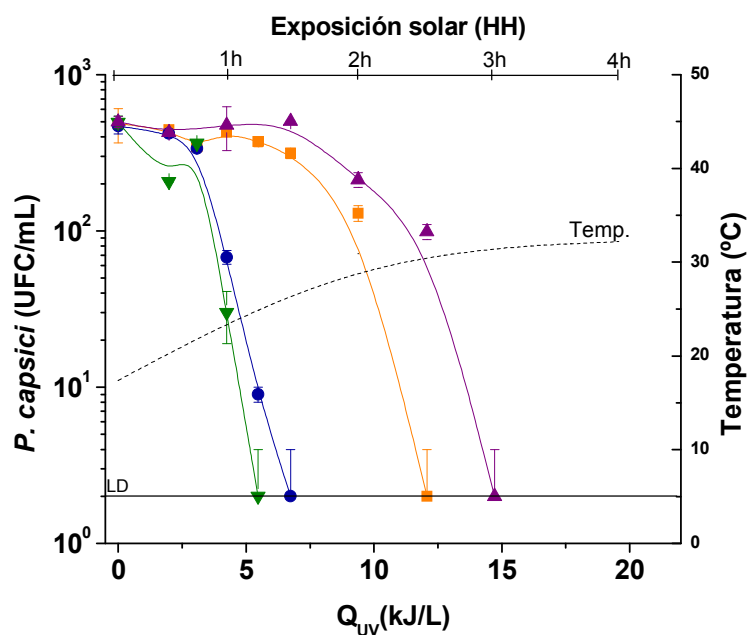
Tabla 5.8. Valores de pH, temperatura inicial (i) y final (f) y medidas de hierro (Fe^{2+} - Fe^{3+} - Fe^T) durante el tratamiento Fe^{3+} /Solar en el reactor de botella.

Fe^{3+} (mg/L)	pH _i /pH _f	T _{min/max} (°C)	$\text{Fe}^{2+}_i/\text{Fe}^{2+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^{3+}_i/\text{Fe}^{3+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^T_i/\text{Fe}^T_f$ (mg/L)	Q_{UV} (kJ/L)	LD
OSCURIDAD*							
1	4,27/4,47	22,6/25,0	-	-	0,19/0,90	-	NO
2,5	4,14/4,25	22,8/24,8	-	-	1,18/0,75	-	NO
5	3,71/3,75	22,8/24,9	-	-	3,86/0,66	-	NO
RADIACIÓN SOLAR							
1	4,49/4,79	17,4/30,4	0,12/0,59	0,39/0,02	0,52/0,62	19,50	NO
2,5	4,09/4,24	17,5/21,7	0,06/1,23	1,78/0,00	1,84/1,24	6,74	SI
5	3,86/3,84	17,6/32,2	0,07/3,28	3,61/0,26	3,68/3,54	5,46	Si

*En oscuridad todo el hierro se encuentra en forma de Fe^{3+} y su concentración se especifica en la columna de Fe^T



a)



b)

Figura 5.12. a) Evolución de la concentración de *P. capsici* en presencia de 1 mg/L (●-), 2,5 mg/L (■-) y 5 mg/L (▲-) de Fe^{3+} en oscuridad. **b)** Inactivación de zoosporas de *P. capsici* en presencia de 1 mg/L (■-), 2,5 mg/L (●-), 5 mg/L (▼-) de Fe^{3+} bajo radiación solar natural y foto-inactivación solar (▲-). La línea discontinua muestra el perfil térmico.

La inactivación fúngica en este caso (Fe^{3+} /Solar) se debe al efecto conjunto de diferentes procesos:

i) La generación de $\text{OH}^{\bullet}$ de acuerdo con la ecuación 1.20, lo que podría ser un primer ataque sobre la pared celular. La eficiencia del sistema Fe^{3+} /Solar se ha investigado en la degradación de compuestos químicos. Mailhot y cols. demostraron el papel de los

acuacomplejos de Fe^{3+} en la generación de radicales hidroxilo bajo radiación solar en un estudio realizado con dietilftalato [Mailhot y cols., 2002].

ii) Se sospecha que el Fe^{3+} tiene una alta probabilidad de ser absorbido sobre la célula formando complejos con moléculas presentes en la membrana bacteriana tales como sitios específicos de proteínas. Además, no puede difundir fácilmente al interior celular [Spuhler y cols., 2010] a diferencia del Fe^{2+} (Vía 1, Figura 5.13). Los Oomicetos se caracterizan por una elevada cantidad de proteínas presentes a nivel de la pared celular comparada con otros procariotas. Estas proteínas se relacionan con la captación de hierro y molibdeno con el objeto de catalizar el transporte de estos compuestos a través de la membrana. Existen evidencias de la presencia de super-familias de proteínas (ATP binding cassette, ABC) en el genoma de *Phytophthora ramorum* y *P. sojae* que es comparable en longitud con la de *Arabidopsis thaliana* y el genoma del arroz y significativamente mayores que dos especies de hongos patógenos, *Fusarium graminearum* y *Magnaporthe grisea* [Morris y Phuntumart, 2009]. Por tanto, la alta cantidad de lugares específicos de intercambio de iones y la influencia de la presión osmótica favorecen la absorción de Fe^{3+} sobre la pared celular de las zoosporas, mejorando la inactivación bajo radiación solar natural. Esto también explica que el límite de detección se alcance más rápidamente en el caso de la mayor concentración de Fe^{3+} ensayada (5 mg/L).

iii) Finalmente, el Fe^{2+} formado (Reacción 1.20) puede también difundir al interior de la célula generando daños internos vía reacciones Haber-Weiss con el H_2O_2 intracelular (Vía 2, Figura 5.13).

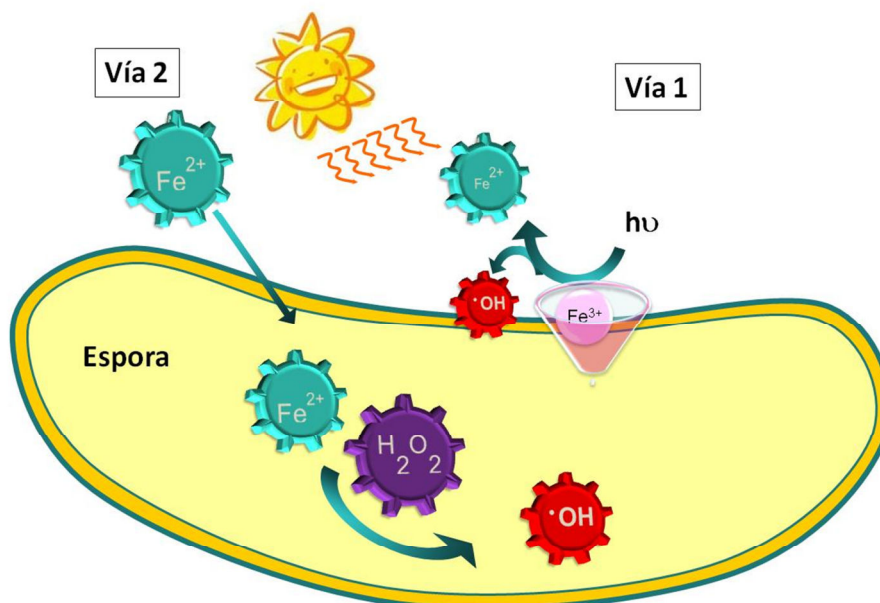


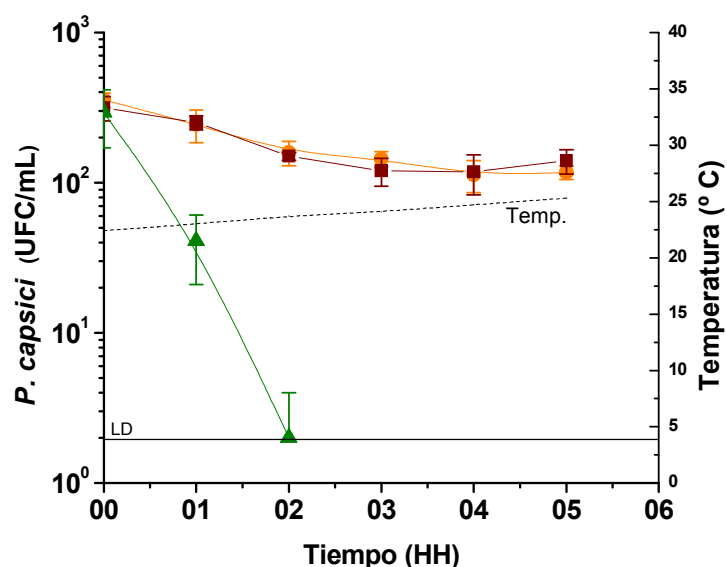
Figura 5.13. Diagrama de las principales rutas de actuación del Fe^{2+} y Fe^{3+} durante el tratamiento de foto-Fenton en la espora fúngica.

5.2.6. Tratamiento de foto-Fenton solar con Fe^{2+} para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

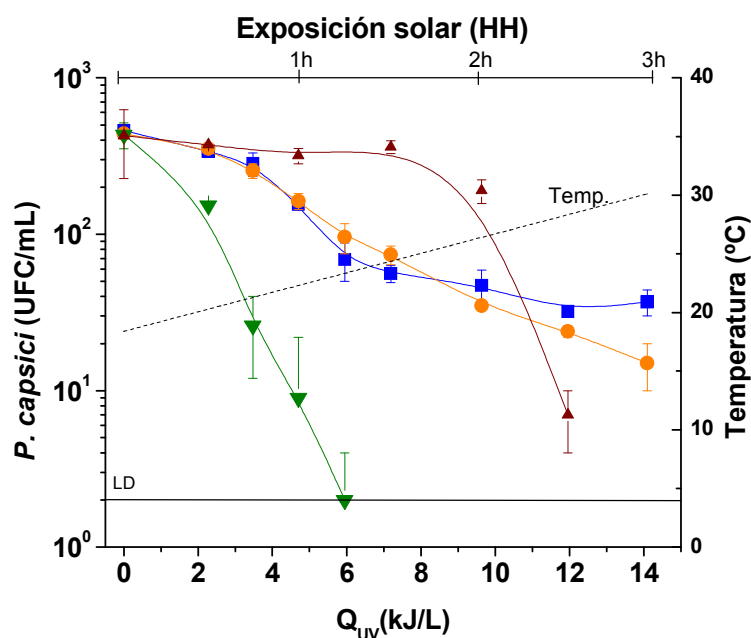
La figura 5.14.a muestra la inactivación de zoosporas de *P. capsici* mediante la reacción de Fenton en oscuridad, con $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ a concentraciones 1/2,5, 2,5/5 y 5/10 mg/L, respectivamente en reactor de botella. Solo se obtiene una inactivación eficiente para el caso de 5/10 mg/L ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) con la que se alcanza el límite de detección después de 2 h en oscuridad desde 300($\pm$ 120) UFC/mL. La inactivación de zoosporas observada con 5 mg/L de Fe^{2+} se debe a la acción conjunta de: (i) el pH, que es el más ácido de todas las concentraciones evaluadas (Tabla 5.9) y (ii) la formación de $\text{OH}^\cdot$. La temperatura permanece constante a un valor de 25 °C. El pH se mantuvo constante en todos los experimentos, siendo más ácido para el sistema 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. El peróxido de hidrógeno añadido al sistema no se consume por completo; la demanda fue de 0,8 mg/L, 1,33 mg/L y 3,16 mg/L tras 5 h de tratamiento, respectivamente (Tabla 5.9). La mayor bajada de hierro disuelto se observó para el caso de 2,5/5 mg/L de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$.

La figura 5.14.b muestra la inactivación de las zoosporas mediante foto-Fenton con radiación solar natural a 1/2,5, 2,5/5 y 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ y un ensayo de foto-inactivación solar. En este caso, solo se alcanza el límite de detección con 5 mg/L de Fe^{2+} en una hora de tratamiento tras alcanzar una energía acumulada de 5,94 kJ/L, mejorando la inactivación por Fenton. El perfil de inactivación en la foto-inactivación

solar presenta un hombro muy marcado que no se observa en ninguna de las curvas de inactivación por foto-Fenton solar. La tabla 5.9 muestra los datos de pH, temperatura y concentraciones de hierro disuelto al principio y final de cada experimento. La temperatura más alta fue 30,1 °C. El pH es más ácido en todos los casos comparado con el tratamiento Fe^{2+} /Solar.



a)



b)

Figura 5.14. a) Evaluación de la concentración de zoosporas de *P. capsici* con Fenton (oscuridad): 1/2,5 mg/L (●-), 2,5/5 mg/L (■-) y 5/10 mg/L (▲-) de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. b) Inactivación de zoosporas de *P. capsici* por foto-Fenton bajo radiación solar natural con 1/2,5 mg/L (■-), 2,5/5 mg/L (●-) y 5/10 mg/L (▼-) de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ y foto-inactivación solar (▲-). La línea discontinua muestra el perfil térmico.

Tabla 5.9. Valores de pH, temperatura inicial (i) y final (f), consumo de H_2O_2 y medidas de hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{\text{T}}$) durante los tratamientos de Fenton y foto-Fenton solar con Fe^{2+} en el reactor de botella.

$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (mg/L)	pH _i /pH _f	T ^a _{min/max} (°C)	H ₂ O ₂ Total	$\text{Fe}^{2+}_i/\text{Fe}^{2+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^{3+}_i/\text{Fe}^{3+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^{\text{T}}_i/\text{Fe}^{\text{T}}_f$ (mg/L)	Q _{uv} (kJ/L)	LD
OSCURIDAD								
1/2,5	5,54/4,52	23,7/25,0	0,80	0,59/0,24	0,13/0,40	0,72/0,67	-	NO
2,5/5	4,32/4,33	23,5/25,3	1,33	0,61/0,09	0,69/0,10	1,30/0,19	-	NO
5/10	3,90/3,96	22,4/24,9	3,16	0,80/0,04	2,57/0,20	3,37/0,24	-	SI
RADIACIÓN SOLAR								
1/2,5	4,53/5,04	19,3/27,4	1,21	0,27/0,19	0,02/0,25	0,30/0,45	14,1	NO
2,5/5	4,20/4,42	19,5/28,4	2,90	0,19/0,45	1,46/0,02	1,66/0,47	14,1	NO
5/10	3,95/4,50	18,4/30,1	5,80	0,20/0,77	2,87/0,01	3,08/0,79	5,9	SI

El mecanismo principal de inactivación del proceso de foto-Fenton solar es la formación de radicales hidroxilo en el exterior de la célula (Reacciones 1.11-1.20). Cabe destacar que el límite de detección solo se alcanza en el caso de 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 , mientras que a concentraciones inferiores de hierro y peróxido (1/2,5 mg/L y 2,5/5 mg/L) la eficiencia del tratamiento es muy baja. Por otro lado, si se comparan estos resultados con los obtenidos para el caso de Fe^{2+} /Solar (Figura 5.11.b), a iguales concentraciones de Fe^{2+} se observa que el foto-Fenton solar no mejora los resultados de inactivación en los casos de 1 mg/L y 2,5 mg/L de Fe^{2+} . Del mismo modo, el proceso de foto-Fenton solar a bajas concentraciones no supone una mejora sustancial en la inactivación respecto al proceso H_2O_2 /Solar (Figura 5.10.b). Por tanto, la formación de radicales hidroxilo mediante foto-Fenton solar para las concentraciones más bajas de reactivos, no es suficiente como para provocar pérdidas significativas de viabilidad, mientras que sí lo es cuando se usan 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 . Tampoco los mecanismos que justificaban la eficacia de inactivación en los procesos Fe^{2+} /Solar y H_2O_2 /Solar parecen estar jugando un papel importante en este caso. Probablemente el Fe^{2+} reacciona rápidamente con el H_2O_2 disponible para formar Fe^{3+} (Reacción 1.11) fuera de la célula, no estando favorecidos los procesos de difusión de reactivos al interior celular.

5.2.7. Tratamiento de foto-Fenton solar con Fe^{3+} para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

El proceso de Fenton se realiza con 1/2,5, 2,5/5 y 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ durante 5 h. La figura 5.15.a muestra que la viabilidad de las esporas permanece constante durante todo el tiempo experimental cuando se emplean 1/2,5 y 2,5/5 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Sin embargo, con 5 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2 la viabilidad de las esporas se reduce hasta alcanzar el límite de detección en 2 h de tratamiento. En

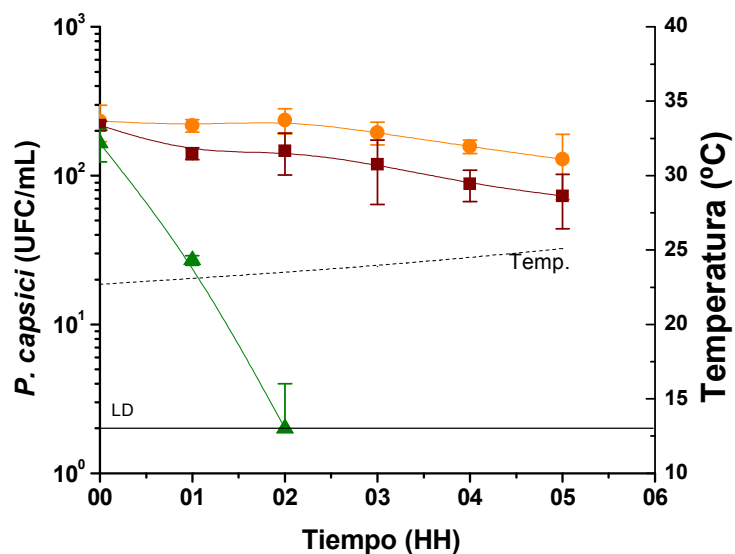
general, se observa un comportamiento similar en la inactivación de las esporas con ambas sales de hierro. La tabla 5.10 muestra los valores de pH, temperatura y las concentraciones de H_2O_2 y hierro disuelto al principio y final de cada experimento. El descenso de H_2O_2 en los ensayos de Fenton con Fe^{3+} es aproximadamente la mitad que en el caso de Fenton con Fe^{2+} para todas las concentraciones estudiadas. La inactivación de zoosporas observada en el tratamiento Fenton con 5 mg/L de Fe^{2+} y Fe^{3+} con 10 mg/L de H_2O_2 se debe a la acción conjunta de: (i) el pH, que es el más ácido de todas las concentraciones evaluadas (Tablas 5.9 y 5.10) y (ii) la mayor formación de $\text{OH}^\bullet$. Ambos factores producen condiciones estresantes que provocan la inactivación de las zoosporas. Sin embargo, a concentraciones más bajas (2,5/5 y 1/2,5 mg/L de hierro y H_2O_2) no se producen daños suficientes para obtener la completa inactivación.

Tabla 5.10. Valores de pH, temperatura inicial (i) y final (f), consumo de H_2O_2 y medidas de hierro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^T$) durante el tratamiento de Fenton y foto-Fenton solar con Fe^{3+} en el reactor de botella.

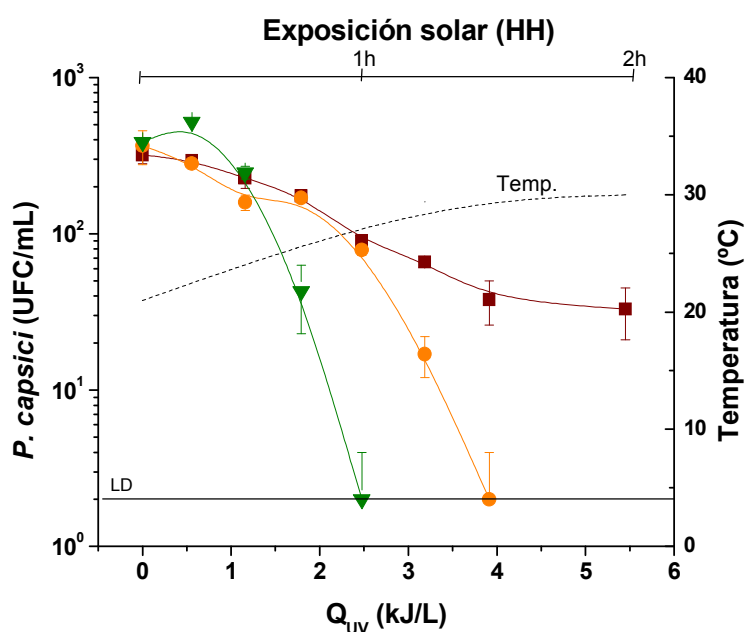
$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (mg/L)	pH _i /pH _f	T _a _{min/max} (°C)	H_2O_2 Total	$\text{Fe}^{2+}_i/\text{Fe}^{2+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^{3+}_i/\text{Fe}^{3+}_f$ (mg/L)	$\text{Fe}^T_i/\text{Fe}^T_f$ (mg/L)	Q_{UV} (kJ/L)	LD
OSCURIDAD*								
1/2,5	4,25/4,42	23,1/25,0	0,41	-	-	0,67/0,82	-	NO
2,5/5	4,16/4,00	23,0/25,1	0,62	-	-	1,94/0,15	-	NO
5/10	3,81/3,67	22,7/24,9	2,33	-	-	3,89/0,25	-	SI
RADIACIÓN SOLAR								
1/2,5	4,43/5,00	21,0/25,4	3,05	0,44/0,05	0,44/0,00	0,88/0,05	5,45	NO
2,5/5	4,06/4,21	21,1/25,5	5,57	0,22/0,34	0,72/0,00	0,95/0,35	3,91	SI
5/10	3,79/3,75	21,1/26,7	11,00	2,39/1,01	0,20/0,00	2,59/3,02	2,47	SI

*En oscuridad todo el hierro se encuentra en forma de Fe^{3+} y su concentración se especifica en la columna de Fe^T .

La figura 5.15.b muestra la inactivación de zoosporas de *P. capsici* con foto-Fenton bajo radiación solar natural con 1/2,5, 2,5/5 y 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$. El límite de detección se alcanza con 2,5/5 y 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ mientras que en el caso de 1/2,5 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ se observa una reducción de 1,8 log tras 2 h de exposición solar. El menor pH (3,79) se obtiene con 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Tabla 5.10). Todo el peróxido de hidrogeno añadido se consume completamente en las primeras 2 h de exposición solar. En el caso de 1/2,5 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ la concentración inicial de esporas se reduce de 387(±12) UFC/mL a 33(±12) UFC/mL con un Q_{UV} de 5,45 kJ/L. Mientras que para 2,5/5 y 5/10 mg/L de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$, el límite de detección se alcanza partiendo de una concentración inicial de 387(±12) UFC/mL con un Q_{UV} de 3,91 y 2,47 kJ/L, respectivamente.



a)



b)

Figura 5.15. a) Evolución de la concentración de zoosporas de *P. capsici* con Fenton en presencia de 1/2,5 mg/L (—●—), 2,5/5 mg/L (—■—) y 5/10mg/L (—▲—) de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$. **b)** Inactivación de zoosporas de *P. capsici* con foto-Fenton solar en presencia de 1/2,5 mg/L (—■—), 2,5/5 mg/L (—●—) y 5/10 mg/L (—▼—) de $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$. La línea discontinua muestra el perfil térmico.

La inactivación más eficiente de zoosporas se obtuvo con foto-Fenton solar con 5 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2 . Los mecanismos de inactivación son similares a los descritos anteriormente para el proceso de foto-Fenton solar con Fe^{2+} ; no obstante, la eficiencia de inactivación se mejora en este caso. La elevada probabilidad de que el Fe^{3+} se adsorba sobre los lugares específicos de la pared celular [Sphuler y cols., 2010]

aumentaría la probabilidad de generar $\text{OH}^\bullet$ en la superficie de la espora, aumentando el ataque oxidativo y la eficacia del proceso foto-Fenton con Fe^{3+} comparado con el de Fe^{2+} . Si se comparan las curvas de inactivación con foto-Fenton solar a concentraciones iguales de ambas sales de hierro, en general, se observa una mejor eficiencia con Fe^{3+} para todos los casos.

5.2.8. Estudio cinético de la inactivación de zoosporas de *P. capsici*

Los resultados del ajuste cinético de los distintos tratamientos que se presentan en este capítulo se muestran en la Tabla 5.11. Igual que en el capítulo anterior, se selecciona el modelo cinético que mejor ajusta (método de los mínimos cuadrados) los datos experimentales de concentración de esporas (en UFC/mL) frente a Q_{UV} (kJ/L).

Tabla 5.11. Datos cinéticos obtenidos de los diferentes tratamientos solares evaluados para la inactivación de zoosporas de *P. capsici*.

	k (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	$\text{Log}(N_{\text{res}})$	R^2	Modelo
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$					
2,5	$0,20 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,60$	-	0,96	Hombro + Log lineal
5	$0,20 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,50$	-	0,93	Hombro + Log lineal
10	$0,50 \pm 0,30$	$0,40 \pm 0,80$	-	0,86	Hombro + Log lineal
$\text{Fe}^{2+}/\text{Solar}$					
1	$0,30 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,60$	-	0,91	Hombro + Log lineal
2,5	$0,40 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,80$	-	0,94	Hombro + Log lineal
5	$0,50 \pm 0,17$	$3,40 \pm 1,60$	-	0,94	Hombro + Log lineal
$\text{Fe}^{3+}/\text{Solar}$					
1	$0,10 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,30$	$1,30 \pm 0,10$	0,97	Hombro + Log lineal + Cola
2,5	$0,60 \pm 0,02$	$1,80 \pm 0,10$	-	0,99	Hombro + Log lineal
5	$0,90 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,05$	-	0,99	Hombro + Log lineal
$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$					
1/2,5	-	-	-	-	-
2,5/5	$0,10 \pm 0,10$	-	-	0,93	Log lineal
5/10	$0,40 \pm 0,05$	-	-	0,98	Log lineal
$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$					
1/2,5	$0,20 \pm 0,01$	-	-	0,97	Log lineal
2,5/5	$0,90 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,40$	-	0,98	Hombro + Log lineal
5/10	$1,60 \pm 0,20$	$1,70 \pm 0,40$	-	0,99	Hombro + Log lineal

En el tratamiento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Solar}$ la constante de inactivación más elevada se obtiene con 10 mg/L de reactivo. El proceso $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{Solar}$ arroja el mayor valor de k en ambos casos para una concentración de hierro de 5 mg/L. Por otro lado, comparando los

resultados obtenidos con Fe^{2+} y Fe^{3+} se observa que la velocidad de inactivación fue mayor para el caso del Fe^{3+} . El mismo comportamiento se observa en el tratamiento de foto-Fenton solar. La mayor velocidad de inactivación se alcanza con 5 mg/L de Fe y 10 mg/L de H_2O_2 , y comparando las dos sales de hierro, el caso de Fe^{3+} tiene una constante cinética mayor que el Fe^{2+} .

6. DESINFECCIÓN DE EFLUENTES DE EDAR CON H_2O_2 /SOLAR, TiO_2 /SOLAR Y FOTO-FENTON SOLAR EN REACTOR CPC DE 60 L

Este capítulo presenta los resultados obtenidos para la inactivación de esporas de *F. solani* en el reactor solar CPC de 60 L en agua simulada y real de salida de EDAR (El Bobar), Almería, mediante los diferentes tratamientos solares objeto de estudio, es decir, H_2O_2 /Solar, TiO_2 /Solar y foto-Fenton solar. Aquí se evalúa también el efecto de la utilización de dos sales de hierro distintas: sulfato ferroso como fuente de Fe^{2+} y nitrato férrico como fuente de Fe^{3+} , así como las adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno durante los ensayos de foto-Fenton solar.

6.1 Inactivación de esporas de *F. solani* con H_2O_2 /Solar

La figura 6.1 muestra la inactivación de microconidios de *F. solani* en presencia de 10 mg/L de H_2O_2 en agua destilada y agua simulada de salida de EDAR. Se puede observar que el límite de detección se alcanza en agua destilada con un Q_{UV} de 13,3 kJ/L. En el caso del agua simulada de salida de EDAR se obtiene un resultado similar con un Q_{UV} de 18,5 kJ/L.

La tabla 6.1 muestra los cambios de pH, el Q_{UV} necesario para alcanzar el límite de detección y el H_2O_2 consumido. La evolución del COD se representa en el caso del agua simulada de salida de EDAR en la figura 6.1. Como es de esperar, no se observa una degradación significativa de la materia orgánica disuelta en el caso del efluente simulado de EDAR, ya que el COD solo baja un 2 %.

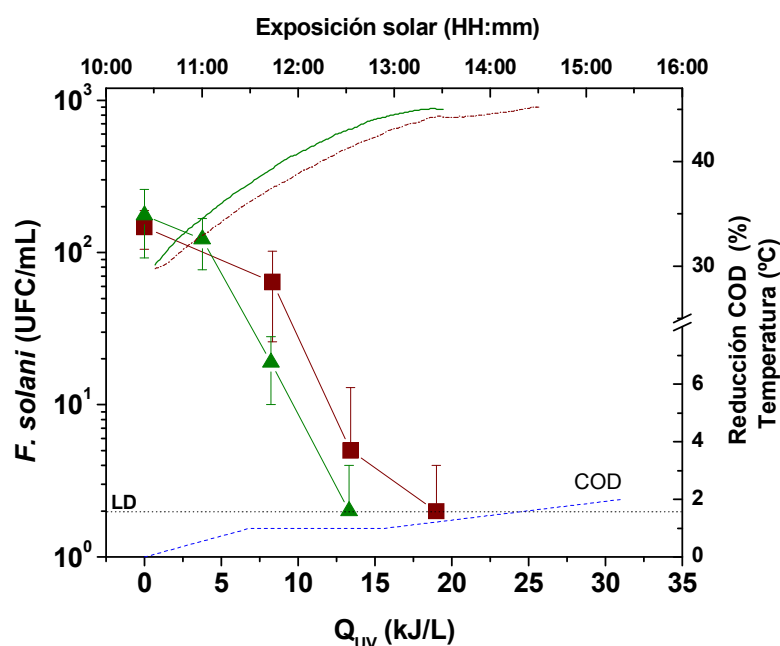


Figura 6.1. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L con 10 mg/L de H_2O_2 en agua destilada (-▲-) y su correspondiente perfil térmico (-); y en agua simulada de salida de EDAR (-■-) y el perfil térmico (-). La evolución del COD para el agua simulada de salida de EDAR se representa por la línea discontinua (....).

Tabla 6.1. Datos registrados de H_2O_2 , pH_i , pH_f y Q_{UV} durante el tratamiento de H_2O_2 /Solar en el reactor solar CPC de 60 L.

Tipo de agua	H_2O_2 Total (mg/L)	pH_i	pH_f	Q_{UV} (kJ/L)	Tiempo (h)
Agua destilada	6,06	6,76	6,46	13,3	1,5
Agua simulada salida de EDAR	5,43	8,06	8,36	18,5	1,5

A lo largo de los resultados experimentales se ha demostrado la eficiencia del tratamiento de H_2O_2 con radiación solar natural para la inactivación de esporas fúngicas en agua. En el Capítulo 4 se demostró la susceptibilidad de las clamidosporas del género *Fusarium* tanto en el reactor de botella como en reactor CPC de 60 L en agua destilada, agua de pozo y agua simulada de salida de EDAR. En ambos tipos de reactores, la mayor inactivación se obtuvo en agua destilada. Los resultados obtenidos en este capítulo con microconidios de *F. solani* muestran un comportamiento similar, ya

que la eficiencia de inactivación es mayor en agua destilada que en agua simulada de salida de EDAR, aunque las diferencias entre ambas no son muy elevadas, el ensayo en agua simulada con 18,5 kJ/L sólo tarda 30 minutos más en alcanzar el límite de detección que en agua destilada (Q_{UV} de 13,3 kJ/L). Las aguas naturales contaminadas contienen materia orgánica natural como ácidos húmicos, porfirinas, hidrocarburos orgánicos, cromóforos orgánicos, etc., que pueden actuar como foto-sensibilizadores [DeRosa y Crutchley, 2002]. Estos compuestos bajo radiación solar natural pueden generar procesos foto-químicos en los que se producen ROS como el oxígeno singlete ($^1O_2$), radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y radicales hidroxilo ($OH^{\cdot}$), favoreciendo la inactivación celular [Paul y cols., 2004]. Sin embargo, esto no sucede en este caso ya que el agua simulada de salida de EDAR no contiene ninguno de estos foto-sensibilizadores, aunque sí están presentes otros compuestos químicos como nitratos y carbonatos que pueden interferir en la difusión del H_2O_2 al interior celular reduciendo la eficiencia de la inactivación.

Para demostrar la eficacia de los tratamientos bajo estudio en este trabajo, se llevaron a cabo experimentos con agua real de salida de la EDAR procedente de El Bobar (Almería). El análisis inicial del agua reveló la presencia de colonias del género *Fusarium*, sin embargo, por analogía con el resto de los ensayos realizados se añadió al agua una concentración de esporas de *F. solani* conocida y similar a las estudiadas en los capítulos previos. Sin embargo, a lo largo del tratamiento fotocatalítico se analiza tanto la inactivación de esporas de *Fusarium* spp. como el resto de colonias fúngicas que crecieron en el medio de cultivo utilizado para la cuantificación de esporas de *Fusarium* spp. Los géneros fúngicos más comunes en el agua de salida de EDAR son *Aspergillus* spp., *Candida* sp., *Fusarium* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton* spp. y *Epidermophyton* spp.

El tratamiento H_2O_2 /Solar (Figura 6.2) muestra que el límite de detección en agua real de salida de EDAR se alcanza tras recibir 28 kJ/L de Q_{UV} . El COD no sufre reducción alguna a lo largo del experimento, tal y como se ha observado en todos los estudios de H_2O_2 /Solar. El pH se mantuvo constante en 8,3 y el OD varió de 7,97 mg/L a 6,32 mg/L. La máxima temperatura alcanzada fue de 43,8 °C. Cabe destacar la demanda de H_2O_2 que presentó el tratamiento en este caso. Hasta el momento, los experimentos realizados con H_2O_2 /Solar no requerían añadir peróxido de hidrógeno extra al agua. Sin embargo, en este caso fue necesario añadir 30 mg/L de H_2O_2 más tras 1 h de exposición ya que en este tiempo se produjo un descenso muy marcado de la concentración de este reactivo. El consumo total de H_2O_2 durante el ensayo fue de 40 mg/L. Esto se debe a la elevada cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos

presentes en el agua real así como a la alta temperatura alcanzada. El H_2O_2 también puede reaccionar con compuestos orgánicos coexistentes en el efluente favoreciendo su desaparición. Por otro lado, pueden formarse distintos subproductos de desinfección (DBPs) dependiendo del tipo de compuesto orgánico [Jones, 1999]. Los DBPs tales como halometanos son potencialmente mutagénicos y su formación varía dependiendo de la concentración de H_2O_2 , el tipo de materia orgánica y de la radiación UV [Jones, 1999]. Sin embargo, este tema es complejo y su estudio en profundidad debe ser abordado en investigaciones adicionales.

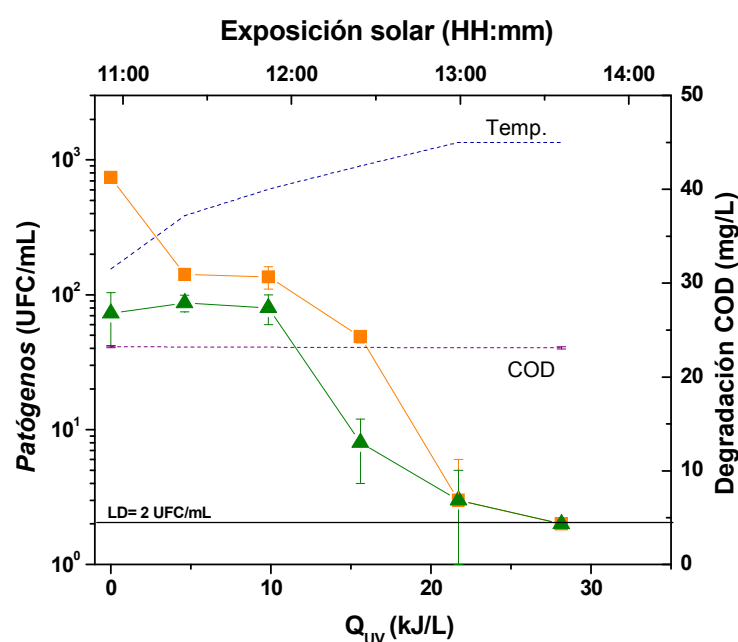


Figura 6.2. Inactivación de esporas de *F. solani* (—■—) y otros hongos (—▲—) en agua real de salida de EDAR con H_2O_2 /Solar (10 mg/L + adición de 30 mg/L). La línea discontinua (---) representa el perfil térmico. La línea discontinua (---) muestra la evolución del COD a lo largo del tratamiento experimental.

Si se comparan las figuras 6.1 y 6.2, se ve una pérdida de eficiencia desinfectante a medida que aumenta la complejidad química del agua. De modo que el orden de eficiencia (de mayor a menor) del tratamiento H_2O_2 /Solar en diferentes tipos de agua es: **agua destilada > efluente simulado de EDAR > efluente real de EDAR.**

6.2. Inactivación de esporas de *F. solani* con TiO_2 /Solar

La eficiencia del tratamiento fotocatalítico con TiO_2 en el reactor solar CPC de 60 L ya se demostró en el Capítulo 3. Ahora se muestran los resultados de inactivación de esporas de *F. solani* en agua simulada y real de salida de EDAR. La concentración de TiO_2 utilizada es de 100 mg/L, la mejor concentración según los estudios previamente realizados.

Los resultados obtenidos en agua simulada de salida de EDAR se muestran en la figura 6.3 donde se puede observar una reducción de la concentración de esporas de 350(±30) UFC/mL al límite de detección con un Q_{UV} de 31,8 kJ/L. La reducción del COD es de un 56 % al final del experimento con 55,42 kJ/L de energía UV-A solar acumulada por unidad de volumen de agua tratada. La temperatura más alta medida fue de 44,1 °C y el pH aumentó ligeramente desde 7,78 a 7,93.

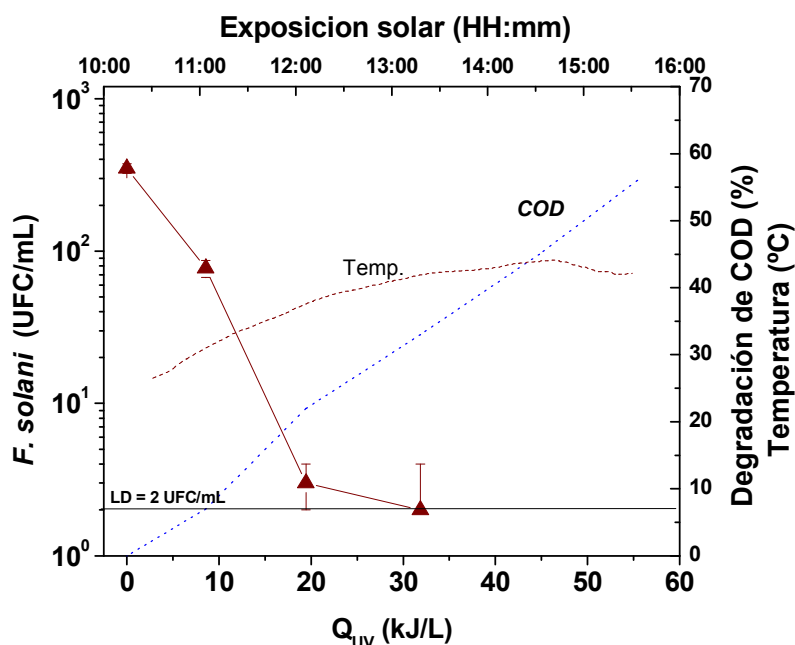


Figura 6.3. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L con 100 mg/L de TiO_2 en agua simulada de salida de EDAR (-▲-). Temperatura (---) y degradación del COD (....).

Los resultados de inactivación de microconidios de *Fusarium* spp. por fotocatalisis con TiO_2 (100 mg/L) mostrados en el capítulo 3, en agua destilada y de pozo, indican que se alcanza el límite de detección con valores de Q_{UV} de 29,9 kJ/L y 41,5 kJ/L respectivamente, y en agua simulada de salida de EDAR son necesarios 31,8 kJ/L, muy parecido al caso del agua destilada.

La presencia de carbonatos y bicarbonatos en el agua afecta de forma negativa a la fotocatalisis con TiO_2 , porque estas especies reaccionan con los $OH^\bullet$ limitando así la eficiencia del proceso [Canonica y cols., 2005]. El agua simulada de salida de EDAR contiene 13 mg/L de carbono inorgánico y el agua de pozo 132 mg/L, lo que explica la diferencia observada en las energías por unidad de volumen necesarias en ambos casos para alcanzar el límite de detección en la inactivación.

La adsorción de las partículas de catalizador sobre las esporas está favorecida a un pH ligeramente ácido de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 3. Por tanto, en agua simulada de salida de EDAR (pH ~ 8) así como en agua de pozo (pH ~ 7), el proceso de adsorción se verá desfavorecido, por lo que el proceso de desinfección fotocatalítico no es tan eficiente como en el caso del agua destilada (pH ~ 5.5) [Gumy y cols., 2006].

No obstante, los resultados obtenidos demuestran una alta eficiencia en el proceso de inactivación y degradación de COD aún en presencia de carbonatos y bicarbonatos. Esto se debe en parte a la gran capacidad de captación de fotones solares del reactor CPC y a la temperatura alcanzada por el agua durante los ensayos. En el estudio con agua destilada la temperatura alcanza un valor máximo de 36,5 °C, mientras que en el agua simulada de salida de EDAR se alcanzan 44,1 °C (experimentos realizados en la misma época del año).

La figura 6.4 muestra el proceso de inactivación fúngica mediante fotocatalisis con TiO_2 (100 mg/L) al pH natural del agua real de salida de EDAR El Bobar (~ 8). Se puede observar cómo se alcanza el límite de detección en el caso de esporas de *F. solani* desde una concentración de 80(±2) UFC/mL y con una irradiancia solar acumulada de 26,9 kJ/L. El resto de colonias presentes en el medio de cultivo requirió una irradiancia solar acumulada de 59 kJ/L para alcanzar el LD desde 60(±2) UFC/mL. La velocidad de inactivación obtenida en ambos casos es muy elevada, sobre todo teniendo en cuenta que se trata de un agua real con 85 mg/L de carbonatos y bicarbonatos.

De manera simultánea se analizó el COD y se observa que permanece estable a una concentración de 17 mg/L. Esto puede deberse a la presencia de carbonatos y bicarbonatos y la mayor concentración de microorganismos presentes en el agua de EDAR. El pH aumentó de 8 a 8,5 durante el tratamiento. El OD varió de 8,5 a 7,9 mg/L. La temperatura inicial del agua fue 30,9 °C y el máximo medido fue de 42,8 °C.

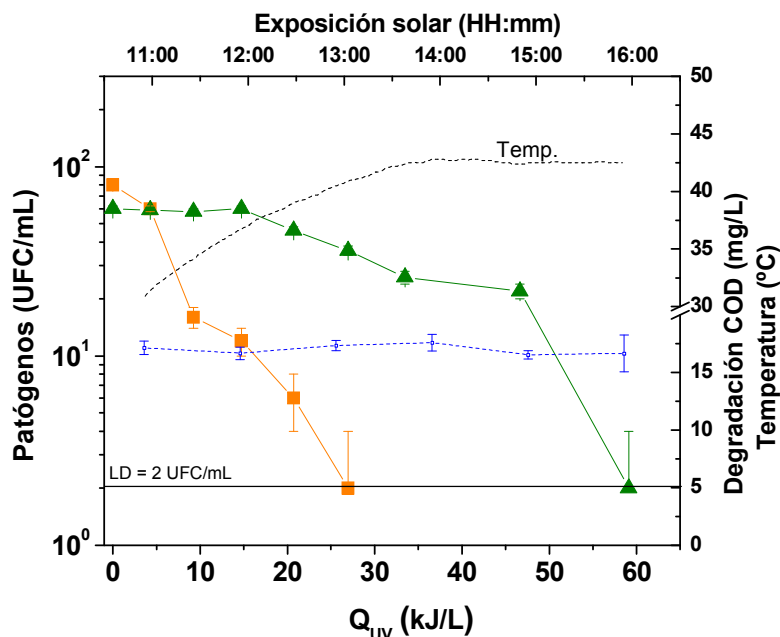


Figura 6.4. Inactivación de esporas de *F. solani* (—■—) y otros hongos (—▲—) en agua real de salida de EDAR mediante fotocátalisis solar con TiO_2 (100 mg/L). La línea discontinua (---) representa el perfil térmico. La línea discontinua (---) muestra la evolución del COD a lo largo del tratamiento experimental.

La eficiencia del tratamiento fotocatalítico con TiO_2 está fuertemente influenciada por la presencia de carbonatos y bicarbonatos y el pH básico donde se favorece la adsorción espora-catalizador. El orden de eficiencia (de mayor a menor) del tratamiento TiO_2 /Solar para distintos tipos de agua es: **efluente real de EDAR > agua destilada > efluente simulado de EDAR > agua de pozo.**

6.3. Inactivación de esporas de *F. solani* con Fenton

Para determinar el efecto del tratamiento Fenton sobre las esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L se realizó el ensayo en oscuridad a las concentraciones de 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 a pH 3 durante 5 h. Estas son las condiciones más estresantes para las esporas fúngicas utilizadas en este trabajo. También se analizó el COD durante estos ensayos (Figura 6.5).

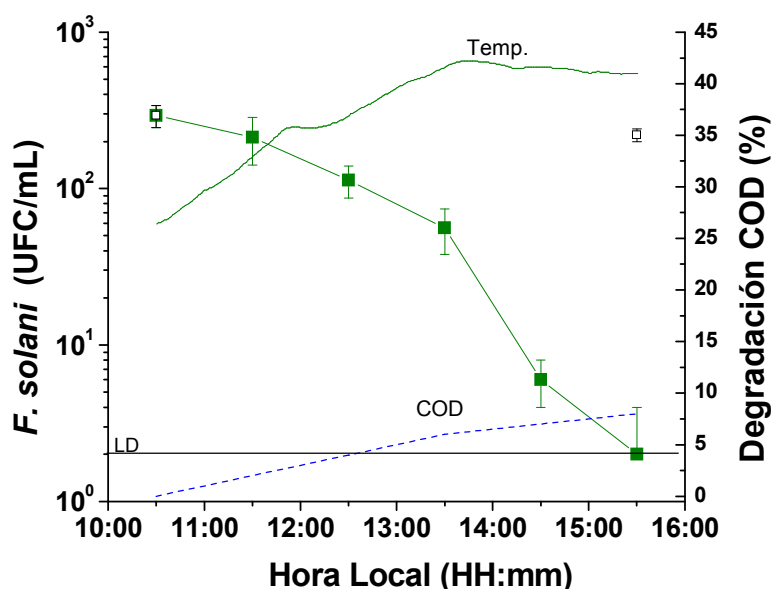


Figura 6.5. Viabilidad de microconidios de *F. solani* durante el tratamiento de Fenton en reactor CPC de 60 L con 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 a pH 3 en agua simulada de salida de EDAR (-■-). La temperatura se representa por la línea punteada (---). La evolución del COD se representa por la línea discontinua (....).

El H_2O_2 no se consumió por completo durante las 5 h del ensayo, sólo 11,5 mg/L de los 20 mg/L añadidos inicialmente. El pH descendió desde 3,01 a 2,85. La concentración de hierro inicial descendió ligeramente tras 5 h de tratamiento, de 9,2 mg/L a 7,9 mg/L. Del total del hierro disuelto, el 8 % se presentó en forma de Fe^{3+} tanto al inicio como al final del tratamiento.

Es importante destacar el descenso en la concentración de esporas observado en las dos últimas horas de tratamiento. Además de los radicales hidroxilo generados durante el proceso Fenton, la elevada temperatura alcanzada (max. 42 °C) junto el pH ácido afectan de forma negativa a la viabilidad de las esporas. La reducción del COD solo fue de un 8 % al final.

A diferencia de estos resultados, los obtenidos en reactor de botella con Fenton para las mismas esporas y mismo tipo de agua (Figura 5.1) no muestran cambios significativos en la concentración de esporas viables. Con lo cual, no se puede atribuir la fuerte inactivación observada en el reactor CPC solamente a la generación de radicales hidroxilo. Otros factores de estrés como la temperatura y el pH juegan un papel importante en este proceso. Por otro lado, la baja reducción del COD demuestra la escasa formación de $OH^\bullet$ durante el tratamiento.

6.4. Inactivación de esporas de *F. solani* con foto-Fenton solar: comparación de la eficiencia utilizando Fe^{2+} y Fe^{3+}

6.4.1. Agua destilada

Antes de comenzar el estudio con agua de salida de EDAR (simulada y real), se utilizó agua destilada para evaluar la inactivación de las esporas de *F. solani*. La figura 6.6 muestra la inactivación de esporas con diferentes concentraciones de Fe^{2+} , 5 mg/L y 10 mg/L con 10 y 20 mg/L de H_2O_2 respectivamente. Además se investiga el efecto de la adición de H_2O_2 (una adición de 10 mg/L una vez consumida la inicial). La concentración de esporas se redujo hasta el límite de detección en todos los casos analizados. De hecho, no se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones de operación estudiadas ya que la energía UV-A solar acumulada requerida para alcanzar el límite de detección varía entre 26,5 y 29,5 kJ/L. No obstante, la mayor eficiencia en agua destilada se alcanza en el caso de 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 , de modo que ni la adición sucesiva de H_2O_2 ni el incremento de la concentración de hierro desde 5 mg/L a 10 mg/L mejora la inactivación.

En condiciones similares se hicieron los ensayos con nitrato férrico (Fe^{3+}) en lugar de sulfato ferroso (Fe^{2+}), y los resultados de inactivación se muestran en la figura 6.7. El límite de detección se alcanzó en todos los casos partiendo de una concentración de esporas inicial de 10^3 UFC/mL. La mejor eficiencia de inactivación se obtuvo de nuevo con 5 mg/L Fe^{3+} y 10 mg/L H_2O_2 y el proceso de inactivación tampoco mejoró al incrementar la concentración de hierro, al igual que en el caso del Fe^{2+} . En este caso no se llevó a cabo el experimento en el que la adición de H_2O_2 se realiza por dosis, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a la única adición al comienzo del ensayo para el caso del Fe^{2+} .

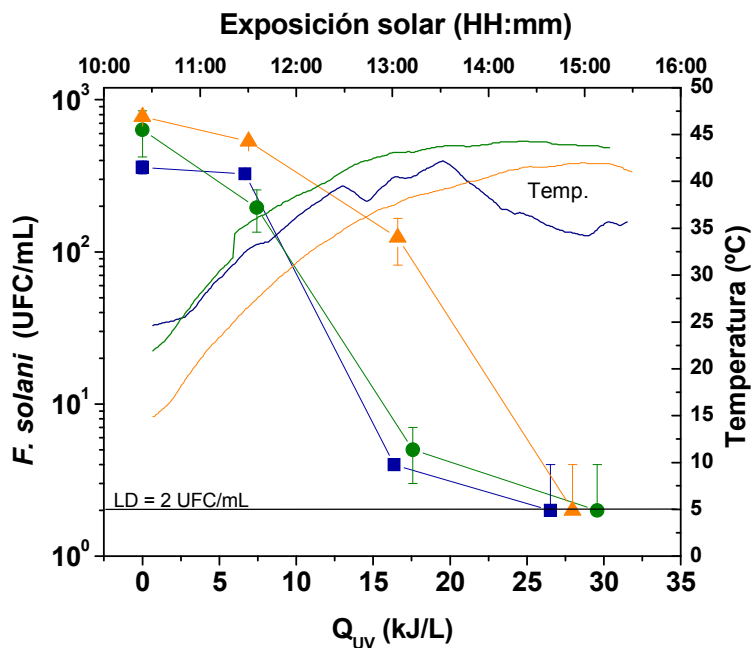


Figura 6.6. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L mediante foto-Fenton solar en agua destilada con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 (-■-) y perfil térmico (-·-); 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 por dosis (-●-) y perfil térmico (-·-); 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 (-▲-) y perfil térmico (-·-).

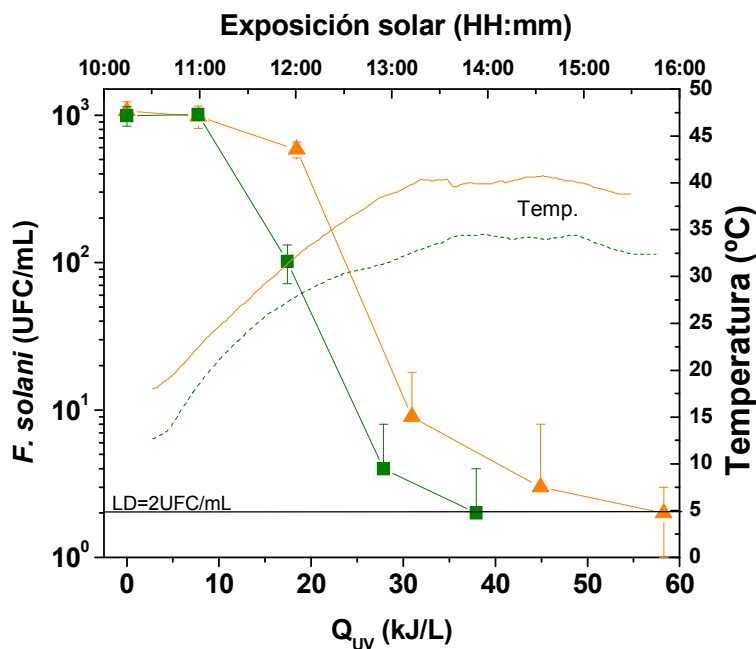


Figura 6.7. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L mediante foto-Fenton solar en agua destilada con 5 mg/L de Fe^{3+} y 10 mg/L de H_2O_2 (-■-) y perfil térmico (-·-); 10 mg/L de Fe^{3+} y 20 mg/L de H_2O_2 (-▲-) y perfil térmico (-·-).

La tabla 6.2 muestra el consumo de H_2O_2 , pH, y concentraciones de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe^T medidos a lo largo de los experimentos. El pH no se ajustó al óptimo de la reacción de Fenton (2,8) sino que se mantiene el pH que queda en el agua destilada con la concentración de sal de hierro añadida en cada caso. Como se puede observar en la tabla 6.2, en el caso de Fe^{2+} , el hierro disuelto se mantiene prácticamente estable y a un valor similar al añadido inicialmente. Sin embargo, en el caso de Fe^{3+} , la concentración total disuelta descende de 4,73 a 1,89 mg/L en el caso de de 5 mg/L y de 7,24 a 2,71 mg/L con 10 mg/L, esto supone una pérdida de hierro disuelto del 60 % y del 62 %, respectivamente.

Tabla 6.2. Datos registrados de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^T , pH_i , pH_f y Q_{UV} durante el proceso de foto-Fenton solar en agua destilada con Fe^{2+} y Fe^{3+} en reactor CPC de 60 L.

Fe (mg/L)	H_2O_2 Total (mg/L)	Fe^{2+}_i/Fe^{2+}_f (mg/L)	Fe^{3+}_i/Fe^{3+}_f (mg/L)	Fe^T_i/Fe^T_f (mg/L)	pH_i	pH_f	Q_{UV} (kJ/L)	Tiempo (h)
Foto-Fenton solar con sulfato de hierro (Fe^{2+})								
5	10	0,82/1,26	2,07/1,13	2,89/2,40	4,86	4,83	26,5	3
5+D	20	0,83/1,01	2,84/1,61	3,68/2,62	5,40	4,75	29,5	3
10	20	0,00/1,20	8,39/0,40	8,39/1,67	6,40	4,55	27,9	3
Foto-Fenton solar con nitrato férrico (Fe^{3+})								
5	10	0,19/1,17	4,54/0,72	4,73/1,89	5,17	4,81	37,9	4
10	20	0,37/1,83	6,87/0,87	7,24/2,71	5,03	4,69	58,2	5

+D = Dosificación de H_2O_2 a lo largo del desarrollo experimental (10 mg/L)

Los mecanismos principales de inactivación durante el proceso de foto-Fenton solar se producen por el ataque oxidativo de los $OH^\bullet$ producidos por las reacciones 1.11-1.20. Si se comparan los resultados obtenidos con 5 mg/L de Fe^{2+} y Fe^{3+} (Figuras 6.6 y 6.7) se puede observar que para la inactivación de esporas en el caso de Fe^{2+} se necesita menos energía solar acumulada (26,5 kJ/L) que en el caso del Fe^{3+} (37,9 kJ/L). En el caso de 10 mg/L de hierro, se observa un comportamiento similar, ya que con Fe^{2+} (27,9 kJ/L) se obtiene también una mejor inactivación que con Fe^{3+} (58,2 kJ/L). Esto es debido a que cuando el proceso de foto-Fenton se inicia con Fe^{2+} se generan de forma inmediata radicales hidroxilo (Reacción 1.11) previo a la exposición solar. Por otro lado, cuando se parte de Fe^{3+} , la generación de radicales hidroxilo no se produce hasta que se inicia la exposición solar (Reacción 1.20). Además, la capacidad de difusión del Fe^{2+} a través de membranas celulares puede ser el motivo de la diferencia de inactivación entre ambas sales de hierro. Una vez en el interior, el Fe^{2+} puede reaccionar con el H_2O_2 intracelular formando radicales $OH^\bullet$ internos [Spuhler y cols., 2010] una vez que la espora ha germinado. Por otro lado, el Fe^{3+} con una mayor

tendencia a formar complejos con compuestos orgánicos presentes en la membrana celular requeriría una cantidad mayor de radicales para poder alterar la estructura de la pared celular y producir finalmente la inactivación de la espora. El comportamiento del Fe^{2+} y Fe^{3+} en la espora se ha discutido ampliamente en el Capítulo 5.

El aumento de la concentración de hierro de 5 a 10 mg/L en ambos tipos de sales no mejora el resultado final, tal y como ocurría para el caso de foto-Fenton en el reactor de botella (Capítulo 5). Cabe destacar que la concentración de hierro disuelto descende más en el caso de 10 mg/L en ambos tipos de sales que con 5 mg/L (Tabla 6.2), lo cual podría justificar las eficiencias similares observadas en ambos casos.

En los ensayos con dosificación de H_2O_2 , ésta se lleva a cabo en función del consumo de H_2O_2 durante la reacción, y en este caso fue necesario añadir solamente una dosis de 10 mg/L durante el experimento para compensar la pérdida de H_2O_2 y mantener su concentración estable en 10 mg/L durante el tratamiento. Los resultados no muestran una mejora (Figura 6.6). La cantidad de radicales hidroxilo generados durante la primera fase del proceso de foto-Fenton provoca, probablemente, daños letales en las células, de modo que mantener la reacción de foto-Fenton con la adición de H_2O_2 extra generando más radicales no induce a una mejora clara en el proceso. Dada la elevada constante cinética de la reacción 1.11, el hierro reacciona con el H_2O_2 mientras queda en el medio y sólo cuando éste se ha consumido, el hierro puede difundir al interior celular generando daños internos en la espora mediante reacciones de Fenton internas, lo cual estaría ocurriendo en la segunda fase del proceso.

6.4.2. Agua simulada de salida de EDAR

Los experimentos con este tipo de agua se realizaron con 5 mg/L y 10 mg/L de Fe^{2+} y Fe^{3+} con 10 y 20 mg/L de H_2O_2 respectivamente, y además también se llevaron a cabo ensayos con dosificación de H_2O_2 a lo largo del tratamiento con objeto de mantener una concentración de 10 mg/L constante. En la tabla 6.3 se muestran los datos de pH, H_2O_2 total consumido y concentración de hierro disuelto. El COD se analiza en todos los casos y se muestra en las correspondientes gráficas.

La figura 6.8 presenta la inactivación de esporas mediante foto-Fenton solar con Fe^{2+} . Se puede observar que en todos los casos se alcanza el LD, excepto para el caso de pH ~ 8 (pH natural del agua), donde la concentración de hierro disuelto es nula, por lo que el proceso de oxidación no ocurre, las esporas permanecen viables y el COD no se reduce durante las 5 h de tratamiento (Figura 6.8). Además, el agua simulada de salida de EDAR contiene carbonatos y bicarbonatos y otras especies como fosfatos,

fluoruros, cloruros y bromuros que afectan negativamente a la eficiencia del proceso [Klamert y cols., 2010]. En este caso cabría esperar que el H_2O_2 actuase de forma semejante al tratamiento H_2O_2 /Solar al no haber hierro disuelto. Sin embargo, todo el H_2O_2 inicial se consumió en las dos primeras horas de tratamiento por lo que no se encuentra disponible para producir el daño fúngico observado en otras ocasiones.

Los resultados de inactivación de esporas a pH 3 obtenidos con 5 mg/L de Fe^{2+} - 10 mg/L de H_2O_2 y 10 mg/L de Fe^{2+} - 20 mg/L de H_2O_2 no presentan diferencias significativas entre ellos, requiriendo 18,9 y 20 kJ/L de Q_{UV} respectivamente para alcanzar el LD. Por tanto, desde el punto de vista de efectividad, incrementar la concentración de hierro no mejora el proceso de inactivación (Figura 6.8). Sin embargo, la degradación del COD es ligeramente mayor en el caso de 10 mg/L Fe^{2+} (75 %) que en 5 mg/L (65 %) como se puede observar en la figura 6.9.

La inactivación de las esporas de *F. solani* mejora en los experimentos en los que se dosifica H_2O_2 durante la exposición solar, lo cual no ocurre en el caso del agua destilada. Durante estos ensayos, el H_2O_2 se consume muy rápidamente por lo que se añadió cada 30 minutos en la mayoría de los casos para mantener la relación 1:2 de Fe y H_2O_2 de cada condición experimental evaluada. La mayor eficiencia de inactivación se alcanza con 10 mg/L de Fe^{2+} (8,5 kJ/L de Q_{UV}) donde se obtuvo una degradación del COD del 83 % al final del experimento (total de H_2O_2 consumido = 100 mg/L). En el caso de 5 mg/L de Fe^{2+} se necesitaron 12,2 kJ/L de Q_{UV} para obtener el mismo resultado y la degradación del COD al final del experimento fue del 87 % (total de H_2O_2 consumido = 140 mg/L).

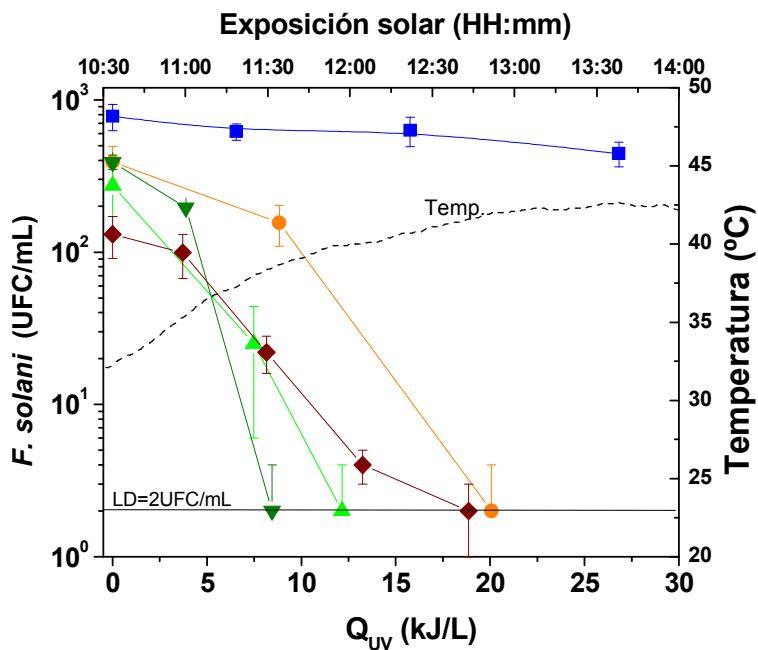


Figura 6.8. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor solar CPC de 60 L mediante foto-Fenton con sulfato ferroso solar en agua simulada de salida de EDAR:

- (-■-) 5 mg/L Fe^{2+} - 10 mg/L H_2O_2 a pH 8 (natural);
- (-○-) 5 mg/L Fe^{2+} - 10 mg/L H_2O_2 a pH 3;
- (-▲-) 5 mg/L Fe^{2+} - 10 mg/L H_2O_2 a pH 3 dosificando H_2O_2 ;
- (-◆-) 10 mg/L de Fe^{2+} - 20 mg/L H_2O_2 a pH 3;
- (-▼-) 10 mg/L Fe^{2+} - 20 mg/L H_2O_2 a pH 3 dosificando H_2O_2 .

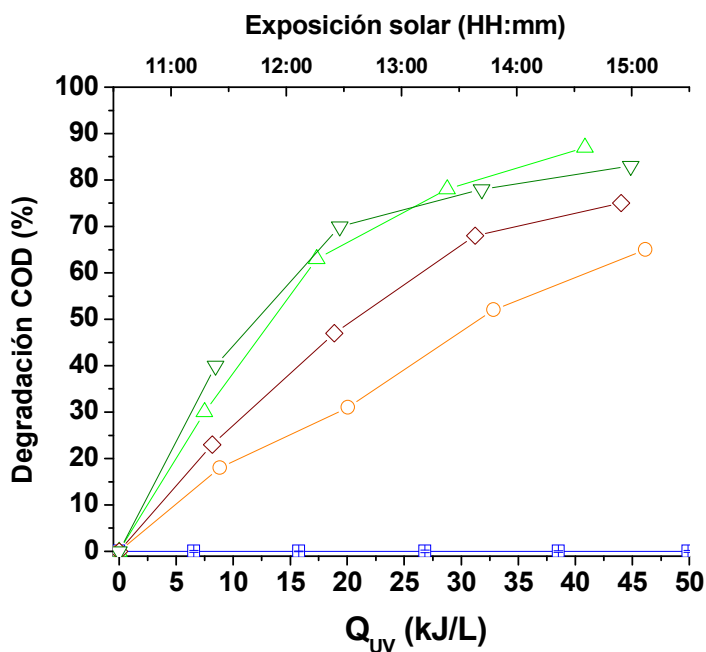


Figura 6.9. Evolución del COD durante los mismos experimentos desarrollados en la figura 6.8, éstos se representan por símbolos huecos: (-□-); (-○-); (-▲-); (-◆-); (-▼-).

Tabla 6.3. Datos medidos de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^T , pH_i , pH_f y Q_{UV} durante el proceso de foto-Fenton solar en agua simulada de salida de EDAR con Fe^{2+} y Fe^{3+} en reactor CPC de 60 L.

pH	Fe (mg/L)	H_2O_2 Total (mg/L)	Fe^{2+}/Fe_f^{2+} (mg/L)	Fe^{3+}/Fe_f^{3+} (mg/L)	Fe^T/Fe_f^T (mg/L)	pH_i	pH_f	Q_{uv}	Tiempo (h)
Foto-Fenton solar con sulfato ferroso (Fe^{2+})									
8	5	10	0/0	0/0	0/0	8,00	7,99	-	5
3	5	10	0,71/0,72	2,94/2,13	3,66/2,86	3,00	2,91	20,00	2
3	5+D	50	0,98/0,54	2,97/0,67	3,95/1,21	3,28	3,22	12,15	1,5
3	10	11,4	1,74/2,26	6,63/4,33	8,37/6,60	3,07	2,94	18,86	2
3	10+D	100	1,60/1,92	6,22/3,76	7,83/5,68	3,05	2,98	8,45	1
Foto-Fenton solar con nitrato férrico (Fe^{3+})									
3	5	10	0,50/1,47	4,57/3,48	5,08/4,96	3,08	3,03	19,16	2
3	5+D	70	0,40/1,10	3,61/2,31	4,01/3,42	3,08	2,98	13,86	1,5
3	10	20	0,61/2,56	7,77/4,92	8,39/7,49	3,04	2,94	18,53	2
3	10+D	140	0,23/1,13	6,12/6,32	8,21/7,46	3,05	2,97	12,26	1,5

+D = Dosificación de H_2O_2 a lo largo del experimento (10 mg/L)

Los resultados obtenidos con Fe^{3+} tanto en el proceso de inactivación de esporas fúngicas como en la degradación del COD se muestran en las figuras 6.10 y 6.11 respectivamente. Los datos registrados de medidas de hierro y H_2O_2 , pH y Q_{UV} se muestran en la tabla 6.3. Las curvas de inactivación de esporas y de degradación del COD muestran un patrón similar al obtenido con Fe^{2+} , donde la adición de H_2O_2 en dosis a lo largo del experimento mejora los resultados. La concentración de 10 mg/L de Fe^{3+} no mejora significativamente los resultados si se compara con el tratamiento a 5 mg/L de Fe^{3+} . Sin embargo, desde el punto de vista de la degradación del COD (Figura 6.11), se puede observar que existe una ligera mejora con la concentración de Fe^{3+} más alta al igual que si se dosifica H_2O_2 , aunque entre todos los resultados obtenidos no existen grandes diferencias.

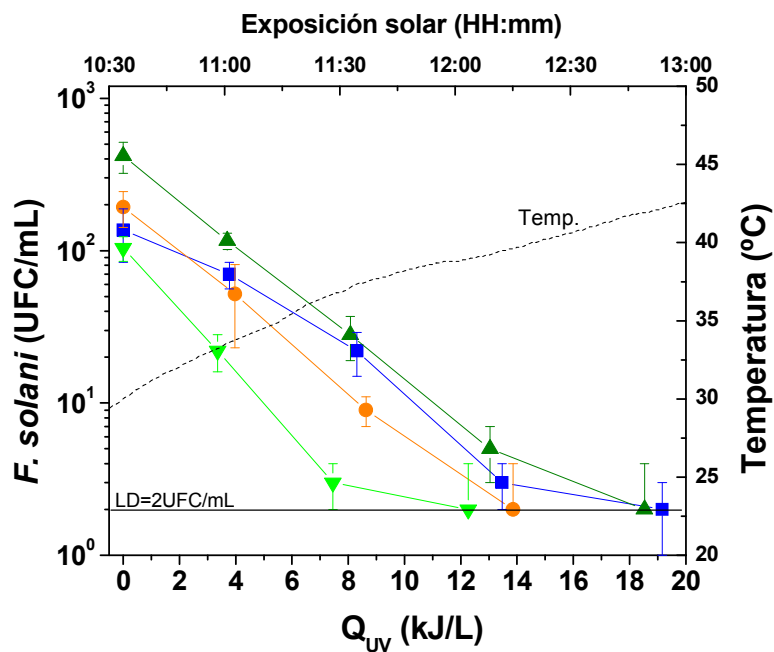


Figura 6.10. Inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L mediante foto-Fenton solar con nitrato férrico en agua simulada de salida de EDAR:

(-■-) 5 mg/L Fe^{3+} - 10 mg/L H_2O_2 ;

(-●-) 5 mg/L Fe^{3+} - 10 mg/L H_2O_2 dosificando H_2O_2 ;

(-▲-) 10 mg/L Fe^{3+} - 20 mg/L H_2O_2 ;

(-▼-) 10 mg/L Fe^{3+} - 20 mg/L H_2O_2 dosificando H_2O_2 .

La temperatura se representa por la línea discontinua.

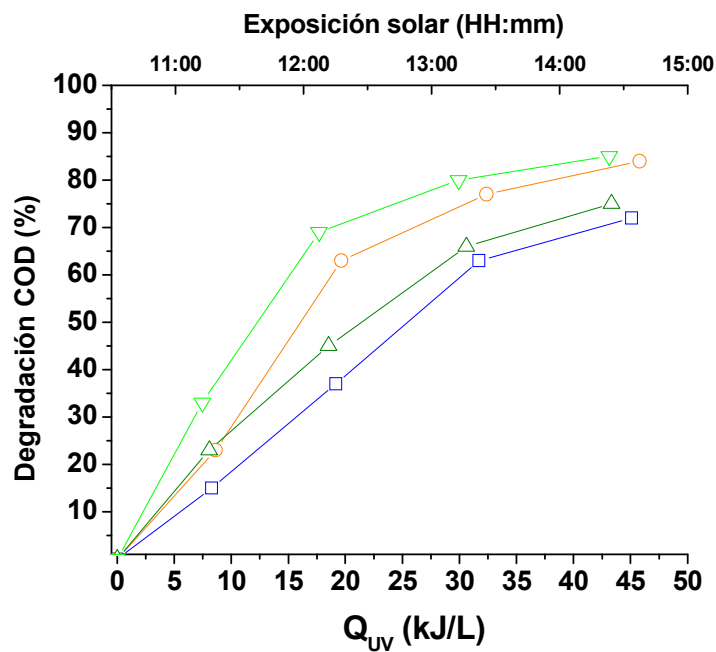


Figura 6.11. Evolución del COD durante los experimentos de la figura 6.10 representados por símbolos huecos: (-□-); (-○-); (-△-); (-▼-).

Como se ha comentado, si se comparan los resultados de degradación de COD con Fe^{2+} y Fe^{3+} se puede observar que no existen diferencias significativas, mientras que respecto a la inactivación de esporas el resultado sí varía, ya que con 8,5 kJ/L y 12,2 kJ/L de Q_{UV} en el caso de 10 y 5 mg/L de Fe^{2+} dosificando H_2O_2 , se alcanza el LD más rápidamente que a las mismas concentraciones en el caso del Fe^{3+} , las cuales necesitaron 12,3 kJ/L y 13,9 kJ/L de Q_{UV} . Esta diferencia se puede explicar de forma similar al caso del agua destilada. Además, la posible formación de complejos de Fe^{3+} con compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua simulada de salida de EDAR, pueden producir un efecto negativo. Por ejemplo, el sulfato y el cloruro presentes en este tipo de agua al reaccionar con el hierro genera especies menos reactivas como SO_4^- o Cl_2^- [De Laat, 2004]. Por tanto, la presencia de aniones inorgánicos en este tipo de agua puede afectar a la reactividad y distribución de las especies de hierro. Estas especies pueden reaccionar con el radical hidroxilo formando radicales inorgánicos menos reactivos y generar reacciones oxidativas que involucren dichos radicales inorgánicos.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en el agua simulada de salida de EDAR muestran una mejor inactivación al compararlos con los obtenidos en agua destilada. Esta diferencia se debe a que la concentración del hierro disuelto en el caso del agua simulada de salida de EDAR es mayor que en el agua destilada ya que se ajustó el pH al óptimo de la reacción de Fenton lo que favorece una mayor solubilidad del hierro. Además las temperaturas alcanzadas durante los experimentos en agua simulada de salida de EDAR son más elevadas que en el agua destilada. Aunque la temperatura no es el factor determinante de la inactivación de esporas por foto-Fenton solar, el aumento de la misma favorece las reacciones químicas del proceso y la inactivación de los microorganismos. Algunos estudios describen en la literatura el efecto que produce la temperatura sobre la reacción de foto-Fenton. Gernjak y cols. demostraron que, a una concentración máxima de hierro de 2,6 mM, la velocidad de reacción aumentaba 5 veces al incrementar la temperatura desde 20 a 50 °C [Gernjak y cols., 2006]. Además, en este trabajo el efecto de aumentar la temperatura hace que aumente la adición de H_2O_2 durante los experimentos, requiriendo dosis de 10 mg/L de H_2O_2 cada 30 minutos.

Con respecto a la mineralización del COD (Figura 6.11), los resultados mejoran ligeramente con la dosificación de H_2O_2 durante los experimentos. La tabla 6.3 muestra que los experimentos con adición extra de H_2O_2 en dosis, consumieron 50 y 100 mg/L de H_2O_2 en el caso de 5 y 10 mg/L de Fe^{2+} . En el caso del Fe^{3+} se consumieron 70 y 140 mg/L de peróxido de hidrógeno. La degradación del COD puede alcanzar una fase

estacionaria, donde un aumento de la concentración de reactivos no implica necesariamente la completa mineralización de la materia orgánica. Esto se debe a que los compuestos orgánicos en el agua son principalmente compuestos alifáticos de cadena corta como ácidos carboxílicos (acético, fórmico, propiónico, pirúvico, oxálico y maleico) cuya degradación mediante foto-Fenton solar se ralentiza. Este efecto se observa en las figuras 6.9 y 6.11 donde la velocidad de mineralización decrece a lo largo del tratamiento de foto-Fenton, siendo ésta mayor en las dos primeras horas de tratamiento. Esta diferencia es más importante en el caso del Fe^{3+} que en el de Fe^{2+} (Figura 6.9) donde la adición de H_2O_2 aumenta la degradación del COD. Además, en el caso del Fe^{2+} se necesita menos concentración de H_2O_2 para alcanzar una degradación de COD similar al de Fe^{3+} , lo cual desde el punto de vista económico supone una mejora del tratamiento.

De forma general, los mejores resultados se obtienen utilizando Fe^{2+} con una adición periódica de H_2O_2 . Desde el punto de vista de la inactivación de esporas, 10 mg/L de Fe^{2+} y 20 mg/L de H_2O_2 (con adición) producen la mejor eficiencia de todos los casos estudiados. Desde el punto de vista de la reducción del COD, con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 se obtiene el mayor grado de mineralización (87 %). Con objeto de reducir costes y dado que la diferencia de inactivación entre 5 y 10 mg/L de hierro no es significativa, se selecciona 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 con dosificación de peróxido para los experimentos con efluente real de EDAR. No obstante, la determinación de las condiciones idóneas de foto-Fenton con efluentes reales requeriría un estudio detallado adicional al presentado en este estudio.

6.4.3. Agua real de salida de EDAR (El Bobar, Almería)

El tratamiento fotocatalítico mediante foto-Fenton solar también se llevó a cabo utilizando un efluente real de salida de EDAR. Los experimentos se realizaron con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 (Figura 6.12.a). Durante el periodo de exposición solar se añadió H_2O_2 (10 mg/L) cada 30 minutos siendo el consumo final de H_2O_2 de 80 mg/L. El efluente de EDAR se acidificó hasta un pH ~ 3, que se mantuvo constante durante 5 h de tratamiento experimental. Esto favorece la solubilidad del hierro en el agua y la eliminación de carbonatos y bicarbonatos en forma de CO_2 . El OD varió de 8,2 mg/L a 7,98 mg/L. La temperatura inicial fue de 31,9 °C y el máximo alcanzado fue 42,4 °C. La inactivación de esporas de *F. solani* se alcanza con un Q_{UV} de 28 kJ/L y el resto de hongos presentes en el agua necesitaron 34,8 kJ/L. El COD descendió desde 11,8 mg/L a 7,7 mg/L, lo que significa un 34 % de reducción.

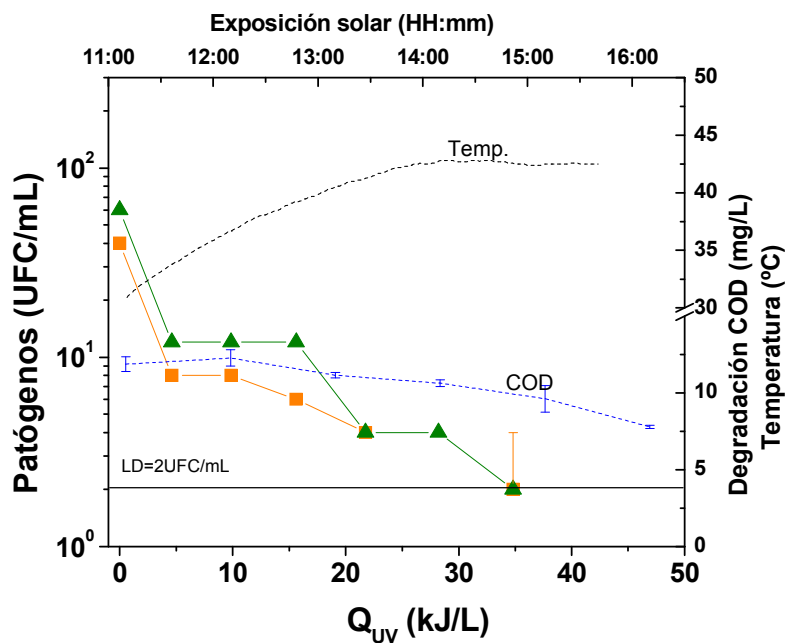
La figura 6.12.b muestra la evolución del hierro total, Fe^{2+} , Fe^{3+} y H_2O_2 a lo largo del tratamiento experimental. Se puede observar que el hierro total disuelto, aun cuando se añaden inicialmente 5 mg/L, se reduce hasta 1,5 mg/L debido a la presencia de otros compuestos químicos, especialmente los fosfatos. Uno de los principales problemas a la hora de aplicar el tratamiento de foto-Fenton a un agua residual real es la presencia de fosfatos. La 91/271/CEE especifica unos valores límite para el vertido de fosfatos a las aguas receptoras. En función del tamaño de la EDAR, estos valores son 2 mg/L de fosfato total (10000 - 100000 h-e) o 1 mg/L de fosfato total (> 100000 h-e). Los agentes de precipitación más empleados en su eliminación son el Fe^{3+} y Fe^{2+} en forma de cloruros o sulfatos; el Ca^{2+} en forma de cal; y el Al^{3+} en forma de alumbre ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$), sulfato de aluminio o aluminato sódico ($Na-AlO_2$), así como combinaciones de Fe^{3+} y cal. El mecanismo de eliminación es fundamentalmente por precipitación en forma de fosfatos de calcio, hierro y aluminio. Los fosfatos reaccionan con el hierro formando complejos que precipitan de acuerdo con la siguiente reacción:



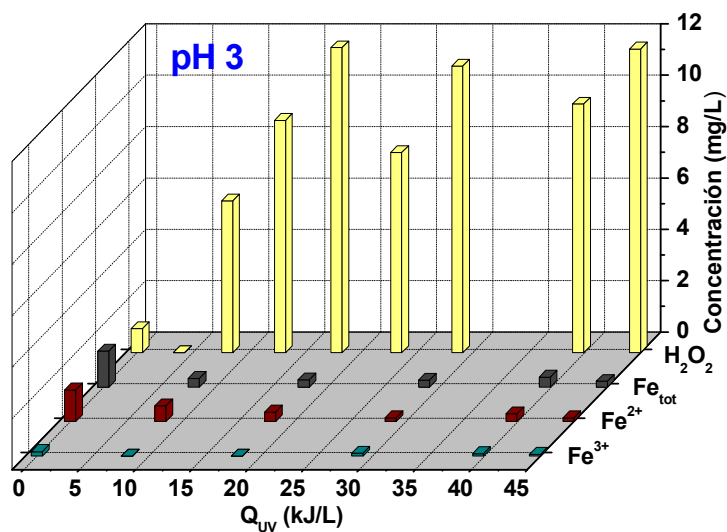
En particular, en el análisis de compuestos químicos realizado al efluente de EDAR de El Bobar se observaron concentraciones anormalmente altas de fosfatos. Esto explica la precipitación del hierro obtenida en este ensayo aun cuando el pH era favorable para mantenerse en disolución.

Comparando estos resultados con los obtenidos con el tratamiento de TiO_2 /Solar, se puede concluir que el uso de TiO_2 supone una ligera mejora comparada con el proceso de foto-Fenton solar. Los resultados de este tratamiento mejorarían en el caso de eliminar los mencionados carbonatos y bicarbonatos del agua.

El foto-Fenton es el tratamiento más efectivo de todos los estudiados para la reducción del COD. No obstante, mayores concentraciones de hierro disuelto podrían mejorar el resultado final. Con respecto al tipo de agua, se observa que a medida que aumenta la complejidad química del agua, la eficiencia del tratamiento fotocatalítico disminuye. El orden de eficiencia (de mayor a menor) del proceso de foto-Fenton solar para los distintos tipos de agua es: **agua destilada > efluente simulado de EDAR > efluente real de EDAR**.



a)



b)

Figura 6.12. a) Inactivación de esporas de *F. solani* (—■—) y otros hongos (—▲—) en agua real de salida de EDAR mediante foto-Fenton solar con 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 , añadiendo peróxido cada 30 minutos (10 mg/L). La línea discontinua (---) representa el perfil térmico. La línea discontinua (---) muestra la evolución del COD a lo largo del tratamiento experimental. **b)** Evolución del Fe^T , Fe^{2+} , Fe^{3+} y H_2O_2 durante el tratamiento.

6.5. Estudio cinético de los distintos tratamientos solares evaluados en reactor solar CPC de 60 L

Las tablas 6.4 y 6.5 muestran el resultado de los ajustes cinéticos de los diferentes tratamientos solares: H₂O₂/Solar, TiO₂/Solar, foto-Fenton solar con Fe²⁺ y Fe³⁺ en agua destilada y agua simulada de salida de EDAR respectivamente, para la inactivación de esporas de *F. solani*. De manera general, el modelo cinético más utilizado para ajustar los datos de inactivación es el modelo 'log-lineal'.

Con respecto a la velocidad de inactivación en el tratamiento H₂O₂/Solar, existen diferencias significativas de la constante de inactivación (k) entre el agua destilada ($0,15 \pm 0,02$ L/kJ) y el agua simulada de salida de EDAR ($0,10 \pm 0,02$ L/kJ), de acuerdo con lo observado en los capítulos anteriores.

Tabla 6.4. Datos cinéticos obtenidos de los resultados experimentales de inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L con diferentes tratamientos solares en agua destilada.

Tratamiento solar	[Fe] (mg/L)	[H ₂ O ₂] (mg/L)	k (L/kJ)	Longitud hombro (kJ/L)	R ²	Modelo cinético
H ₂ O ₂	-	10	$0,15 \pm 0,02$	-	0,97	Log lineal
Foto-Fenton Fe ²⁺	5	10	$0,10 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,90$	0,91	Hombro + Log lineal
	5	10+D	$0,09 \pm 0,01$	-	0,96	Log lineal
	10	20	$0,10 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,50$	0,97	Hombro + Log lineal
Foto-Fenton Fe ³⁺	5	10	$0,10 \pm 0,20$	$0,60 \pm 0,40$	0,97	Hombro + Log lineal
	10	20	$0,05 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,50$	0,94	Hombro + Log lineal

+D = Dosificación de H₂O₂ a lo largo del desarrollo experimental (10 mg/L)

En el caso del tratamiento TiO₂/Solar en agua simulada de salida de EDAR, la constante cinética de inactivación alcanza un valor de $0,07 \pm 0,01$, esta constante también es inferior a la obtenida en el caso del agua destilada y agua natural de pozo (Tabla 3.8).

El foto-Fenton solar en agua destilada arroja cinéticas de inactivación cuyas constantes no muestran diferencias significativas al aumentar la concentración de Fe²⁺ o Fe³⁺. Aunque la k es ligeramente mayor en el caso del Fe²⁺. Las constantes cinéticas obtenidas en agua simulada de salida de EDAR con Fe²⁺ son también mejores que con Fe³⁺.

De forma general, las constantes de inactivación mejoran cuando se dosifica H₂O₂ a lo largo del tratamiento de foto-Fenton solar, especialmente en el caso de 10 mg/L de Fe²⁺. No obstante, la mejora con respecto a 5 mg/L de hierro no es tan significativa si se tiene en cuenta la cantidad de H₂O₂ gastado en el tratamiento. Por otro

lado, y como se esperaba, la peor constante de inactivación se obtiene a pH 8 debido a la ausencia de hierro disuelto en el sistema. El estudio cinético muestra que la mejor combinación de reactivos para inactivar microconidios del género *Fusarium* en agua simulada de salida de EDAR mediante foto-Fenton solar es 5 mg/L de Fe^{2+} y 10 mg/L de H_2O_2 .

Tabla 6.5. Datos cinéticos obtenidos de los resultados experimentales de inactivación de esporas de *F. solani* en reactor CPC de 60 L con diferentes tratamientos solares en agua simulada de salida de EDAR.

Tratamiento solar	[Fe] (mg/L)	[H_2O_2] (mg/L)	k (L/kJ)	R ²	Modelo cinético
H_2O_2	-	10	0,10±0,02	0,95	Log lineal
TiO_2 (100 mg/L)	-	-	0,07±0,01	0,95	Log lineal
Foto-Fenton Fe^{2+}	5 (pH8)	10	0,01±0,00	0,99	Log lineal
	5	10	0,10±0,03	0,95	Log lineal
	5	50+D	0,17±0,02	0,98	Log lineal
	10	20	0,10±0,01	0,98	Log lineal
	10	100+D	0,30±0,10	0,93	Log lineal
Foto-Fenton Fe^{3+}	5	10	0,10±0,01	0,98	Log lineal
	5	70+D	0,14±0,01	0,99	Log lineal
	10	20	0,12±0,01	0,99	Log lineal
	10	140+D	0,14±0,03	0,95	Log lineal

+D = Dosificación de H_2O_2 a lo largo del desarrollo experimental (10 mg/L)

En el caso del agua real de efluente de EDAR, no se realizaron los ajustes cinéticos de los resultados de inactivación de esporas debido a que no se disponían de datos suficientes como para realizar un ajuste adecuado.

7. ASPECTOS REMARCABLES DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA MEDIANTE TRATAMIENTOS SOLARES

La aplicación de tratamientos alternativos a los tradicionales para la desinfección de agua es un campo de estudio bajo continua investigación con el objetivo de abastecer a la población mundial de agua de calidad adecuada. Una de las alternativas más evidentes para la obtención de agua útil para actividades humanas es la reutilización del agua procedente de estaciones de depuración de aguas residuales. El reúso de agua puede ser de gran utilidad especialmente en la agricultura. Los tratamientos solares estudiados no vienen a sustituir a los tratamientos biológicos de aguas convencionales, sino que debe considerarse su aplicación como tratamiento terciario para la eliminación de los microorganismos que quedan en la corriente de salida del reactor biológico secundario de una EDAR.

Aunque la reutilización del agua residual es una de las principales aplicaciones de estos tratamientos fotocatalíticos, existen otras actividades con circuitos cerrados de agua que las hacen susceptibles a estas tecnologías avanzadas para la eliminación de

microorganismos, por ejemplo la agricultura hidropónica recirculante, sistemas de refrigeración de torres en hospitales, sistemas de recirculación de tanques en acuicultura, aguas de embarcaciones, etc.

Dado que la diversidad de ambientes acuáticos sobre la superficie terrestre es tan grande, no existe una solución universal para todos los problemas de contaminación de aguas. La elección de un tratamiento u otro para su implantación a escala real depende de muchas variables que deben ser estudiadas y optimizadas de forma adecuada. Los principales criterios a tener en cuenta a la hora de valorar cual sería el tratamiento alternativo más adecuado de los estudiados en este trabajo experimental son los siguientes:

- (i) Volumen total y caudal del agua a tratar.
- (ii) Características de la contaminación microbiológica, como el tipo de microorganismo, concentración en la que se presenta y variabilidad de la misma.
- (iii) Costes directos e indirectos del tratamiento, donde deberían incluirse tanto los costes de la instalación, como los de reactivos y de personal.
- (iv) Cualificación adecuada del personal operador de la planta al tratar con protocolos y metodología en los que se manipulan microorganismos potencialmente peligrosos.
- (v) Características físico-químicas de la fuente de agua que se quiere tratar ya que no es lo mismo tratar un agua embalsada, agua procedente de un lago (limpia o en proceso de eutrofización) o agua de salida de una EDAR.
- (vi) La aplicación final del agua tratada ya que, como se describió en la introducción, los requerimientos físico-químicos y microbiológicos exigidos dependen del uso final de la misma.
- (vii) Aspectos prácticos y tecnológicos de cada tratamiento fotocatalítico (Tabla 7.1).

Tabla 7.1 Principales características del tratamiento fotocatalítico heterogéneo con TiO_2 y homogéneo mediante foto-Fenton.

	TiO_2 (heterogéneo)	Foto-Fenton (homogéneo)
Catalizador	TiO_2 en suspensión	Fe y H_2O_2 en disolución
Concentración de catalizador	0,05 – 1 g/L	5- 20 mg/L
Toxicidad del catalizador	Inocuo	Inocuo si presente en bajas concentraciones de forma natural en el agua
Espectro solar utilizado	UV	UV y Visible
pH óptimo del agua	A estudiar en cada caso	Inferior a 3
Reactivos limitantes	Oxígeno	H_2O_2
Pre-tratamiento	Eliminar turbidez	Acidificación y eliminar turbidez
Post-tratamiento	Filtración para garantizar la ausencia de catalizador en agua.	Neutralización de pH
Eliminación del catalizador	A pH neutro se produce su sedimentación.	No es necesario a estas concentraciones. Pérdida de la mayor parte tras la neutralización.

Según los resultados presentados en este estudio experimental, la fotocatalisis solar con TiO_2 se podría utilizar para la desinfección de agua de salida de EDAR dado que la inactivación obtenida es muy eficiente, con la ventaja de no tener que modificar el pH de la suspensión. Sin embargo, la presencia de iones como cloruros, fosfatos, carbonatos y bicarbonatos, puede afectar negativamente a la eficiencia del proceso. Con lo cual los tiempos de tratamiento se alargarían y se encarecería el coste del agua tratada. Inmovilizar el TiO_2 es una forma de reducir la necesidad de retirar el catalizador del agua. Sin embargo, hasta la fecha los estudios de desinfección con TiO_2 inmovilizado no han mostrado mejores resultados que el catalizador en suspensión.

El uso del proceso de foto-Fenton presenta buenas eficacias desinfectantes bajo las condiciones de operación estudiadas en este trabajo, pero el principal inconveniente es que el pH óptimo es 2,8 y a pH cercano a la neutralidad no se mantiene el hierro en disolución y la eficiencia del proceso es prácticamente nula o se debe únicamente al efecto del peróxido de hidrógeno. Los costes asociados al ajuste final tras el tratamiento de pH 2,8-3 a neutro encarecen el tratamiento. Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de fosfatos en las aguas reduce drásticamente la capacidad de acción del foto-Fenton pues los iones fosfato reaccionan con el hierro y éste precipita rápidamente. Existen trabajos de investigación centrados en el uso de compuestos complejantes que permitan mantener ciertas concentraciones de hierro en disolución a pH neutro, como por ejemplo el ferroxialato [Cho y cols., 2004]. La presencia de carbonatos y bicarbonatos también podrían limitar la eficacia del proceso de foto-Fenton

por su tendencia a capturar los radicales hidroxilo, sin embargo esto no se da a pH 2,8-3 porque estas especies han desaparecido en forma de CO₂.

El tratamiento H₂O₂/Solar puede ser un buen candidato para la inactivación de microorganismos presentes en aguas embalsadas con baja carga orgánica ya que el COD no se degrada con este tratamiento pero bacterias y hongos demuestran una alta susceptibilidad al mismo. Presenta un alto potencial de aplicación para su uso en agricultura y su posible aplicación en países en vías de desarrollo pues se contempla como un aditivo al proceso SODIS en botella PET a concentraciones tan bajas que las posibles cantidades residuales se auto-descompongan antes de que el agua sea consumida [Sciacca y cols., 2010].

Si se pretende realizar un tratamiento de aguas contaminadas en el que además de desinfectar se pretenda reducir la cantidad de carbono orgánico disuelto, entonces tanto el tratamiento con TiO₂ y H₂O₂ con luz solar tienen una capacidad muy limitada pues los resultados en aguas reales muestran bajadas de COD muy escasas (menos del 10 %), mientras que el proceso de foto-Fenton a pH 3 es ideal para la reducción de COD incluso en efluentes reales de EDAR.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de aplicar estos tratamientos fotocatalíticos es la disponibilidad de suficiente radiación solar natural, lo cual, tal y como se muestra en el Anexo I, es posible en la localización en la que se ha llevado a cabo este trabajo experimental, el sur de España.

8. CONCLUSIONES

1. La evaluación global de los resultados, en reactor de botella y reactores CPC de 14 y 60 L, del tratamiento de fotocátalisis solar con TiO_2 para la inactivación de esporas de *Fusarium* spp. demostró, en las condiciones de irradiancia solar natural y para los distintos tipos de agua estudiados, la alta eficacia de este proceso para reducir concentraciones de 1000 UFC/mL hasta el límite de detección del método de cuantificación.
2. El estudio comparativo de inactivación mediante fotocátalisis solar con TiO_2 de tres tipos de esporas de *Fusarium* spp., microconidios, macroconidios y clamidosporas, mostró una mayor resistencia de las clamidosporas al tratamiento debido a la elevada robustez de su pared celular.
3. La observación de las suspensiones de esporas durante el tratamiento fotocatalítico solar con TiO_2 ha mostrado la elevada afinidad entre las esporas de *Fusarium* spp. y *Phytophthora capsici* y la superficie de las partículas de catalizador. Esta propiedad favorece sin duda la eficiencia de la desinfección fotocatalítica dada la vida media tan corta del radical hidroxilo (~ 1 ns).
4. La desinfección de varios tipos de agua con radiación solar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 (10 mg/L), demuestra que entre los fotones solares (no solo en el rango UV-A sino también parte del visible) y el peróxido de hidrógeno se da un efecto sinérgico germicida comparable en eficiencia a los tratamientos fotocatalíticos solares estudiados en este trabajo.
5. La inactivación de esporas de *Fusarium* spp. mediante fotocátalisis solar con TiO_2 y foto-Fenton, en las condiciones óptimas de cada tratamiento, muestran cinéticas de primer orden debido fundamentalmente a la generación de radicales hidroxilo en presencia de fotones UV-A y UV-A-Vis, respectivamente.

6. En el caso de la radiación solar con peróxido de hidrógeno, la observación de cinéticas de inactivación con una fase estacionaria seguida de un descenso lineal sugirió el importante papel que juegan los procesos biológicos y las reacciones químicas internas de las esporas para interpretar los resultados y justificar su inactivación, pues no se generan radicales hidroxilo por foto-inactivación del H_2O_2 con luz solar.
7. Los tratamientos fotoquímicos y fotocatalíticos estudiados para cuatro tipos de agua diferentes: agua destilada, natural de pozo, efluente de EDAR simulado y real, revelan el papel limitante que algunas especies químicas juegan sobre la eficiencia de los mismos. Por ejemplo, la abundancia de iones carbonato y bicarbonato en agua de pozo y efluentes de EDAR limita la velocidad de desinfección mediante fotocatálisis con TiO_2 y foto-Fenton.
8. La exposición de las esporas de *Fusarium* spp. al tratamiento de foto-Fenton a pH 3 mostró cinéticas de inactivación similares a las obtenidas con TiO_2 y H_2O_2 en presencia de luz solar. No obstante, presenta la ventaja de mineralizar la materia orgánica disuelta, frente al resto de las técnicas solares evaluadas.
9. El empleo de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} en el proceso de foto-Fenton solar produjo resultados de desinfección dispares dependiendo del tipo de espora, mientras que no se observaron diferencias en la degradación de materia orgánica. Por tanto, el estado de oxidación del hierro tiene una función determinante en el proceso de desinfección porque interacciona con la espora de diferentes formas.
10. El empleo de reactores solares tipo CPC para la inactivación de esporas en agua ha mostrado de forma exitosa la viabilidad en el escalado del proceso desde volúmenes de centilitros a varias decenas de litros.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acra, A.; Karahagopian, Y.; Raffoul, Z.; Dajani, R. (1980). Disinfection of oral rehydration solutions by sunlight. *The Lancet*, 2: 1257-1258.
- Agrios, G.N. (2004). Plant Pathology. 5^a ed. Elsevier Academic Press, San Diego, California. ISBN 0-12-044565-4, 948 pp.
- Agüera, A.; Almansa, E.; Tejedor, A.; Fernández-Alba, A.; Malato, S.; Maldonado, M.I. (2000). Photocatalytic pilot scale degradation study of pyrimethanil and of main degradation products in waters by means of solid-phase extraction followed by gas and liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Environmental Science Technology*, 34(8): 1563-1571.
- Ahlstrom. (1999). European Patent, EP1069950 granted.
- Ahonsi, M.O.; Doan, S.; Demuren, A.; Banko, T.J.; Copes, W.E. y Hong, C.X. (2010). Effects of hydrostatic pressure, agitation and CO₂ stress on *Phytophthora nicotianae* zoospores in simulated recycled irrigation water. *Pest Management Science*, 66: 696-704.
- Al Dufour; Snozzi, M.; Koster, W.; Bartram, J.; Ronchi, E.; Fewtrell, L. (Ed.) (2003). Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods. WHO (ISBN 92 4 154630 1); IWA (ISBN 1 84339 036 1), 295 pp.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). (1975). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th Edition, Method 214A, p. 132.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). (1998). Standard Methods for the examination of Water and Waste Water. 20th Edition. United Book Press Inc., Maryland.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). (1987). Standard tables for terrestrial direct normal solar spectral irradiance for air mass 1, 5.
- Anaissie, E.J.; Kuchar, R.T.; Rex, J.H.; Francesconi, A.; Kasai, M.; Müller, F.C.; Lozano-Chiu, M.; Summerbell, R.C.; Dignani, M.C.; Chanock, S.J.; Walsh, T.J. (2001). Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital

- water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1871-1878.
- Anathaswamy, H.N. y Eisenstark, A. (1976). Near-UV-induced breaks in phage ADN sensitization by hydrogen peroxide (a tryptophan photoproduct). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 24(5): 439-442.
- Anathaswamy, H.N. y Eisenstark, A. (1977). Repair of hydrogen peroxide induced single strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 130(1): 187-191.
- Anathaswamy, H.N.; Hartman, P.S.; Eisenstark, A. (1979). Synergistic lethality of phage T7 by near-UV radiation and hydrogen peroxide: an action spectrum. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 29: 53-56.
- Andriopoulos, B.; Hegedüs, B.; Mangin, J.; Riedel, H.; Hebling, U.; Wang, J.; Pantopoulos, K.; Mueller, S. (2007). Sustained Hydrogen Peroxide Induces Iron Uptake by Transferrin Receptor-1 Independent of the Iron Regulatory Protein/Iron-responsive Element Network. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(28): 20301-20308.
- Armellao, L.; Barreca, D.; Bottaro, G.; Gasparotto, A.; Maccato, C.; Maragno, C.; Tondello, E.; Štangar, U.L.; Bergant, M.; Mahne, D. (2007). Photocatalytic and antibacterial activity of TiO₂ and Au/TiO₂ nanosystems. *Nanotechnology*, 18(37): 5709-5716.
- Augugliaro, V.; Baiocchi, C.; Bianco Prevot, A.; García-López, E.; Loddo, V.; Malato, S.; Marcí, G.; Palmisano, L.; Pazzi, M.; Pramauro, E. (2002). Azo-dyes photocatalytic degradation in aqueous suspension of TiO₂ under solar irradiation. *Chemosphere*, 49: 1223-1230.
- Augugliaro, V.; Litter, M.; Palmisano, L. y Soria, J. (2006). The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: a tool for improving the photo-process performance. *Journal of Photochemistry & Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 7: 127-144.
- Bahnmann, D.W.; Bockelmann, D.; Goslich, R.; Hilgendorff, M.; Weichgrebe, D. (1993). Photocatalytic Detoxification: Novel Catalyst, Mechanism and Solar Applications. En: Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air. D. Ollis and H. Al-Ekabi (Eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp: 301-319.
- Bandala, E.R.; González, L.; de la Hoz, F.; Pelaez, M.A.; Dionysiou, D.D.; Dunlop, P.S.M.; Byrne, J.A.; Sanchez, J.L. (2011). Application of azo dyes as dosimetric

- indicators for enhanced photocatalytic solar disinfection (ENPHOSODIS). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 218: 185-191.
- Barb, W.G.; Baxendale, J.H.; George, P.; Hargrave, K.R. (1949). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Nature*, 163: 692-694.
- Barb, W.G.; Baxendale, J.H.; George, P.; Hargrave, K.R. (1951a). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part I. – The ferrous ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47: 462-500.
- Barb, W.G.; Baxendale, J.H.; George, P.; Hargrave, K.R. (1951b). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part II. – The ferric ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47: 591-616.
- Barr, D.J.S. y Desaulniers, N.L. (1990). The flagellar apparatus in zoospores of *Phytophthora infestans* zoospores. *Canadian Journal of Botany*, 68: 2112-2118.
- Barr, D.J.S. (1992). Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia*, 84: 1-11.
- Bartnicki-Garcia, S. y Wang, M.C. (1983). Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. En: *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, y P.H. Tsao (Eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp: 121-137.
- Beckman, C.H. (1987). The nature of wilt diseases of plants. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, 175 pp.
- Beinert, H.; Kennedy, M.C.; Stout, C.D. (1996). Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chemical Reviews*, 96: 2335-2374.
- Belhácová, L.; Krýsa, J.; Geryk, J.; Jirkovský, J. (1999). Inactivation of microorganisms in a flow-through photoreactor with an immobilized TiO₂ layer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(2): 149-154.
- Benitez, F.J.; Beltran-Heredia, J.; Acero, J.L. y Gonzalez, T. (1996). Degradation of protocatechuic acid by two advanced oxidation processes: Ozone/UV radiation and H₂O₂/UV radiation. *Water Research*, 30: 1597-1604.
- Berney, M.; Weilenmann, H.U.; Simonetti, A.; Egli, T. (2006). Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 828-836.

- Bernhardt, E.A. y Grogan, R.G. (1982). Effect of soil matric potential on the formation and indirect germination of sporangia of *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, and *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology*, 72: 507-511.
- Blanco, J.; Malato, S.; Fernández, P.; Vidal, A.; Morales, A.; Trincado, P.; Oliveira, J.C.; Minero, C.; Musci, M.; Casalle, C.; Brunotte, M.; Tratzky, S.; Dischinger, N.; Funken, K-H.; Sattler, C.; Vincent, M.; Collares-Pereira, M.; Mendes, J.F.; Rangel, C.M. (2000). Compound parabolic concentrator technology development to comercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, 67(4-6): 317-330.
- Blanco, J. (2002a). Desarrollo de colectores solares sin concentración para aplicaciones fotoquímicas de degradación de contaminantes persistentes en agua. (Tesis Doctoral). Universidad de Almería.
- Blanco, J.; Malato, S.; Lans, P.; Hulshoff, L.; Wildener, P.; Asano, T. (2002b). Solar photocatalysis: Application to the treatment of pesticides in water. Water recycling and resource recovery. En: Industry: Analysis, Technologies and Implementations. IWA Publish (Eds.), London, UK.
- Blanco-Gálvez, J.; Fernández-Ibáñez, P.; Malato-Rodríguez, S. (2007). Solar photocatalytic detoxification and disinfection of water: Recent overview. *Journal of Solar Energy Engineering, Transactions ASME*, 129: 1-12.
- Blatchley III, E. R.; Hunt, B.A.; Duggirala, R.; Thompson, J.E.; Zhao, J.; Halaby, T. Cowger R.I., Straub C.M., Alleman J.E. (1997). Effects of disinfectants on wastewater effluent toxicity. *Water Research*, 31: 1581-1588.
- Block, S.S.; Seng, V.P.; Goswami, D.W. (1997). Chemically enhanced sunlight for killing bacteria. *Journal of Solar Energy Engineering, Transactions ASME*, 119(1): 85-91.
- Block, S.S. (2001). Disinfection, sterilization and preservation. Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, USA, 1481 pp.
- Bollen, G. (1969). The selective effect of heat treatment on the microflora of greenhouse soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 75: 157-163.
- Bollen, G.J. (1985). Lethal temperatures of soil fungi. En: Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. C.A. Parker, A.D. Rovira, K.J. Moore, P.T.W. Wong, y J.F. Kollmorgen (Eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp: 191-193.

- Bolton, J.R.; Bircher, K.G.; Tumas, W.; Tolman, C.A. (2001). Figures-of-merit for the technical development and application of Advanced Oxidation Technologies for both electric- and solar-driven systems. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 627-637.
- Bolton, J.R. y Linden, K.G. (2003). Standarization of methods for fluence (UV Dose). Determination in bench-scale UV experiments. *Journal of environmental Engineering*, 129: 209-215.
- Boyle, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P.; Arias-Quiroz, G.B.; Iriarte-Puñaa, M.; Mercado, A.; Ubomba-Jaswa, E. y McGuigan, K.G. (2008). Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and environmental microbiology*, 74(10): 2997-3001.
- Brasier, C.M.; Cooke, D.E.L.; Duncan, J.M.; Hansen, E.M. (2003). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* – *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research*, 107: 277-290.
- Brown, R.F.; Jamison, S.E.; Pandit, U.K.; Pinkus, J.; White, G.R.; Braendlin, H.P. (1964). The reaction of Fenton's reagent with phenoxyacetic acid and some halogen-substituted phenoxyacetic acids. *Journal of Organic Chemistry*, 29(1): 146-153.
- Bush, E.A.; Hong, C. y Stromberg, E.L. (2003). Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a recycling irrigation system. *Plant disease*, 87: 1500-1506.
- Buxton, G.V.; Greenstock, C.L.; Helman, W.P.; Ross, A.B. (1988). Critical review of data constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2): 513-886.
- Byrt, P.N.; Irving, H.R. y Grant, B.R. (1982). The effect of cations on zoospores of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of General Microbiology*, 128: 1189-1198.
- Cabanes, F.J.; Alonso, J.M.; Castella, G.; Alegre, F.; Domingo, M.; Pont, S. (1997). Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta* L.). *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12): 3343-3345.
- Canonica, S.; Kohn, T.; Mac, M.; Real, F.J.; Wirz, J.; von Guten, U. (2005). Photosensitizer method to determine rate constants for the reaction of carbonate radical with organic compounds. *Environmental Science Technology*, 39: 9182-9188.

- Carey, J.H.; Lawrence, J.; Tosine, H.M. (1976). Photodechlorination of PCBs in the presence of TiO_2 in aqueous suspensions. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 16(6): 697-701.
- Caslake, L.F.; Connolly, D.F.; Menon, V.; Duncanson, C.M.; Rojas, R.; Tavakoli, A. (2004). Disinfection of contaminated water by using solar irradiation. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1145-1150.
- Cassano A.E. y Alfano O.M. (2000). Reaction engineering of suspended solid heterogeneous photocatalytic reactors. *Catalysis Today*, 58: 167-197.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom Chromista: origin and systematics. En: Progress in phycological research. Vol. 4. I. Round y D.J. Chapman (Eds.). Biopress, Bristol, U.K., pp: 309-347.
- Cavalier-Smith, T. (1987). The origin of fungi and pseudofungi. En: Evolutionary biology of fungi. A.D.M. Rayner, C.M. Brasier y D. Moore (Eds.). Cambridge Univ. Press., Bristol, U.K., pp: 334-359.
- Cerf, O. (1977). A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology*, 42: 1-19.
- Chen, F.N.; Yang, X.D.; Wu, Q. (2009). Antifungal capability of TiO_2 coated film on moist wood. *Building and Environment*, 44(5): 1088-1093.
- Chick, H. (1908). An investigation into the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*, 8: 92-158.
- Chitarra, G.S.; Breeuwer, P.; Rombouts, F.M.; Abee, T.; Dijksterhuis, J. (2005). Differentiation inside multicelled macroconidia of *Fusarium culmorum* during early germination. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 694-703.
- Cho, M.; Lee, Y.; Chung, H.; Yoon J. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* by photochemical reaction of ferrioxalate at slightly acidic and near-neutral pHs. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 1129-1134.
- Chung, C.J.; Lin, H.I.; Chou, C.M.; Hsieh, P.Y.; Hsiao, C.H.; Shi, Z.Y.; He, J.L. (2009). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surface and Coating Technology*, 203(8): 1081-1085.
- Cochrane, V.W.; Cochrane, J.C.; Vogel, J.M.; Coles, R.S. (1963). Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. IV. Metabolism of ethanol and acetate. *Journal of Bacteriology*, 86: 312-319.

- Coelho, L.; Mitchell, D.J. y Chellemi, D.O. (2000). Thermal Inactivation of *Phytophthora nicotianae*. *Ecology and Population Biology*, 90(10): 1089-1097.
- Collares-Pereira, M. (1995). The relevance of Non-Imaging optics for solar energy: a review. *Revista de Ingeniería Técnica, IST*, 3.
- Comisión Nacional del Agua. Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. (2007). Diseño de instalaciones mecánicas. ISBN: 978-968-817-880-5m N° 2416 Col. Copilco El Bajo, Coyoacán, México D.F., 246 pp.
- Conroy, R.M.; Elmore-Meegan, M.; Joyce, T.; McGuigan, K.G.; Barnes, J. (1996). Solar disinfection of drinking water and diarrhoea in Maasai children: a controlled field trial. *The Lancet*, 348(9043): 1695-1697.
- Corolini, A. (1989). Fusariosis in the shrimp *Penaeus semisulcatus* cultured in Israel. *Mycopathologia*, 108(2): 145-147.
- De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Vol. 1, Centra al bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands, 1126 pp.
- De Laat, J.; Truong Le, G.; Kegube, B. (2004). A comparative estudy of the effects of chloride, sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H₂O₂ and organic by Fe(II)/H₂O₂ and Fe(III)/H₂O₂. *Chemosphere*, 55: 715-723.
- DeRosa, M.C. y Crutchley, R.J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234: 351-371.
- Dick, M.W. (1969). Morphology and taxonomy of the *Oomycetes*, with a special reference to *Saprolegniaceae*, *Leptomitaceae*, and *Phythiaceae*. I. sexual reproduction. *New Phytologist*, 68: 751-775.
- Dick, M.W. (1990). Phylum Oomycota. En: Handbook of protocrista. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman (Eds.). Jones and Bartlett Pub., Boston, Mass., pp: 661-685.
- Dick, M.W. (1995a). Sexual reproduction in the *Peronosporomycetes* (Chromista fungi). *Canadian Journal of Botany*, 73: 5712-5724.
- Dick, M.W. (1995b). The straminipilous fungi: a new classification for the biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to lagenidiaceous fungi. *CAB International Mycological Paper*, 168.
- Ditta, I.B.; Steele, A.; Liptrot, C.; Tobin, J.; Tyler, H.; Yates, H.M.; Sheel, D.W.; Foster, H.A. (2008). Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO

- and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1): 127-133.
- Duesterberg, C.K.; Cooper, W.J. y Waite, T.D. (2005). Fenton-mediated oxidation in the presence and absence of oxygen. *Environmental Science and Technology*, 39(13): 5052-5058.
- Duffie, J.A. y Beckman, W.A. (2006). Solar engineering of thermal processes, 3rd edition. Ed. John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 978-0-471-69867-8, 928 pp.
- Dunlap, C.A.; Biresaw, G. y Jackson, M.A. (2005). Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46: 261-266.
- Dunlop, P.S.M.; Sheeran, C.P.; Byrne, J.A.; McMahon, M.A.S.; Boyle, M.A.; McGuigan, K.G. (2010). Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 216: 303-310.
- du Preez, M.; McGuigan, K.G.; Conroy, R.M. (2010). Solar disinfection of drinking water (SODIS) in the prevention of dysentery in South African children aged under 5 years: the role of participant motivation. *Environmental Science and Technology*, 44(22): 8744-8749.
- du Preez, M.; Conroy, R.M.; Ligondo, S.; Hennessy, J.; Elmore-Meegan, M.; Soita, A.; McGuigan, K.G. (2011). Randomized intervention study of solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years. *Environmental Science and Technology*, 45(21): 9315-9323.
- Dynesen, J. y Nielsen, J. (2003). Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnology Progress*, 19: 1049-1052.
- Erkan, A.; Bakir, U.; Karakas, G. (2006). Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO₂ and TiO₂ thin films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184(3): 313-321.
- Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Disease Worldwide. Eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, 562 pp.
- Favre, A. (1977). Photoregulation of *E. coli* Growth. *Front. Matrix Biology*, 4: 199-217
- Fenton, H.J.H. (1984). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society*, 65: 899-910.

- Fernández-Ibáñez, P.; de las Nieves, F.J.; Malato, S. (2000). Titanium dioxide/electrolyte solution interface: Electron transfer phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227: 510-516.
- Fernández-Ibáñez, P.; Blanco, J.; Malato, S. y de las Nieves, F.J. (2003). Application of the colloidal stability of TiO₂ particles for recovery and reuse in solar photocatalysis. *Water Research*, 37: 3180-3188.
- Fernández-Ibáñez, P. (2004). Propiedades coloidales de partículas de TiO₂: aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
- Fernández, P.; Blanco, J.; Sichel, C.; Malato, S. (2005). Water disinfection by solar photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catalysis Today*, 101: 345-352.
- Fernández-Ibáñez, P.; Sichel, C.; Polo-López, M.I.; de Cara-García, M.; Tello, J.C. (2009). Photocatalytic disinfection of natural well water contaminated by *Fusarium solani* using TiO₂ slurry in solar CPC photo-reactors. *Catalysis Today*, 144: 62-68.
- Feuerstein, O.; Moreinos, D.; Steinberg, D. (2006). Synergic antibacterial effect between visible light and hydrogen peroxide on *Streptococcus mutans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 872-876.
- Flood, J. (2006). A review of *Fusarium* wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. *Phytopathology*, 96(6): 660-662.
- Frasca, J.; Duna, J.L. y Backm, J.D. (1996). Mycotic dermatitis in an Atlantic white-sided dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbour seals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2008: 727-729.
- Fratamico, P.M.; Bhunia, A.K.; Smith, J.L. (Eds.) (2005). Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Horizon Scientific Press. ISBN: 978-1-898486-52-7.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247: 1-11.
- Gallard, H.; De Laat, J.; Legube, B. (1998). Influence du pH sur la vitesse d'oxydation de composés organiques par FeII/H₂O₂. Mécanismes réactionnels et modélisation. *New Journal of Chemistry*, 22(3): 263-268.

- Garbelotto, M. y Rizzo, D.M. (2005). A California-based chronological review (1995–2004) of research on *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 127-143.
- García-Fernández, I.; Polo-López, M.I.; Oller, I.; Fernández-Ibáñez, P. (2012). Bacteria and fungi inactivation using Fe^{3+} /sunlight, H_2O_2 /sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. *Applied Catalysis B: Environmental*, 121-122: 20-29.
- Geeraerd, A.H.; Herremans, C.H. y Van Impe, J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 185-209.
- Geeraerd, A.H.; Valdramidis, V.P. y Van Impe, J.F. (2005). GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 95-105.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*. A pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 209: 1-406.
- Gernjak, W.; Fuerhacker, M.; Fernández-Ibáñez, P.; Blanco, J.; Malato, S. (2006). Solar photo-Fenton treatment – Process parameters and process control. *Applied Catalysis B: Environmental*, 64: 121-130.
- Gevens, A.J.; Donahoo, R.S.; Lamour, K.H. y Hausbeck, M.K. (2007). Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology*, 97: 421-428.
- Gogate, P.R. y Pandit, A.B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidations technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8: 501-551.
- Gogniat, G.; Thyssen, M.; Denis, M.; Pulgarin, C.; Dukan, S. (2006). The bactericidal effect of TiO_2 photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1): 18-24.
- Goldstein, S.; Aschengrau, D.; Diamant, Y.; Rabani, J. (2007). Photolysis of aqueous H_2O_2 : quantum yield and applications for polychromatic UV actinometry in photoreactors. *Environmental Science Technology*, 41: 7486-7490.
- Gómez Vázquez, J.; Tello Marquina, J.C. (2000). Presencia de la raza 1-2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en Almería. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 26: 27-33.

- Gooding, G.V. y Lucas, G.B. (1959). Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 49: 277- 281.
- Granke, L.L.; Windstam, S.T.; Hoch, H.C.; Smart, C.D.; Hausbeck, M.K. (2009). Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology*, 99(11): 1258-1264.
- Griffin, G.J. (1970). Carbon and nitrogen requirements for macroconidial germination of *Fusarium solani*: dependence on conidial density. *Canadian Journal of Microbiology*, 16: 733-740.
- Grocock, N.H. (1984). Disinfection of drinking water by ultraviolet light. *Journal of the Institute of Water Engineers and Scientists*, 38(20): 163-172.
- Guía para la aplicación del R.D. 1620/2007 por el que se establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Depuradas. (2010). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Marino y Rural. Gobierno de España. ISBN 978-84-491-0998-0, 145 pp.
- Gumy, D.; Morais, C.; Bowen, P.; Pulgarin, C.; Giraldo, S.; Hajdu, R.; Kiwi, J. (2006). Catalytic activity of commercial of TiO₂ powders for the abatement of the bacteria (*E. coli*) under solar simulated light: Influence of the isoelectric point. *Applied Catalysis B*, 63: 76-84.
- Gupta, A.K.; Baran, R.; Summerbell, R. (2000). *Fusarium* infections of the skin. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 13(2): 121-128.
- Gustafsson, J.; Nordenswan, E.; Rosenholm, J.B. (2003). Consolidation behavior in sedimentation of TiO₂ suspensions in the presence of electrolytes. *Journal of Colloid & Interface Science*, 258: 235-243.
- Haber, F. y Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society of London: Series A*, 147: 332-340.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219: 1-14.
- Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19.
- Harm, W. (1980). Biological effect of ultraviolet radiation. Cambridge University Press, New York, ISBN:9780521293624, 237 pp.
- Harnish, W.N. (1965). Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia*, 57: 86-90.

- Harris, D.C. (1992). Análisis químico cuantitativo. Grupo Editorial Iberoamérica, México, ISBN: 9706250034, 898 pp.
- Hartman, P.S. y Eisenstark, A. (1978). Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiation and hydrogen peroxide: distinction between recA-repairable and recA-non repairable damage. *Journal of Bacteriology*, 133: 769-774.
- Hartman, P.S. y Eisenstark, A. (1980). Killing of *Escherichia coli* K-12 by near-ultraviolet radiation in the presence of hydrogen peroxide: role of double-strand DNA breaks in absence of recombinational repair. *Mutation Research*, 72: 31-42.
- Hausbeck, M.K. y Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88: 1292-1303.
- Hemmes, D.E. y Hohl, H.R. (1971). Ultrastructural aspects of encystations and cyst germination in *Phytophthora parasitica*. *Journal of Cell Science*, 9: 175-191.
- Herrera Melián, J.A.; Doña Rodríguez, J.M.; Vieira Suárez, A.; Tello Rendón, E.; Valdés do Campo, C.; Arana, J.; Pérez Peña, J. (2000). The photocatalytic disinfection of urban waste waters. *Chemosphere*, 41: 323-327.
- Herrmann, J.M.; Guillard, Ch.; Disdier, J.; Lehaut, C.; Malto, S.; Blanco, J. (2002). New industrial titania photocatalysts for the solar detoxification of water containing various pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 35: 281-294.
- Herrmann, J.M. (2005). Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present applications. *Topics in Catalysis*, 34: 49-65.
- Hong, C.X. y Moorman, G.W. (2005). Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 189-208.
- Hong, C.; Gallegly, M.; Richardson, P.; Kong, P.; Moorman, G.; Lea-Cox, J.; Ross, D. (2008). *Phytophthora irrigata* and *Phytophthora hydropathica*, two new species from irrigation water at ornamental plant nurseries. *Phytopathology*, 98: S68.
- Howard, D.H. (2002). Pathogenic fungi in humans and animals, 2nd ed. Marcel Dekker. ISBN 0-8247-0683, 800 pp.
- Huang, Z.; Maness, P.C.; Blake, D.M.; Wolfrum, E.J.; Smolinski, S.L.; Jacoby, W.A. (2000). Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130(2-3): 163-170.
- Ibañez, J.A.; Litter, M.I.; Pizarro, R.A. (2003). Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae*. Comparative study with other Gram (-) bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 157(1): 81-85.

- Imlay, J.A.; Chin, A.M.; Linn, S. (1988a). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240: 640-642.
- Imlay, J.A. y Linn, S. (1988b). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240: 1302-1309.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77: 755-776.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs, Volumes 1 to 42. Report of an IARC Expert Committee. Lyon.
- Ireland, J.C.; Klostermann, P.; Rice, E.W.; Clark, R.M. (1993). Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5): 1668-1670.
- Izco, J.; Barreno, E.; Brugués, M.; Costa, M.; Devesa, J.; Fernández, F.; Gallardo, T.; Llimona, X.; Salvo, E.; Talavera, S.; Valdés, B. (1997). Botánica. McGraw Hill, Madrid, ISBN 84-486-0182-3, 781 pp.
- Jacobs, A. (1976). An intracellular transit iron pool. *Ciba Foundation symposium*, 51: 91-106.
- Jarvis, W.R. (1998). Control de enfermedades en cultivo de invernadero. Ed. Mundiprensa, Madrid, 334 pp.
- Jones, C.W. (1999). Applications of hydrogen peroxide and derivatives. James H. Clark (Ed). Royal Society of chemistry, Cambridge, UK, ISBN 0-85404-536-8, 264 pp.
- Juarez-Palacios, C.; Felix-Gastelum, R.; Wakeman, R.J.; Paplomatas, E.J.; DeVay, J.E. (1991). Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. *Plant Disease*, 75: 1160-1164.
- Kambala, V.S.R. y Naidu, R. (2009). Disinfection studies on TiO₂ thin films prepared by a sol-gel method. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(1): 121-129.
- Keyer, K. y Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America. Biochemistry*, 93: 13635-13640.
- Khoa, L.V.; Hatai, K.; Aoki, T. (2004). *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of Fish Disease*, 27(9): 507-515.

- Kiley, P.J. y Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion In Microbiology*, 6: 181-185.
- Kiwi, J. y Nadtochenko, V. (2004). New evidence for TiO₂ photocatalysis during bilayer lipid peroxidation. *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 17675-17684.
- Kiwi, J. y Nadtochenko, V. (2005). Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*, 21: 4631-4641.
- Klamerth, N.; Rizzo, L.; Malato, S.; Maldonado, M.I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.R. (2010). Degradation of fifteen emerging contaminants at µg L⁻¹ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. *Water research*, 44: 545-554.
- Klotz, S.A. (1994). The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiology Letters*, 120: 257-262.
- Koeppel, D. (2007). Banana: The fate of the fruit that changed the world. B&T (Eds). ISBN-10: 1594630380, 304 pp.
- Kong, P.; Moorman, G.W.; Lea-Cox, J.D.; Ross, D.S.; Richardson, P.A.; Hong, C.X. (2009). Zoospore tolerance to pH stress and its implications for *Phytophthora* species in aquatic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4307-4314.
- Koppenol, W.H.; Butler, J.; Van Leeuwen, J.W. (1978). The Haber-Weiss cycle. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 28: 655-660.
- Kozlova, E.A.; Safatov, A.S.; Kiselev, S.A.; Marchenko, V.Y.; Sergeev, A.A.; Skarnovich, M.O.; Emelyanova, E.K.; Smetannikova, M.A.; Buryak, G.A.; Vorontsov, A.V. (2010). Inactivation and mineralization of aerosol deposited model pathogenic microorganisms over TiO₂ and Pt/TiO₂. *Environmental Science Technology*, 44(13): 5121-5126.
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531: 81-92.
- Ku, Y.; Wang, L.S. y Shen, Y.S. (1998). Decomposition of EDTA in aqueous solution by UV/H₂O₂ process. *Journal of Hazardous Materials*, 60: 41-45.

- Kwon, B.G.; Lee, D.S.; Kang, N.; Yoon, J. (1999). Characteristics of p-chlorophenol oxidation by Fenton's reagent. *Water Research*, 33: 2110-2118.
- Labrada, R. (2004). Manejo de malezas para países en desarrollo. Addendum I. Producción y Protección Vegetal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma. ISBN 92-5-105019-8, pp 305.
- Lamour, K.H. y Hausbeck, M.K. (2000). Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology. Genetics and Resistance*, 90(4): 396-400.
- Lamour, K.H.; Stam, R.; Jupe, J. y Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 329-337.
- Larone, D.H. (2011). Medically important fungi: A guide to identification. 5th ed. ASM Press, Washington, DC, ISBN: 978-1-55581-660-5, 508 pp.
- Lazarova, V. y Bahri, A. (2005). Water reuse for irrigation: agriculture, landscapes, and turf grass. CRC Press, London, ISBN 1-56670-649-1, 432 pp.
- Le Bot, J. y Adamowicz, S. (2006). Nitrogen nutrition and use in horticultural crops. *Journal of Crop Improvement*, 15: 323-367.
- Le Chevalier, M.W. y Au, K.K. (2004). Water treatment for microbiol control: A review document. World Health Organization (ISBN 92 4 156255 2), IWA Publishing (ISBN 1 84339 069 8), London, UK, 136 pp.
- Legrini, O.; Oliveros, E. y Braun, A.M. (1993). Photochemical processes for water-treatment. *Chemistry Review*, 93(2): 671-698.
- Leslie, A.D. y Gulland, F.M.D. (2001). CRC Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation. 2nd ed., CRC press, Marine Mammal Center, Sausalito, California, USA, ISBN 9780849308390, 1120 pp.
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, USA, ISBN: 9780813819198, 400 pp.
- Li, X.Z. y Zhao, Y.G. (1999). Advanced treatment of dying wastewater for reuse. *Water Science and Technology*, 39: 249-255.
- Liao, C.H.; Kang, S.F.; Wu, F.A. (2001). Hydroxyl radical scavenging role of Chloride and bicarbonate ions in the H₂O₂/UV process. *Chemosphere*, 44: 1193-1200.
- Lin, S.H. y Lo, C.C. (1997). Fenton process for treatment of desizing wastewater. *Water Research*, 31(8): 2050-2056.

- Lonnen, J.; Kilvington, S.; Kehoe, S.C.; Al-Touati, F. y McGuigan, K.G. (2005). Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research*, 39: 877-883.
- MacDonald, J.D.; Abeliovich, A.; Lagunas-Solar, M.C.; Faiman, D.; Kabashima, J. (1997). Treatment of irrigation effluent water to reduce nitrogenous contaminants and plant pathogens. Bet Dagan, Israel, Bi-national Agricultural Research and Development Fund (BARD), Final Report Project N° US-2122-92, 47 pp.
- Mailhot, G.; Sarakha, M.; Lavedrine, B.; Caceres, J.; Malato, S. (2002). Fe(III)-solar light induced degradation of diethyl phthalate (DEP) in aqueous solutions. *Chemosphere*, 49: 525-532.
- Malato, S.; Richter, C.; Blanco, J.; Vincent M. (1996). Photocatalytic degradation of industrial residual waters. *Solar Energy*, 56(5): 401-410.
- Malato, S.; Blanco, J.; Richter, C.; Maldonado, M.I. (2000a). Optimization of pre-industrial solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides. Application to pesticide container recycling. *Applied Catalysis B: Environmental*, 25: 31-38.
- Malato, S.; Blanco, J.; Maldonado, M.I.; Fernández-Ibáñez, P.; Campos, A. (2000b). Optimising solar photocatalytic mineralization of pesticides by adding inorganic oxidising species: application to the recycling of pesticide containers. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(3): 163-174.
- Malato, S.; Blanco, J.; Vidal, A.; Richter, C. (2002a). Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37: 1-15.
- Malato, S.; Blanco, J.; Vidal, A.; Fernández, P.; Cáceres, J.; Trincado, P.; Oliveira, J.C.; Vincent, M. (2002b). New large solar photocatalytic plant: set-up and preliminary results. *Chemosphere*, 47: 235-240.
- Malato Rodríguez, S.; Blanco Gálvez, J.; Maldonado Rubio, M.I.; Fernández Ibáñez, P.; Alarcón Padilla, D.; Collares Pereira, M.; Farinha Mendes, J.; Correia de Oliveira, J. (2004). Engineering of solar photocatalytic collectors. *Solar Energy*, 77: 513-524.
- Malato, S.; Blanco, J.; Alarcón, D.C.; Maldonado, M.I.; Fernández-Ibáñez, P.; Gernjack, W. (2007). Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catalysis Today*, 122: 137-149.
- Malato, S.; Fernández-Ibáñez, P.; Maldonado, M.I.; Blanco, J.; Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147: 1-59.

- Mamane, H.; Shemer, H. y Linden, K.G. (2007). Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. *Journal of Hazardous Material*, 146: 479-486.
- Maneerat, C. y Hayata, Y. (2006). Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 99-103.
- Maness, P.C.; Smolinski, S.; Blake, D.M.; Huang, Z.; Wolfrum, E.J.; Jacoby, W.A. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4094-4098.
- Marchant, R. (1966). Fine structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. *Annals of Botany*, 30: 441-445.
- Marchant, R. y White, M.F. (1967). The carbon metabolism and swelling of *Fusarium culmorum* conidia. *Journal of General Microbiology*, 48(1): 65-77.
- Marugán, J.; van Grieken, R.; Sordo, C.; Cruz, C. (2008). Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 82 (1-2): 27-36.
- Masschelein, W.J. (2002). Ultraviolet light in water and wastewater sanitation. Ed. R.P. Rice., CRC Press, Boca Ratón, Florida, ISBN 1-56670-603-3, 174 pp.
- Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Wake, H. (1985). Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, 29: 211-214.
- Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Nakamura, N.; Komine, T. (1988). Continuous-sterilization system that uses photosemiconductor powders. *Applied Environmental Microbiology*, 54(6): 1330-1333.
- McCormick, J.P.; Fischer, J.R.; Pochlatko, J.P.; Eisenstark A. (1976). Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science*, 191: 468-469.
- McGuigan, K.G.; Joyce, T.M.; Conroy, R.M.; Gillespie, J.B.; Elmore-Meegan, M. (1998). Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: Characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6): 1138-1148.

- McGuigan, K.G.; Samaiyar, P.; du Preez, M.; Conroy, R.M. (2011). A high compliance randomised controlled field trial of solar disinfection (SODIS) of drinking water and its impact on childhood diarrhoea in rural Cambodia. *Environmental Science Technology*, 18: 7862-7867.
- McLoughlin, O.A.; Fernández Ibáñez, P.; Gernjak, W.; Malato Rodríguez, S.; Gill, L.W. (2004). Photocatalytic disinfection of water using low cost compound parabolic collectors. *Solar Energy*, 77: 625-633.
- Mello Filho, A.C. y Meneghini, R. (1984). In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 781: 56-63.
- Merwald, H.; Klosner, G.; Kokesch, C.; Der-Petrossian, M.; Hönigsmann, H.; Trautinger, F. (2005). UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79: 197-207.
- Metcalf y Eddy. (1991). Wastewater Engineering Treatment, Disposal, Reuse. 3rd edition. McGraw-Hill, 1334 pp.
- Metcalf y Eddy. (2005). Wastewater engineering treatment and reuse. 4th edition. Ed. Metcalf & Eddy, Inc., 1819 pp.
- Migaki, G. y Jones, S.R. (1983). Mycotic diseases in marine mammals. En: Pathobiology of Marine Mammal Diseases. Edwin B. Howard (Eds.). CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, Vol. II: 1-25.
- Miller, R.V.; Jeffrey, W.; Mitchell, D.; Elasri, M. (1999). Bacterial responses to ultraviolet light. *The American Society for Microbiology News*, 65: 535-541.
- Minotti, G. y Aust, S.D. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 191-208.
- Mitchell, D.J.; Kannwischer, M.E. y Moore, E.S. (1978). Relationship of numbers of zoospores of *Phytophthora cryptogea* to infection and mortality of watercress. *Phytopathology*, 68: 1446-1448.
- Moan, J. y Peak, M.J. (1989). Effects of UV radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 4: 21-34
- Moncayo-Lasso, A.; Sanabria, J.; Pulgarin, 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*, 77: 296-300.

- Morris, P.F. y Phuntumart, V. (2009). Inventory and comparative evolution of the ABC superfamily in the genomes of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora sojae*. *Journal of Molecular Evolution*, 68(5): 563-575.
- Muñoz, M.; Alonso, J.; Bartrolí, J.; Valiente, M. (1990). Automated spectrophotometric determination of titanium(IV) in water and brines by flow injection based on its reaction with hydrogen peroxide. *Analyst*, 115: 315-318.
- Nadtochenko, V.A.; Rincón, A.G.; Stanca, S.E.; Kiwi, J. (2004). Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 169: 131-137.
- Navntoft, C.; Ubomba-Jaswa, E.; McGuigan, K.G. y Fernández-Ibáñez, P. (2008). Effectiveness of solar disinfection using batch reactors with nonimaging aluminium reflectors under real conditions: natural well water and solar light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93: 155-161.
- Navntoft, L.C.; Fernández-Ibáñez, P.; Garreta, F. (2012). UV solar radiation on a tilted and horizontal plane: Analysis and comparison of 4 years of measurements. *Solar Energy*, 86: 307-318.
- Nelson, P.; Dignani, M.C. y Anaissie, E.J. (1983). *Fusarium Species*. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. ISBN: 978-0-271-00349-8, 206 pp.
- Nelson, P.; Dignani, M.C. y Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 479-504.
- Nes, W.D.; Saunders, G.A. y Heftmann, E. (1982). Role of steroids and triterpenoids in the growth and reproduction of *Phytophthora cactorum*. *Lipids*, 17: 178-183.
- Neyens, E. y Baeyens, J.A. (2003). Review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 98(1-3): 33-50.
- Nieto-Juarez, J.I.; Pierzchła, K.; Sienkiewicz, A.; Kohn, T. (2010). Inactivation of MS2 coliphage in Fenton and Fenton-like systems: role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight. *Environmental Science Technology*, 44(9): 3351-3356.
- O'Donnell, K.C.; Kistlerdagger, H.; Cigelnik, E.; Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95(5): 2044-2049.

- Old, K.M. y Schippers, B. (1973). Electron microscopical studies of chlamydospores of *Fusarium solani* f. *cucurbitae* formed in natural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 613-620.
- Ophus, E.M.; Rode, L.; Gylseth. (1979). Analysis of titanium pigments in human lung tissue. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 5(3): 290-296.
- Oppenländer, T. (2003). Photochemical purification of water and air. Principles, Reaction Mechanisms and Reactor Concepts. Wiley, VCH Verlag, Weinheim, Germany, 368 pp.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2006). Statistical Yearbook, FAO Electronic Publishing, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, ISBN 92-5-005506-4, p. 55.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). Guidelines for drinking-water quality first addendum to third edition recommendations. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 92 4 154696. 595 pp.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). Guidelines for drinking water. 4th edition. ISBN 978 924 154815 1. 564 pp.
- Palmero, D.; de Cara, M.; Lomas, T.; Iglesias, C.; Santos, M.; Tello, J.C. (2008a). *Fusarium* species isolated from water from fluvial channels and sea beds of the South-eastern coast of Spain. Evaluation of their pathogenicity on four plant species. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 34(3): 399-414.
- Palmero Llamas, D.; de Cara González, M.; Iglesias González, C.; Ruiz López, G.; Tello Marquina, J.C. (2008b). Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 1411-1418.
- Paspaltsis, I.; Berberidou, C.; Poullos, I.; Sklaviadis, T. (2009). Photocatalytic degradation of prions using the photo-Fenton reagent. *Journal of Hospital Infection*, 71(2): 149-156.
- Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E., y Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304: 55-68.
- Paul, A.; Hackbarth, S.; Vogt, R.D.; Röder, B.; Burnison, B.K.; Steinberg, C.E. (2004). Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic

- substances of aquatic and terrestrial origin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 3: 273-280.
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9): 754-766.
- Pham, H.N.; McDowell, T.; Wilkins, E. (1995). Photocatalytically-mediated disinfection of water using TiO_2 as a catalyst and spore-forming *Bacillus pumilus* as a model. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Environmental Science and Engineering*, 30(3): 627-636.
- Phibbs, M.K. y Giguere, P.A. (1951). Hydrogen peroxide and its analogues. III. Absorption spectrum of hydrogen and deuterium peroxides in the near ultra-violet. *Canadian Journal of Chemistry*, 29: 490-493.
- Pignatello, J.J. (1992). Dark and photoassisted Fe^{3+} -catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, 26: 944-951.
- 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 in Environmental Science and Technology*, 36: 1-84.
- Priest, F.G. y Campbell, I. (2002). *Brewing Microbiology*. Priest and Campbell, ISBN 0-306-47288-0, 411 pp.
- Prousek, J. (1995). Fenton reaction after a century. *Chemicke Listy*, 89: 11-16.
- Qualls, R.G.; Flynn, M.P.; Johnson, J.D. (1983). The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *Journal of the Water Polluted Control Federation*, 55(10): 1280-1285.
- Raviv, M. (2005). Production of high-quality composts for horticultural purposes: a mini-review. *Hort Technology*, 15: 52-57.
- Reeser, P.W.; Sutton, W.; Hansen, E.M.; Remigi, P.; Adams, G.C. (2011). *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103: 22-35.
- Ribeiro, O.K.; Zentmyer, G.A.; Erwin, D.C. (1976). The influence of qualitative and quantitative radiation on reproduction and spore germination of four *Phytophthora* species. *Mycologia*, 68: 1162-1173.
- Rigg, T.; Taylor, W.; Weiss, J. (1954). The rate constant of the reaction between hydrogen peroxide and ferrous ions. *Journal of Chemistry and Physics*, 22(4): 575-577.

- Rincón, A.G.; Pulgarín, C.; Adler, N.; Peringer, P. (2001). Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors - Dihydroxybenzene isomers - in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 139: 233-241.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2003). Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO₂ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 44: 263-284.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2004a). Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂. Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 51: 283-302.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2004b). Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental*, 49: 99-112.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2004c). 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: 635-648.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2005a). Comparative evaluation of Fe³⁺ and TiO₂ photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 63: 222-231.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2005b). Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO₂ photo-assisted treatment of mixed *E. coli* and *Bacillus* sp. and bacterial community present in wastewater. *Catalysis Today*, 101: 331-344.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2007a). Solar photolytic and photocatalytic disinfection of water at laboratory and field scale. Effect of the chemical composition of water and study of the postirradiation events. *Journal of Solar Energy Engineering - Transactions of the ASME*, 129(1): 100-110.
- Rincón, A.G. y Pulgarín, C. (2007b). Fe³⁺ and TiO₂ solar-light-assisted inactivation of *E. coli* at field scale. Implications in solar disinfection at low temperature of large quantities of water. *Catalysis Today*, 122(1-2): 128-136.
- Robert, D. y Malato, S. (2002). Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification. *Science of the Total Environment*, 291: 85-97.

- Romero, M.; Blanc, J.; Sánchez, B.; Vidal, A.; Malato, S.; Cardona, A.; García, E. (1999). Solar photocatalytic degradation of water and air pollutants: challenges and perspectives. *Solar Energy*, 66(2): 169-182.
- Runia, W.T. y Boonstra, S. (2001). Disinfection of *Pythium*-infested recirculation water by UV-oxidation technology. *Mededelingen*, 66: 73-82.
- Rutala, W.A. y Weber, D.J. (2004). Registration of disinfectants based on relative microbicidal activity. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(4): 333-341.
- Rutherford, M.A. (2006). Current knowledge of coffee wilt disease, a major constraint to coffee production in Africa. *Phytopathology*, 96(6): 663-666.
- Saito, T.; Iwase, T.; Horie, J.; Morioka, T. (1992). Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutants streptococci. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 14: 369-379.
- Sakthivel, S.; Neppolian, B.; Arabindoo, B.; Palanichamy, M.; Murugesan, V. (2000). TiO₂ catalyzed photodegradation of leather dye, acid green 16. *Indian Journal of Science and Industrial Research*, 59: 556-562.
- Salcedo, I.; Andrades, J.A.; Quiroga, J.M.; Nebot, E. (2007). Photoreactivation and dark repair in UV treated microorganisms: effect of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5): 1594-1600.
- Sangalang, A.E.; Burgess, L.W.; Backhouse, D.; Duff, J.; Wurst, M. (1995). Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and mediterranean regions of Australia. *Mycological Research*, 99: 523-528.
- Schnitzler, W.H. (2008). Workshop on non-chemical alternatives to replace methyl bromide as a soil fumigant. Report. ISBN 978-92-5-106001-8, FAO Publishing, Rome, 136 pp.
- Schippers, B. y van Eck, W.H. (1981). Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*. En: *Fusarium. Diseases, Biology and Taxonomy*, Nelson PE, Toussoun TA and Cook RJ. (Eds.) The Pennsylvania State University Press, pp. 231-245.
- Sciacca, F.; Rengifo-Herrera, J.A.; Wéthé, J.; Pulgarin, C. (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: 1186-1191.
- Serpone, N.; Terzian, R.; Minero, C. y Pelizzetti, E. (1993). Heterogeneous photocatalyzed oxidations of phenol, cresols, and fluorophenols in TiO₂ aqueous

- suspensions. En: Photosensitive metal-organic systems mechanistic principles and applications. Kotal C., Serpone N., (Eds.), Series: ACS Symposium number N°. 238, Oxford University Press, UK, 281-314.
- Seven, O.; Dindar, B.; Aydemir, S.; Metin, D.; Ozinel, M.A.; Icli, S. (2004). Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 165: 103-107.
- Sheel, D.W.; Brook, L.A.; Ditta, I.B.; Evans, P.; Foster, H.A.; Steele, A.; Yates, H.M. (2008). Biocidal silver and silver/titania composite films grown by chemical vapour deposition. *International Journal of Photoenergy*, Article ID 168185, 11 pp. doi:10.1155/2008/168185.
- Shiklomanov, I.A. (1993). World fresh water resources. En: Water in crisis: A guide to the world's fresh water resources. Peter H. Gleick (Ed.), Oxford University Press, New York, pp: 13-24.
- Shiklomanov, I. (1999). World water resources: Modern assessment and outlook for the 21st Century. Summary of world water resources at the beginning of the 21st Century, prepared in the framework of the IHP UNESCO. State Hydrological Institute, Federal Service of Russia for Hydrometeorology & Environment Monitoring, St. Petersburg.
- Shiklomanov, I.A. y Rodda, J. (2003). World water resources at the beginning of the 21st Century. Cambridge, UK, Cambridge University Press, ISBN: 9780521617222, 452 pp.
- Shlevin, E.; Mahrer, Y.; Katan, J. (2004). Effect of moisture on thermal inactivation of soilborne pathogens under structural solarization. *Phytopathology*, 94: 132-137.
- Sichel, C.; de Cara, M.; Tello, J.; Blanco, J.; Fernández-Ibáñez, P. (2007a). Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi: *Fusarium* species. *Applied Catalysis B: Environmental*, 74: 152-160.
- Sichel, C.; Tello, J.; de Cara, M.; Fernández-Ibáñez, P. (2007b). Effect of UV-intensity and dose on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi under natural sunlight. *Catalysis Today*, 129: 152-160.
- Sichel, C.; Blanco, J.; Malato, S.; Fernández-Ibáñez, P. (2007c). Effects of experimental conditions on *E. coli* survival during solar photocatalytic water disinfection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189: 239-246.

- Sichel, C. (2008). Solar photocatalytic disinfection of plant pathogen *Fusarium* species. (Tesis Doctoral). Universidad de Almería, España.
- Sichel, C.; Fernández-Ibañez, P.; De Cara, M.; Tello, J. (2009). Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water. *Water Research*, 43: 1841-1850.
- Silva, G.H.R.; Daniel, L.A.; Bruning, H.; Rulkens, W.H. (2010). Anaerobic effluent disinfection using ozone: Byproducts formation. *Bioresource Technology*, 101(18): 6981-6986.
- Sinha, R.P. y Häder, D.P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Science*, 1: 225-236.
- Skoog, D.A. (2000). Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill D.L., Madrid, ISBN: 8448127757, 1028 pp.
- Skocaj, M.; Filipic, M.; Petkovic, J.; Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; Is it safe?. *Radiology and Oncology*, 45(4): 227-247.
- Sökmen, M.; Degerli, S.; Aslan, A. (2008). Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. *Experimental Parasitology*, 119(1): 44-48.
- Spuhler, D.; Rengifo-Herrera, J.A.; Pulgarín, C. (2010). The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ 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: 126-141.
- Summerell, B.A.; Rugg, C.A.; Burgess, L.W. (1993). Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species associated with forest and woodland communities in north Queensland, Australia. *Mycological Research*, 97: 1015-1019.
- Sunada, K.; Kikuchi, Y.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. (1998). Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environmental Science Technology*, 32(5): 726-728.
- Sunada, K.; Watanabe, T.; Hashimoto, K. (2003). Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 6221: 1-7.
- Sutton, D.A.; Fothergill, A.W.; Rinaldi, M.G. (1998). Guide to clinically significant fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore, ISBN: 0683182749, 471 pp.

- Szumski, M.; Klodzinska, E. y Buszewski, B. (2005). Separation of microorganisms using electromigration techniques. *Journal of Chromatography A*, 1084: 186-193.
- Tang, W. y Huang, C.P. (1996). 2,4-dichlorophenol oxidation kinetics by Fenton's reagent. *Environmental Technology*, 17: 1371-1378.
- Technical Bulletin Pigments. (1991). Aerosil aluminum oxide C and TiO₂ for catalyst. Degussa.
- Tello, J.C. y Lacasa, Y.A. (1988). La podredumbre del cuello y de las raíces, causada por *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) españoles. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 14: 307-312.
- Thekaekara, M.P. (1973). Solar energy outside the earth's atmosphere. *Solar Energy*, 14: 109-127.
- Tolba, K.M. (1992). Saving our planet: Challenges and hopes. UNEP. (United Nations Environment Programme). Springer, Nairobi, ISBN 0 412 47370 4, 293 pp.
- Tyler, B.M. (2001). Genetics and genomics of the oomycete-host interface. *Trends Genetics*, 17: 611-614.
- Tyrrell, R.; Pourzand, C.; Brown, J.; Hejmadi, V.; Kvam, E.; Ryter, S.; Watkin, R. (2000). Cellular studies with UVA radiation: A role for iron. *Radiation Protection Dosimetry*, 91: 37-39.
- Tyrrell, R.M. y Reeve, V.E. (2006). Potential protection of skin by acute UV-A irradiation- from cellular to animal models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92: 86-91.
- Ubomba-Jaswa, E. (2009a). A study of the genotoxic implications and enhancement technologies for solar disinfection (SODIS) of drinking water. (Tesis Doctoral). Royal College of Surgeons, Ireland.
- Ubomba-Jaswa, E.; Navntoft, C.; Polo-López, M.I.; Fernandez-Ibanez, P.; McGuigan, K.G (2009b). Solar disinfection of drinking water (SODIS): An investigation of the effect of UVA dose on inactivation efficiency. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(5): 587-595.
- Ubomba-Jaswa, E.; Fernández-Ibáñez, P.; Navntoft, C.; Polo-López, M.I.; McGuigan, K.G. (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.
- Umali, D.L. (1993). Irrigation-induced salinity: a growing problem for development and the environment. World Bank Technical Paper N°. 215. Banco Mundial, Washington DC, ISBN 0-8213-2508-6, 98 pp.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). (2009). World Water Assessment Programme. The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World. Paris: UNESCO, and London: Earthscan. ISBN: 978-1-84407-839-4, 429 pp.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1978). Method 180.1. Turbidity (Nephelometric). Approved for NPDES (Editorial Revision 1974), 4 pp.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1986). Design manual: Municipal wastewater disinfection. EPA/625/1-86/021. Office of research and Development, Water Engineering Laboratory, Center for environmental Research Information, Cincinnati, Ohio.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1999). Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. EPA 815-R-99-014. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 346 pp.
- Urrutia Herrada, M.T.; Gómez García, V.M.; Tello Marquina, J. (2004). La fusariosis vascular de la berenjena en Almería. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 30: 85-92.
- Vacaroiu, C.; Enache, M.; Gartner, M.; Popescu, G.; Anastasescu, M.; Brezeanu, A.; Todorova, N.; Giannakopoulou, T.; Trapalis, C.; Dumitru, L. (2009). The effect of thermal treatment on antibacterial properties of nanostructured TiO₂ (N) films illuminated with visible light. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1): 27-31.
- Van der Helm D., y Winkelman G. (1994). Hidroxamates and polycarboxilates as iron transport agents (siderophores) in fungi. En: Metal ions in fungi. Winkelman G, Winge D R, (Eds.). Marcel Dekker, Inc, New York, Vol. 11. pp. 39-98
- van Kuik, A.J. (1992). Spread of *Phytophthora cinnamomi* in a recycling system. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent*, 57: 139-143.

- Varghese, S.; Wu, A.; Park, S.; Imlay, K.R.C.; Imlay, J.A. (2007). Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 64(3): 822-830.
- Vázquez, S. y Carpena-Ruiz, R. (2005). Use of perlite in cadmium plant studies: an approach to polluted soil conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, 7: 1355-1358.
- Vidal, A.; Díaz, A.I.; El Hraiki, A.; Romero, M.; Muguruza, I.; Senhaji, F.; González, J. (1999). Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of contaminated water: pilot plant studies. *Catalysis Today*, 54(2-3): 283-290.
- Vidal, A. y Díaz, A.J. (2000). High performance, low-cost of collectors for disinfection of contaminated waters. *Water Environmental Research*, 72: 271-276.
- Vile, G.F. y Tyrrell, R.M. (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 14678-14681.
- Vörösmarty, C.J.; Leveque, C. y Revenga, C. (2005). Fresh Water. En: Millennium Ecosystem Assessment, Volume 1, Conditions and Trends Working Group Report. Washington, DC: Island Press, pp. 165-207.
- Walling, C. y Kato, S. (1971). The oxidation of alcohols by Fenton's reagent: the effect of copper ion. *Journal of the American Chemical Society*, 93: 4275-4281.
- Warcup, J.H. (1955). On the origin of colonies of fungi developing on soil dilution plates. *Transaction of the British Mycological Society*, 38: 298-301.
- Watts, R.J.; Kong, S.; Lee, W. (1995). Sedimentation and reuse of Titanium Dioxide: application to suspended photocatalyst reactors. *Journal of Environmental Engineering*, 121(10): 730-735.
- Wegelin, M.; Canonica, S.; Mechsner, K.; Fleischmann, T.; Pesaro, F.; Metzler, A. (1994). Solar water disinfection: Scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water SRT-Aqua*, 43: 154-169.9.
- Whitesides J.O. y Oswalt, T.W. (1973). Unusual brown rot outbreak in a Florida Citrus Grove following sprinkler irrigation with *Phytophthora*-infested water. *Plant Disease Reporter*, 57: 391-393.
- Wist, J.; Sanabria, J.; Dierolf, C.; Torres, W.; Pulgarin, C. (2002). Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 147: 241-246.

- Wondrak, G.T.; Jacobson, M.K.; Jacobson, E.L. (2006). Endogenous UV-A-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Journal of Photochemistry & Photobiological Sciences*, 5: 215-237
- Wu, D.; Long, M.; Zhou, J.; Cai, W.; Zhu, X.; Chen, C.; Wu, Y. (2009). Synthesis and characterization of self-cleaning cotton fabrics modified by TiO₂ through a facile approach. *Surface and Coating Technology*, 203(24): 3728-3733.
- Wu, P.G.; Xie, R.C.; Shang, J.K. (2008). Enhanced visible-light photocatalytic disinfection of bacterial spores by palladium-modified nitrogen-doped titanium oxide. *Journal of the American Ceramic Society*, 9: 2957-2962.
- Wu, P.; Xie, R.; Imlay, J.A.; Shang, J.K. (2009). Visible-light-induced photocatalytic inactivation of bacteria by composite photocatalysts of palladium oxide and nitrogen-doped titanium oxide. *Applied Catalysis B*, 88(3-4): 576-581.
- Wu, P.; Imlay, J.A.; Shang, J.K. (2010). Mechanism of *Escherichia coli* inactivation on palladium-modified nitrogen-doped titanium dioxide. *Biomaterials*, 31(29): 7526-7533.
- Xi, W. y Geisen, S.V. (2001). Separation of titanium dioxide from photocatalytically treated water by cross-flow filtration. *Water Research*, 35(5): 1256-1262.
- Yamazaki, S.; Matsunaga, S.; Hori, K. (2001). Photocatalytic degradation of trichloroethylene in water using TiO₂ pellets. *Water Research*, 35(4): 1022-1028.
- Yoakum, G.H. y Eisenstark, A. (1972). Toxicity of L-tryptophan photoproduct on recombinationless (rec) mutants of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 112: 653-655.
- Yoakum, G.; Ferron, W.; Eisenstark, A.; Webb, R.B. (1974). Inhibition of replication gap closure in *Escherichia coli* by near-ultraviolet light photoproducts of L-tryptophan. *Journal of Bacteriology*, 119: 62-69.
- Yoakum, G.; Eisenstark, A.; Webb, R.B. (1975a). Near-UV photoproduct(s) of L-tryptophan: an inhibitor of medium-dependent repair of X-ray-induced single-strand breaks in DNA which also inhibits replication- gap closure in *Escherichia coli* DNA; molecular mechanisms for repair of DNA. En: Molecular Mechanism for Repair of DNA, Part B. P. C. Hanawait and R. B. Setlow (Eds.), Plenum, New York, pp. 453-458.

- Yoakum, G.H. (1975b). Tryptophan photoproduct(s): sensitized induction of strand breaks (or alkali-labile bonds) in bacterial deoxyribonucleic acid during near-ultraviolet irradiation. *Journal of Bacteriology*, 122: 199-205.
- Yu, J.C.; Ho, W.; Yu, J.; Yip, H.; Po, K.W.; Zhao, J. (2005). Efficient visible light- induced photocatalytic disinfection on sulfur-doped nanocrystalline titania. *Environmental Science Technology*, 39(4): 1175-1179.
- Zhang, P.; Scrudato, R.J.; Germano, G. (1994). Solar catalytic inactivation of *Escherichia coli* in aqueous solutions using TiO₂ as catalyst. *Chemosphere*, 28(3): 607-611.
- Zhang, S.; Ahearn, D.G.; Stulting, R.D.; Schwam, B.; Simmons, R.; Pierce, G.E.; Crow, S. (2007). Differences among strains of the *Fusarium oxysporum*- *Fusarium solani* complexes in their penetration of hydrogel contact lenses and subsequent susceptibility to multipurpose contact lens disinfection solutions. *Cornea*, 26(10): 1249-1254.

PÁGINAS WEBS CITADAS:

1. USGS (United States Geological Survey) [Accedido 12 de diciembre 2011]:
<http://ga.water.usgs.gov/edu/watercyclespanish.html>.
2. UNDP (United Nations Development Programme) [Accedido 12 de diciembre 2011]:
<http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/chapters/>
3. BBC (British Broadcasting Corporation) [Accedido 14 de diciembre 2011]:
<http://www.bbc.co.uk/spanish/especiales/agua/default.stm>
4. FAO (Food and Agriculture Organization) Water at a glance (2011) [Accedido 17 de diciembre 2011]:
www.fao.org/nr/water/docs/waterataglance.pdf
5. UNFPA (United Nations of Population Fund) [Accedido 12 de diciembre 2011]:
http://foweb.unfpa.org/SWP2011/reports/SP-SWOP2011_Final.pdf
6. OMS (Organización Mundial de la Salud) [Accedido 17 de diciembre 2011]:
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/es/
7. (OMS). Organización Mundial de la Salud (2009). [Accedido 27 Agosto]:
http://www.who.int/household_water/en/
8. ONU (Organización de la Naciones Unidas) [Accedido 18 de diciembre 2011]:
<http://www.politicaspUBLICAS.net/panel/agua/dhagua/667-onu-2010-resolucion-agua.html>
9. IWA (International Water Association) [Accedido 18 de diciembre 2011]:

- <http://www.iwahq.org/1nb/home.html>
10. BOE. Boletín oficial del Estado, Real Decreto 1620/2007 [Accedido 22 de diciembre 2011]:
<http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>
 11. BOE. Boletín Oficial de Estado, Ley 29/1985 [Accedido 22 de diciembre 2011]:
<http://www.boe.es/boe/dias/1985/08/08/pdfs/A25123-25135.pdf>
 12. Directiva 2000/60/CE del Consejo y el Parlamento Europeo del 22 de diciembre de 2000 [Accedido 22 de diciembre 2011]:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:327:0001:0072:EN:PDF>
 13. Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas [Accedido 23 de diciembre 2011]:
http://www.marm.es/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm7-28959.pdf
 14. Directiva 98/83/EC relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano [Accedido 27 de julio 2012]:
http://www.belt.es/legislacion/vigente/seg_ind/prl/higiene/cont_biolo/pdf/Dir_98_83.PDF
 15. NA (Naciones Unidas). Declaración del Milenio. A/Res/55/L.2 (2000) [Accedido 27 de diciembre 2011]:
<http://www.un.org/spanish/milenio/ares552.pdf>

ANÁLISIS DEL RECURSO UV-A SOLAR PARA LA APLICACIÓN DE DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA DE AGUAS

Para poder utilizar los tratamientos fotocatalíticos estudiados en este trabajo, es necesario una disponibilidad mínima de radiación solar (en especial UV-A) en la localización donde se ubique la instalación. Por ello, previo al diseño de una planta solar para el uso de estas tecnologías, debería conocerse el recurso solar de la zona. En este anexo se presentan los resultados del análisis de la medida de la radiación solar incidente en la PSA durante los años 2010 y 2011 para conocer la aplicabilidad de la desinfección fotocatalítica solar de aguas en una zona de elevada irradiación solar y pobre en precipitaciones como es el sur de España.

Utilizando como fuente de datos los registros minutales de irradiancia solar UV-A (300-400 nm) en W/m^2 , obtenidas con el piranómetro de Kipp and Zonen (Holanda) modelo CUV3, y almacenados en el sistema de adquisición de datos de la PSA, se han realizado los cálculos de dosis de energía UV-A recibidos cada día (Ecuación A.1).

$$Dosis_{UV-A} = \int Irradiancia_{UV-A} dt \quad (A.1)$$

Las figuras A1.1 y A1.2 muestran la dosis de radiación solar en kJ/m^2 que alcanza la superficie terrestre en la PSA durante las horas de luz de cada día, para los 365 días de los años 2010 y 2011.

Las figuras A1.3 y A1.4 muestran los valores de energía solar UV-A acumulada por unidad de volumen (Q_{UV} , ecuación 2.8) diarios correspondiente a los años 2010 y 2011 teniendo en cuenta los parámetros de diseño del reactor CPC de 60 L empleado en este trabajo. Se han marcado en naranja todos aquellos días en los que se recibió una cantidad de energía UV-A por unidad de volumen inferior a 30 kJ/L , la mínima necesaria para lograr la inactivación completa (desde una concentración inicial de 1000 UFC/mL hasta el LD) de esporas de *F. solani* tanto con fotocátalisis con TiO_2 como con foto-Fenton en efluentes reales de salida de EDAR, según los resultados experimentales del capítulo 6.

El cómputo total de días en los que se alcanza el límite de detección para obtener una inactivación total de esporas fúngicas en el año 2010 es 333, por tanto el porcentaje de días en los que este tratamiento es susceptible de ser aplicado es del 91 %. En el caso del año 2011, el número de días en los que se alcanzan 30 kJ/L es 332 lo que significa un 90 %. Estos datos demuestran que es posible la utilización de los

tratamientos fotocatalíticos que hacen uso de la radiación solar como fuente de fotones y, por tanto, son una alternativa muy importante a tener en cuenta en el futuro.

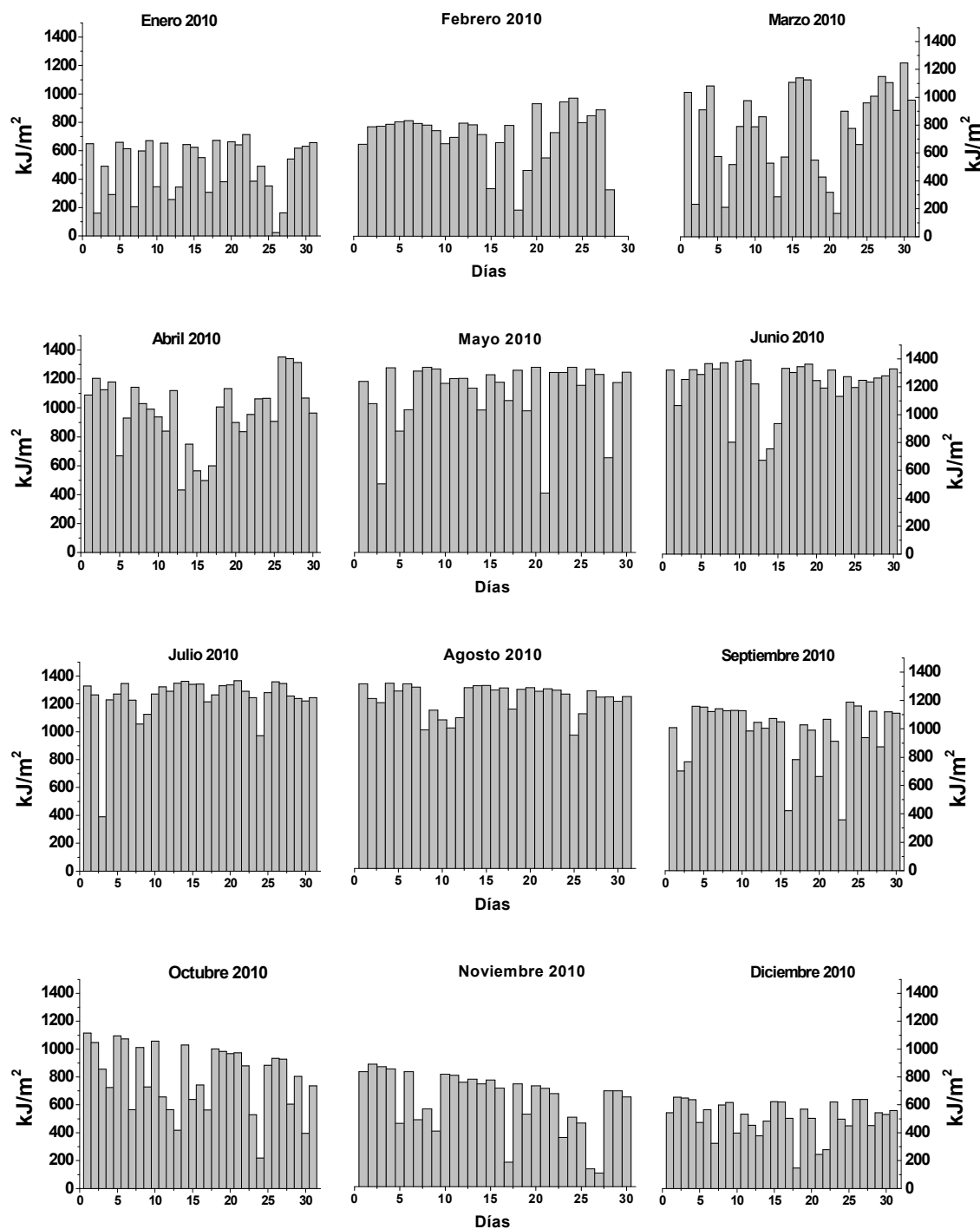


Figura A1.1. Dosis de radiación solar UV-A recibida diariamente en el año 2010 en la PSA.

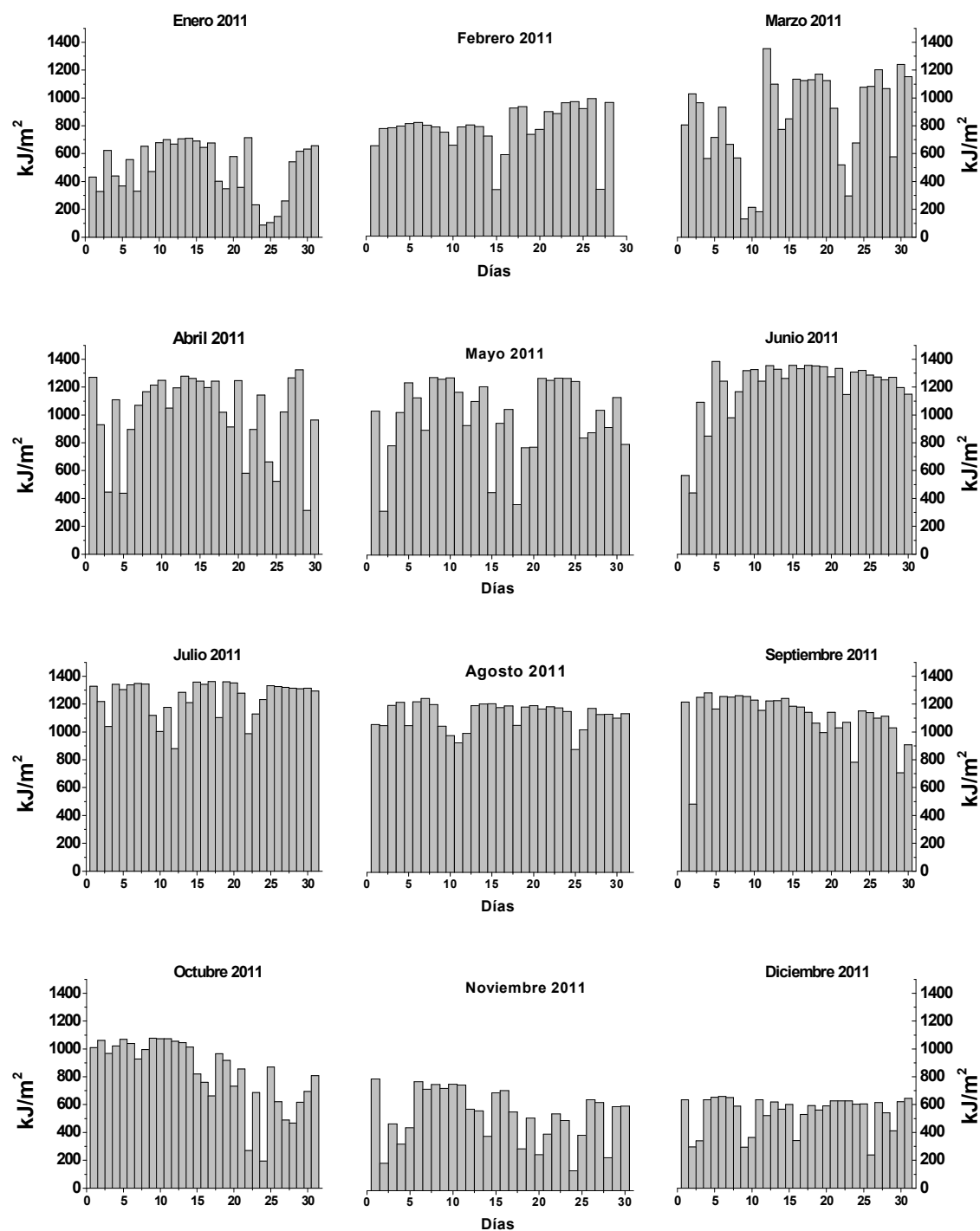


Figura A1.2. Dosis de radiación solar UV-A recibida diariamente a lo largo del año 2011 en la PSA.

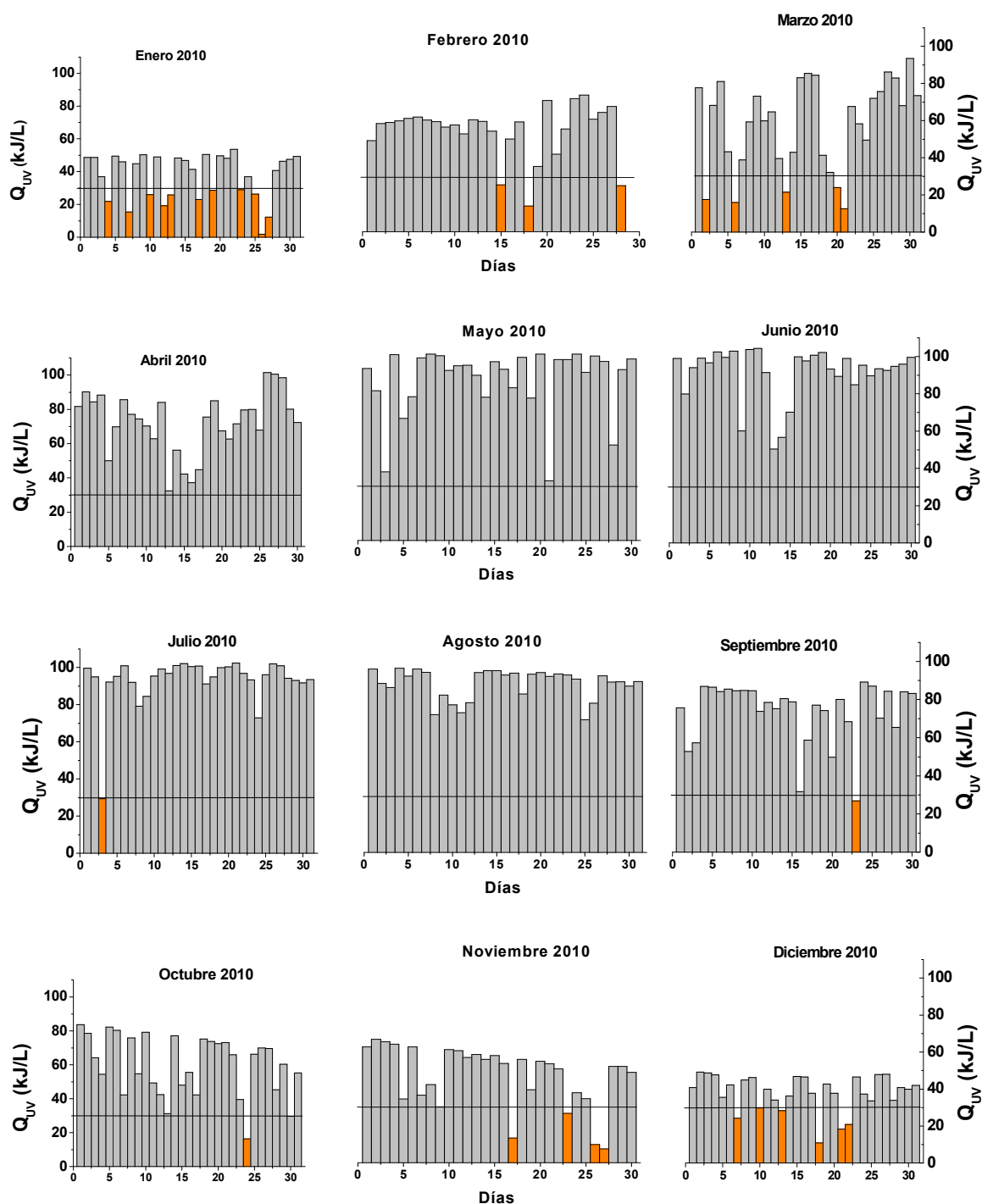


Figura A1.3. Irradiancia solar UV-A acumulada por unidad de volumen de agua diaria durante el año 2010. La línea continua representa el valor 30 kJ/L necesario para alcanzar el LD en la inactivación de esporas de *F. solani*. Las barras grises representan los días en los que se superan los 30 kJ/L y las barras naranjas los días en los que ese valor no se alcanza.

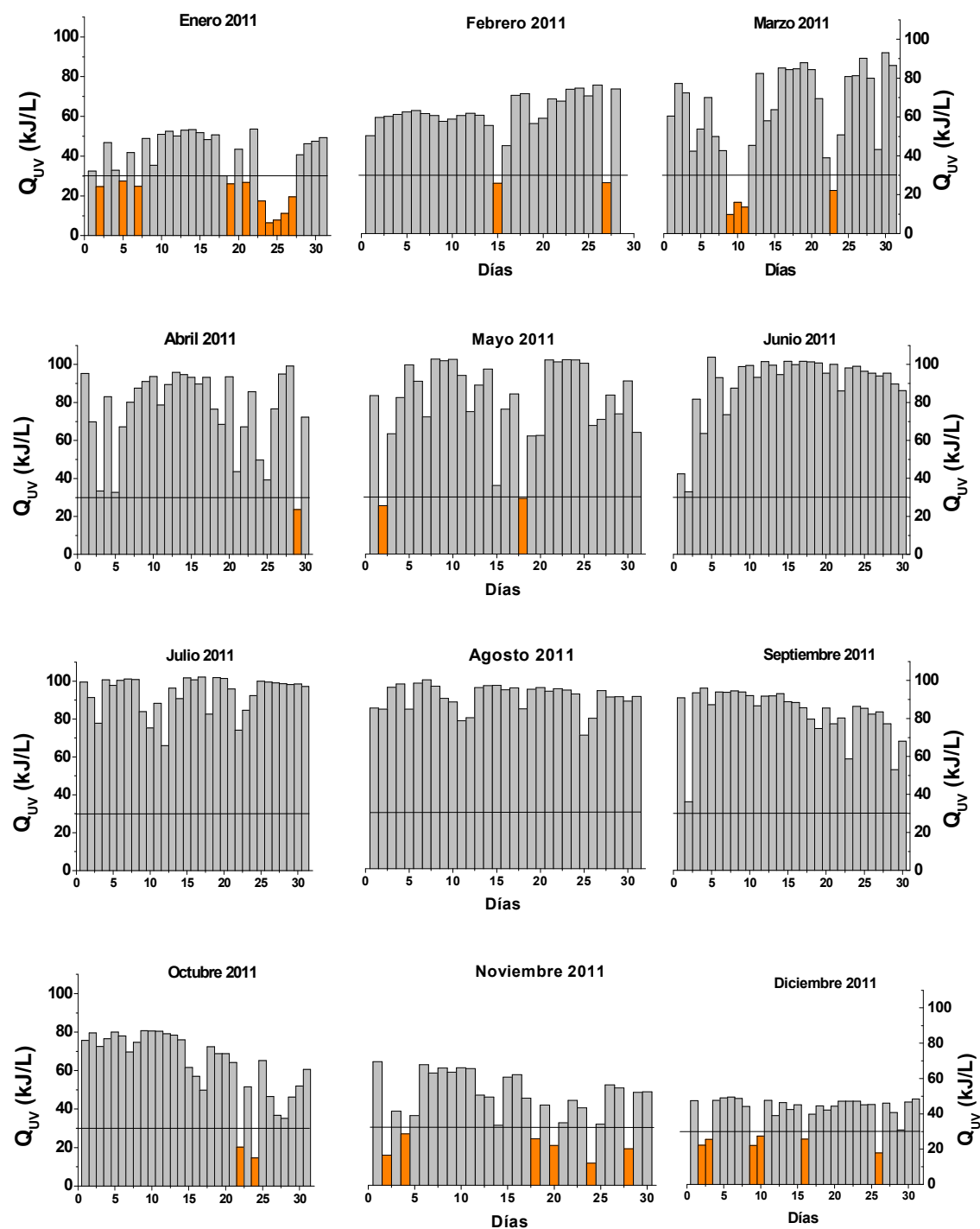


Figura A1.4. Irradiancia solar UV-A acumulada por unidad de volumen de agua diaria durante el año 2011. La línea continua representa el valor 30 kJ/L necesario para alcanzar el LD en la inactivación de esporas de *F. solani*. Las barras grises representan los días en los que se superan los 30 kJ/L y las barras naranjas los días en los que ese valor no se alcanza.

