



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Se presenta esta Tesis como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para obtener el grado Académico de:

## **DOCTOR EN TECNOLOGÍA QUÍMICA**

# **DESINFECCIÓN DE AGUAS, UTILIZANDO UN AGENTE OXIDANTE Y SU COMBINACIÓN CON UV. ESTUDIO CINÉTICO**

Autora

**Lic. Marina J. FLORES**

Realizada en

**INTEC (UNL-CONICET)**

**Directora:** Dra. Marisol D. LABAS

**Co-Director:** Dr. Alberto E. CASSANO

### **Miembros del Jurado**

Dr. Roberto CANDAL

Dr. Juan Carlos BASÍLICO

Dra. Fabiana LO NOSTRO

SANTA FE, 2014

*A mi querida Tata y su luminoso recuerdo.*

*A mis Papás*

*A mi hermana Vero.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Marisol, por estar siempre dispuesta a tenderme una mano, por su forma de enseñar y transmitir conocimientos, no sólo académicos. Por muchos buenos momentos pasados aun en momentos duros de trabajo, por el apoyo que me brindó y me sigue brindando y por todo el tiempo que dedicó para poder lograr esta tesis.

A mi codirector Alberto, por exigirme a dar siempre un poco más, por haber puesto un voto de confianza en mí sin conocerme y por alentarme a que siga investigando.

A los miembros del Jurado por su interés y participación en la evaluación de la presente Tesis.

A Rodolfo Brandi, por su ayuda invaluable durante la realización de esta tesis doctoral, su dedicación, paciencia, amistad y por las charlas de cine y libros compartidas entre modelos cinéticos.

A Pablo Nieres, con quien realicé los primeros trabajos experimentales, gracias por estar, por tu empuje y por tu amistad.

A Agustina Dalla Fontana y Pato Galvez, quienes me ayudaron (y ayudan) con la preparación del material y los ensayos experimentales durante este último año. Con ustedes comparto muy buenos momentos y muy malos mates.

A los que colaboraron con su granito de arena para que esta tesis sea posible: bajándome papers, instalando programas, con aportes valiosos: Ale Ontiveros, Fernando Herrera, Mario Barbaglia, Maria Benzzo, Roy. Aconsejándome y acompañándome en el trabajo: Villa, Chely.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química, por su buena predisposición y ayuda durante la realización de la tesis doctoral, salvando dudas, ayudando con la conservación de la cepas. Especialmente mi gratitud con la Profesora Laura Frison, quien siempre estuvo dispuesta a responder mis consultas.

A los que empezaron siendo compañeros de doctorado y terminaron siendo mis queridos amigos: Ale Ontiveros, Agus Manassero, Angie Sosa, Eva Luengo, Gise Di Luca, Maia Lezcano, Meli Mariani y Marugenia Martinez.

A mi familia de acá y de allá, que siempre me apoyó en mis decisiones, especialmente a mis papás, a quienes dedico esta tesis y a mi hermana, mi roca.

A los de siempre, que tantas, tantas veces escucharon y entendieron “no puedo, estoy con la tesis, no puedo tengo que estudiar”: Sebas, Vero, Yami Yoli, Fernandatus, Sofi, Cintia, Franco, Lito, Tomy, Claudia

A mis amigos de Dignidad Animal, con quienes lucho a diario, Cintia, Franco, Gise, Pao, Mica, Ale, Sole Flaca, Sole R, Joan, Agos y Jose, gracias por trabajar para lograr un mejor lugar, gracias por saberme esperar.

A Nora, por estar y por cuidarme, a Juan por enseñarme a ser valiente.

A mi abuela Inés, que nunca pudo aprender a decir: Doctorado en Tecnología Química-Beca de CONICET y lo tenía escrito en un papel, en su cartera, en el bolsillo de los caramelos frutales y a mi Padrino, siempre viviendo, los dos, en mi corazón.

A Greta, Galadriel y Leono, por su amor infinito, fidelidad eterna y compañía, quienes sin duda merecían a alguien mucho mejor.

Al personal del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) y del CCT CONICET Santa Fe.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Litoral (UNL) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el apoyo financiero.

Finalmente, quisiera extender mi agradecimiento a todas esas personas, que aún no estando presentes en esta lista, han aportado su granito de arena, contribuyendo así a la finalización de este trabajo.

## RESUMEN

El agua es fundamental para todas las formas de vida conocidas. El acceso al agua potable es primordial para la salud, uno de los derechos humanos básicos y un componente de las políticas eficaces de protección de la salud. Uno de los principales problemas de la humanidad en pleno siglo XXI es el acceso al agua potable y a medios adecuados de saneamiento. Esta problemática influye de manera directa sobre la salud de una gran parte de la población mundial e indirectamente repercute en el desarrollo de los países más desfavorecidos. La falta de agua potable afianza el ciclo de la pobreza, dado que las regiones pobres se encuentran en condiciones de mayor desventaja para afrontar éste y otros muchos problemas.

El tratamiento de los efluentes y las aguas contaminadas mediante procesos adecuados es esencial para evitar este problema. Hasta el presente, los efluentes son principalmente desinfectados por derivados del cloro debido a su alto poder biocida. Sin embargo, el cloro puede reaccionar con las sustancias orgánicas presentes en las agua superficiales, como los ácidos húmicos, dando lugar a numerosos productos de desinfección volátiles y no volátiles como son el vapor de cloro y los trihalometanos los cuales, de acuerdo a numerosos estudios presentan propiedades mutagénicas, carcinogénicas y/o tóxicas. Un sistema de desinfección ideal debería garantizar la eficiencia máxima para la remoción de microorganismos patógenos sin generar subproductos tóxicos e indeseables. La solución correcta del problema de la contaminación pasa por el uso de tecnologías limpias que en ninguno de sus pasos

afecten el medio ambiente. Dentro de estos procesos se ubican los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) y como caso particular, de indudable crecimiento en la investigación de los últimos años, se destaca la aplicación de aquellas que emplean radiación UV para llevar a cabo la tarea. Estas tecnologías pueden utilizarse sola o combinadas entre ellas para producir especies altamente oxidantes como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) que reacciona con el contaminante logrando su destrucción.

En esta Tesis de Doctorado en Tecnología Química se aborda uno de los aspectos vacantes como es la determinación de la cinética de la inactivación para un contaminante microbiológico modelo (*Escherichia coli*) en aguas claras con desinfectantes alternativos amigables con el ambiente.

Se estudia inicialmente un proceso de desinfección pseudo heterogéneo utilizando peróxido de hidrogeno como desinfectante. Se realiza la interpretación química del posible mecanismo de daño celular. La hipótesis planteada es la existencia, en la célula bacteriana, de sitios factibles (targets), de ser atacados por los ataque de los radicales  $\text{OH}^\cdot$ : la capa de peptidoglicano, la capa de lipopolisacáridos (que se encuentra sólo en las bacterias Gram-negativas) y la bicapa fosfolipídica. La disrupción de la membrana, la posterior lisis de los componentes de las bacterias y la oxidación del lisado resultante, se modela como una secuencia de eventos en serie, seguidos de una secuencia de eventos en paralelo, en el que el nivel de daño aumentará hasta que la bacteria no sólo muere, o se ve gravemente afectada en sus funciones vitales, sino también y dado el tiempo suficiente, los componentes químicos de la célula se oxidan totalmente.

Como una segunda etapa, se lleva a cabo un extenso estudio experimental utilizando la mezcla comercial de ácido peracético (APA) como agente desinfectante. El

ácido peracético comercial es una mezcla cuaternaria de equilibrio entre: ácido peracético, peróxido de hidrógeno, ácido acético y agua. En base a los estudios experimentales, se postula un mecanismo de desinfección, nunca antes propuesto, considerando el poder oxidante de cada uno de los agentes de la mezcla por separado y el efecto sinérgico de estos. El mecanismo de este modelo comprende a través de ecuaciones matemáticas simples, los procesos fisicoquímicos y enzimáticos involucrados en la inactivación bacteriana, como oxidación de enlaces proteicos, inhibición de mecanismos de defensa bacterianos y alteración en las funciones metabólicas vitales en los microorganismos. Se obtienen las concentraciones de desinfectantes ideales y las condiciones de trabajo óptimas para lograr altas tasas de inactivación (99.99%) en cortos períodos de tiempo.

Como complemento, se estudia la combinación de la solución comercial de APA con la radiación UV, se modelan los resultados obtenidos con un Modelo de Eventos en serie, donde, en este modelo, la bacteria, al ser expuesta a la radiación UV va sufriendo daños a través de pasos consecutivos que se acumulan hasta que alcanzan un umbral donde se produce la muerte del microorganismo. Se realizan análisis de recrecimiento y fotoreparación bacterianos para evaluar el potencial uso de la combinación de ambos oxidantes.

La elección del tema de tesis responde a una problemática actual del país: el acceso al agua microbiológicamente segura. Además, realizará aportes para contribuir con la solución del problema de tratamiento de aguas, en especial, con la ausencia de subproductos de desinfección sin involucrar mayores costos adicionales.

# INDICE DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I.1 IMPORTANCIA DEL AGUA</b>	1
<b>I.2 IMPORTANCIA DEL AGUA DE CONSUMO.</b>	2
<b>I.3 DISTRIBUCION Y ACCESO DEL AGUA EN EL MUNDO</b>	4
<b>I.3.1 DISTRIBUCIÓN Y ACCESO AL AGUA EN LA ARGENTINA</b>	7
<b>I.4 MARCO LEGAL EN ARGENTINA</b>	8
<b>I.5 DESINFECCIÓN DE L AGUA</b>	9
<b>I.5.1 DESINFECTANTES ALTERNATIVOS</b>	12
<i>I.5.1.1 PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN</i>	13
<i>I.5.1.2 DESINFECCIÓN CON UV GERMINICIDA</i>	14
<i>I.5.1.3 DESINFECCIÓN CON APA COMERCIAL</i>	15
<b>ACRONIMOS CAPÍTULO I</b>	16
<b>I.6 OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL</b>	17
<b>I.6.1 OBJETIVO GENERAL</b>	18
<b>I.6.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	18
<b>CAPÍTULO II. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN</b>	19
<b>II.1 GENERALIDADES DE LOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN</b>	19
<b>II. 2 DESINFECTANTES QUÍMICOS</b>	21
<b>II.2.1 DESINFECCIÓN CON CLORO</b>	22
<b>II.2.2 DESINFECCIÓN CON CLORAMIDAS</b>	23
<b>II.2.3 DESINFECCIÓN CON OZONO</b>	25
<b>II.3 DESINFECTANTES QUÍMICOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL</b>	26
<b>II.3.1 ÁCIDO PERACÉTICO</b>	26
<b>II.3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>	27
<i>II.3.2.1 QUÍMICA DEL ÁCIDO PERACÉTICO</i>	27
<i>II.3.2.2 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS</i>	28
<i>II.3.2.3 ÁCIDO PERACÉTICO COMO DESINFECTANTE DE AGUAS NATURALES</i>	30
<i>II.3.2.4 FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE LA DESINFECCIÓN</i>	31
<b>II.3.4 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO</b>	32
<i>II.3.4.1 QUÍMICA DEL ÁCIDO PERACÉTICO</i>	33
<i>II.3.4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</i>	34
<b>II.4 DESINFECCIÓN CON AGENTES FÍSICOS</b>	36

<b>II.4.1 RADIACIÓN CON UV</b>	36
II.4.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA RADIACIÓN UV	37
II.4.1.2 ACCIÓN DE LA RADIACIÓN UV	39
II.4.1.3 MECANISMOS DE FOTORREPARACIÓN	42
<b>II.5 PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN</b>	44
<b>II.5.1 FOTOOXIDACIÓN</b>	47
<b>II.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO</b>	49
<b>II.6.1 PARED CELULAR BACTERIANA</b>	50
II.6.2 CITOPLASMA	57
<b>II.7 MICROORGANISMO MODELO ESTUDIADO: <i>Escherichia coli</i></b>	57
<b>II. 7.1 <i>Escherichia coli</i> CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS</b>	57
II.7.1.2 HABITAD	60
II.7.1.3 PODER PATOGENICO DE <i>Escherichia coli</i>	61
<b>II.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DESINFECTANTES</b>	62
<b>II.8.1 BIOCIDAS</b>	62
<b>II.8.2 REQUISITOS DE LOS BIOCIDAS</b>	64
II.8.2.1 NIVELES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	65
<b>II.8.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS BIOCIDAS</b>	67
<b>II.8.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA</b>	70
<b>ACRONIMOS CAPÍTULO II</b>	73
<b>CAPÍTULO III. MODELADO DE LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN</b>	74
<b>III.1 REACTORES Y REACCIONES FOTOQUÍMICAS</b>	74
III.1.1 REACCIONES FOTOQUÍMICAS	74
<b>III.2 DISEÑO DE REACTORES FOTOQUÍMICOS</b>	75
<b>III.2.1 BALANCE DE MATERIA</b>	78
III.2.1.1 LA ECUACIÓN GENERAL DE CONSERVACIÓN DE MATERIA	78
III.2.1.2 REACCIONES HETEROGÉNEAS	79
<b>III.2.2 CAMPOS DE RADIACIÓN</b>	80
<b>III.2.3 DEFINICIÓN DE LA INTENSIDAD DE RADIACIÓN</b>	81
<b>III.2.4 DEFINICIÓN DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA</b>	83
III.2.4.1 ECUACIÓN GENERAL DE TRASPORTE DE FOTONES	85
III.2.4.2 LA CONDICIÓN DE CONTORNO	88
III.2.4.3 EXPRESIÓN DE LA L.V.R.P.A UTILIZADAS EN UN MODELO DE EMISIÓN	91
<b>III.2.5 MODELADO CINÉTICO DE REACTORES</b>	93
<b>III.3 MODELOS CINÉTICOS DE DESINFECCIÓN</b>	94

<b>III.3.1 MODELO DE CHICK</b>	94
<b>III.3.2 MODELO DE CHICK-WATSON</b>	96
<b>III.3.3 MODELO DE WICKRAMANYAKE Y SPROUL</b>	97
<b>III.3.4 MODELO DE GARD</b>	98
<b>III.3.5 MODELO DE COLLIN Y SELLECK</b>	99
<b>III.3.6 MODELO DE HOM</b>	100
<b>III.3.7 MODIFICACIÓN DEL MODELO DE HOM</b>	101
<b>III.3.8 MODELO DE MAJUNAR</b>	102
<b>III.3.9 MODELOS PROPUESTO POR BLAIR SEVERÍN</b>	103
<i>III.3.9.1 CINETICA DE SEGUNDO ORDEN DE MEZCLADO</i>	104
<i>III.3.9.2 CINETICA MULTI-TARGET</i>	105
<b>III.4 MODELO PSEUDO HETEROGÉNEO DE DESINFECCIÓN PROPUESTO POR FLORES</b>	106
<b>III.4.1 INTRODUCCIÓN AL MODELO</b>	106
<b>III.4.2 MODELADO DE LA RECCIÓN PERÓXIDO-MEMBRANA CELULAR</b>	108
<b>III.4.3 LISIS DE LAS BACTERIAS MUERTAS</b>	112
<b>III.4.4 REPRESENTACIÓN MATEMÁTICA</b>	114
<b>III.4.5 DISCUSIÓN Y RESULTADOS</b>	117
<b>III.4.6 CONCLUSIONES DEL MODELO</b>	124
<b>ACRONIMOS CAPÍTULO III</b>	126
<b>CAPÍTULO IV. TÉCNICAS ANALÍTICAS. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	129
<b>IV.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	129
<b>IV.1.1 ACONDICIONAMIENTO DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL</b>	132
<b>IV. 1.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO</b>	132

IV.1.2.1 REACTIVACIÓN DE LA CEPA	132
IV.1.2.2 CONSERVACIÓN DE LA CEPA	133
IV.1.2.3 CONSERVACIÓN POR CONGELAMIENTO: FUNDAMENTOS	133
<b>IV.1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO PERACÉTICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA SOLUCIÓN COMERCIAL</b>	135
IV.1.3.1 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE LA SOLUCIÓN COMERCIAL DE ÁCIDO PERACÉTICO AL 15%	136
<b>IV.1.4 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO</b>	139
<b>IV.1.5 TOMA DE MUESTRA</b>	139
<b>IV.1.6 SIEMBRA DE LA MUESTRA</b>	141
<b>IV.1.7 INCUBACIÓN DE LAS PLACAS</b>	143
<b>IV.1.8 RECUENTO DE BACTERIAS</b>	143
<b>IV.1.9 DETERMINACIÓN DEL APA RESIDUAL</b>	143
IV.1.9.1 CURVA DE CALIBRADO	144
<b>IV.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS COMPLEMENTARIAS</b>	146
<b>IV.2.1 MÉTODO DE ADICCIÓN DE CATALASA PARA LA ELIMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	146
IV.2.1.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	146
IV.2.1.2 EFECTO DEL PH EN LA CATALASA	148
<b>IV. 2.2 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN DILUIDA DE ÁCIDO PERACÉTICO</b>	149
<b>IV.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS</b>	151
<b>IV.3.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO: FUNDAMENTOS</b>	151
<b>IV. 3.2 MEDIO DE CULTIVO PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	151
<b>IV.3.3 MEDIO DE CULTIVO PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i></b>	154
<b>IV.3.4 MEDIO DE CULTIVO PARA REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN</b>	157
<b>IV.3.5 MEDIO LÍQUIDO PARA DILUCIONES</b>	159
<b>IV.4 TRATAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO</b>	159

IV.4.1 TÉCNICA DE TINCIÓN DE GRAM	159
IV.4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	163
IV.4.2.1 PRUEBAS INVIC PARA <i>Escherichia coli</i>	163
IV.5 MEDIDA DE ABSORBANCIA	167
IV.5.1 ESTABILIDAD OPTICA DEL MEDIO DE CULTIVO	168
IV.6 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	170
IV.6.1 DEFINICIÓN DE CRECIMIENTO	170
IV.6.2 CURVA DE CRECIMIENTO	170
IV.6.3 ETAPA EXPERIMENTAL	172
IV.6.3.1 MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA	176
<b>CAPÍTULO V DESINFECCIÓN ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL-UV</b>	
V.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL	179
V.1.1 ANALISIS DE LAS CURVAS DE INACTIVACIÓN	186
V.2 MODELO CINÉTICO PROPUESTO. DESINFECCIÓN CON RADIACIÓN UV SIN EL AGREGADO DE AGENTES OXIDANTES	191
V.3 SOLUCIÓN NUMÉRICA	196
V.4 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO	196
V.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	198
ACRONIMOS CAPÍTULO V	200
<b>CAPÍTULO VI PROCESOS DE DESINFECCIÓN CON ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL</b>	
VI. 1 MÉTODO EXPERIMENTAL	202
VI.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES	203
VI.2.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES CON ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL	203
VI.2.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	213
VI.3 MODELO CINÉTICO	221

<b>VI.3.1 MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON ÁCIDO PERACÉTICO INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO</b>	222
<i>VI.3.1.1 BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR</i>	225
<i>VI.3.1.2 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO</i>	227
<b>V.3.2 MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON PEROXIDO DE HIDROGENO</b>	232
<i>V.3.2.1 BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR</i>	236
<i>VI.3.2.2 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO</i>	238
<b>VI.3.3. MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL</b>	241
<i>V.3.3.1 BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR</i>	243
<i>VI.3.2.2 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO</i>	244
<b>VI.4 CONCLUSIONES</b>	248
<b>ACRONIMOS CAPÍTULO VI</b>	251
<b>CAPÍTULO VII CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	
<b>VII.1 CONCLUSIONES</b>	252
<b>VII.2 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	254
<b>APENDICE I DATOS EXPERIMENTALES <i>Escherichia coli</i></b>	
<b>AI. 1 GRILLAS EXPERIMENTALES ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL</b>	256
<b>AI.2 GRILLAS EXPERIMENTALES UV Y UV/ ÁCIDO PERACÉTICO</b>	260
<b>AI.3 DATOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN EL MODELO CINÉTICO</b>	265
<b>APENDICE II. CATALOGO LAMPARA PHILIPS TUV 15</b>	
<b>APENDICE II. CATÁLOGO LAMPARA PHILIPS TUV 15</b>	268
<b>APENDICE III. MODELADO MOLECULAR CON VMD</b>	
<b>AIII.1 LECTURA DEL PROGRAMA VMD</b>	270

## **APENDICE IV *Pseudomonas aeruginosa***

<b>AIV. CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMOS ESTUDIADO (2):</b>	<b>272</b>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i>. DATOS GENERALES. DESARROLLO EXP.</b>	
<b>AIV. 1 HABITAD</b>	<b>272</b>
<b>AIV.1.1 PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>	<b>274</b>
<b>AIV.2 EXPERIMENTAL <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>276</b>
<b>AIV.2.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA ATCC 15442 <i>P. AERUGINOSA</i></b>	<b>276</b>
<b>AIV.3 ENSAYOS EXPERIMENTALES CON <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>282</b>

## **APENDICE V PUBLICACIONES**

<i>CHEMICAL DISINFECTION WITH H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-THE PROPOSAL KINETIC MODEL (JOURNAL: CHEMICAL ENGEERING JOURNAL, 2012)</i>	<b>286</b>
<i>A NOVEL APPROACH TO EXPLAIN THE INACTIVATION MECHANISM OF ESCHERICHIA COLI EMPLOYING A COMERCIALLY AVAILABLE PERACETIC ACID (JOURNAL: WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2014)</i>	<b>295</b>
<i>WATER DISINFECTION WITH UVC AND/OR CHEMICAL INACTIVATION. MECHANISTIC DIFFERENCES, IMPLICATION AND CONSEQUENCES (BOOK: SUSTAINABLE ENERGY DEVELOPMENTS, SERIES, 2013)</i>	<b>302</b>

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>329</b>
-----------------------------------	------------

# INDICE DE FIGURAS

## CAPITULO I

<b>FIGURA I.1</b> PROPORCIÓN DE LA POBLACIÓN MUNDIAL QUE CONSUME AGUA DE FUENTES MEJORADAS	5
<b>FIGURA I.2</b> EVOLUCIÓN DE LA COBERTURA MUNDIAL DEL ACCESO AL AGUA POTABLE EN ZONAS URBANES Y RURALES	6
<b>FIGURA I.3</b> SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN	12

## CAPITULO II

<b>FIGURA II.1</b> FORMULA MOLECULAR DESARROLLADA DEL ÁCIDO PERACÉTICO	27
<b>FIGURA II.2</b> FORMULA MOLECULAR DESARROLLADA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	33
<b>FIGURA II.3</b> ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	35
<b>FIGURA II.4</b> ESPECTRO ELECTROMAGNETICO	37
<b>FIGURA II.5</b> ESPECTRO DE EMISIÓN TÍPICO DE LÁMPARAS DE BAJA Y MEDIANA PRESIÓN	38
<b>FIGURA II.6</b> DIMERIZACIÓN DEL ADN	41
<b>FIGURA II.7</b> ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ADN Y DE LA INACTIVACIÓN DE E. COLI	42
<b>FIGURA II.8</b> a) b) FOTORREPARACIÓN	43
c) d) ESTRUCTURAS FADH MTHF	44
<b>FIGURA II.9</b> DIFERENCIAS EN LA PARED CELULAR BACTERIANA	51
<b>FIGURA II.10</b> UNIÓN DE LA N-ACETILGLUCOSAMIDA CON EL N-ACETILMURANICO	52
<b>FIGURA II.11</b> a) y b) PARED CELULAR GRAM (+) Y GRAM (-)	56
<b>FIGURA II.12</b> IMAGEN DE <i>E.coli</i>	58
<b>FIGURA II.13</b> PODER PATOGENICO DE <i>E. coli</i>	61
<b>FIGURA II.14</b> AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS	66

## CAPITULO III

<b>FIGURA III.1</b> DEFINICIÓN DE INTESIDAD DE RADIACIÓN	81
<b>FIGURA III.2</b> MODELO DE EMISIÓN PARA UNA LAMPARA TUBULAR	92
<b>FIGURA III.3</b> RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN CON EL MODELO DE 5 PARÁMETROS	119
<b>FIGURA III.4</b> RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN CON EL MODELO DE 4 PARÁMETROS	120

<b>FIGURA III.5</b> RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN OMITIENDO LA ETAPA DE LISADO	121
<b>FIGURA III.6</b> DESCRIPCIÓN GRÁFICA DE LA EVOLUCIÓN DEL PROCESO (185 ppm)	122
<b>FIGURA III.7</b> DESCRIPCIÓN GRÁFICA DE LA EVOLUCIÓN DEL PROCESO (45 ppm)	123
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>FIGURA IV.1</b> DISPOSITIVO EXPERIMENTAL IRRADIADO	130
<b>FIGURA IV.2 a)</b> TITULACIÓN CON PERMANGANATO	139
<b>b)</b> TITULACIÓN CON IODURO	139
<b>FIGURA IV.3 a)</b> ACONDICIONAMIENTO DE LA MUETRA	142
<b>b)</b> SIEMBRA	142
<b>FIGURA IV.4 a)</b> MEDIOS DE CULTIVO	143
<b>b)</b> INCUBACIÓN DE PLACAS	143
<b>FIGURA IV.5 a)</b> DETERMINACIÓN DE APA EN EL ESPECTROFOTÓMETRO	144
<b>b)</b> DISTINTAS CONCENTRACIONES DE APA	145
<b>c)</b> CONSUMO DE APA DURANTE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES	145
<b>FIGURA IV. 6</b> CRISTALES DE CATALASA	147
<b>FIGURA IV. 7 a) y b)</b> CRISTALES DE CATALASA LUEGO DE REACCIONAR CON UV	147
<b>FIGURA IV.8</b> ACTIVIDAD DE LA CATALASA DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> A DIFERENTES VALORES DE pH.	148
<b>FIGURA IV.9</b> ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DEL APA EN EL TIEMPO	149
<b>FIGURA IV.10</b> COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE <i>E. COLI</i> EN EMB	154
<b>FIGURA IV.11</b> COLONIAS CARACTERÍSTICAS DE <i>P. aeruginosa</i> EN AGAR CETRIMIDE	156
<b>FIGURA IV.12 a)</b> PREPARACIÓN DEL PORTA CON AGUA	162
<b>b)</b> TOMA DE MUESTRAS PARA LA TINCIÓN	162
<b>c)</b> FIJACIÓN A LA LLAMA.	162
<b>FIGURA IV.13 a)</b> <i>E.coli</i> GRAM NEGATIVA	162
<b>b)</b> <i>P. aeruginosa</i> GRAM NEGATIVA	162
<b>FIGURA IV.14</b> PRUEBAS INVIC PARA <i>E. coli</i>	163

<b>FIGURA IV. 15</b> BARRIDO ESPECTRAL DEL MEDIO DE CULTIVO	168
<b>FIGURA IV.16</b> ABSORBANCIA DEL CALDO DE CULTIVO IRRADIADO CON UV	169
<b>FIGURA IV.17</b> FASES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	172
<b>FIGURA IV.18</b> CURVA DE CRECIMIENTO EXPERIMENTAL	174
<b>FIGURA IV.19</b> CURVA DE ABSORBANCIA	176

## **CAPITULO V**

<b>FIGURA V. 1</b> ESQUEMA DEL REACTOR EXPERIMENTAL	180
<b>FIGURA V.2</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC	181
<b>FIGURA V.3</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 1 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	181
<b>FIGURA V.4</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 2 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	182
<b>FIGURA V.5</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 3 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	182
<b>FIGURA V.6</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 4 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	183
<b>FIGURA V.7</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 5 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	183
<b>FIGURA V.8</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 6 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	184
<b>FIGURA V.9</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 8 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	184
<b>FIGURA V.10</b> CORRIDA EXPERIMENTAL INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y 10 ppm DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	185
<b>FIGURA V.11</b> INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> CON RADIACIÓN UVC Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL	185
<b>FIGURA V.12 a)</b> <i>E.coli</i> PREVIO AL TRATAMIENTO UVC	188
<b>b)</b> <i>E.coli</i> POST TRATAMIENTO UVC	189
<b>FIGURA V.13</b> EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES Y LA SIMULACIÓN DEL MODELO	197

## **CAPITULO VI**

<b>FIGURA VI.1</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 1 ppm	204
--	-----

<b>FIGURA VI.2</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 1.5 ppm	204
<b>FIGURA VI.3</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 2 ppm	205
<b>FIGURA VI.4</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 3 ppm	205
<b>FIGURA VI.5</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 4 ppm	206
<b>FIGURA VI.6</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 5 ppm	206
<b>FIGURA VI.7</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 6 ppm	207
<b>FIGURA VI.8</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA 8 ppm	207
<b>FIGURA VI.9</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA	208
<b>FIGURA VI.10</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 4 ppm DE ACIDO PERÁCETICO INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	214
<b>FIGURA VI.11</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 5 ppm DE ACIDO PERÁCETICO INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	214
<b>FIGURA VI.12</b> INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 6 ppm DE ACIDO PERÁCETICO INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	215
<b>FIGURA VI.13</b> COMPARACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 4 ppm DE APA COMERCIAL VERSUS 4 ppm DE APA INHIBIENDO PERÓXIDO	216
<b>FIGURA VI.14</b> COMPARACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 5 ppm DE APA COMERCIAL VERSUS 5 ppm DE APA INHIBIENDO PERÓXIDO	216
<b>FIGURA VI.15</b> COMPARACIÓN DE LA VELOCIDAD DE INACTIVACIÓN DE <i>E. coli</i> CON 6 ppm DE APA COMERCIAL VERSUS 6 ppm DE APA INHIBIENDO PERÓXIDO	217
<b>FIGURA VI.16</b> EL GRUPO HEMO	224
<b>FIGURA VI.17</b> ESQUEMA DE REACCIÓN DEL ÁCIDO PERACÉTICO INHIBIENDO PERÓXIDO	225
<b>FIGURA VI.18</b> ESQUEMA PARA LA OBTENCIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	228
<b>FIGURA VI.19</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA DE 4 ppm INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	229
<b>FIGURA VI.20</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA DE 5 ppm INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	229

<b>FIGURA VI.21</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA DE 6 ppm INHIBIENDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	230
<b>FIGURA VI. 22</b> COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE <i>E. coli</i> DEL MODELO PROPUESTO VERSUS <i>E. coli</i> EXPERIMENTAL	230
<b>FIGURA VI. 23</b> ESTRUCTURA EN FORMA DE DE CINTA DE LA ENZIMA CATALASA	234
<b>FIGURA VI.24</b> MOLECULA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE EL GRUPO HEMO PRESENTE EN LA ENZIMA CATALASA	235
<b>FIGURA VI. 25</b> ESQUEMA DE ATAQUE DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	237
<b>FIGURA VI.26</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE 15 ppm DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	238
<b>FIGURA VI.27</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE 25 ppm DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	238
<b>FIGURA VI.28</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE 33 ppm DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	239
<b>FIGURA VI. 29</b> COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE <i>E. coli</i> DEL MODELO PROPUESTO VERSUS <i>E. coli</i> EXPERIMENTAL	239
<b>FIGURA VI. 30</b> ESQUEMA CINÉTICO: ATAQUE DEL ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL	243
<b>FIGURA VI.31</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA COMERCIAL DE 5 ppm	245
<b>FIGURA VI.32</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA COMERCIAL DE 6 ppm	245
<b>FIGURA VI.33</b> EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL Y DEL MODELO PARA UNA CONCENTRACIÓN DE APA COMERCIAL DE 8 ppm	246
<b>FIGURA VI. 34</b> COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES DE <i>E. coli</i> DEL MODELO PROPUESTO VERSUS <i>E. coli</i> EXPERIMENTAL	246
<b>APENDICE IV</b>	
<b>AIV.1</b> ESTRIA DE <i>P. aeruginosa</i>	280
<b>AIV.2</b> COMPARACIÓN DE PLACAS DE <i>P. aeruginosa</i>	280
<b>AIV.3</b> <i>P. aeruginosa</i> BAJO LUZ UV	281
<b>AIV.4</b> CONFECCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO	281

# INDICE DE TABLAS

## CAPITULO I

<b>TABLA I. 1:</b> AGENTES PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR EL AGUA Y SU IMPORTANCIA EN LOS SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO DE AGUA	4
--	---

## CAPITULO II

<b>TABLA II. 1:</b> MÉTODOS CLÁSICOS DE DESINFECCIÓN	19
<b>TABLA II.2:</b> CONSTANTES DE IONIZACIÓN DEL CLORO	23
<b>TABLA II.3:</b> POTENCIALES DE OXIDACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES	45
<b>TABLA II.4:</b> CLASIFICACIÓN DE LOS PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN	46
<b>TABLA II.5:</b> COMPARACIÓN DE LAS GRAM POSITIVIAS Y LAS GRAM NEGATIVAS	54
<b>TABLA II.6:</b> CLASIFICACIÓN DE LOS BIOCIDAS SEGÚN SU UTILIZACIÓN	65
<b>TABLA II.7:</b> MECANISMOS DE ACCION DE LA SOLUCIÓN COMERCIAL DE ÁCIDO PERACÉTICO	70

## CAPITULO IV

<b>TABLA IV.1:</b> CARACTERÍSTICAS DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	131
<b>TABLA IV.2</b> REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA TITULACION	136
<b>TABLA IV.3</b> DISEÑO EXPERIMENTAL SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA+UV	140
<b>TABLA IV. 4</b> DISEÑO EXPERIMENTAL SOLUCIÓN COMERCIAL DE APA	141
<b>TABLA IV.5</b> FÓRMULA EMB AGAR	153
<b>TABLA IV.6</b> MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS EN EMB AGAR	154
<b>TABLA IV. 7</b> FÓRMULA DE AGAR CETRIMIDE	155
<b>TABLA IV.8</b> MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS EN AGAR CETRIMIDE	156
<b>TABLA IV.9</b> FORMULA DEL AGAR NUTRITIVO	158
<b>TABLA IV.10</b> MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS EN CALDO NUTRITIVO	158
<b>TABLA IV.11</b> VALORES DE CRECIMIENTO PARA E.COLI	175
<b>TABLA IV.12</b> DATOS EXPERIMENTALES DE LAS ABSORBANCIAS MEDIDAS CURVA CRESC.	177

## CAPITULO V

<b>TABLA V.1</b> RECRECIMIENTO BACTERIANO	187
---	-----

<b>TABLA V.2</b> LOGARITMO DE LA INACTIVACIÓN DE <i>E.coli</i> A LOS 4 SEGUNDOS DEL ENSAYO EXPERIMENTAL	190
---	-----

## CAPITULO VI

<b>TABLA VI.1:</b> TIEMPO NECESARIO PARA LOGRAR EL MISMO NIVEL DE INACTIVACIÓN(APA-HP)	217
--	-----

<b>TABLA VI.2:</b> RESULTADOS DE INACTIVACIÓN EMPLEANDO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL	220
--	-----

<b>TABLA VI. 3:</b> ETAPAS DE REACCIÓN PROPUESTAS	221
---	-----

## APENDICE I

<b>AI.1 TABLA 1:</b> 1 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	256
--	-----

<b>AI.1 TABLA :</b> 1.5 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	256
---	-----

<b>AI.1 TABLA 3:</b> 2 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	257
--	-----

<b>AI.1 TABLA 4:</b> 3 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	257
--	-----

<b>AI.1 TABLA 5:</b> 4 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	258
--	-----

<b>AI.1 TABLA 6:</b> 5 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	258
--	-----

<b>AI.1 TABLA 7:</b> 6 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	259
--	-----

<b>AI.1 TABLA 8:</b> 8 ppm APA COMERCIAL / <i>E. coli</i>	259
---	-----

<b>AI.1 TABLA 9:</b> FRACCIÓN DE REMOCIÓN/INACTIVACIÓN	260
--	-----

<b>AI.2 TABLA 1:</b> UVC/ <i>E. coli</i>	260
--	-----

<b>AI.2 TABLA 2:</b> UV/1 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	261
---	-----

<b>AI.2 TABLA 3:</b> UV/2 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	261
---	-----

<b>AI.2 TABLA 4:</b> UV/3 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	262
---	-----

<b>AI.2 TABLA 5:</b> UV/4 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	262
---	-----

<b>AI.2 TABLA 6:</b> UV/5 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	263
---	-----

<b>AI.2 TABLA 7:</b> UV/6 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	263
---	-----

<b>AI.2 TABLA 8:</b> UV/8 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	264
<b>AI.2 TABLA 9:</b> UV/10 ppm APA COMERCIAL/ <i>E. coli</i>	264
<b>AI.3.1 TABLA 1:</b> ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL INHIBINADO PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	265
<b>AI.3.2 TABLA 2:</b> PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	266
<b>AI.3.3 TABLA 3:</b> SOLUCIÓN COMERCIAL DE ÁCIDO PERACÉTICO	267

#### **APENDICE IV**

<b>AIV.1.1</b> MATERIALES NECESARIOS PARA LA ACTIVACIÓN DE <i>P. aeruginosa</i>	279
<b>AIV.3 TABLA 1:</b> 1 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	282
<b>AIV.3 TABLA 2:</b> 1.5 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	283
<b>AIV.3 TABLA 3:</b> 2 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	284
<b>AIV.3 TABLA 4:</b> 3 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	284
<b>AIV.3 TABLA 5:</b> 4 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	285
<b>AIV.3 TABLA 6:</b> 5 ppm ACIDO PERACÉTICO COMERCIAL/ <i>P. aeruginosa</i>	285

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN



## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN AL TEMA EN ESTUDIO**

### **I.1. IMPORTANCIA DEL AGUA.**

El agua es fundamental para todas las formas de vida conocidas. El acceso al agua potable es primordial para la salud, uno de los derechos humanos básicos y un componente esencial en las políticas eficaces de protección de la salud.

Uno de los principales problemas de la humanidad en pleno siglo XXI es el acceso al agua potable y a medios adecuados de saneamiento. Esta problemática influye de manera directa sobre la salud de una gran parte de la población mundial e indirectamente repercute en el desarrollo de los países más desfavorecidos. La falta de agua potable afianza el ciclo de la pobreza, dado que las regiones pobres se encuentran en condiciones de mayor desventaja para afrontar éste y otros muchos problemas.

La escasez de agua potable se ha convertido en la actualidad en una prioridad para la comunidad internacional. Esto ha quedado reflejado en los documentos finales de diversos foros internacionales sobre políticas de salud, entre los que cabe mencionar: la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud que tuvo lugar en Alma Ata, Kazajstán en 1978, conferencias sobre la importancia del agua, como la Conferencia Mundial sobre el Agua de Mar del Plata (Argentina) de 1977, que dio inicio al Decenio Internacional del Agua Potable y del Saneamiento Ambiental, así como los Objetivos de Desarrollo del Milenio aprobados por la Asamblea General de las Naciones Unidas (ONU) en 2000 y el documento final de la Cumbre Mundial sobre el Desarrollo Sostenible de Johannesburgo de 2002.

Uno de los objetivos principales de la Organización Mundial de la Salud consiste en garantizar el acceso a una fuente de agua potable segura a todas las personas, cualquiera sea su nivel de desarrollo y su condición social o económica. En este sentido, las Naciones Unidas proclamaron el periodo de 2005 a 2015 Decenio Internacional para la Acción: “El agua, fuente de vida”, y decidieron otorgar mayor importancia en el plano mundial a las cuestiones relativas al agua.

La calidad del agua en los sistemas naturales depende de diversos factores naturales, aunque, el factor más importante en la actualidad es la actividad antrópica. El hombre ha utilizado las aguas continentales como fuente de recurso para multitud de funciones, así como medio receptor y depurador de los residuos generados por las mismas.

## **I.2. CALIDAD DEL AGUA DE CONSUMO**

El Código Alimentario Argentino (CAA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus Guías para la calidad del agua potable, la Directiva 98/83 de la Comunidad Económica Europea (CEE) y otras normas internacionales, instituyen o recomiendan requisitos de calidad para el agua de consumo humano. En general, estas normativas establecen que el agua es bacteriológicamente apta si se encuentra exenta de microorganismos patógenos de origen entérico y de parasitarios intestinales.

El agua de consumo humano ha sido definida en las Guías de Calidad del Agua de Bebida de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2004; OMS, 2003; OMS, 1995) como aquella: “*inocua (potable) que no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida (lactantes, niños y ancianos)*”. El objetivo de las normas y estándares es el de controlar la cantidad de un determinado microorganismo en el agua, siendo este microorganismo la causa de una enfermedad específica o un indicador de las condiciones dentro de las cuales podría transmitir enfermedad (Jones, 1997). En el caso de los microorganismos patógenos no existe un límite inferior tolerable, por lo que el agua destinada al consumo, la preparación de alimentos y bebidas o la higiene personal no debe contener ningún agente patógeno para los seres humanos.

En las guías para el control de la calidad de la OMS (2003) se postula que: “*La garantía de la inocuidad microbiana del abastecimiento de agua de consumo se basa en la aplicación, desde la cuenca de captación al consumidor, de barreras múltiples para evitar la contaminación del agua de consumo o para reducirla a niveles que no sean perjudiciales para la salud*”. La seguridad microbiológica del agua se mejora mediante la implantación de barreras múltiples, como la protección

de los recursos hídricos, la selección y aplicación correcta de una serie de operaciones de tratamiento, y la gestión de los sistemas de distribución (por tuberías. o sistemas alternativos) para mantener y proteger la calidad del agua tratada. Esto se puede conseguir seleccionando fuentes de agua de buena calidad, tratando y descontaminando eficazmente el agua contaminada y protegiéndola para que no haya contaminación durante la distribución al usuario.

No obstante, a pesar de los protocolos, guías y programas de organizaciones gubernamentales y no gubernamentales para controlar la contaminación microbiológica, aproximadamente un 80% de todas las enfermedades en los países en desarrollo están asociadas a la utilización y al consumo de agua contaminada (Rojas, 2002). Las enfermedades causadas por bacterias, virus, protozoarios parásitos o helmintos son el riesgo más común que lleva consigo el agua de consumo (OMS, 2004). El uso de la misma para beber o cocinar, el contacto durante baños o la inhalación de pequeñas gotitas (aerosoles) pueden resultar en infecciones (Guimarães, 2001). La gama de agentes patógenos cambia en función de factores variables como el aumento de la población, el incremento del uso de aguas residuales, los cambios poblacionales, las migraciones y viajes, y condiciones ambientales de stress o selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o de la recombinación de estos agentes ya existentes.

La transmisión por el agua de consumo es sólo uno de los vehículos de transmisión de los agentes patógenos transmitidos por la vía fecal-oral. Pueden ser también vehículo de transmisión los alimentos contaminados, las manos, los utensilios y la ropa, sobre todo cuando el saneamiento e higiene domésticos son deficientes. Para reducir la transmisión de enfermedades por la vía fecal-oral es importante mejorar la calidad del agua y su disponibilidad, así como los sistemas de eliminación de excrementos y la higiene general. La tabla I.1 proporciona información general sobre agentes patógenos importantes en la gestión de sistemas de abastecimiento de agua de consumo.

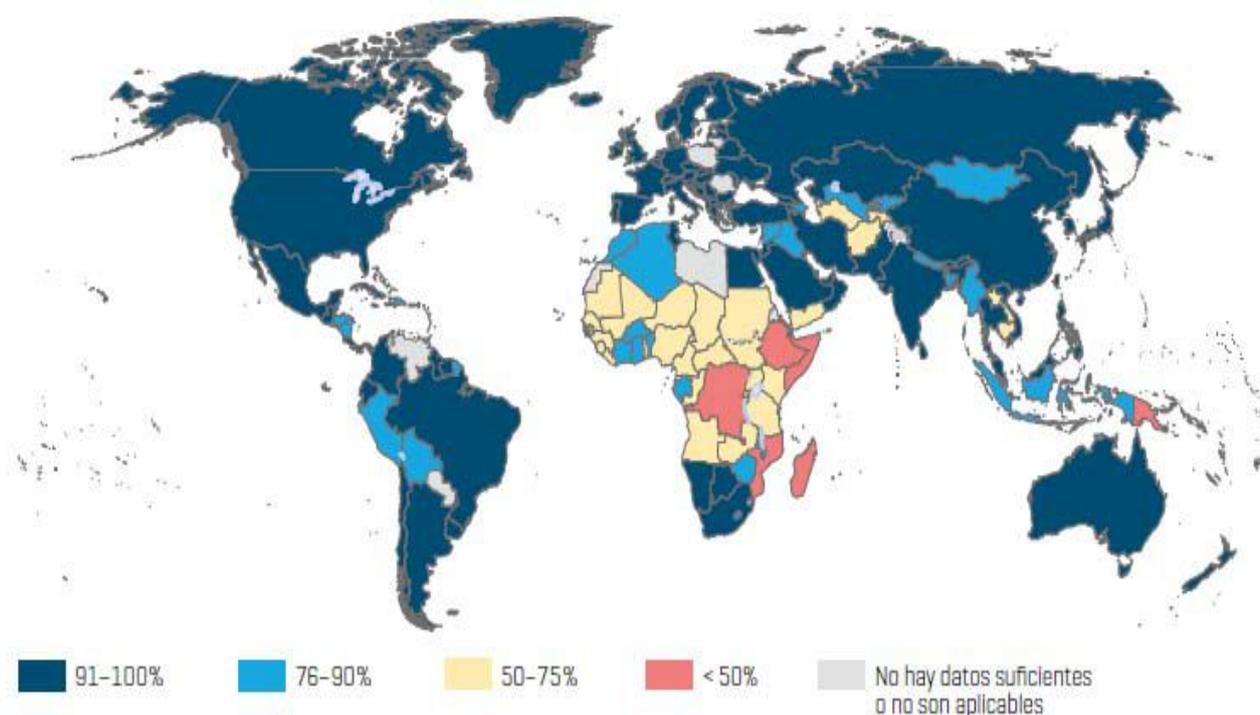
**Tabla I.1 Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia en los sistemas de abastecimiento de agua (modificado de OMS, 2005).**

AGENTE	IMPORTANCIA PARA LA SALUD	PERSISTENCIA EN EL AGUA	INFECTIVIDAD RELATIVA
<i>Campilobacter jejuni</i>	alta	moderada	moderada
<i>Escherichia coli (patogena)</i>	alta	larga	moderada
<i>Escherichia coli (hemorrágica)</i>	alta	moderada	moderada
<i>Legionella sp</i>	alta	moderada	moderada
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	alta	moderada	baja
<i>Salmonella thypi</i>	alta	larga	moderada
<i>Shigella sp</i>	alta	moderada	baja
<i>Vibrio cholerae</i>	alta	prolifera	alta
<i>Adenovirus</i>	alta	larga	alta
<i>Enterovirus</i>	alta	larga	alta
<i>Virus Hepatitis A</i>	alta	larga	alta
<i>Virus Hepatitis B</i>	alta	larga	alta
<i>Acanthamoeba spp</i>	alta	larga	alta
<i>Entamoeba histolytica</i>	alta	larga	alta
<i>Giardia intestinalis</i>	alta	larga	alta
<i>Toxoplasma gondii</i>	alta	larga	alta
<i>Dranculus medienesis</i>	alta	moderada	alta
<i>Schistosoma spp</i>	alta	moderada	alta

### I.3. LA DISTRIBUCIÓN Y ACCESO AL AGUA EN EL MUNDO

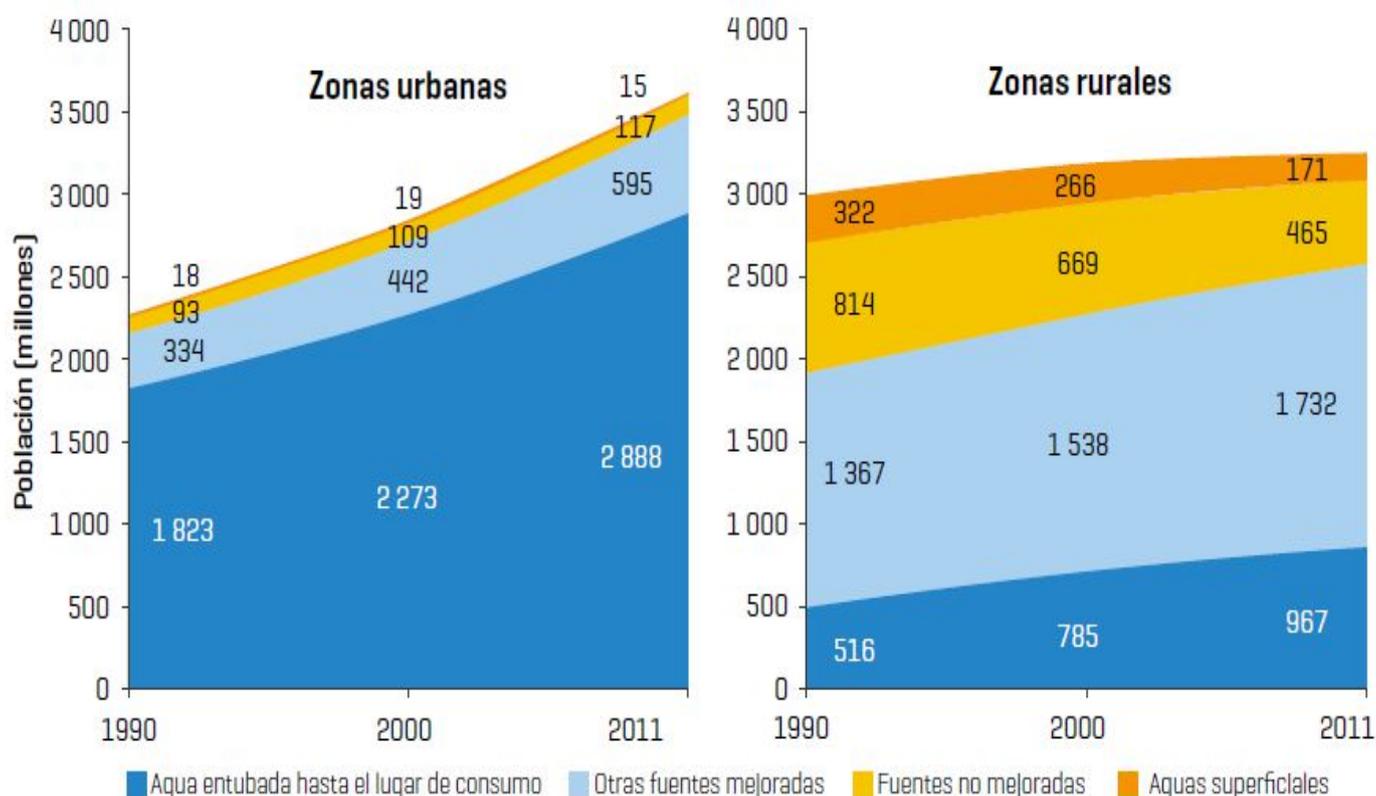
El total del agua presente en el planeta, en todas sus formas, se denomina hidrósfera. Se estima que en la superficie terrestre hay unos 1.500 km<sup>3</sup> de agua que cubren el 70% de la superficie mundial. De este porcentaje, el 97,5 % de ella es agua salada. y del restante 2,5 %, que es agua dulce, casi las tres cuartas partes se encuentran congeladas en forma de capas de hielo. El agua dulce accesible de los lagos, ríos y mantos acuíferos es inferior al 0,1 % del total de agua de la Tierra. El agua tiene su propia dinámica en el denominado ciclo hidrológico. A medida que el hombre ha modificado el ciclo natural para poder utilizar el agua para su provecho, se han generado diferentes ciclos artificiales o antrópicos del agua que no sólo modifican su circulación, sino que implican una modificación de sus características, ya que en estos nuevos ciclos el agua ve alterada su calidad (Fernandez Cirelli, 2009).

La distribución y el acceso al agua no son equitativos, se calcula que en el 2011, 768 millones de personas no consumían agua de una fuente mejorada, de las cuales 185 millones recurrían a aguas superficiales para satisfacer sus necesidades diarias de agua (United Nations International Childrens Emergency Fundation, UNICEF, 2013), el 83% de la población sin acceso a una fuente de agua de consumo mejorada vivía en zonas rurales, en países en desarrollo. La tasa de cobertura de agua en el 2011 puede observarse en la figura I.1.



**Figura I.1. Proporción de la población mundial que consume agua de fuentes mejoradas. (Modificada del Informe de Actualización de UNICEF, 2013)**

En los países en desarrollo, cerca del 85% de la población cuenta con servicios de agua potable, ya sea con conexión o con fácil acceso a una fuente pública. Estas estimaciones de la cobertura sugieren que los niveles de servicio son relativamente altos. Sin embargo, no hay equidad en el acceso y uso de estos servicios y se observan grandes disparidades entre zonas urbanas y rurales, si bien esta diferencia ha decrecido en los últimos 20 años. En la figura I.2 puede observarse la evolución de la cobertura del acceso al agua potable en las zonas urbanas y rurales en el periodo comprendido entre 1990 y 2011.



**Figura I.2. Evolución de la cobertura mundial del acceso al agua potable en zonas urbanas y rurales (Modificada del Informe de Actualización de UNICEF, 2013)**

Dentro de las cuatro metas principales de las Naciones Unidas, UNICEF y la OMS para los próximos 20 años, tres de ellas hacen referencia al acceso al agua segura, estas son:

✓ que en 2030 todas las personas dispongan en el hogar de una instalación básica para lavarse las manos y obtener agua potable.

✓ que en 2040 todas las personas utilicen instalaciones de saneamiento adecuadas en el hogar; que la proporción de la población sin un servicio de abastecimiento de agua intermedio en el hogar se haya reducido a la mitad; que los excrementos de al menos la mitad de las escuelas, centros de salud y hogares con instalaciones de saneamiento adecuadas estén gestionados de forma segura, y que se hayan reducido progresivamente las desigualdades en el acceso a todos estos servicios.

✓ que todos los servicios de abastecimiento de agua, saneamiento e higiene se proporcionen de una manera cada vez más accesible, responsable y sostenible económica y medioambientalmente.

### **I.3.1. DISTRIBUCIÓN Y ACCESO AL AGUA EN ARGENTINA.**

Existe en Argentina una amenaza creciente a la sostenibilidad de las fuentes de aguas superficiales y subterráneas por la alteración antrópica del uso del suelo en su cuenca de aporte. Las prácticas agrícolas no conservacionistas, la deforestación, el uso de agroquímicos y los cambios en el uso del suelo, particularmente la urbanización, perturban el balance hídrico y las condiciones de calidad de las fuentes.

De acuerdo al Censo Nacional 2011 (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) el 96% de la población urbana del país está abastecida por sistemas de agua potable por red, en tanto que el 4% de la población urbana se abastece por fuentes alternativas, mientras que el 53.8% de esta población dispone de servicios de evacuación de excretas por red. El 18% de la población urbana utiliza sistemas individuales para la evacuación de efluentes cloacales, tales como cámara séptica y pozo absorbente; por lo que la población urbana que tiene acceso a un sistema cloacal seguro alcanza aproximadamente al 65%. No obstante estos valores, existe una marcada disparidad en los niveles de cobertura de agua potable y saneamiento entre provincias y entre áreas urbanas y rurales de éstas.

El 40% de la población rural dispone de agua potable por red mientras que sólo el 1,6% evacua sus excretas a una red colectora domiciliaria, en tanto, el 48, 2% de la población rural dispone de sistemas individuales de descarga de efluentes (cámara séptica y pozo absorbente). De esta información se puede observar que en Argentina, la presencia de microorganismos patógenos en el agua de bebida es un riesgo que se incrementa en las aéreas marginales de mayor densidad poblacional que no tengan disposición final de excretas o en zonas sin disponibilidad de agua tratada (zonas rurales).

El promedio nacional de producción de agua por habitante servido se estima en 380 litros/habitantes/día, con un rango amplio de variación entre las distintas provincias, que oscila entre un máximo de 654 l/ hab/ día en la provincia de San Juan y un mínimo de 168 l/ hab/ día en la provincia de La Pampa. El consumo medio real

sobre la base de los resultados de sistemas que operan con micro medición (Bahía Blanca en la provincia de Buenos Aires y la provincia de Jujuy) es del orden de los 180 l/ hab/ día.

El vertido de las aguas residuales domésticas sin depurar a los ríos y lagos y la infiltración de excretas provenientes de fosas sépticas y redes de alcantarillado mal mantenidas, constituyen una de las principales fuentes de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas en el país, generando así un riesgo potencial para la salud de la población. Sólo el 10% del volumen total de los efluentes domésticos recolectados por los sistemas de desagües cloacales, son tratados por un sistema de depuración.

Como complemento, se puede agregar que las enfermedades relacionadas con el agua más frecuentemente desarrolladas en el país son las gastrointestinales agudas, la paratifoidea, la fiebre tifoidea y las parasitosis intestinales. La diarrea es uno de los problemas de salud más acuciante. La incidencia media anual en niños menores de cinco años es de 3,5 episodios cada mil, uno de los cuales puede ser prolongado y dar lugar a una deshidratación, cuya gravedad varía de acuerdo al microorganismo infeccioso, la intensidad de la infección, la edad y el estado nutricional e inmunidad del niño. La Hepatitis ("A" y las sin especificar) presentan una fuerte incidencia, registrándose en 1997 en el ámbito nacional 39.000 notificaciones, evidenciando marcados incrementos en coincidencia con las áreas de bajo nivel socioeconómico y carentes de servicios adecuados de saneamiento.

#### **I.4. MARCO LEGAL DEL AGUA EN ARGENTINA:**

A nivel nacional, se puede decir que no existe una ley nacional de aguas. Numerosos proyectos sobre una ley nacional o federal de aguas fueron presentados por el Poder Ejecutivo o por diversos legisladores a lo largo de los años, sin encontrar el adecuado respaldo para su sanción. La actual legislación nacional está constituida entonces por las normas contenidas fundamentalmente en el Código Civil, el Código de Comercio, el Código de Minería, el Código Penal y leyes federales como las de energía, navegación, transporte, puertos, protección del ambiente y de los recursos naturales, etc., las que contienen disposiciones directa o indirectamente relacionadas con el agua. A su vez la Nación ha ratificado tratados internacionales sobre aguas compartidas; ingreso de buques nucleares en aguas argentinas; préstamos para obras

de abastecimiento de agua potable y saneamiento urbano y rural; construcción de obras de uso múltiple; y otros cuya normativa involucra directa o indirectamente al agua.

## **I.5. DESINFECCIÓN DEL AGUA**

La desinfección del agua es un proceso que tiene como objetivo volver inactivo al agente biológico contaminante, y generalmente es la etapa final de los tratamientos de agua para consumo.

Según la Organización Panamericana de la Salud, OPS, (2004), la eficiencia del proceso de desinfección dependerá de factores que se deberán tener en cuenta, como son:

- ✓ La naturaleza y número de los organismos a ser destruidos.
- ✓ El tipo y concentración del desinfectante usado.
- ✓ La temperatura del agua a ser desinfectada. Cuanta más alta sea la temperatura, más rápido es el proceso.
- ✓ El tiempo de contacto entre el desinfectante y el agua. Mientras mayor sea este periodo, los resultados son mejores. La totalidad de muertes de microorganismos es proporcional al tiempo de contacto.
- ✓ La calidad del agua a ser desinfectada. Si el agua contiene partículas, especialmente de naturaleza coloidal y orgánica, la eficiencia de la desinfección es menor. Es recomendable que la turbiedad del agua sea menor a 5 UNT.
- ✓ El pH del agua.
- ✓ Las condiciones de la mezcla. Se obtiene buenos resultados cuando la mezcla del agua y el desinfectante es homogénea.

A su vez, un desinfectante ideal deberá reunir las siguientes características:

- ✓ Destruir o inactivar, dentro de un tiempo determinado, las clases y número de microorganismos patógenos presentes en el agua.
- ✓ Ser fiable para usar dentro del rango de condiciones que podrían encontrarse en el abastecimiento de agua.

- ✓ Mantener una concentración residual adecuada en el sistema de distribución de agua a fin de evitar la recontaminación.
- ✓ No introducir ni producir sustancias tóxicas o, en caso contrario, éstas deben mantenerse por debajo de los valores guía.
- ✓ Ser seguro y conveniente de manejar y aplicar en las situaciones en que se prevé su uso.
- ✓ El análisis para determinar la concentración de desinfectante en el agua debe ser exacto, sensible, rápido y apropiado.
- ✓ El costo del equipo, instalación, operación, mantenimiento y reparación, así como su adquisición y el manejo de los materiales requeridos para sustentar permanentemente una dosificación eficaz, deben ser accesibles.

El agente desinfectante normalmente utilizado en América Latina y en la mayoría de los países en desarrollo es el cloro, que continúa desempeñando una función primordial en la reducción y el control de estas enfermedades que hoy día siguen siendo una preocupación en muchos países. La dosificación de un agente químico con fines de desinfección en el agua, puede traer como consecuencia que, al reaccionar con ciertos compuestos orgánicos, se propicie la formación de productos secundarios de la desinfección DBPs (disinfection by-products, por sus siglas en inglés), muchos de los cuales se han identificado como potencialmente perjudiciales para la salud humana. Rook (1974) detectó en el agua potable clorada la existencia de subproductos generados por la reacción con el cloro y la materia orgánica natural, NOM, (natural organic matter, por sus siglas en inglés). La materia orgánica natural presente en el agua y el ión bromuro (u otros iones) se consideran como los precursores orgánicos e inorgánicos, respectivamente para la formación de los DBPs (Sadiq y Rodriguez, 2004).

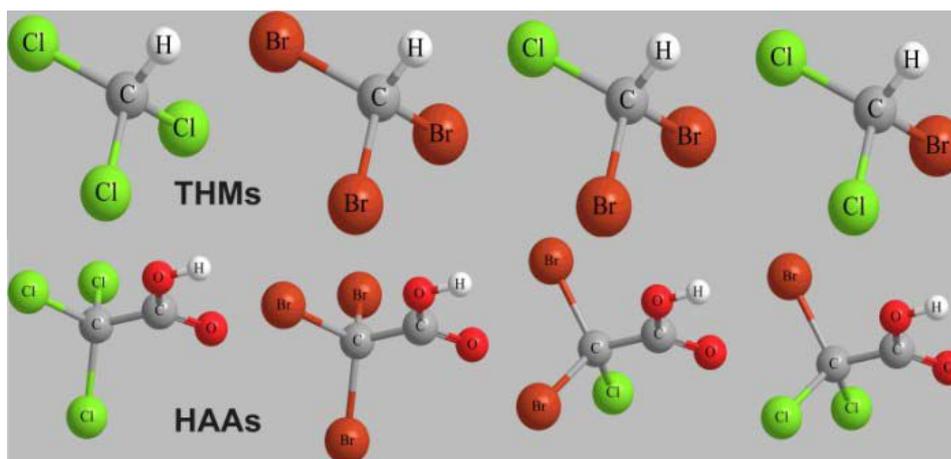
Como se mencionó en el párrafo anterior, los precursores de los subproductos de la desinfección pueden agruparse en dos grandes grupos, los precursores orgánicos y los inorgánicos, la materia orgánica natural (NOM), en particular las sustancias húmicas presentes en el agua no tratada (es decir, en aguas naturales), constituye el grupo más abundante de precursores orgánicos que reaccionan con el desinfectante en el proceso de desinfección, dando lugar a la formación de los mencionados subproductos (Nikolaou et al., 2004; Singer, 1994, 1999; Christman et

al., 1983; Miller and Uden, 1983; Oliver, 1983; Johnson et al., 1982; Rook, 1976; Bellar et al., 1974).

La NOM incluye una variedad de compuestos orgánicos, cuyas concentraciones varían dependiendo de la vegetación próxima a la fuente hídrica, la concentración de algas en el agua y la época del año (Singer, 1994; Kavanaugh et al., 1980). Una fuente importante de NOM la constituyen las sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos), y las sustancias no húmicas, principalmente proteínas y aminoácidos, azúcares y polisacáridos, ligninas, ceras y lípidos (Richardson, 2003). Una característica de las aguas naturales es que el 90% de las sustancias húmicas disueltas son ácidos fúlvicos y el 10% ácidos húmicos.

El otro grupo de precursores, los inorgánicos, está formado por los componentes inorgánicos naturales y antropogénicos presentes en el agua, procedentes de varios minerales y otras sustancias derivadas de fuentes abióticas, como el desgaste geológico. El precursor inorgánico más común es el bromuro, cuya concentración puede variar entre 10 y 100 µg/L en aguas superficiales, pero es menos frecuente en aguas subterráneas.

Estos productos secundarios pueden ser considerados como riesgos químicos derivados del proceso de desinfección, al generarse exclusivamente por la reacción de los desinfectantes con sustancias presentes naturalmente en el agua. Los DBPs están constituidos principalmente por trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (HAAs) y los haloacetoneitrilos. El Cloroformo, los bromodiclorometanos, los dibromoclorometanos y el bromoformo, son todos componentes de los trihalometanos totales (TTHMs), que presente en el agua, puede causar problemas en el hígado, riñón, o en el sistema nervioso y también incrementa el riesgo de cáncer (Gehr et al., 2002.; Wagner et al, 2002; Colgan y Gehr, 2001). Algunos de los subproductos de desinfección más usuales pueden observarse en la figura I.3.



**Figura I.3 Subproductos de la desinfección (Cyprus University of Technology)**

Cada desinfectante produce una gama de subproductos diferentes, dependiendo de las características del agua, de las condiciones del proceso de desinfección e incluso de la combinación de desinfectantes usados (desinfectante primario y secundario). Por tanto, aunque la desinfección del agua es una barrera contra los microorganismos que pueden originar enfermedades que en su momento causaron grandes epidemias y que las siguen causando pero en menor medida; también implica la presencia de compuestos potencialmente tóxicos y/o genotóxicos, a los que cualquier persona que consuma agua desinfectada estaría expuesto (Meier et al., 1988; 1987; 1986).

La desinfección del agua potable es un proceso muy vinculado a la salud, que si se lleva a cabo en forma confiable resulta en la disminución de la mayor parte de las enfermedades de transmisión hídrica, pero debe hacerse en forma tal que no introduzca riesgos adicionales por el uso inadecuado de los productos químicos dosificados.

Actualmente, efectuar un balance entre los riesgos biológicos asociados a la ingesta de agua, y los riesgos químicos que derivan del uso de los desinfectantes, es una tarea necesaria y una nueva variable a tener en cuenta en el diseño y operación de los sistemas de potabilización.

### **I.5.1 DESINFECTANTES ALTERNATIVOS.**

Un sistema de desinfección ideal debería garantizar la eficiencia máxima para la remoción de microorganismos patógenos sin generar subproductos tóxicos e

indeseables. La solución correcta del problema de la contaminación pasa por el uso de tecnologías alternativas que en ninguno de sus pasos afecten el medio ambiente.

Es especialmente interesante concentrar el esfuerzo en nuevas tecnologías que sean del tipo destructivo, permitiendo obtener como resultado medios purificados e ino cuos. Dentro de estos procesos se ubican las los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) y como caso particular, de indudable crecimiento en la investigación de los últimos años, se destaca la aplicación de aquellas que emplean radiación UV (en algunos casos solar) para llevar a cabo la tarea.

La búsqueda de desinfectantes “verdes”, amigables con el ambiente, es un desafío constante para las Organismos Nacionales, empresas y Organizaciones Sociales que buscan minimizar el impacto ambiental de los productos químicos, el ácido peracético comercial, se presenta como el desinfectante “verde” de esta última década.

#### ***1.5.1.1. PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN***

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs o AOPs “Advanced Oxidation Processes”, por sus siglas en inglés) son procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes químicos y biológicos (Gogate et al., 2004; Legrini et al., 1993). El concepto fue inicialmente establecido por Glaze y colaboradores quienes definieron los PAOs como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación.

Los PAOs se clasifican en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos, en función de la utilización o no de radiaciones luminosas en el proceso. (Labas et al, 2009). Los PAOs más utilizadas en los últimos años son; dentro de los fotoquímicos: UV; UV/ $\text{O}_3$ ; UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Foto-Fenton ( $\text{Fe}^{2/+3}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ); Fotocatálisis Heterogénea ( $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ) y dentro de los no fotoquímicos: ozonización ( $\text{O}_3/\text{OH}$ ;  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ); Reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2/+3}/\text{H}_2\text{O}_2$ ); oxidación electroquímica, tratamiento con haces de electrones, ultrasonido, etc.

Las ventajas de los PAOs frente a los tratamientos tradicionales se pueden resumir en:

- ✓ El contaminante se transforma químicamente, a diferencia de los sistemas de separación de los contaminantes del agua.
- ✓ Se puede obtener una mineralización completa del contaminante.
- ✓ No se generan fangos que requieran un tratamiento posterior.
- ✓ Son de mucha utilidad frente a contaminantes tóxicos y/ o no biodegradables.
- ✓ Funcionan en el tratamiento de contaminantes hasta muy bajas concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ ).
- ✓ No se forman subproductos de reacción, o se forman en baja concentración.
- ✓ Son ideales para disminuir la concentración de compuestos formados por pretratamientos alternativos, como la desinfección.
- ✓ Generalmente, mejoran las propiedades organolépticas del agua tratada.
- ✓ En muchos casos, consumen mucha menos energía que otros métodos (por ejemplo, la incineración).
- ✓ Permiten transformar contaminantes refractarios en productos tratables luego por métodos más económicos como el tratamiento biológico.
- ✓ Eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro.

#### ***1.5.1.2. DESINFECCIÓN CON UV GERMICIDA***

La inactivación por irradiación se debe a la absorción de radiación UV de alta energía por los componentes fundamentales de la célula, causando reacciones fotoquímicas que perjudican su funcionamiento normal (USEPA, 1999).

Mientras que la mayoría de los agentes desinfectantes normalmente utilizados en aguas inactiva los microorganismos por una interacción (reacción) química, la inactivación de los microorganismos por irradiación se debe a la absorción de radiación ultravioleta (UV) de alta energía, que causa reacciones fotoquímicas de los componentes fundamentales de las células, perjudicando así su funcionamiento normal, interrumpiendo el mecanismo de duplicación o causando la muerte.

La desventaja que presenta la utilización de radiación UV es que, si el daño producido al microorganismo no ha sido profundo, este puede volver a repararse. (Labas et al, 2007).

### ***1.5.1.3. DESINFECCIÓN CON ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL***

Dentro de los desinfectantes que se presentan como la más nueva alternativa para la desinfección de efluentes se encuentra el Ácido Peracético (APA),  $\text{CH}_3\text{COOOH}$ . Este desinfectante se encuentra en forma comercial como una solución cuaternaria de equilibrio entre el ácido acético, el agua, el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético (40% agua, 23% de ácido acético, 22% peróxido de hidrógeno, 15% de ácido peracético).

El ácido peracético (APA) y la combinación de APA/UV se presentan como la más novedosa alternativa para el tratamiento de aguas (muy poco aplicadas y difundidas en países con economías emergentes)

El ácido peracético ha mostrado poseer un amplio espectro de ataque a microorganismos como ser bacterias, virus, mohos y amplio poder ovicida y esporicida, incluso a bajas temperaturas (Falsani et al, 2006; Kittis, 2004; Rutala et al, 1999). El mecanismo de principal de acción del APA consiste en atravesar la membrana citoplasmática de la célula, oxidando los componentes y destruyendo el sistema enzimático, permitiendo además, el paso del peróxido de hidrógeno a través de la membrana celular e inhibiendo la enzima catalasa (Kittis 2004). La desinfección con APA tiene un gran beneficio adicional que es que no produce subproductos de desinfección o lo hace en muy baja cantidad (Koivunen and Heinonen-Tanski, 2005, Monarca et al 2002), por tal motivo se lo reconoce como “amigable al ambiente”. Además los residuos del desinfectante se descomponen rápidamente en compuestos inocuos tales como ácido acético y oxígeno.

Si bien en los últimos años se le ha dado mucha importancia al estudio de diferentes tipos de PAO, el tratamiento de aguas con APA y con APA/UV no ha sido estudiado profundamente.

## ACRONIMOS CAPITULO I

UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
NOM	Materia orgánica natural
DBPs	Subproductos de la desinfección
THM	Trihalometanos
TTHM	Trihalometanos totales
HAAs	Haloacéticos
PAO	Procesos Avanzados de Oxidación
µg	microgramos
hab	habitantes

## **I.6. OBJETIVOS Y PLAN EXPERIMENTAL**

La elección del tema de tesis responde a una problemática actual del país: el acceso al agua microbiológicamente segura. Además, realizará aportes para contribuir con la solución del problema de tratamiento, en especial, con la ausencia de subproductos de desinfección sin involucrar mayores costos adicionales.

El trabajo de Tesis tiene como objetivos básicos la generación de conocimientos científicos originales que aporten soluciones a problemáticas ambientales reales.

Este trabajo de tesis pretende el desarrollo de un modelo cinético detallado para la inactivación de dos contaminantes microbiológicos modelos utilizando un agente oxidante y su posterior combinación con radiación UV, la verificación experimental del mismo y la obtención de parámetros cinéticos. Se buscará también analizar la generalidad de los resultados obtenidos con distintos tipos de bacterias. Estos datos cinéticos serán luego empleados para diseñar en forma predictiva reactores en escala mayor y formas operativas diferentes a las de laboratorio.

Se puede establecer entonces, un objetivo general y objetivos particulares:

### **I.6.1. OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar una metodología general para el modelado cinético de la desinfección de aguas empleando un agente oxidante químico (ácido peracético, peróxido de hidrógeno) sólo y/ o combinado con radiación UV.

### **I.6.2. OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Cuantificar, mediante modelos matemáticos el efecto de distintos agentes oxidantes y de la adición de estos al proceso que emplea radiación UV

sola en la descontaminación microbiológica del agua. UVC sola, Oxidantes solos y Oxidantes más UVC.

2. Obtener una cinética intrínseca general de descontaminación de aguas con agentes oxidantes (con y/ sin UCV). Analizar su validez con diferentes especies de bacterias sobre la base de la variación que se produce en los respectivos parámetros cinéticos.

3. Dilucidar con datos cinéticos cuantitativos obtenidos el agente oxidante más conveniente. Establecer las mejores condiciones de operación para cada caso.

# CAPÍTULO II

## MÉTODOS DE DESINFECCIÓN



## CAPÍTULO II. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

### II.1. GENERALIDADES DE LOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

La desinfección, en cuanto a su aplicación al tratamiento de agua, es el proceso que se ocupa de la reducción del número de microorganismos. La desinfección del agua es un proceso muy vinculado a la salud, que si se lleva a cabo en forma confiable resulta en la disminución de la mayor parte de las enfermedades de transmisión hídrica, pero debe hacerse en forma tal que no introduzca riesgos adicionales por el uso inadecuado de los productos químicos dosificados.

Los desinfectantes y el equipo de desinfección se deben seleccionar de modo que satisfagan en lo posible las condiciones específicas de la aplicación a que se destinen teniendo en cuenta todos los factores que influyen en la fiabilidad, continuidad y eficacia de la desinfección. Los métodos de desinfección clásicos se indican en la tabla II.1

**Tabla II.1. Métodos clásicos de desinfección de agua**

FISICOS	QUIMICOS
Ultrafiltración	Cloro- Dióxido de Cloro-Cloramidas
Ultrasonido	Ozono
Ósmosis inversa	Permanganato
Temperatura:	Peróxido de Hidrogeno(*)
i)Ebullición	Ácido peracético(*)
ii)Congelamiento	Glutaraldehido
Radiación:	Plata
i)Ultravioleta(*)	Iodo
ii)Gama	
iii)Ionizante	

(\*) *Se desarrollarán en esta tesis doctoral.*

Los procesos de tratamiento de aguas pueden reducir la concentración de los contaminantes biológicos a través de dos mecanismos:

**Mecanismos de remoción:** remover el contaminante biológico por medios físicos tales como coagulación, floculación, sedimentación o flotación y filtración.

**Mecanismos de inactivación:** volver inactivo el contaminante a través de la acción de los desinfectantes físicos o químicos. El término inactivación es sinónimo de desinfección, y debe distinguirse de esterilización, que es la destrucción de todas las formas de vida.

El propósito de la desinfección de efluentes es proteger la salud pública mediante la inactivación de microorganismos patógenos tales como entero bacterias, virus y protozoarios y generalmente es la etapa final de de una serie de procesos unitarios que tienen lugar en una planta potabilizadora convencional de aguas superficiales (White, 1999).

En una planta potabilizadora convencional los procesos de remoción e inactivación son complementarios, y la efectividad de cada uno depende fuertemente del tipo de tratamiento utilizado, y del agente biológico que se pretende eliminar.

La remoción o inactivación de un contaminante biológico se define como:

$$\% (R/I) = \left( \frac{N_0 - N}{N_0} \right) 100 \quad (II.1)$$

(R/I)=Remoción y/o inactivación de microorganismos.

$N_0$ =Concentración inicial de microorganismos.

$N$ =Concentración final de microorganismos.

La efectividad de los procesos de remoción y/o inactivación se puede evaluar a través de la cantidad x-Log removida y/o inactivada.

$$\text{Log}(R/I) = \text{Log} \frac{N}{N_0} \quad (\text{II.2})$$

$$\text{Log}(R/I) = \text{Log} \left( \frac{100}{100 - (R/I)} \right) \quad (\text{II.3})$$

$$\% (R/I) = \left( 1 - \frac{1}{10^{\text{Log}(R/I)}} \right) 100 \quad (\text{II.4})$$

0,5 Log  $\approx$  68,38% de remoción y/o inactivación.

1,0 Log  $\approx$  90,0% de remoción y/o inactivación.

2,0 Log  $\approx$  99% de remoción y/o inactivación.

3,0 Log  $\approx$  99,9% de remoción y/o inactivación.

4,0 Log  $\approx$  99,99% de remoción y/o inactivación.

Si bien los tratamientos convencionales del agua pueden reducir hasta en un 99,9% los microorganismos presentes, generalmente se requiere de la desinfección para producir agua apta para el consumo humano desde el punto de vista microbiológico (ENOHSA, 2000).

A continuación se presentará una breve descripción de los desinfectantes más utilizados.

## II.2. DESINFECTANTES QUÍMICOS:

Los agentes químicos utilizados en el campo de la potabilización de aguas, pueden ser oxidantes químicos, tales como el cloro, el dióxido de cloro, el ozono, el permanganato de potasio, o iones metálicos tales como los iones de plata. Estos agentes químicos al introducirse en el agua producen la oxidación, con posterior ruptura de pared celular, y la difusión del agente al interior de las células, con la consecuente interferencia en la actividad celular. Por lo tanto la capacidad de oxidación y de difusión son requisitos esenciales para que cualquier agente desinfectante sea considerado eficiente (Asano et al., 2007).

El mecanismo por el cual se destruyen los organismos depende principalmente del tipo de organismo y de la naturaleza del desinfectante. Si bien los mecanismos de inactivación de bacterias, virus y protozoarios no están completamente esclarecidos, se han propuesto cinco modos de acción fundamentales:

1. daño de la pared celular,
2. alteración de la permeabilidad celular,
3. alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma,
4. alteración del ADN o ARN celular y
5. inhibición de la actividad enzimática.

La eficiencia de los agentes químicos son afectadas por diversos factores tales como: la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto entre el agua y el desinfectante, la temperatura, el pH, la concentración y el tipo de microorganismos (Asano et al., 2007; Montgomery, 1985).

### **II.2.1. DESINFECCIÓN CON CLORO:**

El cloro se emplea en el tratamiento de agua:

1. Como desinfectante, para destruir o atenuar los microorganismos patógenos
2. Como oxidante, con el objeto de modificar el carácter químico del agua,
3. Para ambas aplicaciones simultáneas, tanto en la desinfección como en la oxidación.

Cuando se adiciona cloro al agua, este se hidroliza rápidamente, formándose ácido hipocloroso (HOCl)





El ácido hipocloroso, formado por la hidrólisis del cloro, mantiene la propiedad oxidante y es el principal responsable del efecto germicida de la solución acuosa de cloro. Este ácido débil se ioniza o disocia en iones hidrógeno e hipoclorito (ENOHSA, 2000).



El ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipoclorito  $\text{OCl}^-$ , conforman lo que denomina cloro residual libre. Para aguas con pH entre 6,5 y 8,5 la reacción es incompleta y ambas están presentes en diferente porcentaje, dependiendo del pH.

La constante de ionización es:

$$K_i = \frac{[\text{H}^+][\text{OCl}^-]}{[\text{HOCl}]} \quad (\text{II.8})$$

La  $K_i$  varía según la tabla II.2:

**Tabla II.2 Constante de Ionización del Cloro (White, 1992)**

T (°C)	0	5	10	15	20	25	30
$K_i \times 10^8$ Mol/l	1.488	1.753	2.032	2.320	2.621	2.898	3.175

### II.2.2. DESINFECCIÓN CON CLORAMINAS

Las cloraminas, si bien tienen menor poder desinfectante que el cloro libre, se utilizan por su capacidad de persistir en el agua, proporcionando un efecto residual “combinado” que actúa en las redes y depósitos de distribución.

Las prácticas de cloración “residual” combinadas tienen por objetivo la formación de monoclорaminas ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), por la adición de cloro y amonio al

agua, o por reacción del cloro dosificado y el amonio naturalmente presente en la misma.

A los valores de pH que habitualmente se presentan las aguas naturales predomina la monocloramina por sobre la dicloramina, y la tricloramina. Si bien la dicloramina tiene un efecto germicida más potente que la monocloramina, se debe evitar la formación ya que ambas confieren olor y sabor desagradables al agua (ENOHSA, 2000).

Si la concentración de amoníaco en el agua es nula o escasa, se requiere la adición de cloro y amoníaco, hasta lograr la concentración de cloro residual combinado deseada. Si la concentración de amoníaco en el agua es suficiente para lograr la concentración de cloro residual combinado que se requiere, solo se dosifica cloro (ENOHSA, 2000).

Las cloraminas son una buena opción como desinfectante secundario por los siguientes potenciales beneficios (EPA, 1999):

- ✓ No son tan reactivas como el cloro libre con los compuestos orgánicos para formar trihalometanos.
- ✓ La monocloramina residual es más estable en el agua que el cloro libre y el dióxido de cloro, proporcionando mayor protección contra recrecimientos bacterianos en las redes de distribución y depósitos de almacenamiento.
- ✓ Las monocloraminas son muy efectivas para controlar biofilms en las redes de distribución

No obstante, pueden citarse las siguientes desventajas del uso de cloraminas (EPA, 1999):

- ✓ El poder desinfectante de las cloraminas es menor que el de otros desinfectantes tales como el cloro libre, el ozono y el dióxido de cloro.
- ✓ Las cloraminas no oxidan hierro, manganeso y sulfuros.
- ✓ Excesos de amonio en el sistema de distribución pueden conducir a la nitrificación, especialmente en puntas de red.

- ✓ La formación de dicloraminas ocasiona problemas operativos.
- ✓ Las cloraminas deben ser generadas in-situ.

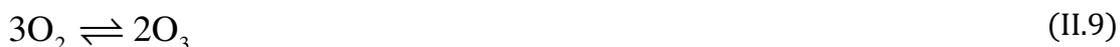
### II.2.3. DESINFECCIÓN CON OZONO

El ozono, poderoso oxidante representado por el símbolo O<sub>3</sub>, es un alótropo (alotropía: propiedad de algunos elementos químicos de presentarse en dos o más formas diferentes, en un mismo estado físico) del oxígeno, conformado por tres átomos de este elemento. Es un gas cuya densidad es 1,5 veces mayor que la del oxígeno, y 1,7 veces más pesado que el aire, y es solo parcialmente soluble en agua, pero cerca de 10 a 20 veces más que el oxígeno.

A presión y temperatura ambiente es un gas inestable que se descompone rápidamente generando la molécula de oxígeno. Por lo tanto no se puede almacenar o envasar, se debe generar en el mismo sitio en donde se va a utilizar, y se debe aplicar inmediatamente (ENOHSA, 2000).

El ozono es extremadamente corrosivo y ataca a la mayoría de los metales, por lo que se deben seleccionar cuidadosamente todos los materiales de las instalaciones (ENOHSA, 2000).

La formación del ozono se da a partir de la combinación de un átomo de oxígeno y una molécula de oxígeno, según la siguiente reacción endotérmica, que requiere de importantes inputs de energía:



El ozono puede producirse a través de variados métodos, tales como la irradiación con luz ultravioleta de un gas que contenga oxígeno, reacciones electrolíticas y otros métodos emergentes (EPA, 1999).

El ozono tiene algunas limitaciones importantes como desinfectante único: su vida media en el agua es corta (aproximadamente media hora), reacciona con sustancias orgánicas para producir derivados de peso molecular

inferior, que son más biodegradables que sus precursores, y no deja efecto residual (desinfectante residual) (ENOHSA, 2000).

El ozono es el desinfectante más potente que se utiliza en los sistemas de potabilización de aguas, siendo los valores de C\*T necesarios para inactivar la mayoría de los microorganismos, la décima parte de los correspondientes al ácido hipocloroso (HOCl) o al dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) (ENOHSA, 2000).

La inactivación de microorganismos se puede producir por contacto físico directo entre éstos y las burbujas de gas ricas en ozono (efecto aparentemente más importante), y por acción del ozono disuelto y sus productos de reacción (ENOHSA, 2000).

Si bien el tiempo de contacto del ozono con el agua tiene su importancia, en la relación C\*T, la dosis suministrada tiene mayor peso relativo, debido a su elevado poder oxidante. Solo queda residual de ozono en el agua luego de que la totalidad de la materia con alta capacidad de oxidación fue oxidada, en caso contrario, es posible que no se haya satisfecho completamente la demanda de ozono (Solsona y Méndez, 2002).

La inactivación de microorganismos por el ozono residual disuelto no se ve afectada significativamente por las variaciones de pH (ENOHSA, 2000; Solsona y Méndez, 2002).

### **II.3. DESINFECTANTES QUÍMICOS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL**

#### **II.3.1. ÁCIDO PERACÉTICO**

La elección del Ácido Peracético como agente desinfectante de aguas para estudiar durante este trabajo de investigación doctoral, responde a varios motivos: el ácido peracético es un poderoso desinfectante con un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Los atributos que hacen del ácido peracético un potencial desinfectante de aguas residuales son: la facilidad de aplicación del tratamiento (sin necesidad de costosas inversiones de capital), su

alto poder oxidante, incluso en presencia de materia orgánica heterogénea, ausencia de subproductos o residuos tóxicos o mutagénicos persistentes, baja dependencia con el pH, cortos tiempos de contacto y efectividad para efluentes primarios y secundarios.

### II.3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### II.3.2.1 QUÍMICA DEL APA

El ácido peracético ( $\text{CH}_3\text{COOOH}$ ) es un peróxido del ácido acético, otros nombres por los cuales se lo conoce es hidroperóxido acético o hidroperácido acético, (Block, 2001), su fórmula molecular desarrollada puede observarse en la Figura II.1.

Comercialmente, el APA, se encuentra disponible como una mezcla cuaternaria en equilibrio de ácido peracético (15% (APA), ácido acético (16%) (AA), peróxido de hidrógeno (23%) (pH) y agua (45%) de acuerdo a la siguiente ecuación (Alasri et al., 1992; Block, 2001; Gehr et al., 2002):

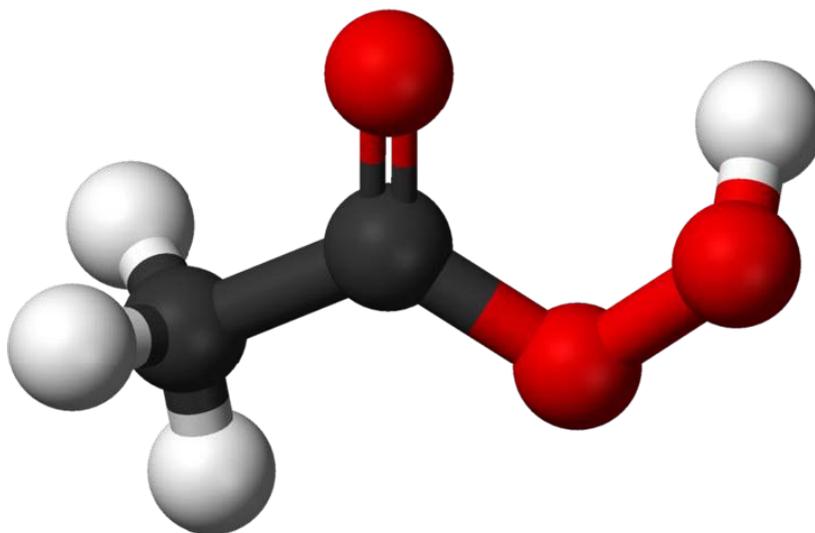
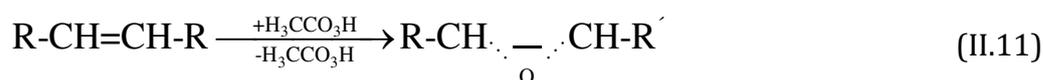


Figura II.1 Fórmula molecular desarrollada del APA

Las soluciones de APA se producen industrialmente por reacción del ácido acético o anhídrido acético con peróxido de hidrógeno en presencia de un catalizador, generalmente ácido sulfúrico. Para evitar la reacción reversa, las soluciones son suplementadas con ácido acético y peróxido de hidrógeno (Block, 2001). Una de las principales desventajas del ácido peracético es que las soluciones diluidas son considerablemente inestables (Block, 2001).

El principal uso del ácido peracético es para la síntesis industrial de epóxidos. Transfiere un átomo de oxígeno a dobles enlaces, por ejemplo en el etileno y el propileno, para formar epóxidos y alcoholes (Ecuación II.11). Puede también ser usado para producir glicerol sintético a partir del propileno, y es usado en la fabricación del nailon.



### II.3.2.2. PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Las propiedades germicidas del APA fueron reportadas por primera vez en 1902 por Freer y Novy, quienes notaron las excelentes acciones desinfectantes del APA. Hutchings y Xezones (1949) evaluaron la acción germicida de 23 desinfectantes contra esporas de *Bacillus thermoacidurans* siendo el APA el desinfectante más efectivo de los 23 evaluados.

Greenspand y MacKellar (1951) encontraron que el APA era bactericida a una concentración de 0,001%, fungicida a 0,003%, y esporicida a 0,3%. La eficiencia de desinfección del APA hacia los microorganismos puede ser clasificada de la siguiente manera: Bacterias > Virus > Esporas Bacterianas > Protozoarios. (Liberti y Notamicola, 1999; Rudd y Hopkinson, 1989).

A pesar de los pocos trabajos que se han realizado para determinar el modo de acción del APA como agente antimicrobiano, se especula que funciona como otros peróxidos y agentes oxidantes (Block, 2001). Su actividad desinfectante está basada en la liberación de especies reactivas del oxígeno (Liberti y Notarnicola, 1999).

El APA ataca las uniones sulfhídrido (–SH) y di–sulfuro (S–S) de proteínas, enzimas, y otros metabolitos. Se sugiere que produce la ruptura de la pared celular afectando posteriormente la función quimiosmótica de las lipoproteínas de transporte de la membrana citoplasmática (Baldry y Fraser, 1988; Leaper, 1984;). También sería eficaz contra lipoproteínas del exterior de la membrana, lo que facilitaría su acción contra bacterias Gram negativas (Leaper, 1984). Su acción como agente desnaturizante de proteínas podría ayudar a explicar sus características como esporicida y ovicida (Block, 2001). Por otra parte, el APA intracelular también puede oxidar enzimas esenciales, por lo tanto las vías metabólicas y mecanismos bioquímicos vitales, el transporte activo a través de membranas, y los niveles intracelulares de soluto se ven perjudicados (Fraser et al., 1984). Además, se demostró que el APA actúa sobre las bases nitrogenadas de la molécula de ADN de las bacterias (Tutumi et al., 1973). Una ventaja importante del APA es que puede inactivar la catalasa, una enzima conocida por desintoxicar y eliminar los radicales libres hidroxilo (Block, 2001). Aunque el peróxido de hidrógeno es un desinfectante por si solo que contribuye al poder de la mezcla, el APA es un agente antimicrobiano más potente que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo altamente efectivo a bajas concentraciones contra un gran espectro de microorganismos (Baldry y French, 1989a; Fraser et al., 1984; Baldry, 1983;). Diferentes estudios indican que se requieren dosis mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para obtener el mismo nivel de desinfección que se alcanza con APA (Wagner et al., 2002).

El APA puede dañar virtualmente todo tipo de macromoléculas asociadas con un microorganismo: carbohidratos, ácidos nucleicos (mutaciones), lípidos (peroxidación lipídica), y aminoácidos (por ejemplo, conversión de *Phe* a *m-Tyr* y *o-Tyr*). Esto lleva de manera final a la lisis celular y una verdadera muerte microbiana.

### *II.3.2.3. ÁCIDO PERACÉTICO COMO DESINFECTANTE DE AGUAS NATURALES*

Debido a la eficacia contra bacterias y virus, demostrada en varias industrias, el uso de APA como desinfectante para los efluentes de aguas residuales se ha investigado a escala laboratorio y piloto desde los 90's (Gehr et al., 2002; Wagner et al., 2002; Stampi et al., 2001; Liberti et al., 2000; Morris, 1993; Lefevre et al., 1992).

En los siguientes párrafos se resume algunos resultados relevantes (es decir, dosis y tiempos de contacto frente a las reducciones microbianas y las conclusiones de estos estudios):

Baldry & French (1989b) encontraron que el APA era un eficaz agente desinfectante para efluentes secundarios y resaltaron la facilidad de aplicación del tratamiento con APA sin necesidad de equipos costosos, el amplio espectro de actividad, incluso en presencia de materia orgánica y la ausencia de generación de subproductos indeseables para el medio ambiente, características que hacen del APA un potencial agente desinfectante para el tratamiento de aguas residuales (Baldry y French, 1989b; Block, 2001). Gehr et al. (2002) encontraron que para efluentes municipales primarios tratados fisicoquímicamente (con cloruro de aluminio o de hierro), se requerían dosis de APA de 2 a 6 mg/L para lograr 1.000 unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes fecales por cada 100ml con un tiempo de contacto de 60 minutos. Para los efluentes secundarios, se requerían dosis menores de APA (0,6 a 4 mg/L) para alcanzar 1.000 UFC de coliformes fecales por cada 100ml.

En los estudios realizados para la planta de tratamiento de aguas residuales de la Comunidad Urbana de Montreal en Canadá, se encontró que una dosis de de 1 a 2 mg/L y un tiempo de contacto de 2 horas era suficiente para alcanzar 10.000 UFC de coliformes fecales por 100ml en efluentes provenientes del tratamiento primario (Colgan y Gehr, 2001), mientras que para efluentes secundarios se recomendó una dosis de APA de 5 a 10 mg/L y un tiempo de contacto de 15 minutos (Poffe et al., 1978).

La eficacia de la desinfección con APA también ha sido evaluada en aguas residuales crudas, donde mostró una amplia variabilidad. Factores que influyeron en dicha variabilidad fueron: la naturaleza y concentración de materia orgánica, la concentración de sólidos en suspensión, la concentración inicial de coliformes, y, sobre todo, el valor del pH. La dosis óptima de APA para aguas residuales sin tratar fue de aproximadamente 20 mg/L con un tiempo de contacto de unos 10 minutos. Dosis más altas o tiempos de contacto mayores no mejoraron sustancialmente la eficiencia del APA contra coliformes totales (Sánchez–Ruiz et al., 1995).

Estudios de laboratorio comparativos de los efectos del APA, el dióxido de cloro y el cloro sobre bacterias indicadoras en efluentes secundarios de aguas residuales mostraron que el APA podría ser una alternativa viable a estos biocidas halogenados (Baldry y French, 1989a).

Ensayos de laboratorio y a gran escala, en Brasil e Italia mostraron que el APA era mejor desinfectante que el hipoclorito de sodio para la desinfección de aguas residuales en climas tropicales y cálidos. Su eficacia sobre *Vibrio cholerae* sugirió que podía ser un elemento importante en el control del cólera. Aproximadamente 5 mg/L de APA y un tiempo de contacto de 10 minutos era suficiente para eliminar prácticamente todas las bacterias coliformes (Baldry et al. 1995).

#### **II.3.2.4. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE LA DESINFECCIÓN**

El APA es efectivo en un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, en carácter general, similar a otros productos químicos desinfectantes, las reducciones microbianas aumentan con el aumento de la temperatura del agua durante la desinfección con APA (Stampi et al., 2001).

La efectividad del APA se ve afectada por el pH, siendo más activo a pH bajo. Se considera que la forma con actividad antimicrobiana del APA es el ácido no disociado (Colgan y Gehr, 2001). El APA tiene un pKa de 8.2, por lo tanto en

condiciones alcalinas (es decir, pH superior a 9), la especie predominante es la forma disociada del ácido lo que resulta en una disminución de la eficiencia de desinfección. La eficiencia de desinfección a pH 5 a 8 no varía demasiado para bacterias, pero sí se encuentra una disminución significativa de la eficiencia de desinfección cuando se trabaja a pH 9 (Tutumi et al., 1973; Baldry y French, 1989b; Baldry et al., 1991; Sánchez – Ruiz et al., 1995; Block, 2001).

Aunque se ha demostrado que el APA es un eficaz desinfectante para los efluentes primarios de aguas residuales, en carácter general, se encontró que la eficacia de la desinfección con APA aumenta con la disminución de los sólidos suspendidos totales (SST) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Meyer, 1976; Poffe et al., 1978; Sánchez-Ruiz et al., 1995; Colgan y Gehr, 2001; Stampi et al., 2001; Gehr et al., 2002).

#### **II.3.4. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

El peróxido de hidrógeno es una excelente fuente de oxígeno singlete, radicales superóxido  $O_2^-$  e hidroxilo, que son altamente reactivos y muy tóxicos para los microorganismos (Willson, R. 1979; Halliwell and Gutterid, 1984). Aunque los mecanismos exactos por los cuales el  $H_2O_2$  genera productos letales para muchos microorganismos no se encuentran clara ni completamente dilucidados, si se sabe que las especies derivadas con propiedades oxidantes, pueden producir daño en ácidos nucleicos, enzimas y constituyentes de membrana (Schurman, J. 2001). No obstante, también ha sido reportado que soluciones acuosas de  $H_2O_2$  solo, no causarían modificaciones en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos sin la presencia de catalizadores para la formación de radicales (Juven and Pierson, 1996). Se considera que la inhibición del crecimiento microbiológico por parte del peróxido de hidrógeno no es el resultado de sus propiedades oxidativas en su estado molecular, sino la consecuencia de las actividades de otras especies químicas oxidantes derivadas del mismo.

### II.3.4.1 QUÍMICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (HP), también conocido como agua oxigenada, dioxigen o dioxidano, es un compuesto químico con características de un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno tal como el agua (Figura II.2), y se presenta como un líquido ligeramente más viscoso que ésta. Es conocido por ser un poderoso oxidante. Líquido incoloro bastante estable. Se comercializa como soluciones acuosas a concentraciones entre el 3 y el 90%. El contenido en  $H_2O_2$  de dichas soluciones puede expresarse en porcentaje o en volúmenes. La expresión en volumen se refiere al contenido en oxígeno y se define como el número de veces que un determinado volumen de  $H_2O_2$  lo contiene es soluble en agua y en éter; insoluble en éter de petróleo.

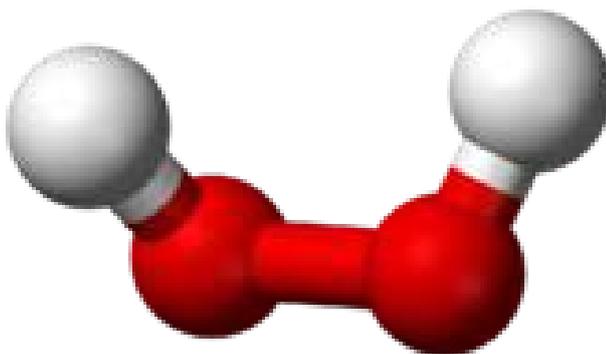


Figura II.2 Formula molecular del peróxido de hidrógeno

Hay varias vías donde el peróxido de hidrógeno puede ser transformado para formar radicales hidroxilos, entre ellas pueden incluirse:

- i. Descomposición espontánea de  $H_2O_2$  a  $\cdot OH$  (Flores et al, 2012; Labas et al, 2009)
- ii. Reacción de Fenton, donde se genera  $\cdot OH$  a partir de  $H_2O_2$  gracias a la presencia de un metal. Algunos de los metales que pueden participar en esta reacción son hierro o cobre, entre otros:



- iii. Reacción de Haber-Weiss. Tiene lugar entre las formas oxidadas de  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  y el anión superóxido, generando la forma reducida de los metales; los que vía Fenton generan el  $\cdot\text{OH}$ .

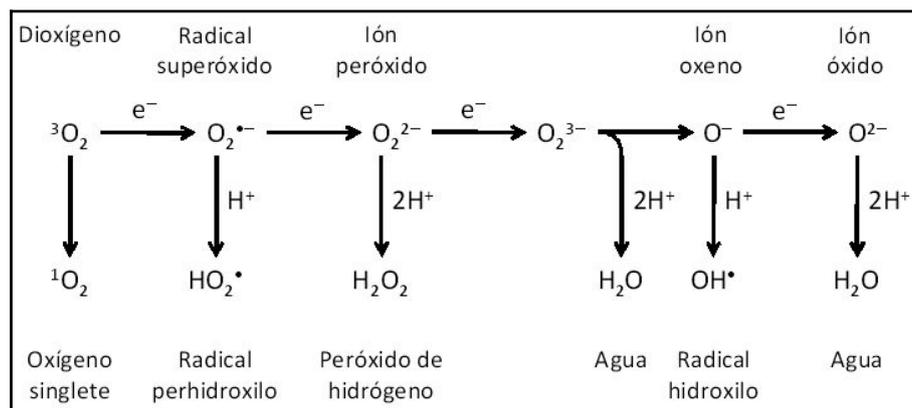


#### ***II.3.4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA***

Los efectos dañinos en los componentes celulares bacterianos aparentan ser producidos por un fenómeno particular llamado estrés oxidativo. El mismo se produce por la exposición de un organismo a oxígeno o a otras moléculas altamente oxidantes, en ocasiones generadas por el propio metabolismo

El oxígeno es una molécula altamente reactiva que puede ser reducida parcialmente para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas pueden ser producidas por:

- ✓ Procesos metabólicos normales, como la respiración aeróbica o la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.
- ✓ El sistema inmune para la destrucción de potenciales competidores o patógenos.
- ✓ El agregado de sustancias químicas externas como el peróxido de hidrógeno.
- ✓ La toxicidad de las ROS es debida a su capacidad de dañar diferentes componentes celulares (Figura II.3)



**Figura II.3. Especies reactivas de Oxígeno**

Como se ha mencionado, es el radical hidroxilo el agente que produce mayor daño celular. Las proteínas son dañadas mediante una oxidación de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína (Storz et al., 1987; Wolff et al., 1986). Algunos aminoácidos son oxidados a derivados carbonilados, quedando así marcados para su eliminación y renovación. Estas modificaciones producen la pérdida de la función de la molécula proteica. Durante el envejecimiento de la célula aumenta el nivel de los derivados carbonilados, lo que relaciona el envejecimiento celular con la oxidación proteica (Stadtman, 1992). Las enzimas que contienen centros Fe/S en su estructura son oxidadas por el anión superóxido, lo que provoca la desintegración de los centros y, por tanto, la pérdida de la funcionalidad de la enzima (Flint et al., 1993). Otra consecuencia de la destrucción de los centros Fe/S es que el hierro procedente de los mismos cataliza la oxidación del ADN junto con el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton (Keyer and Imlay, 1996).

Sobre los lípidos, el estrés oxidativo causa peroxidación de los mismos, lo que produce una pérdida de la integridad de la membrana celular (Coyle y Puttfarcken, 1993). Una de las consecuencias de esta reacción es la pérdida de permeabilidad y otros cambios que producen el deterioro de la organización de la membrana interna.

Sobre el ADN, las ROS, especialmente el radical  $\cdot\text{OH}$ , producen roturas en la doble cadena, así como la pérdida de las bases nitrogenadas por modificaciones químicas (Storz et al., 1987).

## **II.4. DESINFECCIÓN CON AGENTES FÍSICOS**

El método físico de desinfección más empleado a nivel comunitario, es la inactivación de los microorganismos mediante radiación ultravioleta (UV). En la industria de los alimentos se utilizan los métodos térmicos, no así en la desinfección del agua. Actualmente, se está considerando el potencial del ultrasonido como una alternativa a las técnicas más tradicionales de desinfección de agua. La cavitación acústica, generada por ultrasonido, se propone como una potencial herramienta para la desinfección. Dentro de los métodos físicos, se pueden incluir también la sedimentación o la sedimentación-floculación-coagulación, que pueden reducir patógenos, pero esta no es su meta principal.

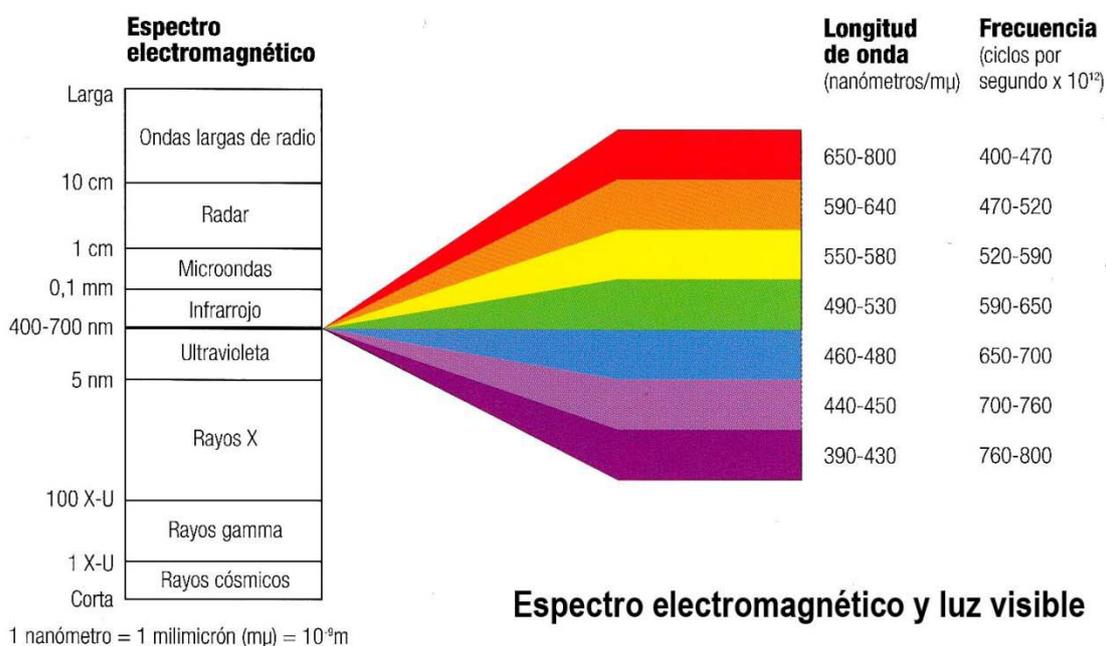
### **II.4.1. RADIACIÓN UV**

La radiación UV es ampliamente difundida como desinfectante físico del agua, ya que se disipa rápidamente en el agua para ser absorbida o reflejada, no dejando por lo tanto efecto residual. La formación de subproductos luego de la radiación ultravioleta es mínima en relación con los subproductos generados por los desinfectantes químicos.

El efecto germicida de este tipo de energía fue reportado por primera vez por Downs y Blunt en 1877 (USEPA, 1996; Groocock, 1984; Schenck, 1981), pero seguramente por falta de desarrollo en el equipamiento y la escasa confiabilidad del proceso, no fue utilizado sino hasta pasada la primera mitad del siglo XX (Wright y Cairns, 2000). Se comprobó el efecto del UV con diferentes microorganismos en numerosa bibliografía (Lawryshyn & Cairns, 2003; Labas et al., 2005; 2006).

**II.4.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA:**

La radiación ultravioleta pertenece al espectro electromagnético y está situada en la faja de 40 a 400nm de longitud de onda, entre los rayos X y la luz visible. La división de la radiación UV puede ser clasificada en UV vacío (40 – 200nm), UV–C (200 – 280nm), UV–B (280 – 315nm) y UV–A (315 – 400nm) (Wright y Cairns, 2000, Meulemans, 1986). En términos de efecto germicida, el rango óptimo de UV se encuentra entre 245 y 285nm (UV–C y UV–B) (Wright & Cairns, 2000; Meulemans, 1986)(Figura II.4).



**Figura II.4. Espectro electromagnético**

Si bien el sol es una fuente de luz ultravioleta, la absorción de la radiación de onda corta por parte de la capa de ozono de la tierra impide que cantidades significativas de UV–B y UV–C alcancen la superficie de la tierra. Por ello, las aplicaciones prácticas de desinfección UV dependen de fuentes artificiales de UV. Las fuentes de UV más comúnmente empleadas son lámparas de arco de mercurio de baja y mediana presión que se encuentran disponibles comercialmente y que emiten generalmente a una longitud de onda de 253.7nm. (Wright y Cairns, 2000).

Una lámpara típica de arco de mercurio consiste de un tubo herméticamente cerrado de sílica vitrea o cuarzo (transmisores ambos de UV) con electrodos a ambos extremos (Phillips, 1983). El tubo es llenado con una pequeña cantidad de mercurio y un gas inerte, usualmente argón a presión de algunos torricellis (torr). Los electrodos están compuestos usualmente de tungsteno con una mezcla de metales de tierra alcalinos para facilitar la formación del arco dentro de la lámpara. Una descarga de gas es producida por un voltaje elevado a través de los electrodos. La luz UV es emitida desde la lámpara cuando el vapor de mercurio excitado por la descarga, retorna a un nivel menor de energía. El argón presente ayuda para el arranque de la lámpara, extender la vida del electrodo, y reducir las pérdidas térmicas. El argón no contribuye al espectro de rendimiento de la lámpara.

En una lámpara de arco de mercurio la radiación UV se produce como resultado de la corriente de electrones a través del vapor ionizado de mercurio entre los electrodos de la lámpara produciendo la mayor parte de su emisión a 253.7 nm. Esta longitud de onda es muy cercana a la mayor actividad germicida, motivo por el cual se utilizan para los procesos de desinfección. En la figura II.5 se muestra el espectro de emisión de las lámparas de mercurio de baja y mediana presión.

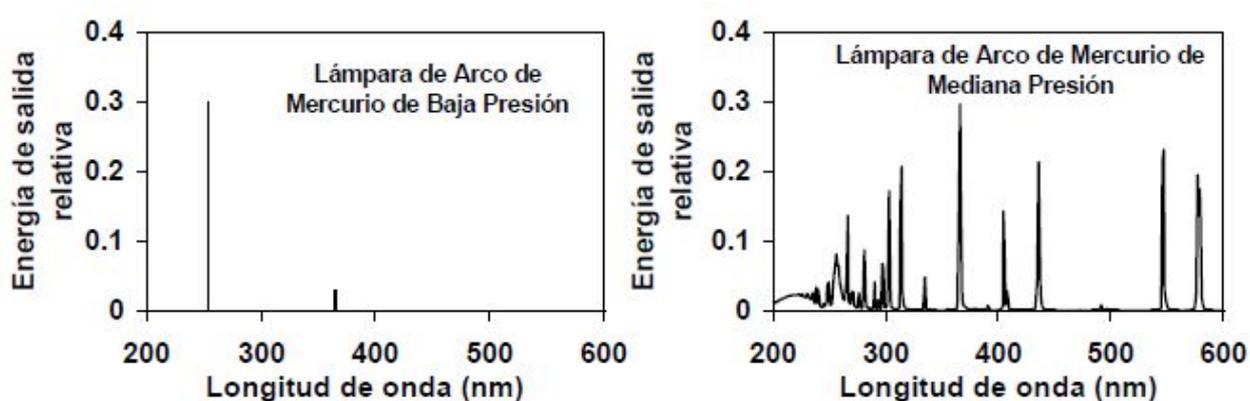


Figura II.5. Espectro de emisión típico de lámparas de baja y mediana presión (Wright y Cairns, 2000)

En el campo de las ciencias experimentales y en el comercial se prefiere las lámparas de baja presión de mercurio que emiten únicamente UV-C de neto poder germicida a una sola longitud de onda y además se evitan las altas temperaturas de las lámparas de mediana presión. El espectro de rendimiento de una lámpara de mediana presión consiste en numerosos picos con un continuo de UV por debajo de los 245 nm. Mientras que las lámparas de baja presión son eléctricamente más eficientes que las de mediana presión, estas últimas producen una potencia UV mayor por lámpara, que se puede traducir a mayor poder germicida, sin embargo operan a temperaturas altas con mucho consumo de energía. Por lo tanto, la decisión de elegir un sistema de irradiación apropiado para una aplicación específica, ya sea un sistema de baja o mediana presión o una combinación de los dos dependerá de los factores específicos del sistema en estudio. Estas lámparas UV son similares en el diseño a las lámparas fluorescente estándares con unas pocas diferencias notables. Las lámparas UV típicamente se fabrican con cristal duro de cuarzo a diferencia del cristal suave encontrado en las fluorescentes. Este cuarzo permite una transmisión de energía radiante UV del 90%. Las lámparas fluorescentes contienen un revestimiento delgado de fósforo que convierte el UV a luz visible (González Garrido, 2001).

Dado que este mecanismo de desinfección consiste en energía bajo forma de ondas electromagnéticas, su eficiencia no está limitada por la mayoría de las variables que definen la calidad del agua. Esto implica que parámetros tales como temperatura, alcalinidad, carbono inorgánico total y pH no interfieren con la radiación ultravioleta. En cambio, el material orgánico y la turbiedad pueden proteger a los microorganismos de las radiaciones, bajando la eficiencia del proceso, y con aguas duras puede ocurrir que sales poco solubles se depositen en el tubo que reviste las lámparas lo cual puede ser sumamente perjudicial (Wolfe, 1990).

#### ***II.4.1.2. ACCIÓN DE LA RADIACIÓN UV***

La radiación UV a pesar de no tener actividad ionizante, provoca cambios químicos en las moléculas absorbentes. Las moléculas alteradas por este tipo de

radiación se denominan fotoproductos. De todas las moléculas biológicas, los ácidos nucleicos son los más importantes absorbentes de radiación UV en células pequeñas (como bacterias).

Los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. La radiación UV es absorbida por los nucleótidos, promoviendo la formación de enlaces entre nucleótidos adyacentes, por lo que se generan dímeros (Jagger, 1967). Si bien la formación de dímeros de timina – timina son los más comunes, también suelen ocurrir dímeros de citosina – citosina, citosina – timina, y dimerización del uracilo (Figura II. 6). Los dímeros de pirimidina son los fotoproductos más importantes en las células vegetativas bacterianas. Esta “dimerización” se trata de aductos (uniones) entre pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN, mediante la creación de un anillo de ciclobutano. Su efecto principal es la distorsión local de la configuración de la doble hélice, que interfiere en el normal emparejamiento de bases complementarias, ello, a su vez, provoca una interferencia en los procesos de replicación y transcripción y secundariamente en el crecimiento y respiración.

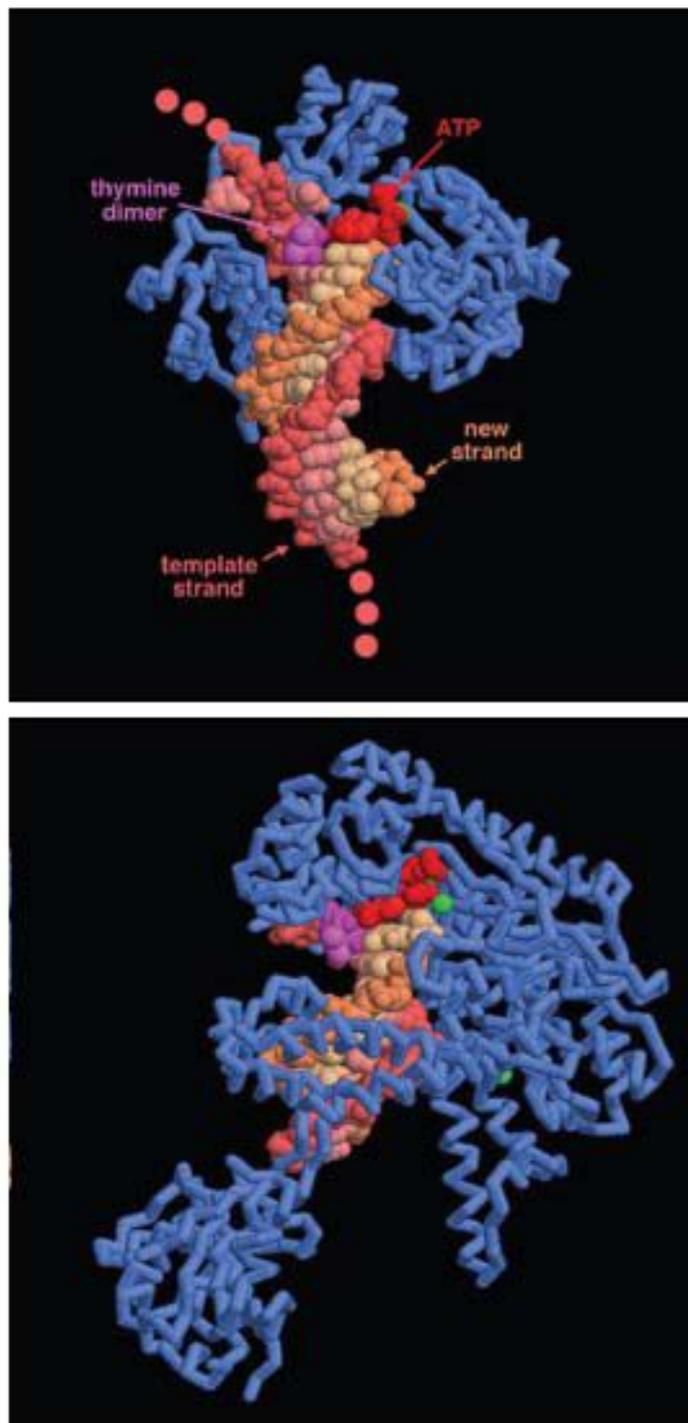


Figura II.6. Dimerización del ADN. (figuras creadas con RasMol del Protein Data Bank)

En la figura II.6, La enzima del extremo superior (PDB entrada) es una fotoliasa que rompe directamente los enlaces que conectan el dímero, corrigiendo el error en su lugar. Irónicamente, las fotoliasas utilizan la luz

visible para alimentar este proceso. Esta estructura captura el ADN después que el dímero de timina se ha solucionado. Observe que las dos bases de timina (color magenta) se volcaron fuera de la hélice de ADN normal y están unidos en la superficie de la enzima, la figura del extremo inferior representa la misma enzima desde otro ángulo.

La formación de un número suficiente de dímeros en un microorganismo impide que este replique su ADN, lo que impide su reproducción. La absorción de radiación UV por el ADN depende fuertemente de la longitud de onda. En la figura II.7 se observa que para *E. coli*, el punto máximo de inactivación se alcanza con una longitud de onda de 265nm (Wright y Cairns, 2000).

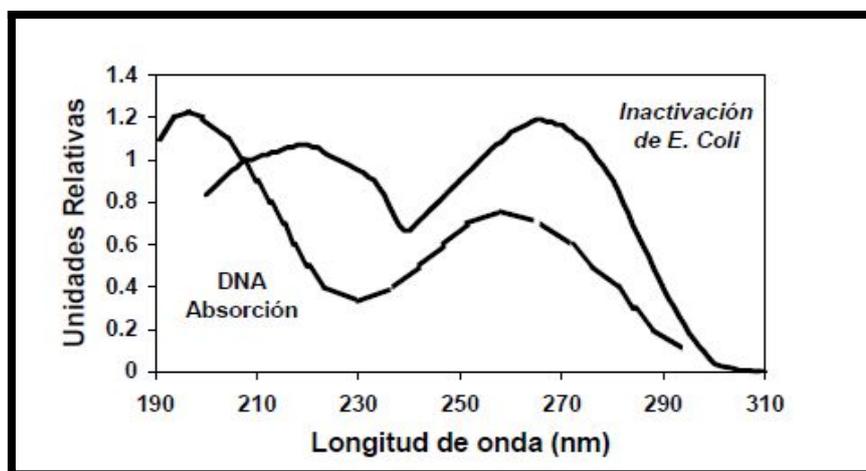


Figura II.7. Espectro de absorción del ácido nucleico y de la inactivación de la *Escherichia coli* (Wright y Cairns, 2000)

#### II.4.1.3. MECANISMOS DE FOTOREPARACIÓN

Muchos microorganismos que tienen un sistema metabólico funcional tienen varios mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos dañados (Jagger, 1967). El mecanismo de reparación que es único a la desinfección UV es el de fotorreactivación. La fotodimerización de timinas adyacentes resultantes de la absorción UV de los ácidos nucleicos puede ser invertida por una enzima fotorreactiva que usa luz entre 300 y 500nm para activar la partición del dímero (Wright y Cairns, 2000). Otras transformaciones inducidas por UV en los ácidos nucleicos incluyendo dímeros que se componen de citosina no pueden ser

reparados excepto por mecanismo de reparación oscuro en el cual segmentos enteros de ácido nucleico son extraídos y el segmento complementario sin dañar es usado como molde para reparar y reemplazar el segmento dañado (Wright & Cairns, 2000). Los virus no tienen mecanismos de reparación para invertir el daño creado por la luz UV. La habilidad de la bacteria para fotorrepararse está relacionada directamente a la extensión del daño UV, la exposición a la luz reactivadora entre 300 y 500nm y al pH y temperatura del agua. Debe ocurrir exposición a luz entre 300 y 500nm dentro de dos a tres horas para que pueda propiciarse el efecto fotorreparador (Grocock, 1984). De acuerdo con ello, el tiempo de residencia dentro de un sistema de tratamiento de agua reducirá el potencial de fotorreparación. En las figuras II.8 a)b)c)d) se puede observar claramente el mecanismo de fotorreparación para *E.coli*, las imágenes fueron obtenidas del Protein Data Bank (DOI:10.4236/abb.2012.33025) y realizada con simulación molecular

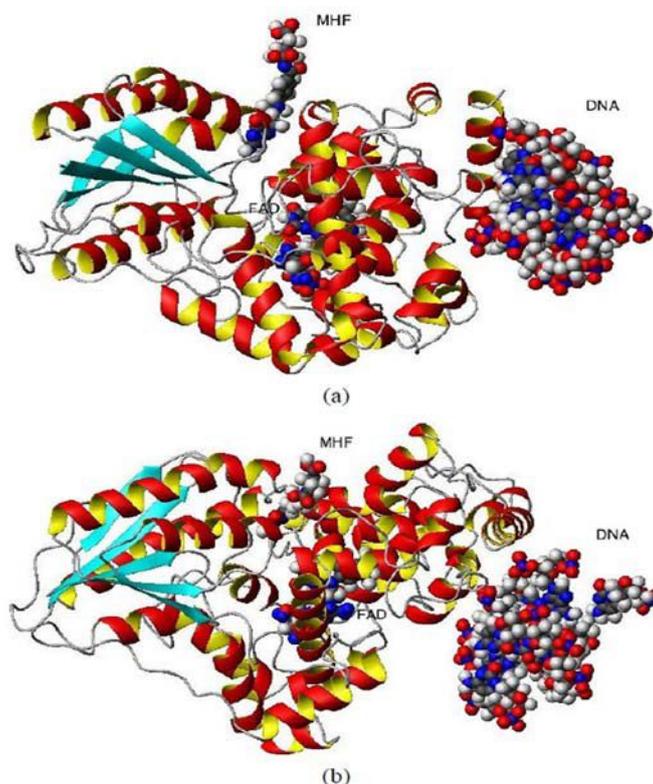


Figura II.8. a) b) Fotorreparación. Estructuras en cinta de una proteína fotoliasa ADN (a) Vista superior; (b) Vista lateral) con dos cofactores y la cadena de ADN. El FADH-(centro; FAD) y MTHF (arriba; MTHF) cofactores y ADN (derecha) se muestran como bolas esféricas.

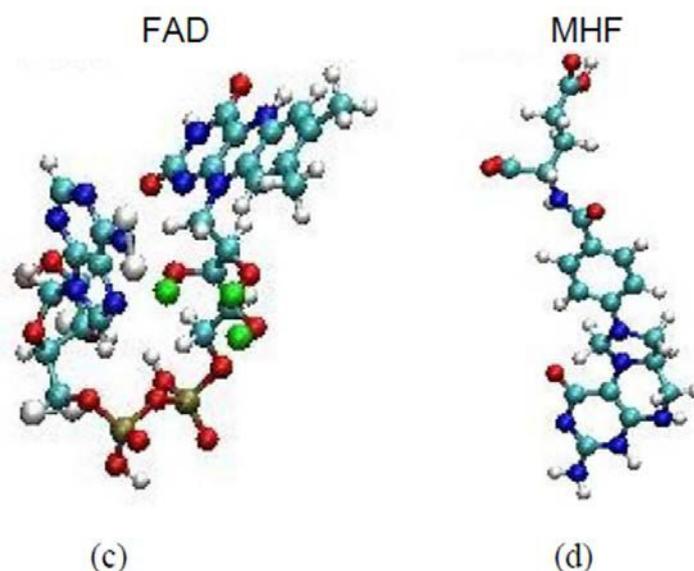


Figura 8 c) y d). Las estructuras de FADH-MTHF y se muestran por separado (c) y (d). *E. coli* fotoliasa se compone de dos dominios bien definidos: un N-terminal (residuos 1-131) y un C-terminal (residuos 204-471), que están conectados entre sí con un bucle de interdominio largo (residuos 132 - 203).

## II.5. PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN

Como se ha señalado, la conciencia sobre la importancia del adecuado manejo de los recursos del agua ha aumentado de manera notable en los últimos años. Debido a ello, los controles en la calidad del agua se han vuelto más estrictos y la investigación en el campo de nuevas tecnologías para la purificación del agua ha crecido considerablemente (Pera Titus et al., 2004). En muchos casos, los métodos convencionales resultan insuficientes para alcanzar el grado de pureza requerido por ley o por el uso posterior del efluente tratado. Dentro de las tecnologías alternativas que se han desarrollado en los últimos 20 años, se encuentran los “Procesos Avanzados de Oxidación” (PAO es común también encontrar la abreviatura AOP “Advanced Oxidation Processes” por sus siglas en inglés), una breve introducción al tema fue presentado en el *Capítulo I. Introducción*.

Los PAO han demostrado ser efectivos en el tratamiento tanto de agua como de suelo y aire contaminados. Estos procesos involucran la generación y el uso de especies oxidantes poderosas y poco selectivas, siendo el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) el principal agente oxidante.

En la Tabla II.3 se muestran los potenciales de oxidación de distintas especies en agua (Litter, 2005).

**Tabla II.3. Potenciales de Oxidación de diversas especies**

ESPECIE	E° (V, 25° C)
Flúor	3,03
Radical hidroxilo	2,80
Oxígeno atómico	2,42
Ozono	2,07
Peróxido de hidrógeno	1,78
Radical perhidroxilo	1,70
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Yodo	0,54

Según se observa en la tabla, luego del flúor, el radical hidroxilo es el oxidante más energético. Cabe mencionar además que la mayoría de los contaminantes ambientales reacciona con el  $\cdot\text{OH}$  entre  $10^6$ – $10^{12}$  veces más rápido que con un oxidante convencional como el  $\text{O}_3$ .

Según el mecanismo de generación del radical hidroxilo, los PAO pueden clasificarse en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos, de acuerdo a si se usa o no radiación UV, tal como se muestra en la Tabla II.4

**Tabla II.4. Clasificación de Procesos Avanzados de Oxidación**

PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	PROCESOS FOTOQUÍMICOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ozonización</li> <li>✓ Ozonización con <math>H_2O_2/O_3</math></li> <li>✓ Procesos Fenton (<math>Fe^{2+}/H_2O_2</math>) y relacionados</li> <li>✓ Oxidación electroquímica</li> <li>✓ Radiolisis y tratamiento con haces de electrones</li> <li>✓ Plasma no térmico</li> <li>✓ Descarga electrohidráulica y ultrasonidos</li> <li>✓ Oxidación en agua sub y supercrítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ultravioleta de vacío</li> <li>✓ UV/<math>H_2O_2</math></li> <li>✓ UV/<math>O_3</math></li> <li>✓ Foto - Fenton y relacionadas</li> <li>✓ Fotocatálisis heterogénea</li> <li>✓ Con semiconductores.</li> <li>✓ Con sensibilizadores orgánicos o complejos de metales de transición</li> </ul>

Los PAO presentan numerosas ventajas sobre los métodos convencionales para el tratamiento de aguas contaminadas. Dentro de ellas, podemos citar las siguientes:

- ✓ logran la mineralización completa de la mayoría de los contaminantes orgánicos, o su transformación en compuestos inocuos;
- ✓ no generan residuos peligrosos que requieran tratamiento posterior, como la ósmosis inversa o la adsorción con carbón activado
- ✓ no producen subproductos tóxicos disueltos como en el caso de la desinfección con cloro;
- ✓ como procesos de post-tratamiento, pueden disminuir la concentración de compuestos indeseables generados por otros métodos de purificación;

✓ como procesos de pre-tratamiento, permiten incrementar la biodegradabilidad de contaminantes refractarios inicialmente al tratamiento biológico.

Debe señalarse que los PAO, a pesar de mostrar altas eficiencias en la degradación de sustancias orgánicas, sólo resultan adecuados para tratar volúmenes pequeños o medios y muestras con bajas concentraciones de contaminantes. De lo contrario, los costos de su aplicación resultarían extremadamente elevados.

La combinación de los agentes oxidantes + radiación UV estudiados en esta tesis doctoral se desarrollaran en los siguientes capítulos.

Los procesos fotoquímicos, que emplean radiación UV (o visible, en el caso de la fotosensibilización) para generar las especies reactivas, presentan una velocidad de reacción apreciablemente mayor que la misma tecnología en ausencia de radiación. Esta característica permite ahorrar energía y reactivos, y construir sistemas de tratamiento más compactos. Además, la posibilidad de la utilización de radiación solar como fuente primaria de energía (si bien la radiación UV representa sólo un 3–5 % del espectro solar), otorga a estos procesos un significativo valor medioambiental y económico.

### **II.5.1. FOTO-OXIDACIÓN.**

La luz promueve reacciones de oxidación iniciadas por la presencia de radicales libres. Para que estos procesos se lleven a cabo es necesaria la presencia de agentes oxidantes, los que permiten la formación de dichos radicales, de los cuales los más reconocidos y utilizados son el peróxido de hidrógeno, el ozono, etc. Entre los distintos procesos de aplicación para el tratamiento de aguas, la combinación de radiación ultravioleta y el peróxido de hidrógeno es muy interesante cuando se desea un agua con un alto grado de pureza. Este PAO implica la formación de radicales hidroxilo. Como se mencionó anteriormente, el peróxido de hidrógeno es un potente agente oxidante no selectivo y una excelente fuente de radicales libres; es además un

aditivo deseable ecológicamente ya que durante su descomposición únicamente se genera agua y/o oxígeno. Desde finales de los años sesenta muchos autores han demostrado el éxito de la fotooxidación con peróxido de hidrógeno. El éxito del proceso radica en la formación estequiométrica de radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) a partir de la descomposición fotocatalítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El mecanismo más normalmente aceptado para la fotólisis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la ruptura del enlace O-O por la acción de la luz ultravioleta.



El rendimiento cuántico de este proceso es muy elevado, formándose como máximo dos radicales hidroxilo, e invariable con la longitud de onda aplicada. Al igual que en la fotólisis, a partir de los ( $\text{OH}^\bullet$ ) se forman los radicales C-centrados que en presencia de oxígeno forman radicales peroxilo intermedios, claves en las reacciones de oxidación y la completa mineralización de los compuestos. Los radicales reaccionan con la materia orgánica según las reacciones de abstracción del hidrógeno (reacción 15), adición (reacción 16) y por las reacciones de transferencia de electrones (reacción 17).



Si bien en los últimos años se le ha dado mucha importancia al estudio de diferentes tipos de PAOs ( $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3/\text{UV}$ ,  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ), el tratamiento de aguas con APA/UV no ha sido ampliamente estudiado. En este trabajo de investigación, se propondrá un mecanismo para explicar como la luz UV produce la ruptura homolítica en la unión O-O de la molécula de APA, con la subsecuente formación del radical hidroxilo (*Capítulo V. Desinfección APA comercial-UV*).

## II.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO.

Para comprender el mecanismo de acción de los diferentes desinfectantes, es importante conocer el “objetivo” del ataque de estos, los microorganismos. En este apartado se estudiarán las características generales de las bacterias Gram negativas y Gram positivas y se analizarán en detalle las características particulares del microorganismo estudiado en esta tesis doctoral: *Escherichia coli*. Además en el *Apéndice IV*, se detallan las características de *Pseudomonas aeruginosa*, otro microorganismo utilizado en los ensayos experimentales.

Una vez estudiados los microorganismos se describirán los mecanismos de acción que exhiben los agentes desinfectantes químicos sobre estos, para ello es necesario antes, conocer los principales sitios de ataque que presentan los microorganismos.

Un biocida debe llegar e interactuar con su(s) sitio(s) objetivo(s) o “target” microbiano para ser eficaz. La penetración de un agente químico dentro de la célula puede ser una condición importante para la mayoría, pero no para todos los biocidas, algunos menos reactivos necesitan penetrar la célula bacteriana y recién dentro de esta comienzan a estar activos, sin causar daños en la membrana externa. La reacción inicial de un biocida con una célula microbiana implica como primer medida, una unión o contacto con la superficie celular, aunque su target pueden encontrarse dentro de la célula. El mecanismo global(es) de la acción de un biocida químico puede ser definido de acuerdo con la estructura bacteriana sobre la cual ejerce su actividad principal. Por lo tanto, tres niveles de interacción pueden describirse:

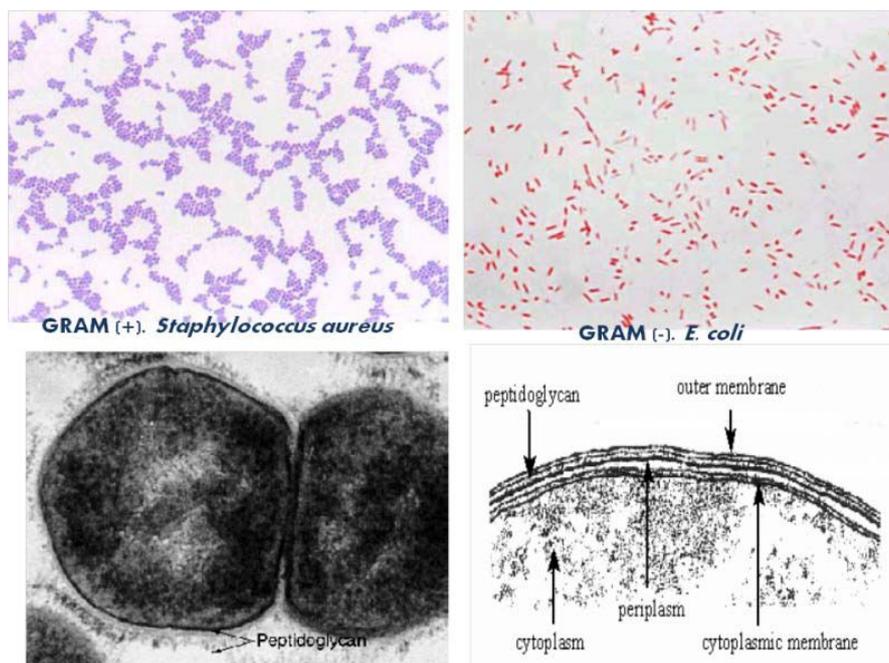
- i. la interacción con componentes celulares exteriores
- ii. interacción con la membrana citoplasmática y
- iii. la interacción con los componentes del citoplasma

Sin embargo, es posible que un biocida actúe en uno o en los tres niveles de interacción ejerciendo su actividad antimicrobiana. Como primera medida se desarrollarán entonces, los sitios targets principales.

### **II.6.1. PARED CELULAR BACTERIANA.**

La pared celular es una estructura crítica para las células bacterianas de modo que la mayoría no puede vivir sin ella. La alta concentración interna de solutos en las células bacterianas en relación con el medio externo desarrolla una considerable presión de turgencia (cercana a 2 atmósferas en *Escherichia coli*). La pared celular bacteriana facilita la resistencia de esta presión evitando una lisis osmótica y además otorga la forma y la rigidez de la célula (si bien existen bacterias que pierden su pared celular y se vuelven amorfas). La pared celular no se visualiza fácilmente en el microscopio óptico, pero se observa con claridad en cortes finos en el microscopio de transmisión electrónica (MET). (Naab, 2005).

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. La distinción inicial entre estos dos tipos se llevó a cabo gracias a un tipo de tinción diferencial denominado tinción de Gram (con esta tinción, las Gram positivas aparecen en color púrpura, mientras que las Gram negativas presentan color rojo), esta tinción es detallada en el “*Capítulo IV Materiales y Métodos*”, existen claras diferencias estructurales que sustentan esta clasificación. Incluso el aspecto de las paredes celulares es muy distinto entre ambos tipos. La pared celular de las Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared de las Gram positivas está formada fundamentalmente por un tipo de molécula y es mucho más ancha (Figura II.9).



**Figura II.9. Diferencias en la pared celular de las bacterias Gram (+) y Gram (-)**

En más detalle, se considera a la membrana externa como un esqueleto macromolecular rígido, llamado peptidoglucano (= mucopéptido o mureína), que en Gram-positivas se encuentra inmerso en una matriz aniónica de polímeros azucarados; y en Gram-negativas está rodeada por una membrana externa, e inmersa en un espacio periplásmico.

En las bacterias Gram-positivas el peptidoglucano representa el componente mayoritario de la pared celular (50-80% en peso), mientras que en Gram-negativas supone sólo del 1 al 10%. Como el peptidoglucano es el componente común y más complejo de ambos tipos de bacteria, será desarrollado en detalle. El peptidoglucano está formado por repeticiones de una unidad disacárida fundamental unida a su vez a un tetrapéptido. Distintas cadenas (formadas por el esqueleto de azúcares) se unen entre sí por determinados enlaces peptídicos entre tetrapéptidos de cadenas diferentes.

La unidad disacárida repetitiva: consiste en N-acetilglucosamina (NAG) unida por enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  a N-acetilmurámico (NAM). Se debe observar que el NAM es el 3-O-D-lactil-éter de la NAG (o sea, se deriva de unir el ácido D-láctico con el OH del C-3 de la NAG). Las distintas unidades disacáridas se van uniendo

entre sí por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  entre el NAM de una unidad y la NAG de la siguiente. Este enlace es susceptible a la rotura catalizada por el enzima lisozima. El número de repeticiones (n) puede oscilar entre 10 y 100 (Figura II.10).

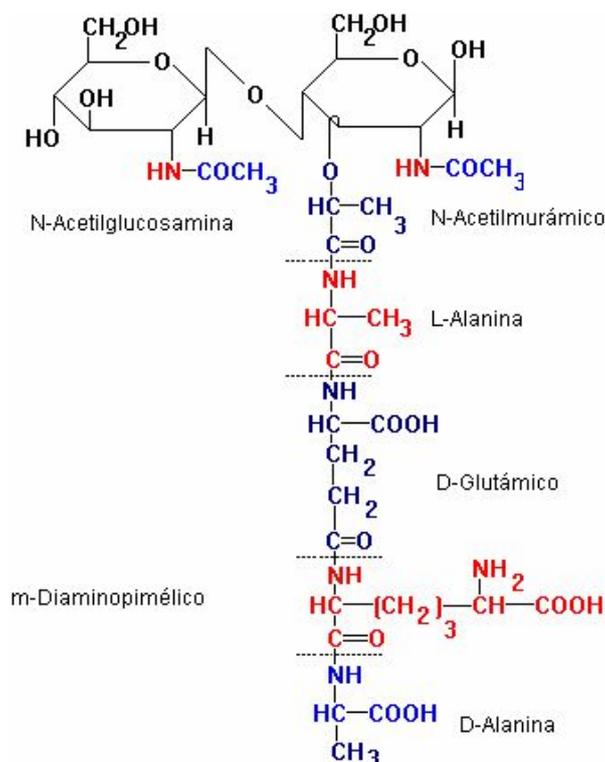


Figura II.10 Unión de la N-acetilglucosamina con el N-acetilmurámico

Desde el grupo carboxilo de cada ácido NAM, y mediante un enlace amida, se encuentra unido el tetrapéptido. Un tetrapéptido típico de muchas bacterias es: *L-alanina-glutámico-meso-diaminopimélic-D-alanina*.

Los resultados de la difracción de rayos X parecen indicar que las unidades disacáridas de las cadenas están giradas unas respecto de otras, formando una estructura helicoidal, como resultado de esto los péptidos se desplazan alternativamente: hacia arriba, a la izquierda, hacia abajo, a la derecha, y así sucesivamente. Esta organización permite que una cadena de peptidoglucano, PG, se pueda unir con cadenas cercanas de su mismo nivel, así como con cadenas por encima y por debajo de su nivel, formando un perfecto entramado tridimensional (característico de las Gram-positivas).

La orientación de las cadenas azucaradas en relación con la superficie celular está aun en debate, se ha sugerido que se disponen casi paralelas a la superficie celular, con una tendencia a adquirir forma de espiral por encima de la membrana citoplasmática. Los grupos tetrapéptidos salen perpendicularmente de los NAM, en sentido vertical hacia la membrana. Sin embargo, cuando dos tetrapéptidos de un nivel se unen entre sí, forman un puente casi horizontal, formando ángulos de unos  $90^\circ$  respecto de los esqueletos carbonados, y siguiendo el eje longitudinal de la célula.

Esta estructura confiere una serie de importantes propiedades:

- 1) Gran rigidez, que contrarresta las fuerzas osmóticas a las que está sometido el protoplasto (soporta presiones de unas 5 a 15 atmósferas). Esta rigidez depende de:
  - i. el grado de entrecruzamiento;
  - ii. el hecho de que el enlace  $\beta(1 \rightarrow 4)$  es muy compacto. La alternancia regular entre anillos piranósicos de NAG y de NAM genera uno de los polisacáridos más estables desde el punto de vista termodinámico, que recuerda en su forma a la quitina y a la celulosa;
  - iii. la alternancia de aminoácidos, en configuraciones D y L en el tetrapéptido, esto supone un factor adicional que confiere aún más fuerza estructural, y además permite que todas las cadenas laterales de estos aminoácidos se dispongan hacia el mismo lado, facilitando la formación de puentes de H.
- 2) La estructura permite una notable flexibilidad, esto colabora, junto con su rigidez, a soportar variaciones amplias de la tensión osmótica del protoplasto.
- 3) Condiciona la forma celular. Aunque la química del PG, por sí misma, no determina la forma, es su disposición espacial la responsable principal de esta forma.

Un resumen comparativo de las paredes bacterias Gram (+) y Gram (-) puede representarse según la tabla II.4

**Tabla II.5 Comparación pared Gram(+)-Gram(-)**

PARED GRAM NEGATIVAS	PARED GRAM POSITIVAS
<b>Membrana externa</b>	Peptidoglucano
<b>Lipoproteínas</b>	Matriz (polímeros) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos teicoicos</li> <li>• Ácidos teicurónicos</li> <li>• Ácidos lipoteicocios</li> </ul>
<b>Espacio periplasmático</b>	Proteínas asociadas a membrana
<b>Peptidoglucano</b>	
<b>Membrana interna</b>	

Los ácidos teicoicos de la pared Gram negativa:

- ✓ Presentes en muchas bacterias Gram+, pero no en todas.
- ✓ Son polímeros de glicerol-fosfato o ribitol-fosfato
- ✓ Pueden ser de hasta 30 unidades.
- ✓ Están unidos covalentemente al peptidoglucano
- ✓ Es variable según las especies
- ✓ No se sintetizan en limitación de fosfato.

Los Ácidos Lipoteicoicos de la pared Gram negativa

- ✓ Presentes en todas las bacterias Gram +
- ✓ Aun en condiciones de carencia de fosfato
- ✓ Variación de los Ac. Teicóicos (ácidos glicerol-teicoicos)
- ✓ Se encuentran unidos a la membrana citoplásmica.\*

- ✓ Su extremo terminal queda expuesto al exterior
- ✓ Suministran especificidad antigénica

Las lipopolisacáridos en la pared Gram (+)

- ✓ Papel estructural: Le da menor fluidez y mayor resistencia física (Lípido A)
- ✓ Poco permeable a muchas moléculas hidrofóbicas incluyendo antibióticos.
- ✓ Se une a cationes divalentes (como  $Mg^{+2}$  o  $Zn^{+2}$ )
- ✓ Endotoxina de las bacterias Gram-negativas (Lípido A) - productor de síntomas
- ✓ Efectos beneficiosos: Estimula algunos mecanismos defensivos del hospedador.
- ✓ Antígeno somático O: Especificidad y virulencia

En la figura (II.11 a) y (II.11.b) se pueden visualizar las diferencias estructurales entre ambas paredes bacterianas.

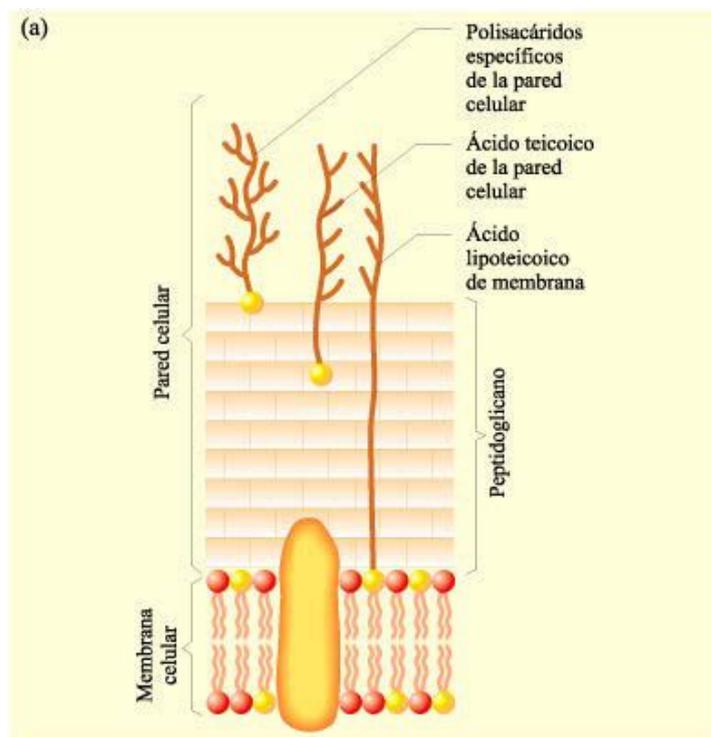


Figura II. 11.a) Pared GRAM positiva

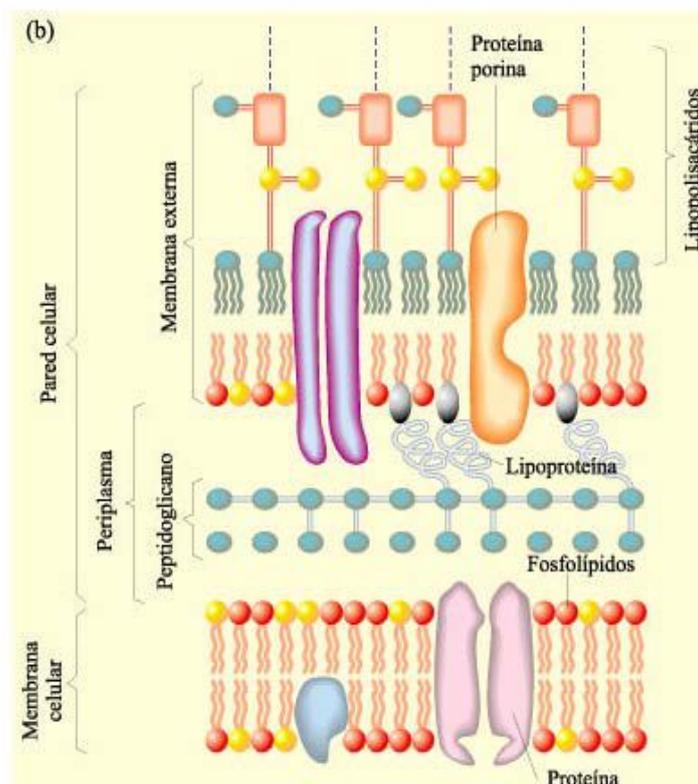


Figura II.11.b) Pared GRAM negativa

## II.6.2 CITOPLASMA

El citoplasma celular está limitado por la membrana citoplasmática, y en él se encuentran las inclusiones celulares. En un principio considerado una "solución" homogénea de proteínas, los métodos de fraccionamiento acoplados a los estudios bioquímicos y de microscopía electrónica mostraron la complejidad del sistema. En realidad está atravesado por numerosas membranas que lo compartimentalizan, si bien esta compartimentalización no es tan desarrollada como en eucariotas.

Si se homogeneizan células bacterianas y luego se las centrifuga a 100.000 g se separa en el fondo del tubo de centrifuga una fracción "particulada" que contiene los ribosomas y las membranas con los ácidos nucleicos, y una fracción "soluble" que contiene proteínas, y los ácidos ribonucleicos solubles ( tARN y mARN).

Los ribosomas son las estructuras celulares donde se sintetizan las proteínas. Se encuentran en el citoplasma bacteriano y al microscopio electrónico se presentan como partículas de unos 16 x 18 nm. Un ribosomas de *E. coli* es una ribonucleoproteína con una masa de 2700 kd, un diámetro aproximado de 200 Å. Los 20,000 ribosomas de una célula bacteriana constituyen cerca de una cuarta parte de todo su volumen. Los ribosomas no disociados tienen una velocidad de sedimentación en una ultra centrifuga de 70 S. Los ribosomas pueden disociarse en una subunidad grande (50S) y una subunidad pequeña (30S) que unidas forman el ribosoma 70 S.

## II.7. MICROORGANISMO MODELO ESTUDIADO: *Escherichia coli*.

### II.7.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La definición de *Escherichia coli* de acuerdo al Manual Bergey de bacteriología sistemática es: bacteria Gram negativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. (Figura II.12)

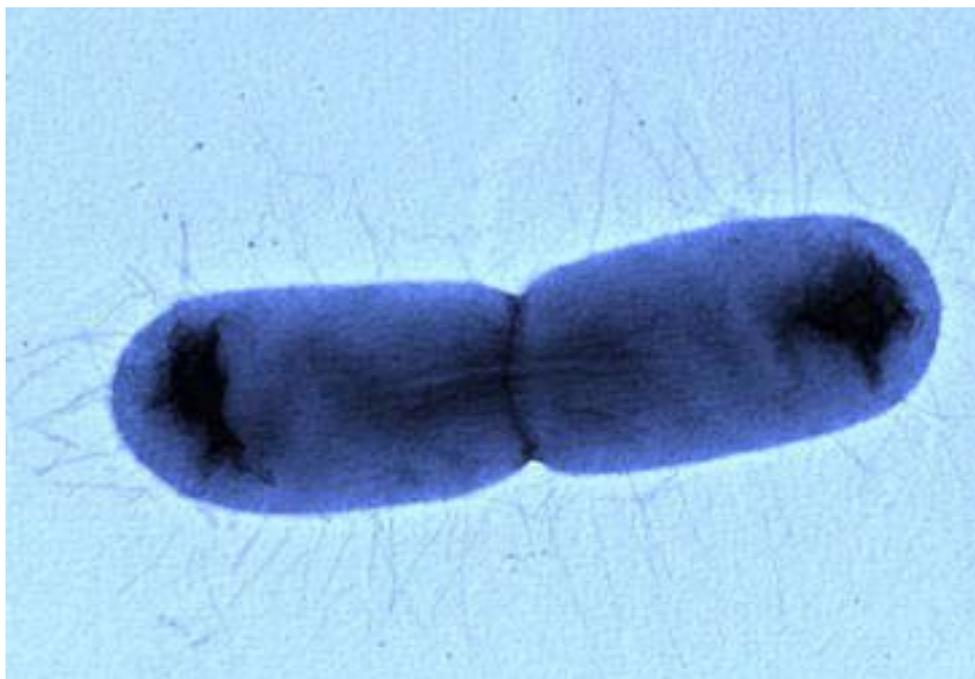


Figura II.12. Imagen de *Escherichia coli* (Intitud Recerca Biomedica-Barcelona)

Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y  $\beta$ -galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito. *E. coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999. Esta está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las *Enterobacterias* en patología humana puede cuantificarse constatando que

constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados.

*E. coli* es la especie tipo del género *Escherichia*. Produce reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H<sub>2</sub>S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación.

El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. La especie tipo es *E. coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *E. hermanni*, y *E. vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional (Blanco et al., 2002), las imágenes se pueden observar en la figura II.13

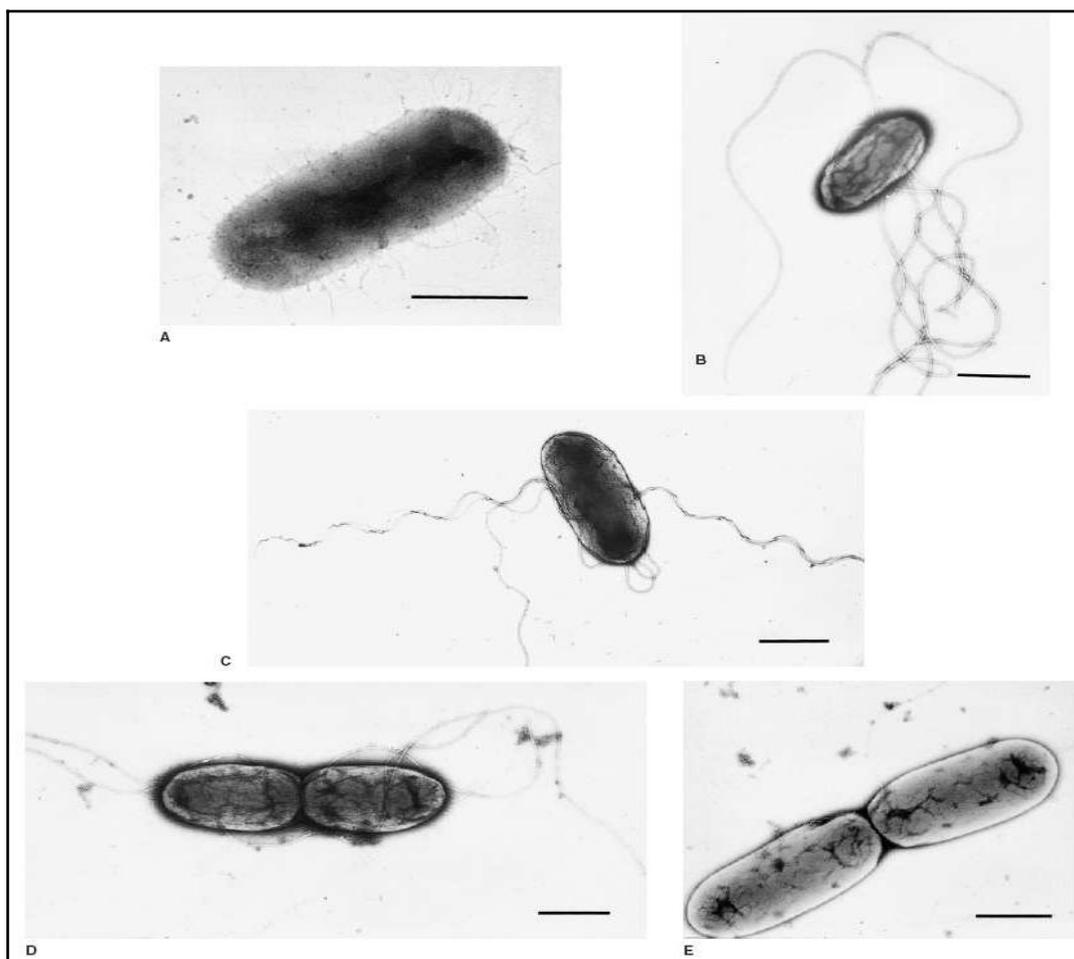


Figura II.13. Fotomicrografías electrónicas de *E. blattae* (A), *E. coli* (B), *E. fergusonii* (C), *E. Herman* (D) y *E. vulneris* (E). Barra = 1  $\mu\text{m}$ . (Scheutz y Strockbine, 2005).

El estudio de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación entre las especies. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen *E. coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz y Strockbine, 2005), estas reacciones fueron desarrolladas en *Capítulo IV. Materiales y Métodos*.

#### II.7.1.2. HÁBITAT

*E. coli* es la especie predominante de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las

heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico (Todar, 2008; Blanco et al., 2002). Algunos anaerobios como *Bacteroides spp.* son, al menos, veinte veces más abundantes que *E. coli* en el intestino grueso. Sin embargo por su presencia regular en el intestino y en las heces, *E. coli* es utilizada como indicador de contaminación fecal. Se puede encontrar en el ambiente ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Todar, 2008, Blanco et al., 2002)

El intestino humano es colonizado por *E. coli* en las primeras 40 horas tras el nacimiento, siendo la bacteria ingerida en agua y alimentos u obtenida directamente de otros individuos en contacto con el recién-nacido. La bacteria se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida una misma cepa puede persistir indefinidamente, aunque constituya solo aproximadamente el 0,1% de la población total (Todar, 2008; Prescott, 2002).

### **II.7.1.3. PODER PATOGENICO DE LA *Escherichia coli***

*E. coli* es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales (Johnson, 2002a). La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos (Todar, 2008). No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo.

Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos (Blanco et al., 2002). Por lo general las cepas de *E. coli* patógenas utilizan múltiples mecanismos de manera similar a las otras bacterias que infectan mucosas, con las etapas de adhesión y colonización de la mucosa, evasión de los mecanismos de defensa, multiplicación y daño tisular (Kaper et al., 2004). El tipo de interacción resultante entre microorganismo y hospedador, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales avirulentos, como patógenos oportunistas o altamente especializados, que a su vez son frecuentemente clasificados en patotipos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y por su conjunto de factores de virulencia (Sousa, 2006). Se han descrito un gran número de patotipos de *E. coli*. La similitud de los nombres dados a los diferentes tipos, las inconsistencias en el uso de una única nomenclatura en la literatura, el avance en los conocimientos de la patogénesis y la emergencia de nuevos patotipos han contribuido a la complejidad de la nomenclatura de estas cepas.

Caracterizado el microorganismo en estudio, es importante ahora conocer como actúan los agentes desinfectantes.

## **II.8. MECANISMOS DE LOS AGENTES DESINFECTANTES**

En este apartado, se detallan los mecanismos de los biocidas ante los diferentes microorganismos, resistencia, destacándose los agentes biocidas utilizadas en los ensayos experimentales: Ácido peracético, Peróxido de Hidrógeno y Ácido Acético.

### **II.8.1. BIOCIDAS**

Los biocidas provienen de una amplia gama de químicos diferentes, también pueden ser agentes físicos (radiación UV, temperatura), el mecanismo de acción del biocida refleja esta gran diversidad, aunque el daño

final que causan en el microorganismo muestra una considerable similitud para cada uno.

Muchos de los productos biocidas utilizados hoy en día ya eran conocidos por griegos y romanos, mientras que otros fueron introducidos durante la Edad Media. Sin embargo, el auge de estos productos se produjo durante el siglo XIX y primeros años del XX, por el desarrollo de la cirugía, el interés médico y social en reducir el elevado número de infecciones hospitalarias, mejorar la curación de las heridas, el conocimiento científico sobre los microorganismos y su relación con ciertas enfermedades. No obstante, la revolución terapéutica que acompañó la introducción de los antibióticos en medicina hizo que los biocidas fueran olvidados y permanecieran en la sombra, pero la aparición en las últimas décadas de bacterias resistentes a los antibióticos, la emergencia de patologías fúngicas y víricas nuevas y para las que existían limitaciones terapéuticas hizo imponer y actualizar los métodos preventivos para reducir el riesgo de adquisición de las infecciones.

Con ello los antisépticos y desinfectantes volvieron a adquirir importancia, no solo en medicina, sino también en otros campos como el veterinario, el industrial y en la conservación de los alimentos.

Aunque los antisépticos y desinfectantes empezaron a ensayarse *in vitro* desde los albores de la Microbiología, los procedimientos para su evaluación no están tan bien definidos como las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana de los antibióticos.

Originalmente, los ensayos se dirigieron al estudio de la cinética de la desinfección, determinándose si los microorganismos eran destruidos por una determinada concentración de desinfectante en un determinado tiempo de contacto. Estudios reseñables en los inicios de los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana de los biocidas fueron los realizados por Bucholtz en 1875, para determinar la CMI del fenol para inhibir el crecimiento de las bacterias; también por Robert Koch, que hizo mediciones del poder inhibitorio del cloruro de mercurio frente a las esporas de *Clostridium anthracis*, y por Geppert en 1889, que utilizó el sulfato amónico como neutralizante del cloruro

de mercurio con resultados más realistas que los obtenidos con anterioridad por Koch.

### **II.8.2. REQUISITOS DE LOS BIOCIDAS**

No todas las propiedades que debería poseer idealmente un biocida las cumplen todos los productos o procesos; además éstas pueden variar dependiendo del uso específico del biocida dispositivos médicos, superficies medioambientales y piel. Preferentemente, los biocidas deben poseer un amplio espectro de actividad microbiológica, deben ser bactericidas frente a todas las bacterias vegetativas no esporuladas, incluyendo micobacterias. Actualmente, existe un mayor conocimiento sobre la adquisición de infecciones nosocomiales de origen vírico, por lo que se recomienda incluir a los virus en el espectro de actividad de los biocidas de uso más común. Los desinfectantes utilizados en superficies tanto inanimadas como sobre la piel deben poseer una acción microbiocida rápida, al producirse un descenso de actividad bactericida cuando se seca la superficie. Por otro lado, los desinfectantes no deberían ser inactivados por la materia orgánica presente habitualmente en los dispositivos médicos y superficies medioambientales, y por los jabones y el agua corriente empleados durante el proceso de desinfección.

Existen otras características de operatividad y seguridad no menos importantes, y que deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar los biocidas. Los efectos tóxicos deben ser mínimos para asegurar la protección de la salud. Sin embargo, muchos de los desinfectantes utilizados hoy en día de forma rutinaria para la desinfección medioambiental y de dispositivos médicos son tóxicos y corrosivos, lo que exige unas condiciones de almacenamiento y uso cuidadosas. En el caso de los antisépticos, éstos no deben dañar la piel por lo que se pueden incorporar aditivos que lo eviten.

Los biocidas pueden ser clasificados según su utilización de acuerdo a la tabla II.6

**Tabla II.6. Clasificación de los biocidas según su utilización:**

ANTISEPTICOS	DESINFECTANTES	CONSERVANTES
Compuestos fenólicos: hexaclorobenceno	Compuestos fenólicos	Compuestos fenólicos: parabenos
QACs	QACs	QACs
Clorados	Clorados: dióxido de cloro, hipoclorito de sodio y de calcio	
Compuestos yodados		
Alcoholes (etanol, isoproponol)		
Metales: mercuriales, plata, cobre	Metales: mercuriales	
Aldehidos: taurolidina, noxitiolina	Aldehidos: formaldehido y grutaraldehido	
Ácido bórico		
Oxidantes: peróxido de hidrogeno	Oxidantes: ozono, peróxido de hidrogeno, ácido peracético	Ácidos orgánicos débiles: ácido acético, ácido cítrico
Tensioactivos anionicos	Compuestos anfóteros	

### **II.8.2.1. NIVELES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Como ya se mencionó en el *Capítulo I*, la desinfección es un proceso que reduce el nivel de microorganismos contaminantes y la materia orgánica, pero

no elimina todos los microorganismos presentes. Spaulding destacó la importancia de la desinfección y propuso tres niveles o grados de desinfección<sup>10</sup>. Estos niveles propuestos (alto, intermedio y bajo) se basan en el hecho de que los microorganismos pueden clasificarse en grupos de acuerdo a su resistencia intrínseca a los desinfectantes químicos. Estos grupos se pueden observar en orden decreciente de resistencia en la figura II.14



Figura II. 14. agentes causales de enfermedades infecciosas en orden decreciente de resistencia a los desinfectantes

**La desinfección de alto nivel destruye** las formas bacterianas vegetativas, los hongos, las micobacterias y los virus, sobreviviendo algunas endosporas bacterianas. Esta menor actividad esporicida es el aspecto que diferencia a la desinfección de alto nivel de la esterilización química. Algunos desinfectantes de alto nivel pueden destruir un elevado número de esporas bacterianas a elevadas concentraciones y un tiempo de exposición prolongado, convirtiéndose así en esterilizantes químicos. Varios productos biocidas se han

clasificado en esta categoría, entre ellos se incluyen: el glutaraldehído alcalino al 2% y y varias presentaciones de ácido peracético

**Los desinfectantes de nivel intermedio** provocan la destrucción de las formas bacterianas vegetativas, los virus lipídicos y los hongos, pero pueden sobrevivir los virus no lipídicos y las micobacterias, así como las esporas bacterianas. Ejemplos de desinfectantes de nivel intermedio son los alcoholes (70-90%), los compuestos clorados y los fenólicos en distintas formulaciones y concentraciones.

**La desinfección de bajo nivel** elimina las formas bacterianas vegetativas y los virus lipídicos, pero no eliminan, en tiempos prácticos de uso, todas las formas fúngicas, las micobacterias, los virus no lipídicos y las esporas bacterianas. Un ejemplo de desinfectante de bajo nivel lo constituyen los derivados de amonio cuaternario (QACs).

### **II.8.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BIOCIDAS:**

La actividad de un agente antimicrobiano (biocida) frente a una bacteria depende primeramente de su capacidad para atravesar la pared bacteriana, paso necesario para acceder a su punto de acción "target". Dicha capacidad está en relación con su naturaleza fisicoquímica y con la estructura de la barrera que ha de franquear. El enfoque clásico para dilucidar el mecanismo de acción de los biocidas reside en establecer una correlación entre los efectos bacteriostáticos o bactericidas y aquellos que producen cambios fisiológicos o bioquímicos.

La comprensión del mecanismo (s) de acción de un biocida se ha convertido en un problema de interés actual, debido a la aparición de bacterias resistentes a estos y a las pruebas emergentes de que la resistencia a los antibióticos en bacterias podría estar vinculada con la resistencia a estos agentes desinfectantes.

La eficacia antimicrobiana de las formulaciones biocidas utilizadas para una amplia gama de aplicaciones (hogar, sanidad e industria) ha sido bien documentada por Hugo y Russell (1999). Sin embargo, los mecanismos de acción de los biocidas sólo se han estudiado hace relativamente poco tiempo y la

cantidad de información disponible es limitada, aunque creciente. El entendimiento de los mecanismos de acción de los biocidas, junto con los factores que influyen en su actividad, se ha convertido en una cuestión clave para un mejor uso de las formulaciones y el control de la aparición de microorganismos resistentes a estos.

El mecanismo general (s) de la acción de un biocida puede ser definido de acuerdo con la estructura bacteriana contra la cual ejerce su actividad principal. Por lo tanto, tres niveles de interacción, ya han sido mencionados a lo largo de este capítulo, pero es importante recordarlo: (i) la interacción con los componentes celulares exteriores (superficie de la célula); (ii) interacción con la membrana citoplasmática y (iii) la interacción con componentes citoplasmáticos. Sin embargo, es posible que un biocida actúe en uno o en los tres niveles de interacción con las células bacterianas para producir su actividad antimicrobiana.

El daño puede manifestarse de la siguiente manera:

- ✓ Disrupción de la fuerza protónica (fuerza protón-motriz) transmembrana, que conduce a la fosforilación oxidativa y al transporte activo.
- ✓ Inhibición de la respiración y de las reacciones catabólicas y anabólicas.
- ✓ Disrupción de la replicación.
- ✓ Pérdida de la integridad de la membrana, resultado en la ruptura de constituyentes esenciales extracelulares como pentosas, ácidos nucleicos y proteínas.
- ✓ Lisis.
- ✓ Coagulación del material extracelular.

Estas lesiones, que se pueden producir en paralelo, representan el daño que va desde efectos bacteriostáticos aumentando hasta bactericidas. Los daños progresivos que comienzan con una lesión, si son mantenidos por suficiente

tiempo, o si la concentración aplicada es suficientemente alta, el daño puede culminar en la muerte de la célula bacteriana.

La acción de los biocidas es distinta según el tipo de microorganismo, debido a sus distintas características, tanto en composición química como en estructura, fisiología, replicación y metabolismo. Típicamente, los biocidas actúan sobre múltiples puntos o dianas; al afectar a diversos componentes es muy difícil distinguir entre los efectos primarios y secundarios que provocan y que contribuyen a la muerte o destrucción de los microorganismos.

Muchos productos biocidas interaccionan con la superficie celular y una vez en el interior del microorganismo pueden dañar uno o más componentes celulares. Por ejemplo, la clorhexidina y los QACs actúan sobre la membrana citoplasmática de los cocos gram-positivos, bacterias gram-negativas y levaduras. Los fenoles ejercen su acción sobre la membrana de las bacterias vegetativas y de los hongos, pero también coagulan los componentes citoplasmáticos. Otras dianas intracelulares de los biocidas son las proteínas y los ácidos nucleicos. El glutaraldehído y el formaldehído actúan sobre las proteínas, el DNA y el RNA bacteriano.

En la tabla II.7 se detalla el mecanismo de acción de los agentes biocidas utilizados en los ensayos experimentales de este trabajo de investigación:

Tabla II.7. Mecanismos de Acción de la Solución comercial de Acido Peracético.

MECANISMO DE INTERACCIÓN	BIOCIDA	TARGET TÍPICO	REFERENCIA
Reacción química: oxidación con radicales libres	PAA HP	Enzimas y proteínas con grupos tiol (SH)	Denyer (1998)
Interacción física: penetración/partición en la bicapa fosfolipídica	Ácidos orgánicos débiles: AA	Membrana. Gradiente de pH transmembrana	Hugo 1999
Disipación de la fuerza proton-motriz, desacoplamiento de la oxidación fosforilativa	Ácidos orgánicos débiles: AA	Membrana externa	Freese et al (1973) Sheu et al. 1975)
Inhibición del transporte activo	Ácidos orgánicos débiles: AA	Membrana externa	Freese et al (1973) Sheu et al. 1975)
Aumento de la permeabilidad de la membrana	Ácidos Orgánicos PAA y AA	Membrana citoplasmática	Maillard 2202
Inhibición de las enzimas citoplasmáticas	PAA HP	Citoplasma	Hugo 1992
Interacción con biomoléculas funcionales (ADN-ARN)	PAA HP	Citoplasma	Hugo 1992
Actividad autocida inducida	Hp PAA	Célula bacteriana	Maillard 2002

#### II.8.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes es un problema de salud pública, que se creía superado.

La resistencia bacteriana a los biocidas fue descrita en las décadas de 1950 y 1960 y ha ido en aumento. Ciertos biocidas como alcoholes,

formaldehídos, biguanidas, yodoforos, aldehídos y agentes catiónicos como los compuestos de amonio cuaternario, la clorhexidina y el triclosán se han comprometido como posibles causantes de la selección y persistencia de cepas bacterianas con bajo nivel de resistencia a los antibióticos (Cabrera *et,al*, 2007).

En la actualidad se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, cassettes de ADN transmisibles). Los genes de resistencia naturales en plásmidos, se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias.

La resistencia intrínseca se ha demostrado para bacterias Gram negativas, esporas bacterianas, micobacterias y bajo ciertas condiciones en especies del género *Staphylococcus*. (Cabrera *et,al*, 2007).

Las bacterias Gram negativas por lo general son más resistentes a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas. La membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos sin relación química. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Además de las vías antes descritas se ha propuesto una tercera vía para agentes catiónicos como los Compuestos de amonio cuaternario, biguanidas y diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación. Un ejemplo claro de resistencia mediada por la membrana externa es el de *P. aeruginosa* que presenta diferencias en la composición del lipopolisacárido (LPS) y el contenido de cationes como el magnesio, que produce enlaces estables entre moléculas de LPS y como complemento a este mecanismo, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias. Algunas cepas que son muy resistentes a

clorhexidina, CAC, EDTA y diamidinas se han aislado de muestras clínicas. La presencia de un LPS menos ácido en la membrana externa puede ser un factor que contribuye a la resistencia intrínseca. (Cabrera *et,al*, 2007).

La presencia de lípidos en la membrana externa de los bacilos Gram negativos se relaciona con el hecho de que estas bacterias son mucho más resistentes que los Gram positivos a los agentes antibacterianos, incluyendo los desinfectantes. En los estafilococos, por ejemplo, los lípidos están presentes en pequeñas cantidades; si se incrementa (por ejemplo haciéndoles crecer en presencia de glicerol), los microorganismos se vuelven más resistentes a ciertos fenoles y penicilinas. En las micobacterias, el contenido en lípidos se asocia con su gran resistencia a los desinfectantes. Se han llevado a cabo estudios con mutantes rugosos, defectivos en la región interna del núcleo, que resulta sensibles a una amplia variedad de desinfectantes y detergentes, relacionándose lo uno con lo otro. Se ha visto también, que la reorganización de los fosfolípidos de la membrana externa puede permitir la penetración de moléculas hidrofóbicas por disolución y difusión en los lípidos. (Camargo, Torres, 2003).

La superficie de los Gram negativos lisos es hidrofílica; en el caso de los mutantes rugosos, sin embargo, tienden a ser mucho más hidrofóbica. En las cepas salvajes, las moléculas del LPS intactos se oponen al acceso rápido de los biocidas hidrofóbicos o de los antibióticos, al interior de la célula probablemente mediante un sistema de blindaje protector conferido por los fosfolípidos, muchos de los cuales no están presentes en la estructura de la membrana clásica. En el caso de los bactericidas cationicos, como es el caso de las biguanidas y los derivados de amonio cuaternario, ambos interactúan con fosfolípidos y LPS, produciendo daño en la membrana celular. (Camargo Torres, 2003).

**ACRÓNIMOS CAPITULO II**

AA	Ácido Acético
APA	Ácido Peracético
HP	Peróxido de Hidrógeno
I	Inactivación
K	Constante cinética
LPS	Lipopolisacáridos
N	Microorganismos (concentración)
NAM	n-acetilmurámico
NAM	n-acetilmurámico
QAC	Derivados de amonios cuaternarios
R	Remoción
UFC	Unidades formadoras de Colonias

**Sufijos**

0	Correspondiente a la condición inicial
---	--

## CAPÍTULO III

# MODELADO DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN



## **CAPITULO III. MODELADO DE PROCESOS DE DESINFECCIÓN.**

### **III.1. REACTORES Y REACCIONES FOTOQUÍMICAS**

#### **III.1.1. REACCIONES FOTOQUÍMICAS**

Una reacción fotoquímica es un proceso iniciado por la absorción de una determinada energía radiante por una molécula. Gracias a la absorción de radiación la molécula excitada puede transformarse en uno o más pasos en un producto o puede convertirse en un intermediario altamente reactivo que puede participar en reacciones subsiguientes de naturaleza térmica como sucede, por ejemplo, en las reacciones en cadena. El primer grupo de reacciones se llama reacciones moleculares y el segundo, reacciones de radicales libres. A veces, la absorción de radiación puede ocurrir en una molécula particular pero los cambios definitivos (en ambos tipos de mecanismos moleculares o de radicales libres) suceden en otras, como es el caso de las reacciones fotosensibilizadas y fotocatalíticas (Cassano et al.,1995).

A pesar de las ventajas mencionadas, las reacciones fotoquímicas no son ampliamente usadas en la práctica industrial. De hecho, se han adoptado cuando:

- (i) ningún proceso alternativo térmico o catalítico está disponible;
- (ii) el proceso fotoquímico a escala industrial puede desarrollarse únicamente con unas pocas dificultades
- (iii) la escala de fabricación es pequeña y muy frecuentemente, dedicada a los productos de alto valor agregado, reduciendo mucho las dificultades de procesamiento y minimizando los efectos de los costos de equipamiento y de operación.

En el pasado, una de las razones usadas para explicar esta situación era la carencia de: (i) el modelo conveniente del reactor y los procedimientos de

diseño y (ii) suficiente información cuantitativa con respecto a los parámetros físicos y químicos pertinentes. Según Cassano et al. (1997) hay otras razones para el uso limitado de fotoprocesos en operaciones de gran escala. Entre ellos podemos contar: (i) limitaciones de tamaño, (ii) dificultades de construcción, (iii) dificultades en el mantenimiento y operación de lámparas, (iv) depósitos en la pared del reactor que afectan la entrada de radiación al reactor y (v) existencia frecuente de inhibidores de reacción. La mayoría de estas dificultades se asocian con la existencia de partes de vidrio o cuarzo en el equipo requerido. Estos factores han mitigado contra el camino de la fotoquímica. Sin embargo, la carencia de métodos de diseño no es más una razón (por lo menos para sistemas homogéneos) como ha sido indicado por Cassano y Alfano (1991).

## **III.2. DISEÑO DE REACTORES FOTOQUÍMICOS**

La comprensión de los procesos que ocurren en un reactor químico de cualquier escala impone la necesidad de utilizar conocimientos de distintas disciplinas. En el análisis del proceso a partir de su etapa inicial, la emisión de energía radiante en forma de fotones por parte de una fuente (la lámpara o el sol, cuando se utiliza un reactor irradiado) hasta una final en la cual una molécula de un dado contaminante deviene en una especie inocua para éste, o se inactiva un microorganismos se aplican conceptos vinculados a la física del estado sólido, la fisicoquímica, la electroquímica, los fenómenos de transporte (Cassano et al., 1997),

Puede ser conveniente revisar cual es el significado del diseño de un fotorreactor; se considera que el diseño de un reactor es un procedimiento completo definido de la manera siguiente (Cassano et al., 2001; Cassano et al., 1995):

Dada algunas especificaciones de producción tales como las concentraciones de entrada y salida (o inicial y final) y las especificaciones sobre la selectividad (si es aplicable), el diseño del reactor resultante debe proveer:

- ✓ Los requerimientos para las materias primas.
- ✓ Las condiciones de operación (sistemas simples o multifase), tipo de operación hidrodinámica (flujo continuo, batch, semibatch, etc.) y reciclos (si es aplicable).
- ✓ La/s temperatura/s y presión/es del/os reactor/es, la carga de catalizador (si es aplicable).
- ✓ Los requerimientos para evitar inhibiciones y explosiones.
- ✓ El número de reactores y la geometría del reactor (forma y dimensiones). La velocidad de circulación en el reactor o el tiempo de reacción.
- ✓ Los requerimientos de mezclado (si son aplicables).
- ✓ La calefacción y/o requerimientos de enfriamiento.
- ✓ Los materiales de construcción de reactor.
- ✓ El control del reactor, rutinas de mantenimiento y requerimientos de seguridad.
- ✓ Cuando se tratan con reacciones fotoquímicas, el diseño también incluye:
- ✓ Las especificaciones de la fuente de radiación (lámpara/s), es decir la potencia de salida, su distribución espectral, sus formas y dimensiones, los requerimientos de operación y de mantenimiento.

- ✓ El arreglo geométrico de las fuentes de radiación con respecto al espacio de reacción.
- ✓ El sistema de entrada de radiación al reactor (la manera, materiales de construcción y procedimientos de limpieza).
- ✓ Las características de los reflector/es si es aplicable (cantidad, arreglo, forma y dimensiones).

Tanto el tamaño de la lámpara como algunas de las especificaciones asociadas al reactor no pueden cambiarse en forma continua, el diseño siempre implica un procedimiento iterativo. Luego se verán peculiaridades de los reactores fotoquímicos originadas por el acoplamiento de los parámetros característicos del transporte de radiación, cantidad de movimiento, energía y materia, hacen estas iteraciones siempre necesarias.

Uno de los métodos más poderosos para diseñar un fotorreactor a escala comercial es el uso de un modelo matemático riguroso sustentado por experimentos de laboratorio analizados apropiadamente llevados a cabo en reactores pequeños.

Las etapas del modelado de un reactor pueden presentarse siguiendo una secuencia lógica típica de los reactores químicos, pero describiendo ciertas características intrínsecas que hacen necesario utilizar herramientas diferentes de las que se emplean en el tratamiento de las reacciones puramente térmicas. Se deberá formular:

- a) Un balance de cantidad de movimiento (campo de distribución de velocidades);
- b) Un balance de energía térmica (campo de distribución de temperaturas);
- c) Un balance de materias para cada especie - reactivas, intermediarias y productos- (campo de distribución de concentraciones).

- d) Los dos últimos balances van a exigir por una parte expresiones de velocidades de reacción que participan en ellos como términos "fuente" o "sumidero" (dependiendo si se trata de productos o de reactivos) y por otra los valores de ciertos parámetros que caracterizan fisicoquímicamente al sistema reaccionante (coeficiente de difusión o de transferencia de materia, densidad, conductividad térmica, viscosidad, etc.).
- e) Es indispensable, para los fotorreactores, fotorreactores catalíticos, cuantificar la velocidad volumétrica local de absorción de fotones (LVRPA). El cálculo de los valores de la LVRPA requiere de dos tareas extras:
- f) Formulación y resolución del balance de fotones a partir de la ecuación de transferencia radiativa (RTE)
- g) Caracterización óptica del medio mediante los parámetros inherentes, a saber: coeficientes de absorción y de "scattering", función de fase, etc.

Es importante remarcar que, excepto en condiciones muy especiales, siempre existe una acentuada no uniformidad en la distribución espacial de la LVRPA dentro del reactor (y por ende de las velocidades de reacción), que es de carácter irreducible (a diferencia, por ejemplo, de la temperatura o las concentraciones). Esta característica, sumada a lo descrito en (d) y (e), le da a los requerimientos del diseño de fotorreactores sus características "especiales", no consideradas cuando se analiza un reactor químico convencional (térmico o catalítico).

### **III.2.1. BALANCES DE MATERIA**

#### ***III.2.1.1. LA ECUACIÓN GENERAL DE CONSERVACIÓN DE MATERIA***

La ecuación general de conservación de materia en sistemas de varios componentes, ha sido cuidadosamente derivada en textos de grado de ingeniería química

$$\underbrace{\frac{\partial c(\underline{x},t)}{\partial t}}_{\text{velocidad de acumulación}} + \underbrace{\nabla N_i(\underline{x},t)}_{\text{todos los flujos de materia}} = \underbrace{R_{\text{Hom},i}(\underline{x},t)}_{\text{reacción química homogénea del componente } i} \quad (\text{III.1})$$

La ecuación (III.1), válida para una partícula material ubicada en un punto del espacio de reacción, indica que la velocidad de cambio de la concentración con el tiempo (también denominada velocidad de acumulación), sólo se puede modificar por flujos de materia de entrada y salida de dicho espacio, y/o por reacción química. La ecuación diferencial es válida en una única fase; por lo tanto sólo reacciones homogéneas pueden ser descritas por ella.

### III.2.1.2. REACCIONES HETEROGÉNEAS

El caso más simple de analizar para una reacción heterogénea es el de un sistema que se encuentra perfectamente mezclado y en él tiene lugar en estado estacionario una reacción catalizada por un sólido. Los componentes a reaccionar están habitualmente en la fase fluida (sea líquida o gaseosa). El sistema reactivo fluido puede estar en contacto con paredes impermeables sólidas, tales como las representadas por las paredes del reactor; otras paredes pueden ser aberturas de entrada y salida y hay otras que son permeables porque al menos parte de la materia que es transportada hacia ellas desaparece (para transformarse en un producto). Ellas constituyen las superficies catalíticas. Es decir los flujos de materia que llegan a las superficies impermeables no producen cambios de composición (tan sólo se anulan), mientras que la materia que llega a superficies catalíticas es alterada en su composición por la reacción química. El proceso de interés ocurre en la interfaz fluido-sólido. Si la reacción heterogénea es modelable incluyendo las etapas de adsorción y desorción, y teniendo en cuenta la correcta estequiometría del proceso, necesariamente la diferencia de los flujos de materia hacia y desde la pared catalítica es igual a la velocidad de la reacción química heterogénea. Si  $\underline{n}$  es la normal a la superficie

sólida dirigida hacia fuera de ella, y teniendo en cuenta los signos de cada flujo, se cumple la ecuación (III.2):

$$\underbrace{E_n}_\text{sobre la superficie} \rightarrow \underbrace{N_i(\underline{x}) \times n(\underline{x})}_\text{flujo de materia del componente i} = - \underbrace{R_{\text{Het},i}(C_i^{\text{sup}}, C_j^{\text{sup}}, \dots, T, \text{pH}, \text{ect})}_\text{relacion en la superficie del componente i} = -R_{\text{Het},i}(\underline{x}) \quad (\text{III.2})$$

### III.2.2. CAMPO DE RADIACIÓN

Cuando se expresa la velocidad de una reacción fotoquímica es necesario hacer la distinción entre las etapas oscuras y las activadas por radiación (iluminadas). Para el tratamiento de las reacciones oscuras se usa la misma metodología empleada en los reactores convencionales; el principal obstáculo aparece cuando se evalúa la velocidad de la etapa de iniciación. La existencia de este paso muy particular constituye la diferencia cinética principal (y la más importante) entre las reacciones térmicas (o catalíticas) y las activadas por radiación.

La velocidad de la etapa de activación por radiación es proporcional a la energía útil absorbida mediante una propiedad que se ha definido como la Velocidad Local Volumétrica de Absorción de Fotones ó “Local Volumetrical Rate of Photon Absorption” (Irazoqui et al. 1973). La L.V.R.P.A, ( $e_{\lambda}^a$ ), representa la cantidad de fotones (en unidades de energía para un intervalo determinado de longitudes de onda) que se absorbe por unidad de volumen de reacción y unidad de tiempo.

La L.V.R.P.A depende del campo de radiación (la distribución de fotones) existente en el espacio de reacción; vemos entonces que necesitamos conocer el campo de radiación dentro del fotorreactor. Esta distribución de la energía radiante no es uniforme en el espacio debido a varias razones; entre ellas, la atenuación producida por la absorción de especies que está siempre presente.

Otros factores importantes a tener en cuenta, son las propiedades físicas y las características geométricas del sistema lámpara-reactor. Por lo tanto, la reacción de iniciación será espacialmente dependiente, aún en el caso de ausencia de gradientes de concentración. Esta carencia de homogeneidad en el campo de radiación es intrínsecamente irreductible en reactores fotoquímicos en la práctica.

La evaluación de la L.V.R.P.A. se lleva a cabo resolviendo primero la ecuación general de transporte de radiación que requiere de las ecuaciones constitutivas apropiadas para la absorción, emisión y el scattering. El balance resultante de radiación se aplica entonces al espacio de reacción donde hay absorción únicamente (en medios homogéneos) o hay absorción y scattering (en medios heterogéneos), y a la lámpara donde la emisión es el fenómeno predominante. Combinando ambos resultados uno puede obtener, de una manera directa, el valor puntual (local) de la velocidad de absorción de radiación.

### III.2.3. DEFINICIÓN DE LA INTENSIDAD DE RADIACIÓN

Macroscópicamente, la radiación puede considerarse como fotones que se propagan en forma de rayos, caracterizados sólo por su energía y su dirección. La propiedad fundamental asociada a la energía es la Intensidad Específica Espectral, definida por la ecuación (III.3), como la energía del haz de radiación por unidad de tiempo, por unidad de ángulo sólido de la dirección de propagación, por unidad de área de superficie proyectada según dicha dirección y por unidad de intervalo de longitudes de onda. En fotoquímica es conveniente expresar  $I_\lambda$  en einstein por metro cuadrado, por estereoradián, por segundo y por unidad de intervalo de longitud de onda. El valor de la intensidad es proporcional al número (o densidad) de fotones que se propagan en la dirección  $\Omega$ , con una energía igual a  $h\nu$ .

$$I_{\lambda}(\underline{x}, \underline{\Omega}, t) = \lim_{\partial A, \partial \Omega, \partial x \rightarrow 0} \left( \frac{\partial E_{\lambda}}{\partial A \cos \theta \partial t \partial \lambda} \right) \quad (\text{III.3})$$

Para definir  $I_{\lambda}$  podemos considerar una superficie de tamaño diferencial ( $dA$ ), que puede ser caracterizada por su posición ( $\underline{x}$ ) respecto a un sistema fijo de coordenadas y su orientación en el espacio, mediante su vector unitario normal ( $\underline{n}$ ), como se muestra en la Figura III.1. Desde esta superficie supongamos que se emite un haz de radiación con dirección  $\underline{\Omega}$ ; esta dirección de propagación genera un diferencial de ángulo sólido  $d\Omega$ . La dirección de propagación y la orientación de la superficie, forman un ángulo que puede ser evaluado por el producto escalar  $\underline{\Omega} \cdot \underline{n} = \cos \theta$ . Mediante este ángulo podemos determinar el área proyectada según la dirección de propagación  $dA' = dA \cos \theta$ . Entonces, si  $dE_{\lambda}$  es la energía emitida en el rango entre  $\lambda$  y  $\lambda + d\lambda$ , podemos definir la Intensidad Específica Espectral  $I_{\lambda}$  mediante la ecuación (III.3)

En el caso más general, dentro de un reactor fotoquímico la radiación puede llegar a un volumen reaccionante elemental (punto material) desde todas las direcciones en el espacio. La integración de la Intensidad Específica Espectral en todas las direcciones posibles que vienen desde el espacio esférico entero de irradiación, define una propiedad fotoquímica llamada Radiación Incidente Espectral, ecuación (III.4)

$$G_{\lambda}(\underline{x}) = \int_{\Omega} I_{\lambda}(\underline{x}, \underline{\Omega}) d\Omega \quad (\text{III.4})$$

En algunos casos, tanto  $I_{\lambda}$  como  $G_{\lambda}$  pueden ser también función del tiempo.

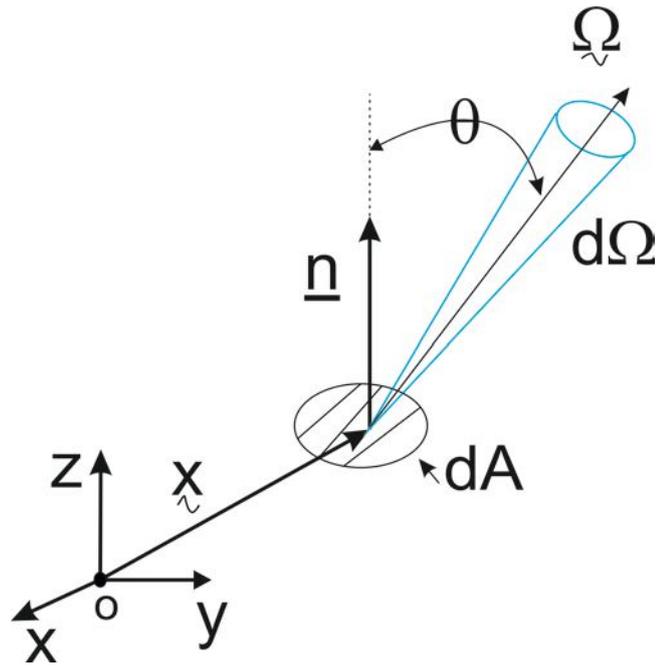


Figura III. 1 Definición de la Intensidad de Radiación (Adaptada de Cassano et al., 1995)

#### III.2.4. DEFINICIÓN DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA

Dentro de un reactor fotoquímico la radiación puede llegar a un punto, en el caso más general, desde todas las direcciones en el espacio. Para que una reacción fotoquímica ocurra, esta radiación debe ser absorbida por un volumen reaccionante elemental (punto material). De esta manera los rayos de radiación provenientes de todas las direcciones deben cruzar un elemento de superficie que limita tal elemento de volumen. La integración de la Intensidad Espectral Espectral en todas las direcciones posibles que vienen desde el espacio esférico entero de irradiación, define una propiedad fotoquímica llamada *Radiación Incidente Espectral*, como fue desarrollada en la ecuación III.4

Se debe notar que en algunos casos, tanto la intensidad como la radiación incidente pueden ser también función del tiempo. Al igual que en el caso de  $G\lambda$ ,

muchas de las propiedades del campo de radiación, surgen de la integración de esta propiedad fundamental  $I_\lambda$ .

En la Ec. (III. 4) se ha realizado una integración para todas las direcciones posibles  $\underline{\Omega}$  dentro del espacio esférico total. Para un sistema en coordenadas esféricas localizado en el punto de incidencia (el volumen elemental de reacción) la radiación incidente total es:

$$G_\lambda = \int_{\theta_1}^{\theta_2} \int_{\phi_1}^{\phi_2} I_\lambda \text{sen}\theta d\phi d\theta \quad (\text{III. 5})$$

$[\theta_1, \theta_2]$  y  $[\phi_1, \phi_2]$  son los límites de integración que define el espacio desde el cual la radiación arriba al punto de incidencia. Si la radiación arriba desde todo el espacio  $4\pi$  entonces dichos límites se extienden para  $\theta$  de 0 a  $\pi$  y para  $\phi$  de 0 a  $2\pi$ .

Debe considerarse que, con la excepción de un haz paralelo y colimado (donde un sistema de coordenadas cartesianas es suficiente), la energía radiante que emerge de una fuente (o que alcanza un punto de incidencia) siempre se propaga en forma esférica. De esta manera, un sistema de coordenadas esféricas es el sistema natural de representación para la propagación de la radiación.

Para la radiación policromática, debe realizarse una integración sobre el rango de longitudes de onda de interés (considerando las regiones de  $\lambda$  en que se solapan la emisión de la lámpara, la transmisión de la pared del reactor y el coeficiente de absorción de las especies que absorben radiación):

$$G = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \int_{\theta_1}^{\theta_2} \int_{\phi_1}^{\phi_2} I_\lambda \text{sen}\theta d\phi d\theta d\lambda \quad (\text{III. 6})$$

A partir de la definición de la radiación incidente se puede definir la energía absorbida, en un volumen elemental, de acuerdo a:

$$e_{\lambda}^a(\underline{x}) = \kappa_{\lambda}(\underline{x}) G_{\lambda}(\underline{x}) \quad (\text{III. 7})$$

$e_{\lambda}^a$  es la *Velocidad Volumétrica Local de Absorción de Fotones* (L.V.R.P.A), muy a menudo inapropiadamente llamada "Intensidad Absorbida". Sus unidades son Einstein por metro cúbico y por segundo, muy diferente de las que corresponden a una Intensidad;  $\kappa_{\lambda}$  es el coeficiente volumétrico espectral de absorción, que guarda algún tipo de relación funcional con la concentración de las especies absorbentes .

Para radiación policromática:

$$e^a = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \kappa_{\lambda} G_{\lambda} d\lambda \quad (\text{III. 8})$$

$$e^a = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \int_{\theta_1}^{\theta_2} \int_{\varphi_1}^{\varphi_2} \kappa_{\lambda} I_{\lambda} \text{sen}\theta d\varphi d\theta d\lambda \quad (\text{III. 9})$$

De esta forma, para evaluar la LVRPA debemos conocer la Intensidad Específica Espectral en cada punto dentro del reactor. Su valor puede obtenerse de la ecuación de transporte de fotones.

### III.2.4.1. LA ECUACIÓN GENERAL DE TRANSPORTE DE FOTONES

La forma general de la ecuación de conservación de fotones, a partir de la intensidad de radiación caracterizada por su longitud de onda y una dirección de propagación  $\underline{\Omega}$ , es (Cassano *et al.*, 1995):

$$\underbrace{\frac{1}{c} \frac{\partial I_{\lambda, \underline{\Omega}}(\underline{x})}{\partial t}}_{\text{Transiente}} + \underbrace{\nabla \cdot (I_{\lambda, \underline{\Omega}}(\underline{x}) \underline{\Omega})}_{\text{Variación sobre la dirección } \underline{\Omega}} = - \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{abs}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por absorción del medio}} - \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{out-s}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por "Out-scattering"}} + \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{em}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por emisión del medio}} + \underbrace{W_{\lambda, \underline{\Omega}}^{in-s}(\underline{x})}_{\text{Ganancia por "In-scattering"}} \quad (\text{III.10})$$

La primera hipótesis que podemos hacer para simplificar la ecuación es suponer el campo de radiación en estado estacionario. Esta suposición es válida, ya que el sistema alcanza el estado estacionario a la velocidad de la luz. Como paso siguiente, se pueden incorporar las ecuaciones constitutivas apropiadas para modelar cada fenómeno. De esta manera un rayo a lo largo de su trayectoria pierde energía debido a la absorción, que se modela con el coeficiente de absorción volumétrico  $\kappa_\lambda$  que caracteriza a las especies absorbentes y representa la fracción de la radiación incidente que es absorbida por la materia por unidad de longitud a lo largo de la ruta del haz de luz. Esta ecuación constitutiva, cuando se inserta en la ecuación de transporte de fotones para un medio puramente absorbente, da origen a lo que generalmente se conoce como “Ley de Bouguer-Lambert” para la absorción de radiación en medios homogéneos. También se pierde energía debido al “out-scattering” (pérdida de energía por “scattering”), que se modela mediante el coeficiente volumétrico de “scattering”  $\sigma_\lambda$ . El scattering de salida es un proceso mediante el cual la radiación transportada en un dado ángulo sólido  $d\Omega$  alrededor de la dirección  $\underline{\Omega}$ , es desviada por el medio fuera de tal dirección o trayectoria y dispersada en todas direcciones en el espacio.

La ganancia de energía del haz se debe a la emisión interna y al “in-scattering”. La posibilidad de que exista emisión radiativa varía apreciablemente entre un proceso y otro. La mayoría de los materiales producen una emisión espontánea que depende de su temperatura, siendo significativo a altas temperaturas (un cuerpo radiante, una llama, etc.). En otros casos los cuerpos pueden emitir radiación mediante la excitación producida por campos externos (*por ejemplo*: un arco de luz producido por una descarga eléctrica entre dos electrodos, la fluorescencia generada por un campo de radiación, etc.).

El “in-scattering” puede definirse como la contribución de energía producida por otros rayos distintos de aquel en que se efectúa el análisis; es decir, parte de la energía dispersada en otros puntos como consecuencia del

“out-scattering”, es redistribuida e incorporada a la dirección  $\underline{\Omega}$ . Esta “redistribución” de radiación se puede modelar con la función de fase para “scattering”  $p(\underline{\Omega}' \rightarrow \underline{\Omega})$ , suponiendo “scattering” elástico (redistribución, sin cambio de longitud de onda). La función de fase  $p$  informa cuales, de todas las direcciones posibles  $\underline{\Omega}'$ , se incorporan a la dirección del balance  $\underline{\Omega}$ .

La expresión para el balance de radiación monocromática, teniendo en cuenta estas consideraciones es:

$$\underbrace{\frac{dI_{\lambda,\underline{\Omega}}(\underline{x})}{ds}}_{\text{Variación sobre la dirección } \underline{\Omega}} + \underbrace{\kappa_{\lambda}(\underline{x}) I_{\lambda,\underline{\Omega}}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por absorción}} + \underbrace{\sigma_{\lambda}(\underline{x}) I_{\lambda,\underline{\Omega}}(\underline{x})}_{\text{Pérdida por "Out-Scattering"}} = \underbrace{j_{\lambda}^e}_{\text{Ganancia por emisión}} + \underbrace{\frac{\sigma_{\lambda}(\underline{x})}{4\pi} \int_{\Omega'=4\pi} p(\underline{\Omega}' \rightarrow \underline{\Omega}) I_{\lambda,\underline{\Omega}'}(\underline{x}') d\Omega'}_{\text{Ganancia por "In - scattering"}} \quad \text{(III.11)}$$

En el caso de un sistema homogéneo tanto el término de “in scattering” como el de “Out scattering” pueden despreciarse. Además, si la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente la emisión también se considera despreciable.

La distribución de la radiación se obtiene resolviendo la ecuación de transferencia radiativa en un sistema homogéneo con todas las consideraciones realizadas. En este trabajo en particular, las especies absorbentes varían su concentración a través del tiempo, por lo tanto es necesaria una dependencia con esta variable:

$$\frac{dI_{\lambda,\underline{\Omega}}(s,t)}{ds} + \kappa_{\lambda}(s,t) I_{\lambda,\underline{\Omega}}(s,t) = 0 \quad \text{(III.12)}$$

Con una condición de contorno en el punto de entrada al reactor ( $s = s_R$ ) dada por:

$$I_{\lambda,\Omega}(s_R, t) = I_{\lambda,\Omega}^0(t) \quad (\text{III. 13})$$

La representación paramétrica de la trayectoria del rayo está dada por la variable  $s$ . La ecuación (III. 12) es válida para luz monocromática y una dirección simple  $\Omega$ . La solución de esta ecuación diferencial provee el campo de intensidades de radiación.

#### III.2.4.2. LA CONDICIÓN DE CONTORNO

En las condiciones planteadas, y a efectos de resolver el balance de radiación, se debe conocer la condición de contorno. Para ello, se pueden emplear distintos procedimientos.

Existen dos tipos de modelos rigurosos, que permiten el cálculo de la condiciones de contorno del espacio de reacción, estos son:

**Modelo de Emisión:** son los que modelan la emisión de la fuente, considerando sus características geométricas y ópticas. Hasta el presente, en las aplicaciones ingenieriles de fotorreactores, las lámparas tubulares han sido usadas casi exclusivamente. Pueden modelarse dos tipos principales de lámparas: de emisión superficial y de emisión volumétrica.

Las lámparas de emisión superficial poseen un tubo de vidrio con un material fluorescente que recubre la pared interna del mismo. La radiación UV emitida por el mercurio contenido en el tubo es absorbida por el material fluorescente depositado sobre la superficie, el cual a su vez emite un espectro continuo de radiación UV y/o visible, dependiendo de la composición del material empleado. Entre estas lámparas se encuentran las lámparas actínicas, de luz negra y las fluorescentes en general. Si el medio existente entre la lámpara y la pared del reactor es diactínico (la intensidad no cambia con la trayectoria) a partir de la definición de intensidad específica espectral se obtiene la ecuación (III. 14) en función de la potencia de salida de la lámpara  $P_{s,\lambda}$  a una

longitud de onda  $\lambda$  (fotones por segundo),  $r_L$  es el radio de la lámpara,  $L_L$  es la longitud útil de la lámpara, y  $Y_{R,\lambda}$  es un coeficiente de transmisión de la pared del reactor (Cassano *et al.*, 1995).

$$I_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = \frac{P_{\lambda}}{2\pi^2 r_L L_L} Y_{R,\lambda} \quad \text{(III.14)}$$

Las lámparas de emisión volumétrica, en cambio, producen un espectro discontinuo o de líneas, generado por la emisión del mercurio gaseoso contenido en el tubo. En este caso, la emisión es producida por todo el volumen de la lámpara. Estas lámparas pueden ser de alta, media o baja presión de mercurio (por ejemplo, germicidas). También en este caso se considera que el medio existente entre la lámpara y la pared del reactor es diatónico. Además, se puede aplicar la RTE a todo el volumen de la lámpara, donde existe solamente el fenómeno de emisión representado por el coeficiente de emisión de radiación  $j_{\lambda}^e$ . Siguiendo el procedimiento presentado por Cassano *et al.* (1995), se obtiene la ecuación (III. 15).

$$I_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = \frac{P_{\lambda}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \Delta \rho_S(\underline{x}, \theta, \varphi) Y_{R,\lambda} \quad \text{(III. 15)}$$

La función  $\Delta \rho(\underline{x}, \theta, \varphi)$  puede obtenerse como la intersección de la ecuación de un cilindro en el espacio (la lámpara) con la ecuación de una recta en coordenadas esféricas (el rayo). Resolviendo la ecuación cuadrática resultante y reemplazando en la ecuación (III. 15), se llega a la ecuación (III. 16).

$$I_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = \frac{P_{\lambda}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \frac{(r_L^2 - r^2 \text{sen}^2 \varphi)^{1/2}}{\text{sen} \theta} Y_{R,\lambda} \quad \text{(III. 16)}$$

Donde  $P_{s,\lambda}$  es la potencia de salida de la lámpara a una longitud de onda  $\lambda$ ,  $R_L$  es el radio de la lámpara,  $L_L$  es la longitud útil de la lámpara, y  $Y_{R,\lambda}$  es un coeficiente de transmisión la pared del reactor.

**Modelo de Incidencia:** Son los que suponen una dada distribución de la energía radiante a la entrada del reactor, independizándose de la emisión de la fuente de radiación. Para determinar experimentalmente la radiación incidente dentro de un fotorreactor, pueden utilizarse dos tipos de métodos:

- i. Físicos: Se basan en la utilización de un instrumento de medición altamente sensitivo a la radiación, el cual debe ser calibrado con una fuente cuya potencia de salida y distribución espectral sean rigurosamente conocidas.
- ii. Químicos: mediante el seguimiento de una reacción química producida por la absorción de energía radiante, cuyas características cinéticas y propiedades ópticas son perfectamente conocidas, además de existir una expresión matemática simple que vincule la velocidad de reacción y la velocidad de absorción de energía radiante.

Entre los métodos físicos de medición uno de los más comúnmente empleados es el sistema compuesto por radiómetro y un sensor de radiación. Este dispositivo puede utilizarse para medidas absolutas o relativas del campo radiante en cualquier zona del espectro dentro del rango visible-ultravioleta. La principal desventaja es que estos equipos deben ser adecuadamente calibrados (se deben utilizar fuentes estándar de radiación).

Los métodos químicos brindan resultados confiables y reproducibles cuando se trata de evaluar la radiación incidente o la velocidad volumétrica de absorción de fotones dentro de un fotorreactor cualquiera sea su geometría y tamaño. Esto significa que cuando un actinómetro es apropiadamente usado se lleva a cabo una especie de “titulación de la luz” en el interior del recipiente de reacción. El análisis de los resultados experimentales de la reacción del

actinómetro mediante un adecuado modelo permite la obtención del valor de la radiación incidente en la pared.

### III.2.4.3. EXPRESIÓN DE LA L.V.R.P.A UTILIZANDO UN MODELO DE EMISIÓN

Para ambos modelos de lámparas mencionados en el punto anterior, es necesario conocer los límites de integración de las coordenadas angulares  $(\theta, \phi)$ , correspondientes al ángulo sólido que forma la fuente de radiación con un punto de incidencia  $I_n$  dentro del reactor. La figura III. 2 muestra la emisión a lo largo de la dirección  $\theta, \phi$  producido por un elemento de volumen pequeño de la lámpara que llega al reactor a  $s = s_R$ . Teniendo en cuenta la figura III. 2, la ecuación III. 11 puede ser integrada a lo largo de la dirección de propagación dada (definida por las coordenadas  $\theta$  y  $\phi$ ) a partir de  $s = s_R$  (a un punto arbitrario de la radiación a la entrada del reactor) en un punto de incidencia  $I_n$  dentro del reactor, como se expresó en la ecuación III. 14 donde  $I_\lambda^0(\theta, \phi, t) = I_\lambda(s_R, \Omega, t)$  es la condición límite para  $I_\lambda$  al punto de entrada y para una dirección arbitraria  $\Omega$ .

El paso siguiente es integrar todas las posibles direcciones de irradiación a partir del volumen de la lámpara de emisión para el punto  $I_n$ . De acuerdo a Irazoqui *et al.* (1973), el valor de la radiación incidente ( $G_\lambda$ ) en un punto  $x$  dentro del reactor se obtiene integrando el ángulo sólido de incidencia  $(d\Omega) = \text{sen}\theta d\theta d\phi$ .

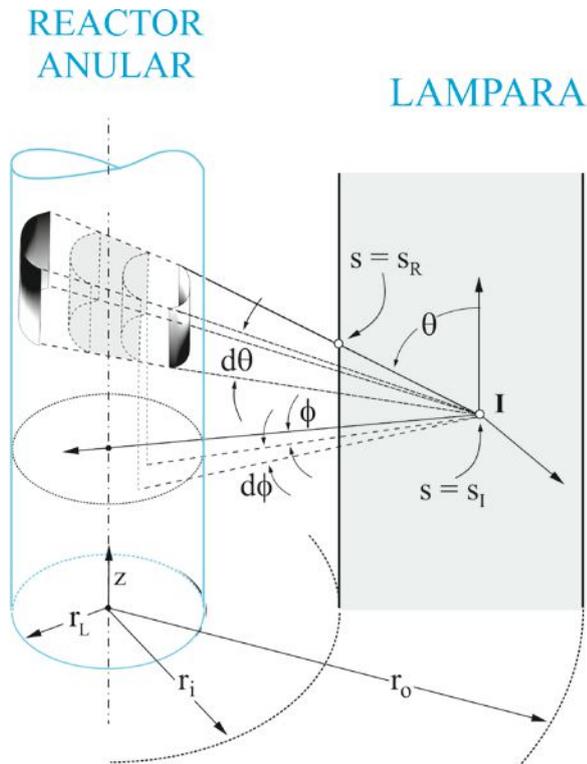


Figura III.2. Modelo de emisión para una lámpara tubular a lo largo de la dirección  $(\theta, \phi)$  en un punto  $I_n$  (reactor anular). [Adaptada de Labas et. al, 2008]

En resumen, integrando la ecuación (III. 12) con la condición de contorno (III. 13) encontramos la Intensidad Específica monocromática. Sustituyendo en la ecuación (III. 6) obtenemos la Radiación Incidente monocromática. Cuando el resultado se pone en la ecuación (III. 7) se obtiene la ecuación siguiente para la L.V.R.P.A.:

$$e_{\lambda}^a(\underline{x}, t) = K_{\lambda}(\underline{x}, t) \int_{\varphi_1}^{\varphi_2} d\varphi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \, \text{sen}\theta \times I_{\lambda, \Omega}^0(t) \exp \left[ - \int_{\bar{s}=s_r(\underline{x}, \theta, \varphi)}^{\bar{s}=s_R(\underline{x}, \theta, \varphi)} K_{\lambda}(\bar{s}, t) \, d\bar{s} \right] \quad (\text{III. 17})$$

En la integral doble,  $\theta$  considera el largo de la lámpara y  $\phi$  el diámetro de la lámpara. Los límites de la integración, que resultan de simples relaciones

trigonométricas, están dados por las ecuaciones (III. 18-20) (Irazoqui *et al.*, 1973):

$$\theta_1(\varphi) = \tan^{-1} \left[ \frac{r \cos \varphi - (r_L^2 - r^2 \sin^2 \varphi)^{1/2}}{(L_L - z)} \right] \quad (\text{III. 18})$$

$$\theta_2(\varphi) = \tan^{-1} \left[ \frac{r \cos \varphi - (r_L^2 - r^2 \sin^2 \varphi)^{1/2}}{-z} \right] \quad (\text{III. 19})$$

$$-\varphi_1 = \varphi_2 = \cos^{-1} \left[ \frac{(r^2 - r_L^2)^{1/2}}{r} \right] \quad (\text{III. 20})$$

### III.2.5. MODELADO CINÉTICO EN REACTORES

Un modelo cinético que represente en forma matemática la velocidad de reacción de un proceso químico o fotoquímico es un requisito indispensable para diseñar un reactor/fotorreactor. Es común encontrar en la literatura expresiones de tipo global que, más allá de su utilidad fenomenológica, no son fácilmente extrapolables a cualquier otro tipo de reactor (geometría, tamaño, fuente, etc.) para llevar a cabo el diseño o cambio de escala (Brandi, 2002). Por esta razón la expresión debe tener desagregadas las dependencias con todas las variables representativas del proceso (concentraciones, pH, etc.) y del dispositivo (geometría, lámpara, reflector, etc.), estas últimas expresadas a través de la adecuada valoración de la LVRPA (fotorreacción). Concretamente, se busca una expresión con validez puntual e independiente del recinto de reacción (cinética intrínseca).

### III.3. MODELOS CINÉTICOS DE DESINFECCIÓN

Un modelo cinético de desinfección, en esta tesis, desinfección de aguas, es una idealización simplificada de un proceso complejo en que participan diferentes fenómenos químicos, biológicos e hidráulicos. Con él se consigue obtener una expresión matemática que facilita el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

#### III.3.1. MODELO DE CHICK

El primer planteo de una cinética de desinfección fue enunciado por Chick (1908), que reconoció cierta similitud entre la inactivación microbiana por desinfectantes químicos y las reacciones químicas (Hass, 1999). Un punto de vista global de los principios de modelado cinético de desinfección ha sido presentado por Gyuren y Finch (1998). La desinfección es análoga a una reacción química bimolecular cuyos reactantes son el microorganismo y el desinfectante, y se puede caracterizar por una ley de velocidad de reacciones químicas.

$$R = -kN \quad (III. 21)$$

Donde:

R= velocidad de inactivación (organismos inactivados/volumen-tiempo)

N= es la concentración de organismos viables a un tiempo t

k= pseudo-constante de velocidad de reacción (depende de la concentración del desinfectante, del desinfectante, tipo de microorganismo y sistema a tratar).

En sistemas batch, esto resulta en una caída exponencial de la concentración de microorganismos ya que la velocidad de inactivación es igual a

$dN/dt$ , asumiendo que  $k$  es realmente constante (es decir, la concentración de desinfectante y demás variables se mantienen constantes).

La ley de Chick expresa la velocidad de inactivación de microorganismos mediante una expresión correspondiente a una reacción química de primer orden:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad (\text{III.22})$$

Donde:

$N$ = concentración de organismos viables a un tiempo  $t$

$N_0$ = concentración de organismos a tiempo 0

$k$ = constante de velocidad de inactivación característica del tipo de desinfectante, microorganismo y aspectos de calidad del agua del sistema.

$t$ = tiempo

La expresión anterior es válida bajo las siguientes condiciones (Daniel,2001):

- Población homogénea de microorganismos (cultivo puro)
- Reactores de flujo pistón o sistemas «batch» de mezcla completa
- Distribución homogénea de desinfectante
- Concentración de desinfectante constante a lo largo del tiempo

La constante  $k$  es válida para una determinada concentración de desinfectante

### III.3.2. MODELO DE CHICK-WATSON

Watson (1908), propuso la ecuación (III.24) para relacionar la constante de inactivación ( $k$ ) con la concentración del desinfectante ( $C$ ):

$$k=k'C^n \quad (III.23)$$

donde  $n$  es el término del coeficiente de dilución y  $k'$  es independiente de la concentración de desinfectante, y teniendo en cuenta la ecuación (III.22), también es independiente de la concentración de microorganismos.

A partir de la ley de Chick-Watson, cuando  $C$ ,  $n$  y  $k'$  son constantes, la ley precedente puede ser integrada de manera que, en un sistema batch totalmente mezclado se obtenga:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k'tC^n t \quad (III.24)$$

Cuando la composición del desinfectante cambia con el tiempo, o cuando se usa un sistema con configuración distinta al batch, se deben utilizar leyes de velocidad apropiadas, que caracterizan la transformación del desinfectante (Haas y Karra, 1994) junto con los balances de materia para obtener la relación entre la inactivación, la concentración y el tiempo.

A pesar de que la teoría de Chick-Watson es ampliamente utilizada su validez es limitada para algunas operaciones prácticas de desinfección. La inactivación de microorganismos en experimentos batch, aun cuando la concentración de desinfectante es constante, no siempre sigue un modelo de decaimiento exponencial como el predicho por la ecuación IV.24. Estas desviaciones a la ley de Chick-Watson dependen del tipo de microorganismo, tipo de desinfectante y otras condiciones de operación (Montgomey, 1985).

Existen varios modelos de desinfección que tratan de interpretar estas “desviaciones”. La presencia de hombros o del lag inicial en las curvas de inactivación se ven frecuentemente en organismos que forman agrupamientos o “clumps”. Esto quiere decir que no se inactiva una célula bacteriana sino una unidad formadora de colonia.

Además, curvas de inactivación con “hombros”, pueden ser explicadas por un modelo disfuncional (Hass, 1999) por un modelo Multitarget (Severín, 1982) o por un modelo de eventos en serie (Severín et al., 1984).

También pueden observarse curvas de inactivación con “colas” o con velocidad de desinfección decreciente con el tiempo. Hay varias teorías también para explicar este fenómeno. Existe una hipótesis que explica este comportamiento por un concepto mecanístico (Certf, 1977). En este caso se encontraron cuatro mecanismos particulares para interpretar esta velocidad decreciente:

- Transformación a una forma resistente durante la inactivación
- Existencia de variantes genéticas de sensibilidad diferente
- Protección de una subpoblación o variaciones en la dosis recibida de desinfectante
- Agrupamiento de una subpoblación

### III.3.3. MODELO DE WICKRAMANAYAKE Y SPROUL

Wickramanyake y Sproul (1988) desarrollaron una formulación empírica para definir la cinética de inactivación de microorganismos utilizando el modelo de Chick – Watson, cuya ecuación puede ser escrita de la siguiente manera:

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = \begin{cases} 0 & \text{si } t < t_0 \\ -k'(t-t_0) & \text{si } t \geq t_0 \end{cases} \quad (\text{III.25})$$

Donde  $k_0$  es la tasa de inactivación y  $t_0$  el tiempo lag. El modelo desarrollado por Wickramanayake y Sproul (1988) está basado en datos experimentales obtenidos durante la inactivación de quistes de protozoarios con ozono.

En algunos casos, la velocidad de inactivación permanece constante desde el inicio de la reacción pero esta disminuye cuando la concentración de microorganismos es baja, lo que da lugar a una grafica con cola. En estos casos se puede aplicar una modificación del modelo Chick-Watson cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = k_1 [1 - \exp(-k_2 t)] \quad (\text{III.26})$$

Este modelo puede reproducir la existencia de un “hombro” al inicio de la reacción, así como una “cola” al final. Sin embargo, no puede reproducir la existencia simultánea de ambas regiones.

### III.3.4. MODELO DE GARD

En la literatura médica, la importancia de la velocidad de inactivación decreciente fue reconocida por Gard (1958). En su investigación de la cinética de inactivación química de un virus, Gard presentó pruebas sobre la velocidad de inactivación afirmando que no era de primer orden y que decrecía con el tiempo. Gard propuso la siguiente ecuación para expresar la velocidad de decrecimiento en un reactor batch.

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{kN}{1+a(Ct)} \quad (\text{III.27})$$

O en la forma integrada

$$\frac{N}{N_0} = [1 + a(Ct)]^{-k/a} \quad (\text{III.28})$$

Donde

N= concentración de organismos viables a tiempo t

C= concentración del desinfectante, constante en el tiempo

k= constante de velocidad de primer orden de inactivación

a= coeficiente de velocidad

### III.3.5. MODELO DE COLLINS Y SELLECK

Collins y Selleck (1972) observaron que los datos de desinfección frecuentemente producen un lag inicial como también una velocidad de inactivación decreciente como se observa en la figura IV.3 . Si se grafica el logaritmo de los sobrevivientes versus el tiempo, como se hace en muchas gráficas de desinfección, se obtiene la forma mostrada en la figura IV.3(a). Después del lag inicial, se observa que parte de la curva de inactivación tiene una velocidad de inactivación decreciente con el tiempo. El propósito del modelo es graficar los sobrevivientes (N/No) versus el producto de la concentración y tiempo (Ct) y no versus el tiempo solo (White, 1999). La ecuación de velocidad para el modelo de Collin-Selleck es la siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (\text{III.29})$$

Donde:

$$k=0 \text{ para } Ct < \tau \quad (III.30)$$

$$k=k' \text{ para } Ct < \tau$$

$$k = \frac{k'}{b(Ct)} \text{ para } Ct > \tau$$

En este caso,  $\tau$  es un producto de la concentración y el tiempo ( $Ct$ ), que debe ser excedida antes de que se inicie la inactivación. Es semejante a un umbral, es decir, que no existe inactivación hasta que el tiempo ( $t$ ) excede un tiempo lag mínimo ( $t'$ ).

Después de la integración y aplicación de las condiciones límite, la expresión de la velocidad se vuelve:

$$\frac{N}{N_0} = 1 \text{ para } Ct < \tau \quad (III.31)$$

$$\frac{N}{N_0} = \left( \frac{Ct}{\tau} \right)^{-n} \text{ para } Ct > \tau \quad (III.32)$$

### III.3.6. MODELO DE HOM

También Hom (1972) desarrollo una formulación cinética flexible y empírica para la velocidad de inactivación basada en la modificación del modelo de Chick-Watson (Pretorius P.C y Pretorius W.A, 1999).

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t^m \quad (III.33)$$

Siendo  $m$  una constante empírica y  $n$  el coeficiente de dilución.

La ecuación (III.33) puede ser modificada para una concentración constante de desinfectante  $k' = kC^m$ .

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k' t^m \quad (\text{III.34})$$

En un estudio posterior, Hass et al (1999), continuaron modificando el modelo de Hom. En este nuevo modelo se tiene en cuenta en el cálculo, un decaimiento del desinfectante residual. En la ecuación (III.35)  $C_0$  es la concentración inicial de desinfectante y  $k^*$  es la velocidad de decaimiento residual de primer orden.

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = - \left( \frac{m}{nk} \right)^m k (C_0)^n \left[ 1 - \exp \left( - \frac{nk^* t}{m} \right) \right]^m \quad (\text{III.35})$$

### III.3.7. MODIFICACIÓN AL MODELO DE HOM (CHO ET AL., 2003)

En un estudio posterior, Cho et al. (2003) propusieron una modificación del modelo de Hom original que puede simplificarse en la siguiente ecuación cuando la concentración de desinfectante permanece constante:

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = -k_1 [1 - \exp(-k_2 t)]^{k_3} \quad (\text{III.36})$$

Estos tres parámetros del modelo ( $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$ ) hacen posible el ajuste de los datos de desinfección con curvas que presentan tres regiones diferentes correspondientes a un “hombro” inicial, una zona de desinfección lineal y una “cola” final.

### III.3.8. MODELO DE MAJUNAR

Majunar et al. (1973) desarrollaron un modelo cinético basado en la inactivación de poliovirus por ozonización en un reactor batch mezcla perfecta (Rios, 2003). La expresión planteada fue la siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = -KN^x C^n \quad (\text{III.37})$$

Donde  $x$  es una constante empírica del modelo. El análisis de los datos experimentales indicó que la tasa de inactivación ( $N/N_0$ ) puede ser correlacionada con el tiempo de contacto y la concentración de desinfectante utilizando la siguiente ecuación:

$$Ct = a \left( \frac{N}{N_0} \right)^b \quad (\text{III.38})$$

Donde  $a$  y  $b$  son constantes dentro de un rango de condiciones experimentales.

Además de estos modelos empíricos muy conocidos y estudiados, en los últimos años, se ha propuesto el uso de nuevos modelos matemáticos que permitan describir curvas de inactivación no lineales. Así, modelos previamente usados para describir las curvas de crecimiento bacteriano han sido aplicados al estudio de la desinfección. Por ejemplo, la ecuación de Gompertz, ampliamente usada para modelar curvas de crecimiento sigmoideas asimétricas, fue probada con éxito en la inactivación térmica de bacterias (Linton et al., 1995). La ecuación logística, también fue empleada para describir la inactivación de *Listeria monocytogenes* (Cole et al., 1993). Finch et al. (1988) utilizaron el modelo de dosis repuesta para evaluar la cinética de inactivación de *E. coli* con ozono. Estos modelos muestran en general una bondad de ajuste satisfactoria, pero carecen de solidez y se adaptan a situaciones particulares. Por otra parte, los parámetros de estas ecuaciones pueden ser difíciles de calcular, y por lo general se dificulta la interpretación física o biológica de los parámetros.

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = a + bC + Ct \quad (\text{III.39})$$

Siendo C y t variables independientes y a, b y c parámetros del modelo.

Las constantes y los coeficientes de todos los modelos de decaimiento son obtenidos por regresión a partir de resultados experimentales, obtenidos en laboratorio, en condiciones controladas y conocidas, como temperatura, pH, alcalinidad, color, turbiedad, y para un determinado tipo de microorganismos (Daniel, 2001).

### III.3.9. MODELOS CINÉTICOS PROPUESTOS POR BLAIN SEVERIN

Existen varias teorías que intentan modelar la cinética de la desinfección, aunque, debe considerarse que la mayoría se determinaron realizando los estudios con desinfectantes químicos y por lo tanto no son directamente aplicables al UV.

En este punto se centrará la atención en los análisis de Blain Severin (1982) propuso tres modelos cinéticos, siendo el más importante el modelo de Eventos en Serie, considerado como el más apto para representar la desinfección con UV.

Este modelo en particular es tomado como base por Labas (2004) para proponer un modelo modificado para el trabajo desarrollado en su tesis doctoral.

En esta tesis se obtuvieron resultados experimentales de desinfección con UV sola similares a los encontrados por Labas (2004), por lo tanto, se adoptó el modelo de eventos en serie modificado para representar estos resultados. Este modelo completo será presentado en el *Capítulo V*.

**III.3.9.1. CINÉTICA DE SEGUNDO ORDEN DE MEZCLADO**

La observación fundamental que conduce al desarrollo de la cinética de segundo orden es que en estudios de inactivación en sistemas batch, una dosis constante de luz UV ( $\mu\text{W s/cm}^2$ ), por ejemplo, un producto constante del flujo de radiación ( $\mu\text{W/cm}^2$ ) y tiempo (s), da un nivel constante de inactivación para un dado cultivo de organismos (el autor llama erróneamente *Intensidad* local al flujo de radiación, ver punto). Esto parece ser una observación universal excepto cuando se utilizan dosis muy bajas de UV y cuando la velocidad a la cual ciertos organismos reparan daños producidos por UV es del mismo orden de magnitud que la velocidad a la cual se produce el daño con UV (Harms, 1980). Con la excepción de este caso especial, la observación mencionada es una buena indicación que la velocidad de inactivación es de primer orden con respecto al flujo de radiación para la mayoría de los casos. En la cinética de segundo orden de mezclado, la velocidad de inactivación es también de primer orden con respecto a la densidad de organismos sobrevivientes. Cuando se quiere representar en gráficas semilogarítmicas la fracción de sobrevivientes versus exposición UV, las curvas de inactivación en sistemas batch son lineales. Este tipo de comportamiento es generalmente verdad para virus con ácidos nucleicos de cadenas simples (Harms, 1980). Organismos más complejos muestran, usualmente, una resistencia inicial al UV.

De acuerdo a lo expuesto, para el modelo de segundo orden de mezclado, la velocidad de inactivación de organismos,  $R_N$  (números de organismos/ $\text{cm}^3 \text{ s}$ ), se representa por:

$$R_N = kq_w \quad (\text{III.40})$$

donde  $k$  ( $\text{cm}^2/\text{w.s}$ ) es la constante de velocidad,  $q_w$  ( $\text{w/cm}^2$ ) es el flujo de radiación UV y  $N$  (número de organismos/ $\text{cm}^3$ ) es la densidad local de organismos sobrevivientes. Cabe aclarar que el símbolo  $k$  es también usada en cinéticas Multi-Target y en cinéticas de Eventos en Serie como la constante

cinética. Aunque en varios casos  $k$  tiene las mismas unidades, el valor y la interpretación de  $k$  no son intercambiables entre los tres modelos.

Para reactores batch con distribuciones espaciales de flujos de radiación cuasi-uniforme, se asume que  $q_w$  y  $N$  son uniformes. El balance de materia de organismos sobrevivientes es el siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = -k q_w N \quad (\text{III.41})$$

donde  $t$  es el tiempo de exposición (s). Para las condiciones de contorno  $N = N_0$  cuando  $t = 0$  y  $N = N$  a  $t = t$ , la integración da lo siguiente:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-k q_w t} \quad (\text{III.42})$$

donde  $N$  es la densidad de organismos sobrevivientes (número de organismos/cm<sup>3</sup>) y  $N_0$  es la densidad de organismos inicial (número de organismos/cm<sup>3</sup>).

### III.3.9.2. CINÉTICA MULTI-TARGET

El modelo Multi-target se ha utilizado para describir la resistencia inicial de los microorganismos a la inactivación UV. Este modelo se desarrolló para otros tipos de radiación además de la radiación UV y observaciones actuales sobre los mecanismos de inactivación UV no sostienen el uso de este modelo. Sin embargo, es utilizado para describir resultados de este tipo de inactivación (Smith y Hanawalt, 1969; Harms, 1980) debido a la aceptabilidad de su lógica, su simplicidad matemática y su capacidad para ajustar datos de reactores tipo batch. Aunque, la cinética Multi-target se extendió para incluir el caso de la inactivación en reactores de flujo continuo completamente mezclados.

En el desarrollo de este modelo, se asume que una partícula contiene un número finito,  $n_c$ , de *targets* o blancos críticos discretos, cada uno de los cuales debe ser previamente atacados para lograr la inactivación total de una “partícula”. Una partícula puede representar un organismo con  $n_c$  *targets* críticos o un grupo de organismos que posee un total de  $n_c$  *targets*.

El modelo no puede distinguir entre un grupo de organismos con un blanco cada uno o un organismo individual con muchos *targets*. En su aplicación, por lo tanto, toda discusión está dada en términos de un organismo con muchos *targets* y que el término “organismo” y “partícula” se utilizan de modo intercambiable. Se asume también que la probabilidad de lograr un golpe sobre una partícula decrece a medida que avanza la reacción, por ejemplo ya que disminuye el número de *targets* a ser atacados cuando avanza la reacción la probabilidad de lograr el próximo golpe, es menor.

#### **III.4. MODELO PSEUDO HETEROGENEO DE DESINFECCIÓN. FLORES et. al, 2012**

##### **III.4.1. INTRODUCCIÓN AL MODELO**

Como iniciación al trabajo de investigación y parte del entrenamiento se estudia un proceso de desinfección pseudo heterogéneo utilizando peróxido de hidrógeno como desinfectante (este trabajo completo se encuentra en *Apéndice V. Publicaciones*) Se realiza la interpretación química del posible mecanismo de daño celular. La hipótesis planteada es la existencia, en la célula bacteriana, de sitios factibles (*targets*), de ser atacados por los ataque de los radicales  $\text{OH}^\bullet$ . De acuerdo con la literatura consultada, (Mc Donnell y Russell, 1999, Maillar, 2002; Dalymple, 2010) en el caso de las bacterias hay tres sitios característicos, que podrían ser los objetivos del ataque del  $\text{OH}^\bullet$ : (1) La capa de peptidoglicano, (2) la capa de lipopolisacáridos (que se encuentra sólo en las bacterias Gram-negativas) y (3) la bicapa fosfolipídica presentes. En este estudio se trabaja con *E. coli*, una bacteria Gram negativa, por lo tanto, los “target” están definidos.

Los agentes químicos reactivos como el peróxido de hidrógeno (como los compuestos halogenados en general) pueden mostrar cierta especificidad de ataque a los grupos tiol membrana y los ribosomas de la membrana celular (como ya se mencionó en el *Capítulo II*), pero, con frecuencia, los radicales hidroxilo tienen reactividad suficiente para interactuar con diferentes componentes celulares “encapsulando” así el daño primario directo.

Una vez que se produce el ataque a la membrana, las especies reactivas de oxígeno, EROs) o ROS (por sus siglas en inglés: reactive oxygen species) pueden actuar en sitios intracelulares vulnerables, tales como proteínas, enzimas, coenzimas y ácidos nucleicos. El sistema enzimático les permite a las bacterias, en ciertos casos, reconstituirse (sobre todo cuando el proceso de desinfección utilizado es la radiación UV), por consiguiente, si la ruptura de la pared celular no es suficiente, este efecto del peróxido de hidrógeno sobre los componentes intracelulares podría explicar por qué la desinfección oxidativa es siempre un proceso irreversible.

Una de las preguntas para desarrollar el modelo fue: cómo se establecen los mecanismos más plausibles para la producción de ROS? Y como producen estas especies oxidantes el posterior daño sobre los componentes de la célula? Una explicación podría observarse en las posibles reacciones químicas que pueden conducir a esta serie de eventos oxidativos.

La mayoría de estas reacciones han sido objeto de considerables análisis y estudios, pero al mismo tiempo, también se reconoce que constituyen una secuencia compleja de una “red de reacciones” de interconexión antes de llegar a lo que podríamos llamar una especie de “productos finales”. Esta denominación química se aplica a la oxidación completa de todos los componentes de la bacteria. La segunda parte de la pregunta se podría poner de esta manera: ¿Es necesario incluir todos estos pasos en el modelo para representar adecuadamente la operación de desinfección que conduce a la muerte de la célula? es decir, en qué medida todos ellos compiten con las bacterias de las especies ROS?

En vista de estas dificultades, y la búsqueda de alguna forma de plausible, y al mismo tiempo simplificada para la representación, conceptualmente sin distorsiones de todos estos procesos, se podría tratar de adoptar un modelo que biológico, sin la asignación de una composición detallada de cada una de las familias representativas de los componentes de la célula. Una vez que este modelo se realice matemáticamente, será necesario, para averiguar el conjunto mínimo de parámetros cinéticos que se requieren para representarlo, dentro de un error aceptable, postular la serie o los eventos en serie-paralelo que conducen a la muerte bacteriana.

La disrupción de la membrana, la posterior lisis de los componentes de las bacterias y la oxidación del lisado resultante, se puede modelar como una secuencia de eventos en serie, seguidos de una secuencia de eventos en paralelo, en el que el nivel de daño aumentará hasta que la bacteria no sólo muere, o se ve gravemente afectada en sus funciones vitales, sino también, dado el tiempo suficiente, los componentes químicos de la célula se oxidan totalmente.

La forma de ruta de la modelo cinético incluye: Bacteria activa ( $B_{AC}$ ), Bacteria injuriada (dañada) ( $B_{IN}$ ) y la mortalidad de la población bacteriana ( $B_{DE}$ ) de las bacterias (“DE” por el término Death en inglés), así como varios productos químicos adicionales de la lisis con la denominación genérica de  $LYP_1$ ,  $LYP_2$  ...,  $Lyp_n$ .

#### **III.4.2. MODELADO DE LA REACCIÓN PERÓXIDO-MEMBRANA CELULAR**

En el modelado de la cinética de las reacciones de desinfección con peróxido de hidrógeno una de las principales dificultades se presenta al momento de incluir la participación del  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$  en el mecanismo para producir los radicales hidroxilos (Sies, 1991; Kehrer, 2000), es decir, las reacciones Haber Weis, fenton o fenton-like. La razón principal de esta

dificultad es que no se conocen con precisión las concentraciones de los iones férrico y ferroso. Una posibilidad para hacer frente a este problema es asumir que la reacción está mediada por el hierro o efectivamente el par de iones, que son a concentraciones constantes y que este proceso puede ser incluido como parte de un paso hipotético de la cinética propuesta. La respectiva constante específica de esta etapa representa una parte de un mecanismo, muy simple para generar los radicales hidroxilos. Así, para una determinada familia de bacterias esta sustitución tomará una pseudo constante cinética que permite el desarrollo de la propuesta.

### ***Iniciación***



Se debe notar que cuando la reacción se escribe como anteriormente, sin incluir específicamente el  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $k_1$  no se conoce.

### ***Propagación***



### ***Terminación***



El proceso que termina con la ruptura de membrana bacteriana se puede tratar recurriendo a una interpretación pseudohomogénea de la intrincada red de reacciones superficiales que conduce a la ruptura de la envoltura protectora en las bacterias. Vamos a representar una especie hipotética de los componentes de la pared celular como  $HS_{CW(BAC)}$  ( $HS_{CW}$  por sus siglas en inglés: hypothetical species of cell wall) para las bacterias activas cuya concentración se puede expresar en unidades de  $\text{mol cm}^{-2}$  y que reacciona con el radical  $\text{OH}^\bullet$ . Esta composición es la misma para cada bacteria de una determinada familia de bacterias. Entonces:



En este punto, es posible pensar en  $SSA_{(BAC)}$  como el **área superficial específica por unidad de volumen de una célula** (en unidades de  $\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}$ ), como el volumen de una célula por CFU (en unidades de  $\text{cm}^3$  de CFU<sup>-1</sup>) y  $[BAC]$  como **a toda la concentración instantánea de las bacterias activas** (en unidades de CFU  $\text{cm}^{-3}$ ). Representando  $V_{(BAC)}$  a la **concentración de las especies hipotéticas por unidad de volumen del fluido**, pudiéndose calcularse a partir de la concentración superficial de esta especie mencionado como:

$$\underbrace{\left[ HS_{CW|_{BAC}} \right]}_{\text{Superficial concentration of hypothetical species of one bacterium}} \times \underbrace{SSA|_{BAC}}_{\text{Superficial area per unit volume of bacterium}} \times \underbrace{V|_{BAC}}_{\text{volume of one CFU}} \times \underbrace{[BAC](t)}_{\text{Instantaneous concentration of active bacteria per unit volume}}$$

Instantaneous representation of the total volumetric concentration of hypothetical species of the active bacteria

(III.50)

Teniendo en cuenta los valores promedios para una familia de bacterias específica  $HS_{(BAC)}$ , los valores  $SSA_{(BAC)}$  y  $V_{(BAC)}$  pueden considerarse constantes

$$\left[ \text{HS}_{\text{CW}} \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} \right] \times \text{SSA} \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} \times V \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} = \text{constant} \quad (\text{III.51})$$

$$\underbrace{k_7}_{\text{Pseudo homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_7^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \times \left[ \text{HS}_{\text{CW}} \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} \right] \times \text{SSA} \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} \times V \Big|_{\text{B}_{\text{AC}}} \quad (\text{III.52})$$

Sin embargo, es muy poco probable que un solo radical hidroxilo, produzca un daño grave a la pared celular. Se desconoce también el número de moles de  $\text{OH}^\bullet$  necesarios para golpear a la bacteria, y considerar que la bacteria se ha lesionado, y el número de bacterias que forman la CFU. Siempre es posible concebir un rendimiento de oxidación como la relación de las unidades formadoras de colonias (CFU) lesionadas con respecto a los radicales hidroxilos gastados para producir este evento.

$$k_7^\# = \frac{k_7}{Y_7} \quad ; \quad Y_7 = \frac{\text{Injured CFU}}{\text{OH}^\bullet \text{ spent in this event}} \left[ = \right] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}} \quad ; \quad k_7^\# \left[ = \right] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU s}} \quad (\text{III.53})$$

Con el fin de tener la correcta aplicación de este rendimiento, así como conseguir la homogeneidad de la unidad que debe tener en cuenta que:

$$R_{7,\text{B}_{\text{AC}}} = -k_7 [\text{B}_{\text{AC}}] [\text{OH}^\bullet] \quad (\text{III.54})$$

$$R_{7,\text{OH}} = -k_7^\# [\text{B}_{\text{AC}}] [\text{OH}^\bullet] \quad (\text{III.55})$$

Con este enfoque de reacción biológica pseudo homogénea, el paso 7 puede ser finalmente expresada como:



De manera similar, el mismo procedimiento se puede aplicar a las bacterias dañadas en la reacción con los radicales de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\underbrace{k_8}_{\text{Pseudo homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_8^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \left[ \text{HS}_{\text{CW}} \right]_{\text{B}_{\text{IN}}} \text{SSA}_{\text{B}_{\text{IN}}} \mathcal{V}_{\text{B}_{\text{IN}}} \quad (\text{III.57})$$

$$k_8^{\#} = \frac{k_8}{Y_8} \quad ; \quad Y_8 = \frac{\text{Dead CFU}}{\text{OH}^{\cdot} \text{ spent in this event}} \left[ = \right] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}} \quad ; \quad k_8^{\#} \left[ = \right] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU s}} \quad (\text{III.58})$$

$$R_{8, \text{B}_{\text{IN}}} = -k_8 [\text{B}_{\text{IN}}] [\text{OH}^{\cdot}] \quad (\text{III.59})$$

$$R_{8, \text{OH}} = -k_8^{\#} [\text{B}_{\text{IN}}] [\text{OH}^{\cdot}] \quad (\text{III.60})$$



Este paso (III.61) lleva a la ruptura de la pared celular y a la posterior muerte de la bacteria.

### III.4.3. LISIS DE LAS BACTERIAS MUERTAS

La muerte de la bacteria implica que la pared celular se ha roto permitiendo el acceso del oxidante hacia los componentes intracelulares, produciendo así el lisado:



Donde:

$$\underbrace{k_9}_{\text{Pseudo homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_9^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \times \left[ \text{HS}_{\text{CW}} \Big|_{\text{B}_{\text{DE}}} \right] \times \text{SSA} \Big|_{\text{B}_{\text{DE}}} \times V \Big|_{\text{B}_{\text{DE}}} \quad (\text{III.63})$$

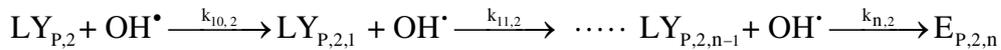
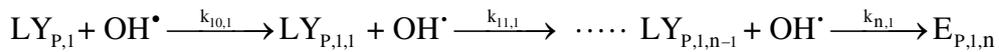
$$k_9^{\#} = \frac{k_9}{Y_9} \quad ; \quad Y_9 = \frac{\text{Lysed CFU}}{\text{OH}^{\bullet} \text{ spent in this event}} \quad [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}} \quad ; \quad k_9^{\#} [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU s}} \quad (\text{III.64})$$

$$R_{9, \text{B}_{\text{LY}}} = -k_9 [\text{B}_{\text{DE}}] [\text{OH}^{\bullet}] \quad (\text{III.65})$$

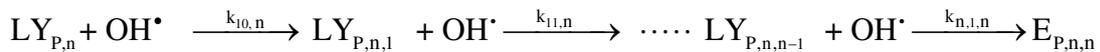
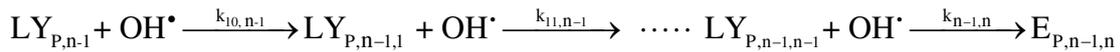
$$R_{9, \text{OH}} = -k_9^{\#} [\text{B}_{\text{DE}}] [\text{OH}^{\bullet}] \quad (\text{III.66})$$

Una vez que la morfología anatómica de la célula ha sido alterada por el lisado, los radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  pueden interactuar con los componentes celulares internos en reacciones típicamente homogéneas. Desde el punto de vista químico, la actividad de los radicales puede ser interpretada en términos de varias reacciones en serie y paralelo con un número indefinido de componentes hipotéticos de la lisis resultante.

En el modelo estos componentes de la lisis están representados por  $\text{LY}_{\text{p},1}$ ;  $\text{LY}_{\text{p},2}$ .. $\text{LY}_{\text{p},n}$  y corresponden a los grupos importantes de compuestos que, después de las oxidaciones ulteriores conducen a los productos finales del proceso de desinfección.



⋮



### III.4.4. REPRESENTACIÓN MATEMÁTICA DEL MODELO

Los parámetros operacionales del proceso pueden obtenerse a partir de la solución de un modelo cinético, derivado de la secuencia propuesta de los procesos que conducen a la destrucción de las células. El cálculo de las velocidades de reacción para cada etapa se lleva a cabo en todas las posiciones del reactor. Sin embargo hay que señalar que para un reactor bien mezclado en la ausencia de efectos externos (por ejemplo, irradiación o mejoras ultrasónicas) las composiciones son uniformes y corresponden a los valores locales. La cinética de la reacción se formula en términos de la ley de acción de masas para todas las etapas propuestas para generar la destrucción bacteriana por el peróxido de hidrógeno. Podemos asumir que:

- (i) El sistema es isotérmico con composiciones perfectamente mezcladas.
- (ii) La aproximación de micro estado estacionario es válida.
- (iii) El primer conjunto de oxidación de los productos de lisado es suficiente para representar el proceso de desinfección.

Si nuestra tercera hipótesis es válida, teniendo en cuenta sólo la primer reacción de oxidación de los subproductos de lisado, debería ser suficiente para representar la reacción de desinfección, incluso si no llega a la oxidación total de los componentes químicos de la célula.

En el esquema de reacción podemos derivar las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}
 R_{OH^\cdot} = & k_1 [H_2O_2] - k_2 [H_2O_2] [OH^\cdot] + k_3 [H_2O_2] [HO_2^\cdot] - k_4 [OH^\cdot]^2 - \\
 & k_6 [OH^\cdot] [HO_2^\cdot] - k_7^\# [B_{AC}] [OH^\cdot] - k_8^\# [B_{IN}] [OH^\cdot] - k_9^\# [B_{DE}] [OH^\cdot] - \\
 & \sum_{i=1}^n k_{10,i} [LY_{P,i}] [OH^\cdot]
 \end{aligned}$$

(III.68)

$$R_{HO_2\cdot} = k_2 [H_2O_2] [OH\cdot] - k_3 [H_2O_2] [HO_2\cdot] - k_5 [HO_2\cdot]^2 - k_6 [OH\cdot] [HO_2\cdot] \quad (III.69)$$

La velocidad de reacción para las bacterias activas y las injuriadas puede representarse a través de las ecuaciones (III.70) y (III.71):

$$R_{B_{AC}} = -k_7 [B_{AC}] [OH\cdot] \quad (III.70)$$

$$R_{B_{IN}} = k_7 [B_{AC}] [OH\cdot] - k_8 [B_{IN}] [OH\cdot] \quad (III.71)$$

La concentración de los radicales OH puede calcularse a partir de la ecuación (III.43)

$$0 \cong k_1 [H_2O_2] - k_2 [H_2O_2] [OH\cdot] + k_3 [H_2O_2] [HO_2\cdot] - k_4 [OH\cdot]^2 - k_6 [OH\cdot] [HO_2\cdot] - k_7^{\#} [B_{AC}] [OH\cdot] - k_8^{\#} [B_{IN}] [OH\cdot] - k_9^{\#} [B_{DE}] [OH\cdot] - \sum_{i=1}^n k_{10,i} [LY_{P,i}] [OH\cdot] \quad (III.72)$$

Sobre la base de evidencias confirmadas, se supone que las velocidades de terminación de los pasos (III.46) y (III.48) son despreciables en comparación con el paso (III.47), que es el paso de terminación predominante, mientras que el paso (III.44) es la etapa de propagación predominante, por tal motivo, la concentración de los radicales hidroxilos puede expresarse:

$$[OH\cdot] = \frac{k_1 [H_2O_2]}{k_2 [H_2O_2] + k_7^{\#} [B_{AC}] + k_8^{\#} [B_{IN}] + k_9^{\#} [B_{DE}] + \sum_{i=1}^n k_{10,i} [LY_{P,i}]} \quad (III.73)$$

El valor de  $\sum_{i=1}^n k_{10,i} [LY_{P,i}]$  puede considerarse como proporcional a la concentración de bacterias muertas. Esta simplificación es posible porque

involucra el mismo nivel de arbitrariedad que todos los términos incluidos dentro de la sumatoria.

$$[OH\dot{]} = \frac{k_1[H_2O_2]}{k_2[H_2O_2] + k_7^{\#}[B_{AC}] + k_8^{\#}[B_{IN}] + (k_9^{\#} + \alpha k_{10})[B_{DE}]} \quad (III.74)$$

Remplazando la ecuación (III.74) en la expresión de la velocidad de reacción para las bacterias activas obtenemos

$$R_{B_{AC}} = - \frac{k_1 k_7 [B_{AC}] [H_2O_2]}{k_2 [H_2O_2] + k_7^{\#} [B_{AC}] + k_8^{\#} [B_{IN}] + (k_9^{\#} + \alpha k_{10}) [B_{DE}]} \quad (III.75)$$

Reordenando, la expresión final de la velocidad de desaparición de las bacterias activas es:

$$R_{B_{AC}} = - \frac{\gamma_A [B_{AC}] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_0 [B_{AC}] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (III.76)$$

Donde:

$$\gamma_A = \left( \frac{k_1 k_7}{k_2} \right); \quad \gamma_0 = \frac{k_7^{\#}}{k_2}; \quad \gamma_1 = \frac{k_8^{\#}}{k_2}; \quad \gamma_2 = \frac{(k_9^{\#} + \alpha k_{10})}{k_2}$$

Reemplazando la ecuación (III.74) en la expresión de la velocidad de reacción para bacterias injuriadas se obtiene:

$$R_{B_{IN}} = \frac{k_1 [H_2O_2] (k_7 [B_{AC}] - k_8 [B_{IN}])}{k_2 [H_2O_2] + k_7^{\#} [B_{AC}] + k_8^{\#} [B_{IN}] + (k_9^{\#} + \alpha k_{10}) [B_{DE}]} \quad (III.77)$$

La expresión final para la desaparición de bacterias injuriadas es:

$$R_{B_{IN}} = \frac{[B_{AC}] [H_2O_2] \gamma_A - [B_{IN}] [H_2O_2] \gamma_{IN}}{[H_2O_2] + \gamma_0 [B_{AC}] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (III.78)$$

Donde:

$$\gamma_{IN} = \left( \frac{k_1 k_8}{k_2} \right)$$

### III.4.5. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor continuo isotérmico, bien mezclado. A continuación, el análisis se realiza con un balance de masas muy simple:

$$R_j = \frac{d[j]}{dt} \quad j = B_{AC}, B_{IN}, B_{DE}, LY_p \quad (III.79)$$

$$t = 0 \quad \begin{cases} [B_{AC}] = [B_{AC}]^0 & \text{for } B_{AC} \\ [j] = 0 & \text{for } j = B_{IN}, B_{DE}, LY_p \end{cases}$$

Los resultados de la simulación para  $j = B_{AC} + B_{IN}$  (bacterias supervivientes) se compararon con los datos obtenidos a partir del cultivo de células de la toma de muestras, empleando un programa informático de optimización multiparamétrica no lineal con el fin de obtener los valores de las constantes de  $\gamma$  k cinética para  $k = A, B, 0, 1$  y  $2$ .

Los valores de los parámetros cinéticos son:

$$\gamma_A = (2.7 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\gamma_{IN} = (9.6 \pm 3.1) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\gamma_0 = (1.5 \pm 0.2) \times 10^{-10} \text{ mol CFU}^{-1}$$

$$\gamma_1 = (4.9 \pm 2.2) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1}$$

$$\gamma_2 = (1.7 \pm 0.2) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1}$$

Con estos parámetros el acuerdo con los datos experimentales se muestra en la Figura (III. 3). El modelo se ajusta razonablemente bien a todos los datos

experimentales para toda la gama de concentraciones de peróxido de hidrógeno exploradas.

Sin embargo, se puede ver que el valor de  $\gamma_0$  es más bien pequeño, por tal motivo es posible reducir los parámetros del modelo cuando se supone que:

$$\gamma_0 [B_{AC}] \ll [H_2O_2] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]$$

Re-escribiendo de las ecuaciones de velocidad obtenidas anteriormente, la expresión final para las bacterias activas y heridas:

$$R_{B_{AC}} = - \frac{\gamma_A [B_{AC}] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (III.80)$$

$$R_{B_{IN}} = \frac{\gamma_A [B_{AC}] [H_2O_2] - \gamma_{IN} [B_{IN}] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (III.81)$$

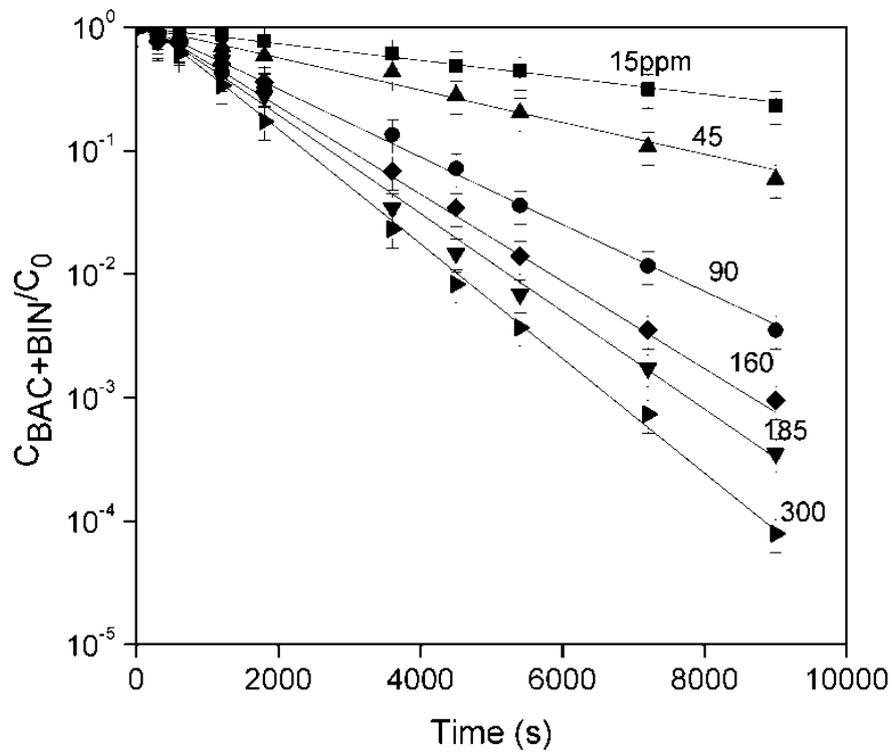


Figura III. 3. Resultados de la simulación con el modelo de cinco parámetros (líneas continuas) comparados con los datos experimentales. La trama presenta a los valores de células cultivables.

Usando esta suposición se obtiene un nuevo conjunto de cuatro constantes cinéticas:

$$\gamma_A = (2.7 \pm 0.0) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\gamma_{IN} = (10.0 \pm 2.8) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\gamma_1 = (5.3 \pm 2.0) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1}$$

$$\gamma_2 = (1.7 \pm 0.1) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1}$$

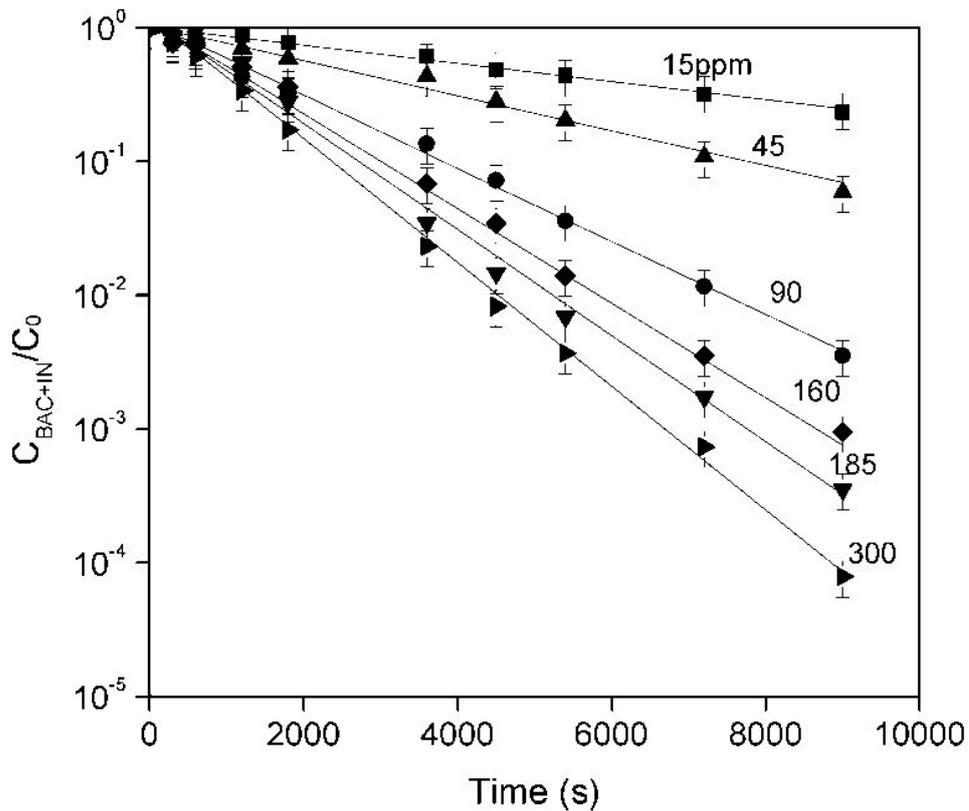


Figura III.4. Resultados de la simulación con el modelo de cuatro parámetros (líneas continuas) en comparación con los datos experimentales. La trama presenta a los valores de las células cultivables.

Se puede observar que el modelo de cuatro parámetros también hace un buen arreglo con los datos experimentales. En este proceso existe una competición por los radicales entre dos grupos: (1) las bacterias muertas y los compuestos resultantes de la formación lisada y (2) las bacterias activas y las injuriadas. La cuestión importante es saber en qué medida las reacciones subsecuentes luego de que las bacterias mueren, afectan a la tasa de desinfección. Estas reacciones corresponden a las constantes cinéticas y  $k_9$   $\alpha k_{10}$ . Ambos se agrupan en  $\gamma_2$ . La importancia de este conflicto puede ser visto por lo  $\gamma_2 = 0$  (ya sea porque  $k_9 = 0$  o  $\alpha k_{10} = 0$  o ambos son cero). Los resultados se muestran en la Figura (III.5)

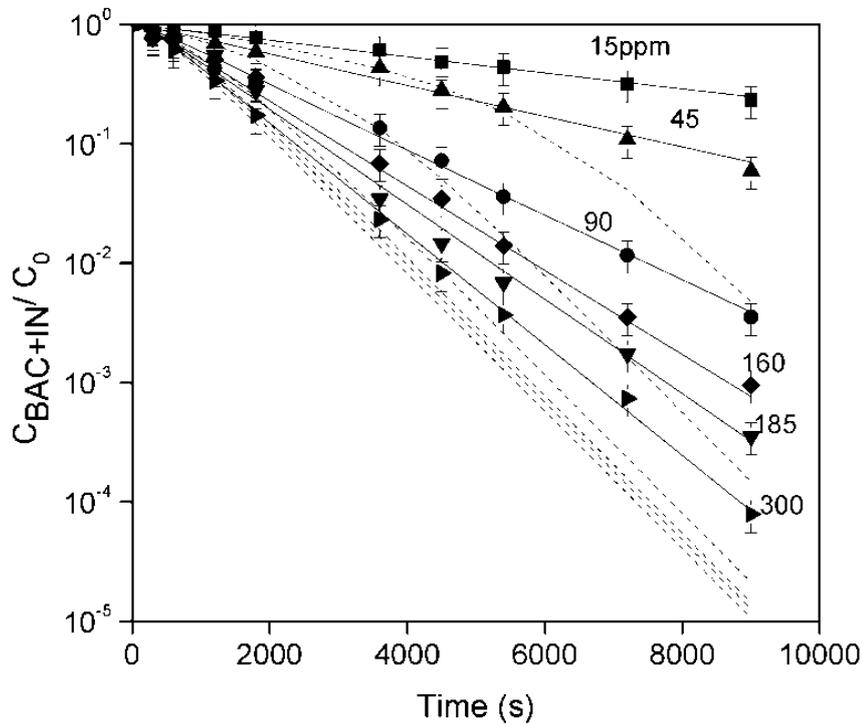


Figura III.5. Resultados suponiendo que se omitió la etapa del lisado. Para  $C_{Ac} + C_{IN}$  en función del tiempo. Las líneas continuas representan el modelo completo, las líneas quebradas:  $\gamma_2 = 0$ .

Se hace evidente que con este supuesto, el modelo predice una degradación mucho más rápida de las bacterias. La implicación es que la competición existente por los radicales  $OH^\bullet$  debería haber sido erróneamente destacada si  $\gamma_0$  se hacía igual a cero, lo que permite llegar a la conclusión de que al menos la etapa correspondiente a la formación del lisado no puede ser ignorada. El aislamiento del efecto correspondiente a cualquiera de  $k_9$  o  $\alpha k_{10}$  no se puede obtener a partir de este modelo, pero sin duda  $\alpha k_{10}$  no puede ser diferente de cero si  $k_9$  era igual a cero antes.

El modelo también proporciona una buena información sobre la forma en que el producen las reacciones de inactivación. Con los parámetros obtenidos es posible seguir los cambios en la concentración de las bacterias activas, lesionadas y muertas. Ellos se muestran en las Figuras III.6 y III.7 para dos diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Se hace evidente que la vida de las bacterias lesionadas es muy corta y su concentración no alcanza valores altos. Este efecto se puede inferir observando los valores de los parámetros obtenidos. Claramente,  $k_8$  es casi cinco veces mayor que la  $k_7$ .

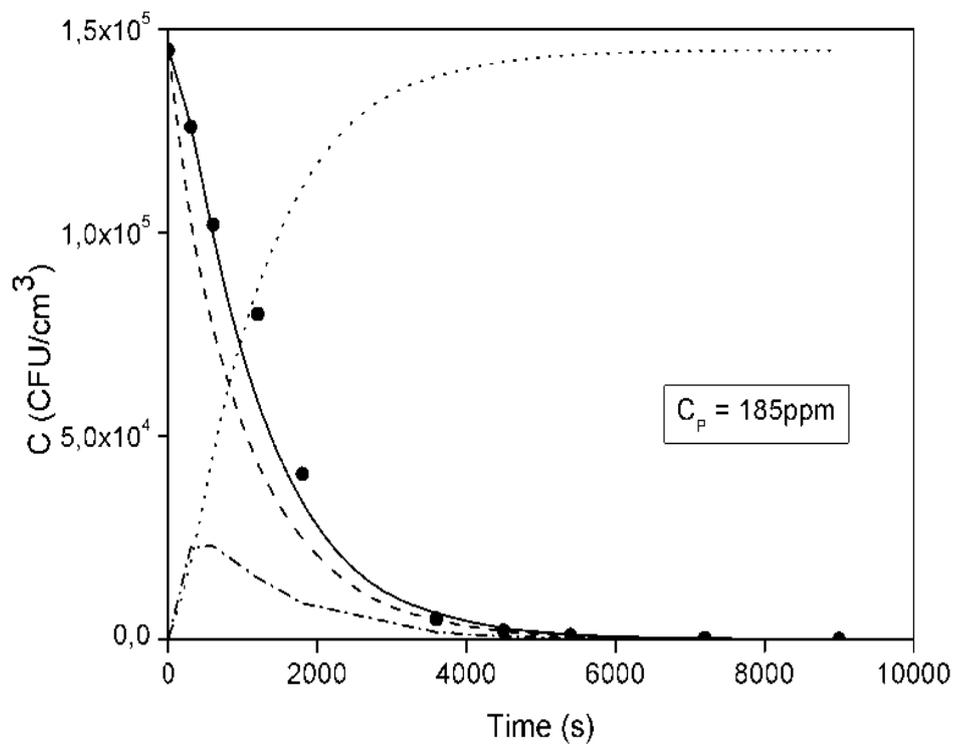
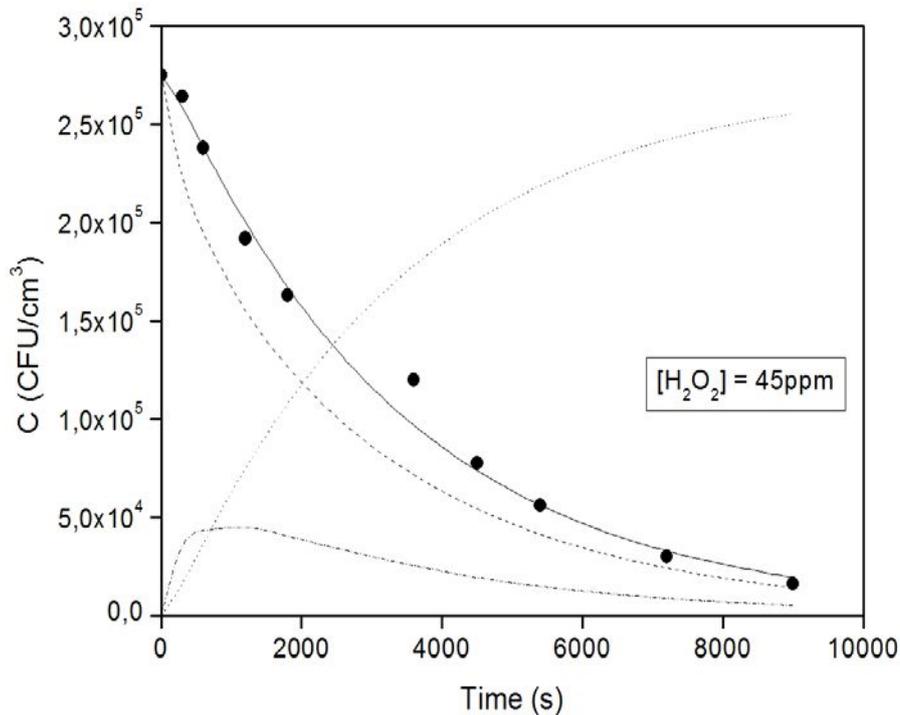


Figura III.6. Descripción gráfica de la evolución del proceso, de acuerdo al modelo. ●: Datos experimentales; línea continua: bacterias cultivables ( $B_{AC} + B_{IN}$ ) línea discontinua: bacterias activas, rota y la línea de puntos: bacterias lesionadas; la línea de puntos: bacterias muertas.



**Figura III.7.** Descripción gráfica de la evolución del proceso, de acuerdo al modelo.●: Datos experimentales; línea continua: bacterias cultivables (BAC + BIN); línea discontinua: bacterias activas, rota y la línea de puntos: bacterias lesionadas; la línea de puntos: bacterias muertas

A partir de estas dos figuras se puede observar también un comportamiento coherente. Cuando se utilizan concentraciones más bajas de peróxido de hidrógeno (45 ppm) se observa la supervivencia de un número importante de bacterias activas y heridas, lo que indica que la oxidación no es suficientemente intensa como para superar la resistencia de la pared celular. Por el contrario, a concentraciones más altas (185 ppm) el número de la supervivientes y las bacterias no dañadas disminuye gradualmente y se produce una ruptura de la pared celular de las bacterias en un tiempo más corto. Entonces, muy rápidamente, se cambia desde el estado de bacterias lesionadas a uno de irreversiblemente muertas. Por esa razón, la concentración de bacterias dañadas es siempre baja. Esto es, al mismo tiempo, una confirmación de que la concentración de oxidante es el factor más importante para afectar a los sitios targets de las bacterias.

### III.4.6. CONCLUSIONES DEL MODELO

Un nuevo modelo cinético para la desinfección química con peróxido de hidrógeno ha sido desarrollado. Los resultados de la simulación con los parámetros proporcionan una muy buena concordancia con los datos experimentales para un amplio intervalo de concentraciones de peróxido de hidrógeno.

El mecanismo propuesto implica una serie de tres pasos heterogéneos (analizados como reacciones Pseudo-homogéneas) seguido de un grupo de reacciones de oxidación de reacciones en serie- paralelo en la fase homogénea .

El proceso de desinfección se caracteriza por los siguientes pasos: (1) La producción de los radicales hidroxilo que se supone que es promovida por un mecanismo Fenton o por reacciones de Haber- Weis - like; (2) Un primer ataque de los radicales hidroxilos para de dañar la pared celular; (3) un segundo ataque por el mismo oxidante , que produce la destrucción completa de la envoltura bacteriana; ( 4 ) la formación de un lisado con todos los componentes de la célula; ( 5 ) la posterior oxidación de las especies químicas resultantes de la lisis de la bacteria .

Las reacciones que conducen a la formación del lisado y la posterior oxidación de los componentes de las células compiten con las bacterias activas y lesionadas por el radical hidroxilo, un fenómeno que con la ayuda del modelo claramente se pudo observar .

De acuerdo con el modelo, la acción que conduce a la destrucción completa de la pared celular de bacteria es más rápida que la que produce el daño, donde se transforma la bacteria activa en bacteria lesionada.

El modelo descrito se basa en una descripción idealizada de la desinfección química, sin introducir una representación conceptual distorsionada de los procesos implicados en la muerte bacteria.

Los parámetros cinéticos obtenidos deben ser independientes del tipo y el tamaño del reactor de laboratorio empleado, siempre y cuando se reproduzcan las condiciones de funcionamiento reportadas, es decir, el rendimiento isotérmico, el pH y las concentraciones de oxidantes.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en: *Chemical Engineering Journal* 198–199 (2012), bajo el título: *Chemical disinfection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - The proposal of a reaction kinetic model (388–396)*. Autores: Flores Marina; Brandi Rodolfo; Cassano Alberto y Labas Marisol (*Apéndice 5-Publicaciones*).

**ACRONIMOS CAPITULO III**

$\underline{x}$	Vector posición, m
$e_{\lambda}^a$	Velocidad volumétrica de absorción de fotones
B	Bacteria
C	Concentración
$C_i$	Concentración del componente i
E	energía radiante, einstein s <sup>-1</sup>
G	radiación incidente, einstein s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>
h	constante de Planck, J s
HS	Especies hipotéticas presentes en una célula bacteriana
I	intensidad específica de radiación, einstein s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> sr <sup>-1</sup>
K	Constante cinética las unidades dependen de la reacción en estudio y de la etapa de la reacción
L	longitud, m
L <sub>py</sub>	Productos de la lisis
$\underline{n}$	Vector unitario normal
N	Concentración de microorganismos
R	Velocidad de reacción, las unidades dependen de la reacción
r	radio
S <sub>g</sub>	coordenada lineal a lo largo de la dirección $\Omega$ , m

SSA	Area superficial especifica (referida a la bacteria)
t	Tiempo(s)
Y	Rendimiento de oxidación

### LETRAS GRIEGAS

$\gamma$	Frecuencia, s <sup>-1</sup>
$\alpha$	absortividad molar neperiana, m <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup>
$\lambda$	longitud de onda, m
$\sigma$	coeficiente volumétrico de scattering, m <sup>-1</sup>
$\kappa$	coeficiente volumétrico de absorción, m <sup>-1</sup>
$\phi$	coordenada esférica, rad
$\theta$	coordenada esférica, rad
$\rho$	coordenada esférica, rad
$\Omega$	ángulo sólido, sr
$\underline{\Omega}$	vector unitario en la dirección de propagación, adimensional
$\Upsilon$	Parámetros del modelo
Y	Coeficiente de transmitancia en la pared

### SUBÍNDICES

AC	activa
IN	Injuriada, dañada
DE	muerta
i	Componente i
Het	heterogéneo
Hom	homogéneo
CW	Pared celular (cell wall)
0	Referido a la concentración inicial

CAPITULO IV  
TÉCNICAS ANALÍTICAS  
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



## **CAPITULO IV: TECNICAS ANALITICAS. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.**

En este capítulo se presenta todo lo referente a las especificaciones de las experiencias realizadas.

Se detallan las técnicas analíticas empleadas para la determinación de la concentración de la solución de trabajo, siembra y recuento de microorganismos. Se describen las técnicas para los ensayos experimentales químicos y microbiológicos.

Se estudia también el crecimiento bacteriano mediante la curva de crecimiento con todas las mediciones necesarias para este fin (concentración de bacterias, absorbancia, temperatura).

Se realiza la descripción del desarrollo de las corridas experimentales, indispensables para el estudio de la cinética de inactivación, así como también ensayos adicionales que completan dicho estudio. Se presentan además, resultados significativos para el posterior análisis de datos y para el modelado cinético.

### **IV.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

Los ensayos experimentales se realizan en un reactor batch, anular, mezcla perfecta (Figura IV.1)

El reactor está compuesto por:

- ✓ Un tanque reservorio de acrílico de 2000 cm<sup>3</sup> de volumen con camisa refrigerante.
- ✓ Un baño termostático (HAAKE) que mantiene la temperatura del líquido constante a 20 °C.



**Figura IV.1. Dispositivo Experimental**

El tanque posee un sistema de agitación orbital mecánica hecho a medida y fuerte, garantizando un eficiente e inmediato mezclado, las características se pueden ver resumidas en la Tabla IV. 1. Además cuenta con dos orificios adicionales por donde se realizan la toma de muestras y la medición de temperatura. Las conexiones entre los elementos del sistema están hechas con mangueras de silicona.

En las corridas experimentales, donde se utiliza radiación, el dispositivo fue irradiado con una lámpara tubular Philips TUV (15 W) que se encontraba en el espacio anular del reactor, separada del líquido por un tubo concéntrico de cuarzo (ver Figura IV.1). Esta es una lámpara de baja presión de vapor de mercurio, conocida como germicida, que produce la mayor parte de su emisión a 253,7nm. El pasaje de luz pudo controlarse debido a la existencia de un interruptor de encendido/apagado.

**Tabla IV.1. Características del Dispositivo Experimental**

Parámetro	Valor
Volumen Total	2000 ml
Radio Interno	3,7 cm
Radio Externo	7,5 cm

Una corrida experimental típica consta de varias etapas que se describen a continuación:

1. Acondicionamiento del dispositivo experimental. Lavado y desinfección-. Para ensayos experimentales con UV se encienden las lamparas30 minutos antes para lograr la estabilidad del sistema.
2. Preparación del inóculo final.
3. Valoración de la solución comercial de APA 15% (v/v).
4. Preparación de la solución de trabajo (Agregado del volumen de APA correspondiente).
5. Toma de Muestra.
6. Siembra de las muestras.
7. Incubación de las muestras.
8. Determinación de la concentración de APA residual.
9. Recuento de bacterias viables.

Previamente a la corrida experimental se debe contar con:

- i. Los medios de cultivos seleccionados para el crecimiento de las UFC.
- ii. Los tubos con agua de peptona para las diluciones seriadas.
- iii. La bacteria incubada a estufa durante al tiempo y temperatura requeridos(inoculo final)

#### **IV.1.1. ACONDICIONAMIENTO DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL:**

Antes de cada corrida se desinfecta el equipo experimental realizando lavados exhaustivos del reactor y de las mangueras conectoras. Primero se realizan dos lavados con hipoclorito de sodio al 1%, luego un lavado con alcohol 70% y por último reiterados lavados con agua destilada estéril (tres lavados mínimo) para garantizar que sean barridos los restos de contaminantes.

Una vez terminado el lavado, se enciende la lámpara UV durante 30 minutos para estabilizarla (en el caso de corridas con UV) además de inactivar cualquier agente que pueda causar contaminación de la muestra a estudiar.

#### **IV.1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO**

La cepa ATCC se encuentra liofilizada por lo tanto, antes de comenzar con la manipulación de la bacteria para la corrida experimental se debe efectuar la reactivación de la misma.

El medio de cultivo complejo que se utiliza es el Caldo Nutritivo cuya composición y especificaciones serán detalladas en el apartado IV.3 de este capítulo. La cepa a utilizar se encuentra en el inicio de la fase estacionaria.

##### ***IV.1.2.1. REACTIVACIÓN DE LA CEPA:***

Partiendo del liofilizado se introduce la muestra del hisopo en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo estándar (20 g/l) y se incuba en una estufa de cultivo (Tecno Dalvo MCI 8) a 37°C durante 24 hs. Luego de este cultivo se toman 2 cm<sup>3</sup> y se colocan en un tubo con 10 cm<sup>3</sup> de caldo nutritivo; este último paso se realiza en tres tubos más y se incuban a 28°C durante 18 hs. De esta manera se tiene la certeza que la cepa esta reactivada.

Una vez la célula bacteriana es viable, se realizan ensayos para verificar la pureza de las cepas en estudio.

#### ***IV.1.2.2. CONSERVACIÓN DE LA CEPA:***

Para conservar la cepa en el laboratorio se procede de la siguiente manera: cada uno de los tubos obtenidos después de la reactivación se siembra por triplicado en tubos estrías con caldo nutritivo agarizado para posteriores repiques. Estos tubos pueden conservarse en la heladera entre 4°C y -6°C sin que se afecte la viabilidad de la bacteria.

#### ***IV.1.2.3. CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN: FUNDAMENTOS.***

Para conservar la cepa y evitar mutaciones y contaminación, se recurre a los métodos de criopreservación, estos pueden ser liofilizado o congelación. Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: i) que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; ii) que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, iii) que estas células permanezcan genéticamente estables. En este trabajo experimental se utilizó un método de conservación a largo plazo. Este método es uno de los más recomendados para preservar las bacterias: se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Los tres factores que

influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

1) ***Edad de las células:*** En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado.

2) ***Velocidad en la congelación y descongelación:*** Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37° C.

3) ***Empleo de agentes crioprotectores:*** Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%.

Si la cepa está pura, de la estría que se encuentra a 4°C se saca una ansada y se la coloca en un tubo con 10 cm<sup>3</sup> de caldo nutritivo, se incuba a 28°C durante 24 hs. Luego se coloca una ansada en un tubo con 10 cm<sup>3</sup> de caldo nutritivo y se incuba 24 hs. Se toma este último tubo, se coloca el cultivo en un erlenmeyer, se completa con caldo nutritivo hasta un volumen de 150 ml y se incuba 25-30 hs, que como se explicará posteriormente, es el tiempo en que la bacteria llega a la fase estacionaria de crecimiento. Este cultivo final se utiliza posteriormente para realizar la corrida experimental, previa dilución con solución fisiológica. En cada etapa del proceso se debe verificar la pureza del cultivo mediante una observación microscópica (coloración de Gram) y una siembra en medio EMB observar las colonias típicas

### **IV.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO PERACETICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA SOLUCIÓN COMERCIAL:**

Los métodos más ampliamente utilizados para el análisis de las soluciones que contienen APA y  $H_2O_2$  son unos métodos de D'Ans y Frey (1914) y su modificación por Greenspan y Mckellar (1951), en estas técnicas, se valora primero el  $H_2O_2$  con permanganato de potasio y el APA residual se determina a continuación mediante la adición de yoduro de potasio a la solución que se titula con tiosulfato de potasio. La determinación precisa de APA se requiere para monitorear los niveles de APA presente en la mezcla cuaternaria de equilibrio.

En la tabla IV.2 se indican los reactivos químicos empleados en este trabajo, indicando su fórmula química, procedencia, grado de pureza y utilización en los distintos procesos y métodos analíticos utilizados.

**Tabla IV.2. Reactivos Utilizados durante la titulación de la solución comercial de APA**

PRODUCTO	FORMULA QUIMICA	ORIGEN	TIPO	UTILIZACION
Solución comercial de Ácido Peracético	CH <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> H	Ciagro		Solución a analizar.
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cicarelli	98% pureza	Titulación de la solución comercial-acidez
Solución de Almidón		Cicarelli	1%	Indicador
Solución de permanganato de potasio (0,1 N)	KMnO <sub>4</sub>	Cicarelli	Pro-análisis	Titulación de la solución comercial-indicador
Solución de tiosulfato de sodio (0,1 N)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cicarelli	Pro-análisis	Titulación de la solución comercial-indicador
Ioduro de potasio	IK	Cicarelli	Pro-análisis	Titulación de la solución comercial

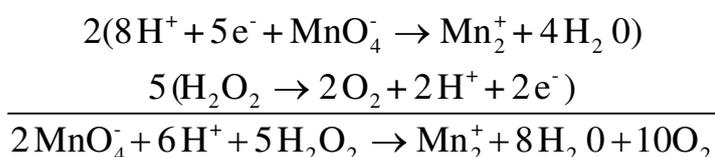
#### ***IV.1.3.1 DETERMINACIÓN DEL TITULO DE LA SOLUCIÓN DE APA 15%.***

En primer lugar se realiza una dilución 1/ 200 de la solución comercial de APA 15%. Se agregan 5 ml de solución comercial con una volpipeta a un matraz de 1000 ml y se enraza con agua destilada. Esta es nuestra solución de trabajo.

#### ***Titulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con KMnO<sub>4</sub> 0,1 N.***

En solución ácida el peróxido de hidrógeno reduce una solución de KMnO<sub>4</sub> de concentración conocida (SPS), con formación de O<sub>2</sub>. Cumpliéndose: meq KMnO<sub>4</sub> ≡ meq H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Reacción química:**



**Técnica Operatoria:**

Se toma una alícuota de la dilución, con una volpipeta de 10 ml, se coloca en un erlenmeyer, al cual se le añaden: 6 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:8 (4N) para obtener pH ácido. Luego se titula con KMnO<sub>4</sub> de normalidad conocida, hasta el primer rosado permanente. Se realizan 2 determinaciones.

**Cálculos:**

Para calcular la concentración, se tiene en cuenta los volúmenes leídos en la bureta en cada una de las dos determinaciones.

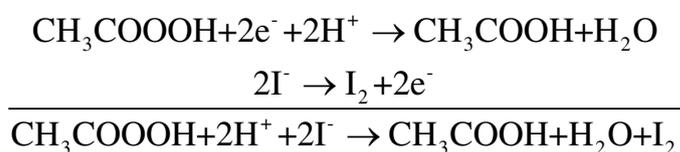
$$\text{ppm H}_2\text{O}_2 = \frac{V_{\text{gastado}} (\text{ml}) \times N_{\text{KMnO}_4} (\text{meq/ml}) \times \text{Peq}_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{meq/ml}) \times 1000 (\text{ml/L})}{V_{\text{vp}} (\text{ml})}$$

**Titulación de PAA con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,1 N.**

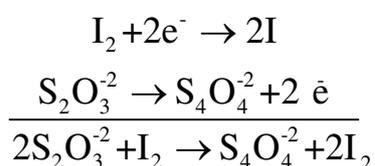
La concentración de ácido peracético se determina yodométricamente. Se toma una alícuota de la muestra (en este caso es la alícuota que se tituló con KmnO<sub>4</sub>), se le añade KI en exceso en medio ácido, y el I<sub>2</sub> liberado es titulado con una solución patrón secundario de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Cumpliéndose: meq S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> ≡ meq I<sub>2</sub> ≡ meq APA. (Los resultados de las titulaciones se encuentran en el Anexo 2 (Experimental)).

**Reacciones químicas:**

**1. Reacción de Oxidación:**



**2. Reacción en la titulación:**



**Técnica Operatoria:**

Se toma una alícuota de la dilución, con una volpipeta de 10 ml, se coloca en un erlenmeyer, al cual se le añaden 150 µl de KI (0,4 g/L).

Luego se titula con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de normalidad conocida, cuando la solución pasa de marrón pardo a amarillo tenue, se agregan 2 ml de solución de almidón 1% (indicador) hasta observar un color oscuro, marrón-azulado. Se continúa titulando lentamente hasta incoloro. Se realizan 2 determinaciones (Figura IV.2 a y IV.2.b).

**Cálculos:**

Para calcular la concentración, se tiene en cuenta los volúmenes leídos en la bureta en cada una de las dos determinaciones

$$\text{ppm APA} = \frac{V_{\text{gastado}} (\text{ml}) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} (\text{meq/ml}) \times \text{Peq}_{\text{APA}} (\text{meq/ml}) \times 1000 (\text{ml/L})}{V_{\text{vp}} (\text{ml})}$$



Figura IV.2. a) Titulación con Permanganato; IV.2. b) Titulación con Ioduro

#### IV.1.4 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

Una vez determinada la concentración de APA y de HP, se procede a realizar la corrida experimental.

En un matraz de 2000 ml se agrega el volumen correspondiente de APA 1/200 y se enraza con solución fisiológica.

Una vez lista la solución se vierte en el reactor, se agita, y luego se agregan los 2 ml de suspensión de *E. coli* de 24 hs de incubación.

#### IV.1.5 TOMA DE MUESTRA.

Las muestras se toman en frascos color caramelo estériles que contienen 200  $\mu$ l de Tiosulfato de sodio 0,1N y 500  $\mu$ l de catalasa al 0,01%. Ambas concentraciones fueron calculadas cuantitativamente para inhibir la acción de los agentes oxidantes y no dañar la concentración bacteriana. Luego de 10 minutos se procede a sembrar en placas de Eosina Azul de Metileno (EMB, por sus siglas en inglés) en flujo laminar (Nuare, Un 425-400E)

La grilla experimental para las corridas de la solución comercial de APA-UV están detalladas en la tabla IV.3 y las corridas experimentales de la solución comercial de APA están detalladas en la tabla IV.4

**Tabla IV. 3 Diseño Experimental: Solución comercial APA+UV**

Número de corridas	Tipo de lámpara	Concentración del agente oxidante	Concentración de bacterias (UFC cm-3)	Tiempos de toma de muestra (segundos)
3	15 W	1 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	2 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	3 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	4 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	5 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	6 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	8 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
3	15 W	10 ppm	10 <sup>5</sup>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

**Tabla IV.4 Diseño Experimental: Solución comercial APA**

Número de corridas	Concentración del agente oxidante	Concentración de bacterias (UFC cm <sup>-3</sup> )	Tiempos de toma de muestra (segundos)
3	1 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	1.5 ppm	10 <sub>5</sub>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	2 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	3 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	4 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	5 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	6 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	8 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	10 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.
3	15 ppm	10 <sup>5</sup>	0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300.

#### IV.1.6 SIEMBRA DE LA MUESTRA:

Una variable muy importante en el estudio cinético de la desinfección es la concentración de bacterias viables. Esta variable es indispensable para el análisis del proceso de desinfección y la resolución del modelo, ya que se sigue la evolución de la concentración del microorganismo para analizar el efecto del ácido peracético y el UV (o la combinación de ambos).

Para determinar la concentración de bacterias presentes en las muestras se optó por la técnica de recuento en placa por siembra en superficie. Este método ofrece la ventaja de cuantificar únicamente los microorganismos viables presentes en una muestra en términos de unidades formadoras de colonia (UFC).

Partiendo de la muestra obtenida en el proceso de desinfección se realizaron diluciones seriadas en tubos estériles con 9,0ml de Agua de Peptona

(Biokar®). Utilizando la pipeta de 1,0ml con punta estéril, se transfirió asépticamente 1,0ml de la muestra de *E.coli* a un primer tubo con 9,0ml de Agua de Peptona estéril (dilución 1/ 10). Se retiró la punta de pipeta y se desechó en un contenedor con Hipoclorito de sodio 1%. Se mezcló la suspensión con un vortex durante unos segundos. Con una nueva punta de pipeta estéril, se transfirió 1,0 ml al siguiente tubo de dilución (dilución  $10^{-2}$ ) y se mezcló en vortex. Se repitió el paso anterior, sucesivamente, hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ . Una vez obtenidas las diluciones sucesivas de la muestra se procedió a realizar la siembra en superficie en placas de petri estériles con medio EMB (2 placas por dilución). Se sembró 0,1ml de cada dilución esparciendo la muestra en todas las direcciones con una espátula de Drigalsky estéril, en la figura IV. 3 a y b se puede observar parte del proceso de siembra de la muestra.

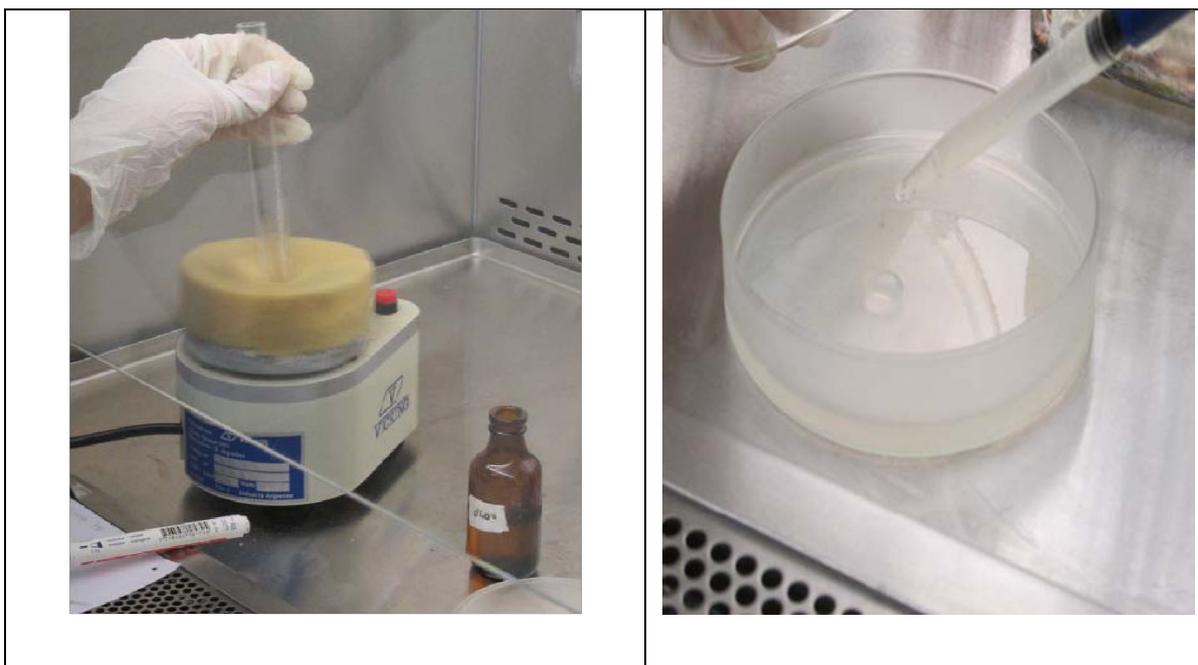


Figura IV.3. a) acondicionamiento de la muestra. b) siembra de la muestra.

#### IV. 1. 7. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS:

Una vez realizada la siembra de todas las muestras, estas se incubaron en posición invertida a 37°C durante 24 horas en una estufa de cultivo. (Figura IV.4)



Figura IV.4. a) Medios de Cultivo para siembra; b) Incubación de placas invertidas de *Ps aeruginosa*

#### IV.1.8. RECUENTO DE BACTERIAS:

Tras la incubación, se observaron las colonias bacterianas sobre la superficie del agar. Se seleccionaron las placas de la dilución que produjo un número de colonias comprendido entre 30–300 y se contó el número de colonias presentes. El resultado se expresó como UFC/ml para lo cual se multiplico el promedio del número de colonias por la inversa de la dilución final de la muestra.

#### IV.1.9. DETERMINACIÓN DEL APA RESIDUAL

La concentración de APA residual se determinó mediante el método del DPD (N,N – dietil – p – fenilendiamina) para lo cual se utilizó un kit comercial de determinación de cloro total (Hach #8167)(Howarth et al., 2010). El kit

consiste en sobres de reactivo en polvo que contienen DPD, ioduro de potasio (KI) y buffer para mantener el sistema de reacción a pH 6,2.

En presencia del ión ioduro ( $I^-$ ), una solución tamponada de APA oxida cuantitativamente el ioduro ( $I^-$ ) a iodo ( $I_2$ ), este último reacciona con el DPD formando un compuesto de color púrpura cuya intensidad es proporcional a la concentración de APA presente en la solución.

#### ***IV.1.9.1. CURVA DE CALIBRADO:***

Para la construcción de la curva de calibrado se partió de una solución de APA de concentración conocida (se inhibió el peróxido de hidrógeno mediante el agregado de catalasa bovina 0,1%). Se prepararon diluciones seriadas de la solución con agua destilada en matraces de 100ml para obtener concentraciones de 0,05 a 2 mg de APA/L (Rango del Kit). Se tomaron 10ml de cada dilución a los cuales se les agregó el contenido de un sobre de reactivo en polvo, se mezcló durante 30 segundos y se midió la absorbancia a 530nm. (Figura IV.5. a. b y c figura IV.5 curva de calibrado y consumo de APA durante los ensayos experimentales)



**Figura IV.5 a. Determinación en el espectrofotómetro Boeco S-22.Vis**



Figura IV.5. b. Distintas concentraciones de APA: mayor intensidad=mayor color

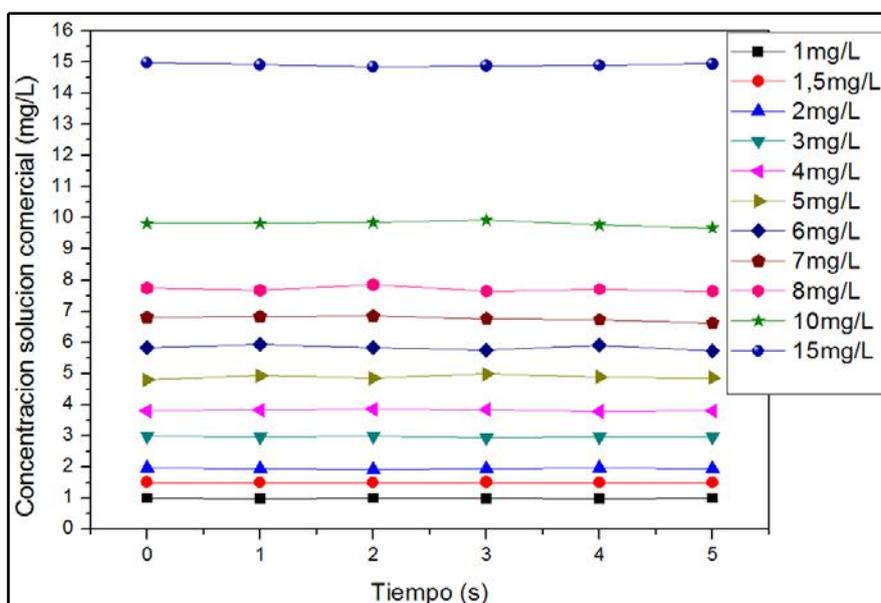


Figura IV.5.c. Consumo de APA durante los ensayos experimentales

## **IV.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS COMPLEMENTARIAS.**

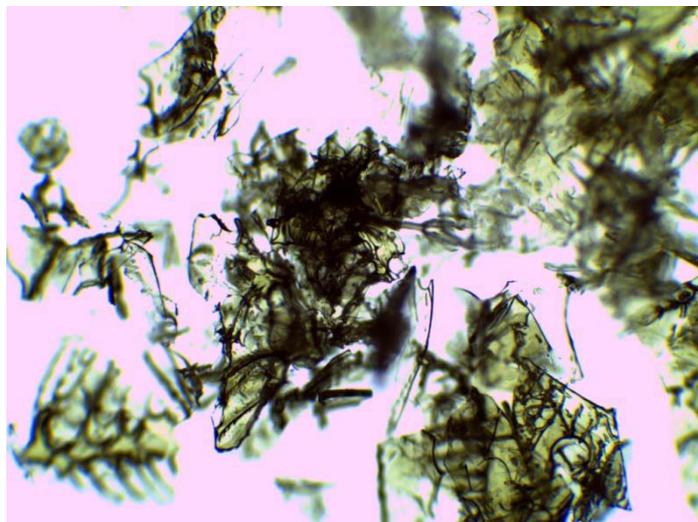
En este inciso se detallaran las técnicas analíticas realizadas adicionalmente a los ensayos experimentales y que completan el estudio de esta tesis doctoral.

### **IV.2.1. MÉTODO DE ADICIÓN DE CATALASA PARA LA ELIMINACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.**

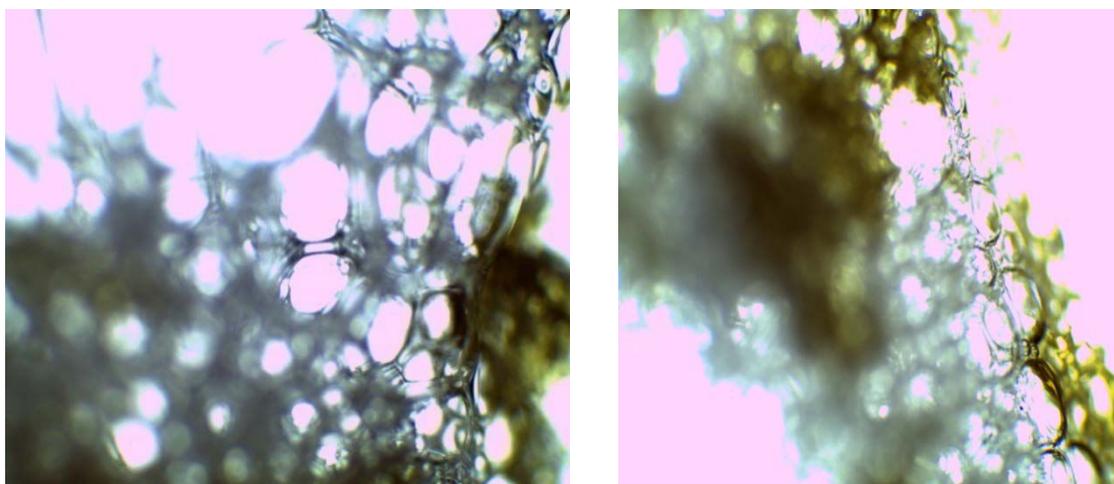
El método de adición de Catalasa emplea catalasa de hígado de bovino (Sigma-Aldrich 2300 unidades/mg), que es una enzima capaz de neutralizar formas tóxicas derivadas del oxígeno (como el  $H_2O_2$ ), que se forman en los ambientes acuosos que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células. La catalasa (Figura IV.6) convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Marín Galvín, 1999). Una unidad de catalasa descompone 1.0  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 7 y a 25° C aproximadamente (Figuras IV.7 a y IV.7.b)

#### ***IV.2.1. 1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL: ADICIÓN DE CATALASA***

En primer lugar se prepara una disolución de catalasa a una concentración de 0.1 g/L con agua destilada. La preparación de esta disolución debe realizarse cada dos días de forma que se mantenga la actividad de la catalasa. Además, esta enzima se inactiva a pH por encima de 8 y por debajo de 5, con lo que las muestras a las que se pretende añadir catalasa deben de ser previamente neutralizadas a un pH entre 6 y 7. Normalmente se añade unas tres veces más catalasa de la necesaria para eliminar el peróxido de hidrógeno presente en las muestras y garantizar una actividad satisfactoria. Para ello se establece una adición de 0.5 mL de la disolución de catalasa a unos 25 mL de muestra y un tiempo de reacción de 10 minutos, para eliminar una concentración de 20 mM de  $H_2O_2$ .



**Figura IV.6. Cristales de Catalasa observados en el microscopio Leica DM 500 (10X)**



**Figura IV.7. a y b) Cristales de catalasa luego de reaccionar con peróxido de hidrógeno.  
Microscopio Leica DM 500 (10x)**

#### IV.2.1.2 EFECTO DEL pH EN LA CATALASA DE *Aspergillus niger* UTILIZADA

La catalasa del *Aspergillus niger* es eficaz bajo un rango muy amplio de pH y de temperatura, y a concentraciones de peróxido de hidrógeno más altas que la catalasa obtenida de fuente animal. La Catalasa del *Aspergillus niger* es especificado en 1000 Unidades Baker por ml.

La Catalasa del *Aspergillus niger* tiene su actividad óptima (probado a 25°C, 1.5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en aproximadamente pH 3 a 9. Arriba de pH 7.0, la actividad disminuye, pero aún en pH 10, más del 50 % de la actividad permanece. En la figura IV. 8 se puede observar la actividad de la catalasa a diferentes concentraciones de pH.

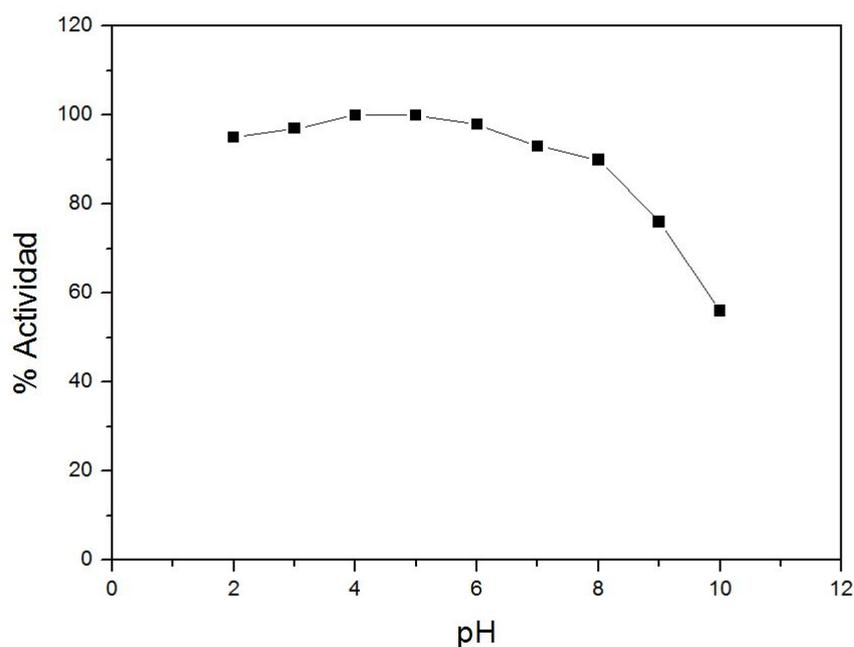


Figura IV.8 Actividad de la catalasa de *Aspergillus niger* a diferentes valores de pH.

#### IV. 2.2. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN DILUIDA DE APA.

Se evaluó la estabilidad de una solución diluida de APA (4 ppm) durante 9 días. La elección de la concentración corresponde al rango de concentraciones de APA utilizadas para desinfectar aguas. Se preparó la solución de acuerdo a lo señalado en el punto IV.1.4 de este capítulo y se determinó diariamente su concentración de acuerdo a lo detallado en el punto IV.1.9. Se mantuvo aislada, en un recipiente color caramelo durante 9 días.

La solución no varió su concentración durante 6 días, permaneciendo estable, luego se redujo un 40%. El ensayo se realizó por duplicado, en la figura IV.8 se observan los resultados obtenidos.

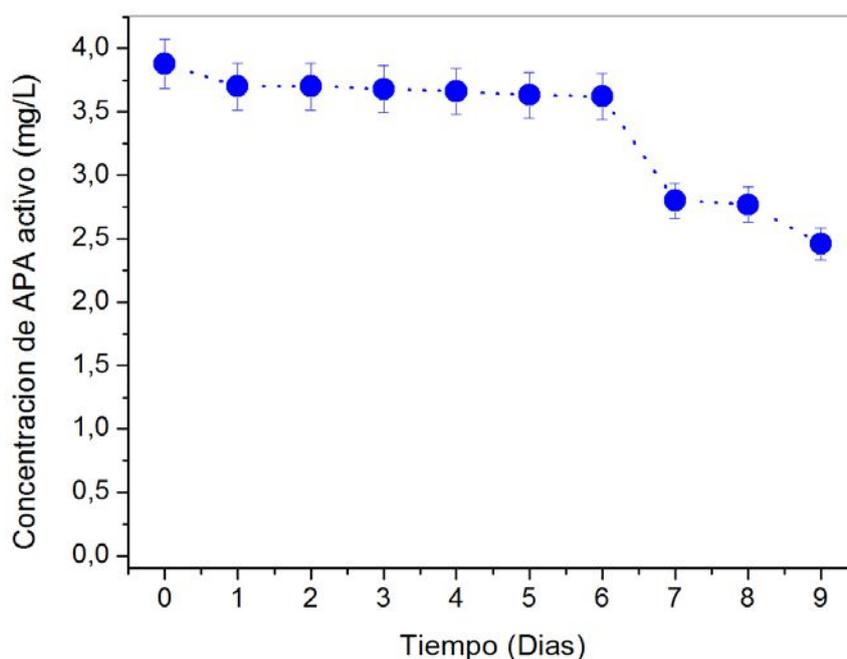


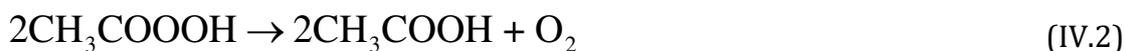
Figura IV.9. Análisis de Estabilidad de la Solución diluida en el tiempo

En las reseñas bibliográficas, se postula que la descomposición del APA se puede realizar por 3 formas diferentes:

1. Por hidrólisis:



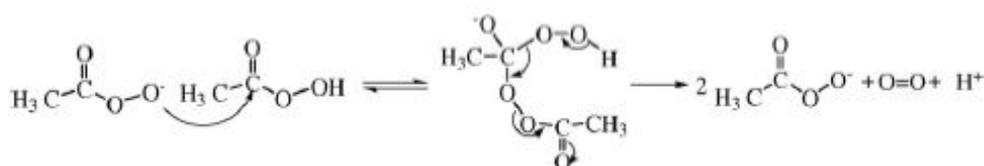
2. Descomposición espontánea:



3. Descomposición catalizada por metales de transición



De acuerdo a Koubet (1964) y Yuan (1997), la descomposición del APA, a un pH cercano a la neutralidad puede estar representada por el siguiente esquema:



Este mecanismo fue propuesto para un rango de pH entre de 5.9 a 10.2. Se propone que el anión perácido juega un papel como nucleófilo y el sitio electrófilo es el carbono carbonilo.

Otros estudios (Ball et al., 1956; 1967) sobre la descomposición espontánea de diversos perácidos mostraron que la velocidad de desaparición del perácido ( $\text{RCOOH}$ ) era de primer orden con respecto a la concentración de anión perácido ( $\text{ROO}^-$ ), y la velocidad de descomposición alcanza su máximo cuando el pH es igual a el pKa del perácido.

Para la solución en estudio, y debido a la concentración de agua presente en la solución cuaternaria de equilibrio (40-42% de agua), la opción de la hidrólisis es la que más representa/ se asemeja a las condiciones experimentales, esta hidrólisis no afecta a los fines prácticos la capacidad desinfectante del APA, ya que los requisitos de estabilidad para los desinfectantes de agua convencionales (como el cloro) se determinan a las 10 horas de aplicado el mismo. Como ha sido probado experimentalmente la solución comercial de APA se mantiene estable por 6 días.

### **IV.3. TECNICAS MICROBIOLÓGICAS:**

#### **IV.3.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS. FUNDAMENTOS. CARACTERÍSTICAS**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Puesto que la diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, la variedad de medios de cultivo es también muy grande. La mayoría de los medios de cultivo se comercializan en forma deshidratada por lo que es preciso rehidratar. La preparación de un medio de cultivo se reduce en general a pesar la cantidad de medio y re-disolverla en agua destilada (libre de inhibidores del crecimiento) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes previamente esterilizados en el autoclave.

Para los microorganismos utilizados en esta tesis doctoral se utilizaron los medios cultivos recomendados para tal fin, optándose por Agar EMB para *Escherichia coli* y para Agar Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **IV.3.2. MEDIO DE CULTIVO PARA *Escherichia coli***

El Levine EMB Agar es un medio adecuado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos, a partir de muestras clínicas, aguas servidas, y otros materiales.

Es recomendado por la American Public Health Association, (APHA) para el análisis microbiológico de productos lácteos y alimentos, y por la convención farmacopea de los Estados Unidos (USP) para la realización de los ensayos de límites microbiológicos.

La fórmula original de este medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram

negativos, la modificación de Levine fue modificar la sacarosa e incrementar la concentración de lactosa, lo que permite una mejor diferenciación de *E. coli*.

Es un medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de enterobacterias. Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante.

Los microorganismos fermentadores de lactosa, originan colonias de color azulado-negro, con brillo metálico. Las colonias producidas por microorganismos no fermentadores de lactosa son incoloras.

Algunas bacterias Gram positivas (cepas de estafilococos, enterococos) y levaduras, pueden crecer, originando colonias incoloras y puntiformes. Este medio de cultivo, es útil para la orientación y no confirmación de especies bacterianas (ya que numerosas cepas de *Citrobacter spp.* producen colonias con brillo metálico), por lo cual es necesario realizar pruebas bioquímicas, para la identificación de género y especie.

Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. La composición de Agar EMB se observa en la tabla IV. 5

**Tabla IV.5. Formula EMB Agar (Levine) en gramos/litro**

Peptona	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Fosfato dipotasico	2.0
Eosina	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar bacteriologico	15

pH Final: 7.2 ± 0.2

#### ***Almacenamiento y Conservación del Medio de Cultivo***

El medio deshidratado debe conservarse en un rango de temperatura de 10-35 °C en un sitio libre de humedad y a resguardo de las radiaciones. Una vez preparado, debe conservarse en heladera, en un rango de temperatura de a 2-8 °C.

#### ***Instrucciones para la preparación del medio***

Se deben suspender 37.5 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos distribuir en placas de Petri estériles.

#### ***Siembra e Incubación***

El sembrado es directo, estriando la superficie o a partir de un caldo enriquecido. La incubación es de 18-24 horas a 35-37 °C en condiciones de aerobiosis.

### *Morfología de las Colonias.*

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se procede al recuento y observación de las colonias, en la tabla VI.6 se detallan las características de crecimiento que presentan las bacterias en este medio (ver Figura IV.9)

Tabla IV.6 Morfología de las colonias en EMB agar.

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC	Bueno a excelente	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	Bueno a excelente	Incoloras



Figura IV.10 Colonias características de *E.coli* en EMB Agar

### **IV.3.3. MEDIO DE CULTIVO PARA *Pseudomonas aeruginosa*.**

El Agar Cetrimide es un medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género. Su fórmula cumple

con los requerimientos de las Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamericana (EP, JP y USP respectivamente).

Su formulación permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. A este medio debe agregársele glicerina, para cumplir con el aporte de los nutrientes para el desarrollo microbiano, el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de pio-cianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*. El agar es el agente solidificante.

La fórmula del Agar Cetrimide se detalla en la tabla IV.7

Tabla VI.7. Formula del Agar Cetrimide en gramos /Litro

Digestión de gelatina pancreatica	20.0
Cetrimide	0.3
Cloruro de Magnesio	1.4
Sulfato de Potasio	10.0
Agar bacteriologico	15

pH FINAL: 7.2 ± 0.2

#### *Almacenamiento y conservación*

EL medio deshidratado debe conservarse en un rango de temperatura de 10-35 °C en un sitio libre de humedad y a resguardo de las radiaciones. Una vez preparado, debe conservarse en heladera, en un rango de temperatura de a 2-8 °C.

### *Instrucciones para la preparación*

Se deben suspender 46,7 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Agregar 10 ml de glicerina. Dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Distribuir en tubos u otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### *Siembra e Incubación.*

El sembrado es directo, estriando la superficie o a partir de un caldo enriquecido. La incubación es de 18-24 horas a 35-37 °C, en condiciones de aerobiosis.

### *Morfología de las colonias*

Las colonias de *Pseudomonas* en Agar cetrimite presentan un color verde brillante (ver figura IV.10). Una vez cumplido el tiempo de incubación, se procede al recuento y observación de las colonias, en la tabla VI.8 se detallan las características de crecimiento que presentan las bacterias en este medio.

Tabla IV.8. Morfología de las Colonias en Agar Cetrimide

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bueno - excelente	Verde fluor
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibido	



Figura IV.11. Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar cetrimide

#### VI.3.4. MEDIO DE CULTIVO PARA REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN: CALDO NUTRITIVO

El caldo nutritivo es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Está descrito en muchos procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros.

Medio no selectivo, contiene triptona y extracto de carne que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el adecuado desarrollo bacteriano.

Puede ser utilizado además, como pre-enriquecimiento en la búsqueda de *Salmonella spp.* a partir de alimentos, ya que permite recuperar células dañadas, diluir metabolitos tóxicos y sustancias inhibitorias. La composición del caldo nutritivo se describe en la tabla IV.9

Tabla IV.9 Formula en gramos /litro del Agar Nutritivo

Triptona	10
Extracto de carne	5
Cloruro de Sodio	5

pH FINAL:  $7.2 \pm 0.2$

#### *Instrucciones para la preparación*

Suspender 20 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos y calentar con agitación frecuente, llevando a ebullición para disolución total. Distribuir en tubos u otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### *Siembra e Incubación*

La siembra es directa a partir de la muestra en estudio. Si se trabaja con hisopo, descargar el contenido del mismo en este medio de cultivo. En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18 a 24 horas.

### *Crecimiento de las colonias*

El crecimiento de las colonias se detalla en la tabla IV.10

**Tabla IV.10 Morfología de colonias en caldo nutritivo**

Microorganismos	Crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	satisfactorio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	satisfactorio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	satisfactorio

### **IV.3.5 MEDIO LÍQUIDO PARA DILUCIONES: AGUA DE PEPTONA.**

El agua de peptona es usada como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos. La concentración del agua de peptona, en gramos/litros es peptona de carne 10 gramos/litro, cloruro de sodio 5 gramos/litro.

#### *Preparación:*

Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

***Siembra:***

Por inoculación directa del material en estudio. Como diluyente: realizar las diluciones 1:10 y 1:100, dependiendo del uso que se le quiera dar.

***Incubación:***

Aeróbica, a 35-37 °C durante 18-24 horas.

***Almacenamiento:***

Medio deshidratado: a 10-35 °C. Medio preparado: a 2-8 °C.

## **VI.4. TRATAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO.**

Como ya se detalló, ambas cepas ATCC se adquirieron liofilizadas por lo tanto, antes de comenzar con la manipulación de la bacteria para los ensayos experimentales, como *E.coli* fue el principal microorganismos estudiado, para verificar su pureza se realizaron pruebas de coloración y pruebas bioquímicas específicas.

### **VI.4.1. TÉCNICAS DE TINCIÓN GRAM**

El procedimiento para la tinción de Gram distingue 2 grupos de células. Las que retienen el colorante primario son llamadas "Gram positivo" y las que pierden el color primario y toman otro colorante de contraste, llamadas "Gram negativas". El mecanismo se basa en las características fisicoquímicas de las estructuras de la pared celular de los microorganismos (desarrollado en el *Capítulo II*).

El procedimiento para la tinción se detalla a continuación:

1. Preparar y fijar un frotis de la muestras por analizar pasándola suavemente en la flama del mechero.
2. Cubrir con colorante de violeta de genciana. Esperar 1 minuto.

3. Escurrir el colorante de violeta de genciana sin enjuagar y cubrir con solución Gram yodo. Esperar 1 minuto.
4. Lavar con solución de alcohol acetona hasta decoloración.
5. Cubrir el frotis con colorante de safranina. Esperar 1 minuto.
6. Lavar repetidas veces con agua corriente hasta que no haya restos del colorante.
7. Secar al aire y observar al microscopio de luz.
8. Preparación de un frotis

Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con objeto de separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida. Este frotis debe ser posteriormente fijado al vidrio del portaobjetos para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados. La fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología y bacteriana y las posibles agrupaciones de células que pudiera haber.

#### *Realización del frotis*

Se coloca una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio. Es necesaria muy poca cantidad de agua, por lo que se puede usar el asa de siembra, ya que en el extremo curvo de su filamento queda retenida una mínima gota de agua, que resulta suficiente.

Se flamea el ansa de siembra, tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua. Remover la mezcla con el ansa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.

Si la muestra se toma de un cultivo en medio líquido, no es necesario realizar los dos primeros pasos ya que basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el ansa de siembra, directamente sobre el portaobjetos.

Se debe esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el porta a la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el porta pues las células pueden deformarse o romperse.

### *Fijación de las bacterias al portaobjetos*

La fijación se realizó por dos técnicas diferentes:

Por calor (cuando se tomó muestras bacterianas de medio sólido): Se hizo pasar tres veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos.

Con metanol (para bacterias procedentes de medio líquido): Se añadieron unas gotas de metanol sobre la extensión completamente seca. Para esta técnica se debe golpear el portaobjetos por su canto con cuidado contra la mesa de trabajo para retirar de inmediato el exceso de metanol. Esperar a que el metanol se evapore completamente.

Una vez realizado el frotis y fijadas las bacterias, las preparaciones pueden ser observadas al microscopio, aunque carecen de contraste. Lo normal es continuar con el proceso de tinción en la figura IV. 12. se observan los pasos detallados.



Figura IV.12 a) preparación de porta objetos con agua, b) toma de muestra para la tinción; c) fijación a la llama

#### *Examen microscópico de la tinción*

Se realiza luego el examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determina así la forma y el Gram del microorganismo en estudio. También es importante determinar la agrupación y otras características morfológicas de interés.

En la figura IV.13 a y b se observan las colonias típicas de *E.coli* y *P. aeruginosa* luego de la tinción Gram.



IV.13 a). *E. coli* (Gram -)



IV.13.b) *Ps aeruginosa* (Gram -)

#### IV.4.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS

Se realizan pruebas secundarias y terciarias para determinar las especies.

##### IV.4.2.1. PRUEBAS IMVIC PARA *Escherichia coli*

Son cuatro pruebas que se utilizan para distinguir bacterias coliformes entre sí. Las pruebas son: Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato.

##### 1) *Investigación de la producción de Indol.*

Con esta prueba bioquímica se mide la capacidad del microorganismo de producir indol a partir de la molécula de triptofano. Sirve para diferenciar *Escherichia coli* y distintas especies del género *Edwardsiella* (+) de especies de los géneros *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (-).

##### *Materiales:*

- ✓ cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- ✓ tubos con caldo triptona.
- ✓ ansa.
- ✓ reactivo de Kovacs: alcohol amílico + paradimetilbenzal-dehído en medio ácido.

##### *Procedimiento:*

- i. Inocular tubos conteniendo caldo triptona. Dejar un tubo sin inocular como control.
- ii. Incubar a 37 °C durante 48 horas.
- iii. Determinar la presencia de indol utilizando el reactivo de Kovacs. Para ello, colocar en un tubo de ensayo 1 ml de medio, agregar 0,1 ml de reactivo y dejar reposar hasta la formación de un anillo.
- iv. Observar coloración. Interpretación de los resultados

**Prueba positiva:** un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica (corresponde a la formación de un compuesto quinónico coloreado derivado del indol).

**Prueba negativa:** anillo amarillo en la superficie del medio en la capa alcohólica (ausencia de indol en medio de cultivo).

## **2) Investigación de la producción de acetil metil carbinol (Voges Proskauer) y ácidos (rojo de metilo).**

Con estas dos pruebas se estudia qué tipo de fermentación (butilenglicólica o ácido mixta) realiza el microorganismo en estudio.

La prueba de Voges-Proskauer sirve para comprobar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir de la fermentación (butilenglicólica) de la glucosa. Esta prueba permite diferenciar *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* (+) de *Escherichia coli* y otras especies de *Klebsiella* (-).

La prueba del rojo de metilo sirve para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación (ácido mixta) de la glucosa. Esta prueba permite diferenciar *Escherichia coli* (+) de distintas especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* (-).

### **Materiales:**

- ✓ cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- ✓ tubos con caldo glucosa fosfato.
- ✓ ansa.
- ✓ reactivos para la determinación de acetil-metil-carbinol (solución alcohólica de naftol al 5% y
- ✓ KOH al 40%
- ✓ reactivos para la determinación de ácido (solución de rojo de metilo 0,1%).

***Procedimiento:***

- i. Inocular tubos conteniendo caldo glucosa fosfato. Dejar un tubo sin inocular como control.
- ii. Incubar a 37°C durante 48 horas.
- iii. Dividir el contenido de cada uno de los tubos en dos partes iguales. En una mitad, investigar la presencia de acetil-metil-carbinol y en la otra la presencia de ácidos.

***Para determinar acetil-metil-Carbinol:***

- i. Agregar 0.6 ml de solución alcohólica de naftol al 5%.
- ii. Agregar 0,2 ml de solución de KOH al 40%.
- iii. Agitar y dejar en reposo 5-10 minutos.
- iv. Observar la coloración resultado.

***Para determinar ácidos:***

- i. Agregar al cultivo 10 gotas de solución de rojo de metilo 0,1%.
- ii. Observar la coloración.

***Interpretación de resultados:***

***Voges-Proskauer***

***Prueba positiva:*** color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína).

***Prueba negativa:*** sin cambio de color (color amarillo) en la superficie del medio.

**Rojo de Metilo:**

**Prueba positiva:** el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un color rojo definido (pH= 4,4) en la superficie del medio.

**Prueba negativa:** color amarillo (pH= 6) en la superficie del medio.

**3) Investigación del aprovechamiento de citrato**

Se usa para determinar la capacidad del microorganismo para utilizar citrato como única fuente de carbono.

Permite diferenciar especies de *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (+) de *Escherichia coli* y especies de *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Actinobacillus* (-).

Materiales:

- ✓ cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- ✓ tubos con caldo citrato de Koser.
- ✓ ansa.

**Procedimiento:**

- i. Inocular tubos conteniendo caldo citrato de Koser. Dejar un tubo sin inocular como control.
- ii. Incubar a 37°C durante 48 horas.
- iii. Observar la presencia o ausencia de crecimiento.

**Interpretación del resultado:**

**Prueba positiva:** hay crecimiento (turbidez).

Los resultados para *Escherichia coli* puede observarse en la figura IV.14

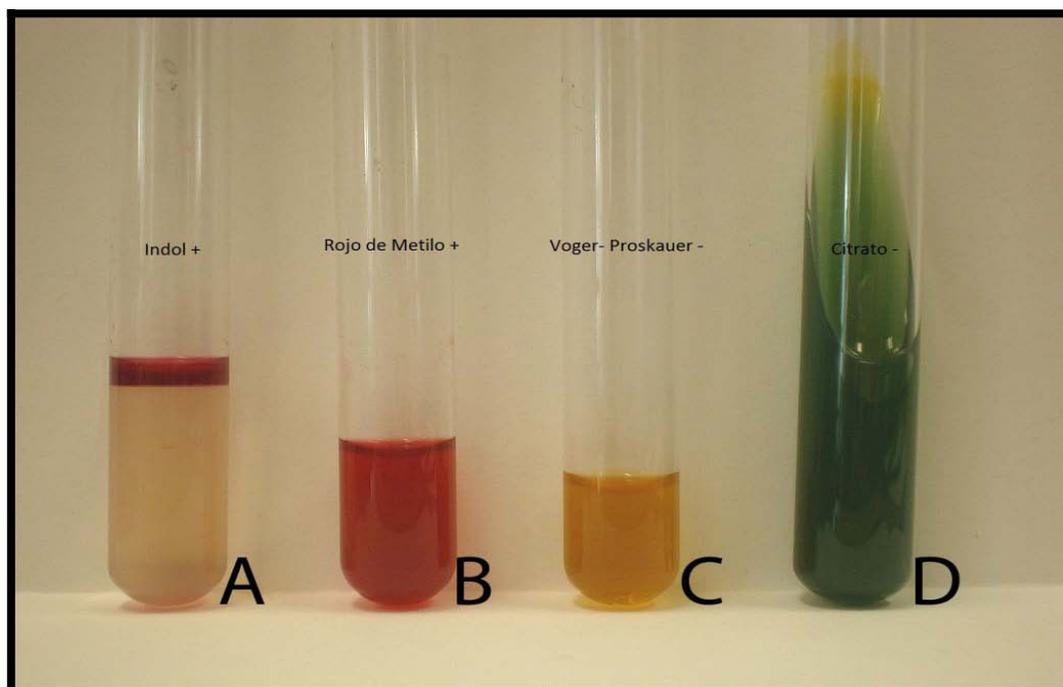


Figura IV.14. Pruebas bioquímicas para identificación de *E.coli*

#### IV.5. MEDIDA DE ABSORBANCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

Es importante conocer a que longitud de onda absorben los medios de cultivo con los que se prepara el inóculo bacteriano utilizado en las corridas experimentales, especialmente cual es la absorbancia que tienen a la longitud de onda utilizada en corridas experimentales con radiación UV germicida (253.7 nm). Para confirmar esa variable a cada uno de los medios de cultivo estériles se lo sometió a un barrido espectral en el espectrofotómetro UV/Vis (PERKIN-ELMER) Lambda 40.

El caldo nutritivo fue diluido 1/20 con solución fisiológica y el valor de absorbancia a 253.7 nm es de 0.60 con una celda de 1 cm de paso óptico, es decir un valor de 12 cuando el medio no está diluido (Figura IV. 15).

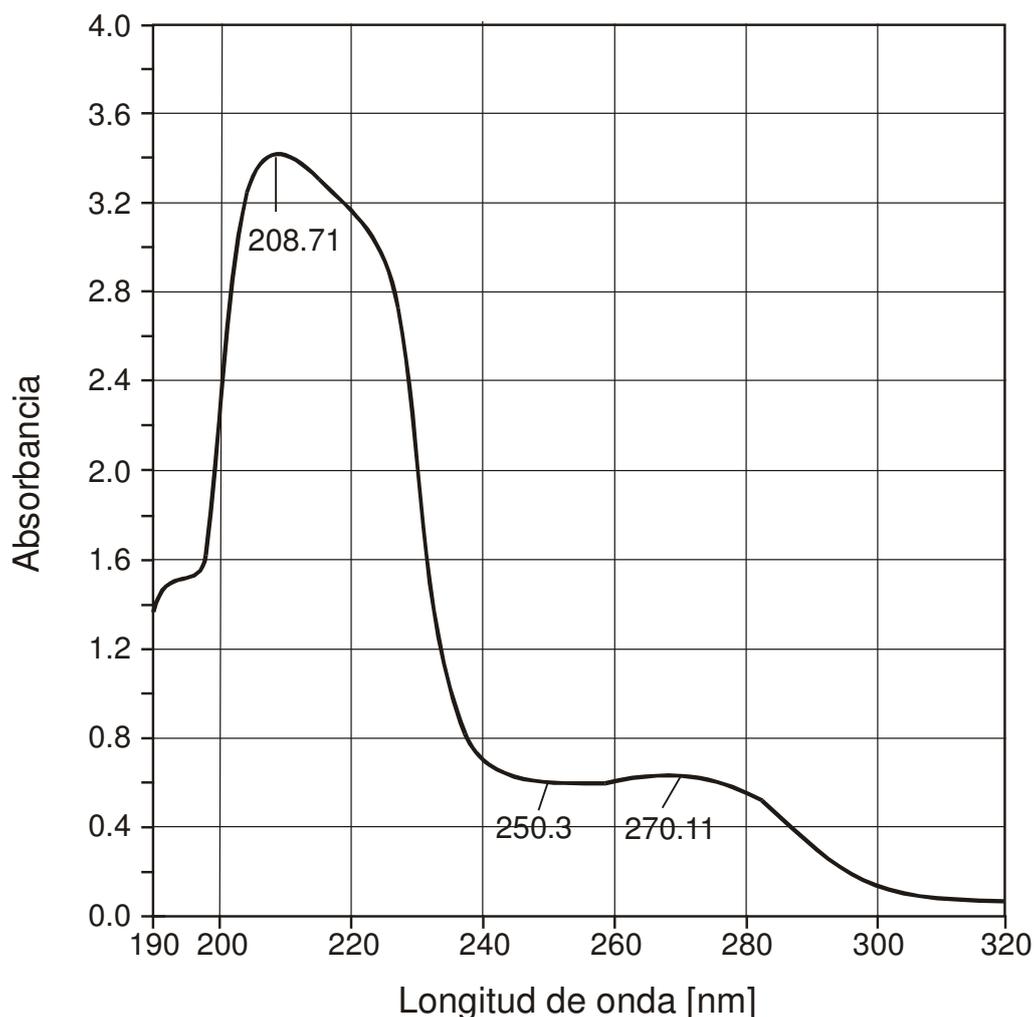


Figura IV.15. Barrido espectral del medio: caldo nutritivo

Se podría concluir que a 253.7 nm la absorbancia es poca y esto no interferiría entonces con la acción del UV sobre las bacterias, ya que no hay competencia con el medio. Además el medio está diluido, eso disminuye aún más la absorbancia

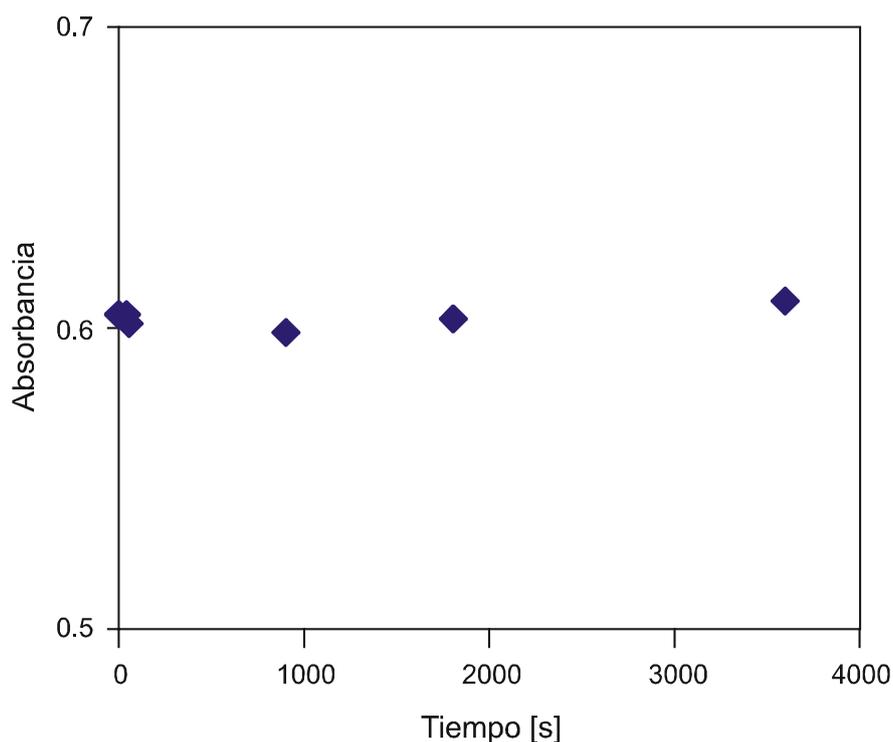
#### IV.5.1 ESTABILIDAD ÓPTICA DEL MEDIO DE CULTIVO

Al ser el medio de cultivo una de las especies absorbentes, la variación de su coeficiente de absorción durante una corrida experimental significaría un inconveniente que se deberá tener en cuenta. Entonces es necesario verificar la

estabilidad óptica del coeficiente de absorción del medio de cultivo cuando se lo irradia con radiación ultravioleta.

Para ello, se trabaja con los dos medios de cultivos a utilizar en este caso. El caldo nutritivo es diluido 1/20 con solución fisiológica (Roux-Ocefa), se lo coloca en el dispositivo experimental, se lo hace circular y se encienden las lámparas, irradiando de esta manera al cultivo. Se toman muestras a intervalos regulares se las coloca en frascos color caramelo y se mide de cada una la absorbancia a 253.7 nm.

En esta parte del trabajo se comprobó que los valores de las absorbancias medidas se mantienen relativamente constantes durante un tiempo prolongado (Figura IV.16)



**Figura IV.16. Absorbancia del caldo de cultivo irradiado con UV.**

## **IV.6. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO**

### **IV.6.1. DEFINICIÓN DE CRECIMIENTO**

En cualquier sistema biológico, el crecimiento puede ser definido como el aumento ordenado de todos los componentes químicos. El aumento de masa, por sí sólo, podría no indicar un crecimiento real, ya que las células pueden estar incrementando únicamente su contenido de productos de reserva, tales como el glucógeno o el polihidroxibutirato. En un medio adecuado, y al cual se han adaptado perfectamente, las bacterias se encuentran en un estado de crecimiento equilibrado. Durante un período de crecimiento equilibrado, una duplicación de la biomasa va acompañada de una duplicación de todas las demás propiedades medibles de la población, por ejemplo, proteínas, ARN, ADN y agua intracelular. En otras palabras, los cultivos en crecimiento equilibrado mantienen una composición química constante. La existencia del crecimiento equilibrado simplifica la tarea de medir la velocidad de crecimiento de un cultivo bacteriano; como la velocidad de crecimiento de todos los componentes de la población es la misma, la medida de cualquier componente basta para determinar la velocidad de crecimiento (Stanier et al., 1985).

### **IV.6.2. CURVA DE CRECIMIENTO**

Cuando se trabaja con una bacteria en particular, en este caso la *E. coli*, es fundamental la realización de una curva de crecimiento en un sistema cerrado representando así lo que ocurre en la naturaleza.

Esta curva tiene un importante significado por dos razones; una es conocer el tiempo de generación de la bacteria para así conocer su velocidad de crecimiento (o viceversa) y otra es conocer el tiempo en que llega a la fase estacionaria, que como se ha mencionado, el inicio de esta etapa es el elegido para realizar las corridas experimentales.

Las poblaciones microbianas raramente mantienen un crecimiento exponencial a altas velocidades durante largo tiempo. La razón es obvia, si se consideran las consecuencias del crecimiento exponencial. Al cabo de 48 horas de crecimiento exponencial, una sola bacteria con un tiempo de duplicación de 20 minutos podría originar una descendencia con un peso total de  $2.2 \times 10^{31}$  gramos (el peso de una célula bacteriana de tamaño medio es de 10-12 gramos), es decir, unas 4000 veces el peso de la Tierra (Stanier et al., 1985). El crecimiento de las poblaciones bacterianas está limitado normalmente o bien por el agotamiento de los nutrientes disponibles o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia, la velocidad de crecimiento disminuye y el crecimiento llega a detenerse. En este punto se dice que el cultivo está en fase estacionaria (Figura IV.17). La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un período de crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades.

En las experiencias de laboratorio se realizan cultivos en sistema cerrados, como realmente ocurre en la naturaleza, donde no existe aporte continuo de nutrientes, como tampoco extracción de células ni sustancias de desecho.

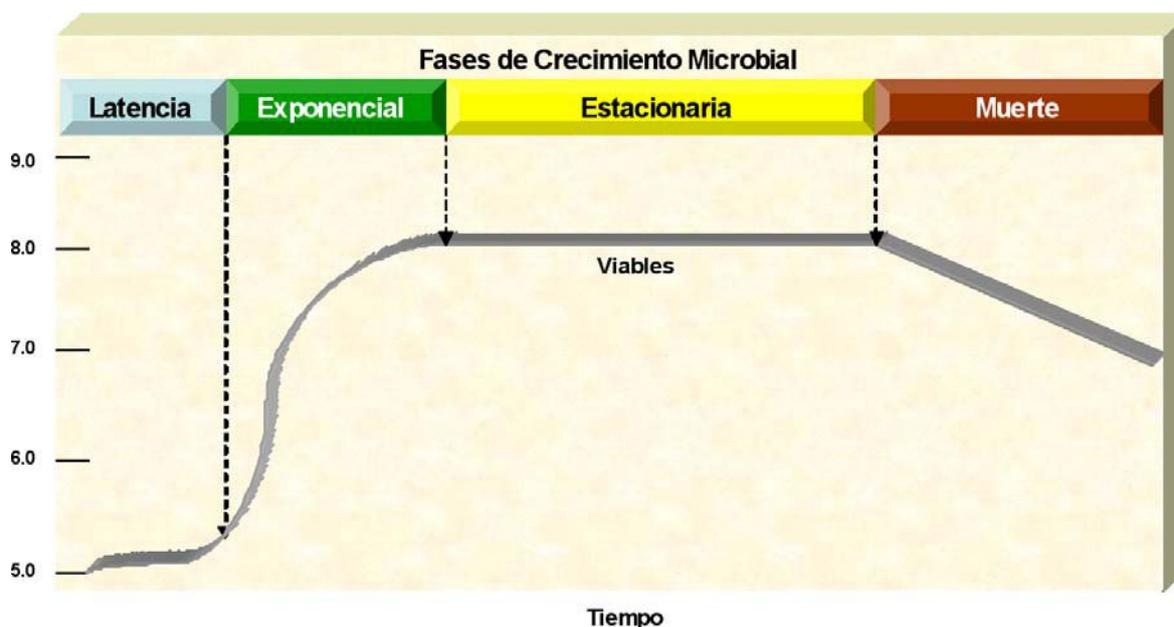


Figura IV.17. Fases de crecimiento bacteriano.

### IV.6.3. ETAPA EXPERIMENTAL

Para realizar una curva de crecimiento se parte de un cultivo de la bacteria elegida a la cual se le quiere estudiar su comportamiento. Dependiendo de la fase en que se encuentra el microorganismo la fase de latencia será diferente. (Labas et. al, 2004).

En este trabajo se realizan curvas de crecimiento con cultivos de bacterias reactivadas en medio complejo (caldo nutritivo). Para comenzar se toma un tubo de este cultivo, se realiza un repique a un tubo que contiene 10 ml de de caldo nutritivo y se incuba a 28 °C durante 18 horas para asegurar que la bacteria se encuentra en una etapa activa de desarrollo (fase exponencial) como luego se comprueba en la curva de crecimiento. Este tiempo se elige para que la fase de latencia sea lo más corta posible comenzando así más rápidamente la etapa de crecimiento exponencial.

Luego de las 18 hs se realiza una dilución (1/2000) del cultivo activo en nuevamente en caldo nutritivo. La dilución se realiza en dos pasos; primero se

toma 1 ml del cultivo y se enrasa con medio de cultivo estéril un matraz de 10 ml (dilución 1/ 10) y luego se toman 0.5 ml de esta dilución y se enrasa con medio de cultivo estéril un matraz de 1000 ml (dilución 0.5/ 1000).

Se toma una muestra de 1 ml de esta dilución y se siembra por duplicado en placas de Petri que contienen EMB agar tomándose como tiempo cero (0) y el recuento resultante de esta siembra es la concentración de *E. coli* a tiempo cero (0) ( $C_{Ec}^0$ ). Las placas sembradas se incuban 24 hs en una estufa de cultivo a 37 °C y la dilución se incubaba en una estufa a 37 °C.

Posteriormente se toman muestras cada dos (2) horas aproximadamente hasta las 32 hs, luego se toman cada 3 o más horas hasta evidenciar la fase de muerte. Cada una de estas muestras se siembra en las placas de EMB y se incuban 24 hs a 37°C. Esta experiencia se llevó a cabo durante 115 horas y fue replicada en dos experiencias de las mismas características. Así mismo, cuando se realizaron cada una de las preparaciones del inóculo de ensayo para las corridas experimentales con irradiación se tomaron muestras esporádicas para reafirmar la curva.

El recuento de las placas se realiza en varias etapas, precisamente cada 24 horas, que es el tiempo en que la *E. coli* logra las características típicas para un mejor recuento.

La curva obtenida cumple con todas las etapas esperadas como se ve en la figura IV.18 y tabla IV.11.

Debido a que se estudió la “inactivación” es importante destacar que en todos los estudios relacionado con las bacterias realizados en esta tesis lo que se mide son bacterias “viables”, es decir, aquellos microorganismos con capacidad de replicarse.

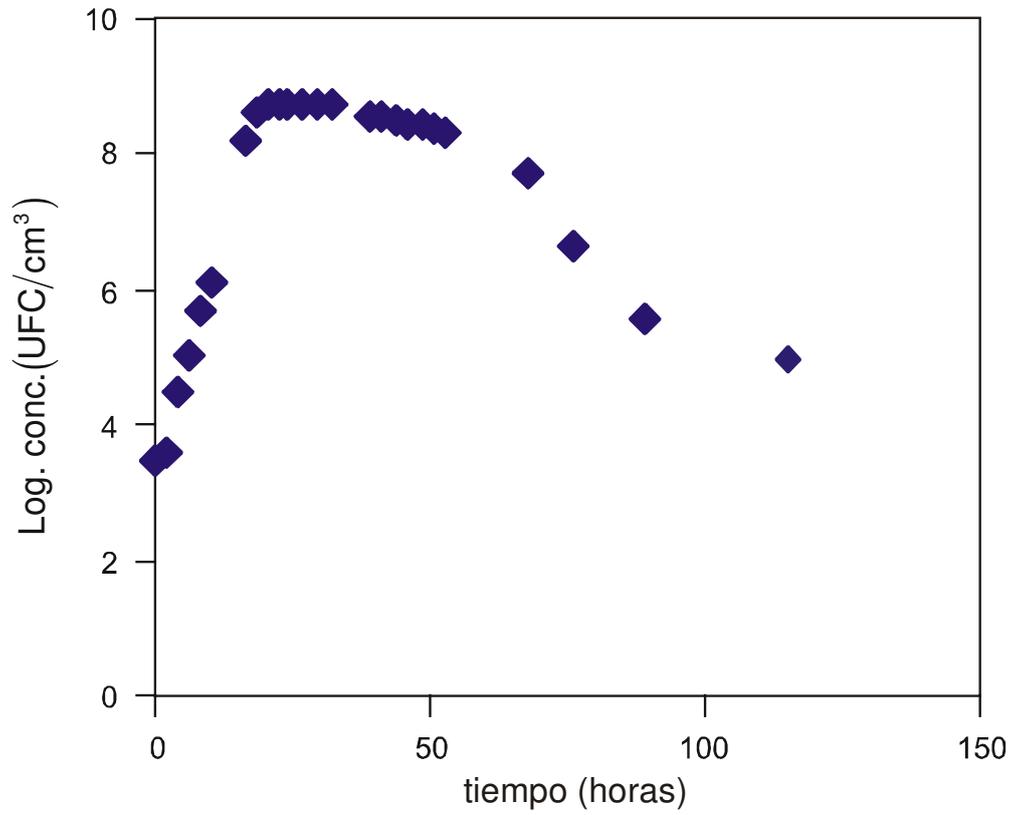


Figura IV.18. Curva de crecimiento experimental

Tabla IV. 11 Tabla de valores de crecimiento de *E.coli*

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Concentración bacterias (UFC/cm<sup>3</sup>) 10<sup>-6</sup></b>
0	0.0028
2	0.0040
4	0.0324
6	0.1080
8	0.5000
10	1.2400
12	14.5000
16.5	155.8000
18.5	410.0000
20.5	580.0000
22.5	580.0000
24.5	590.0000
27	520.0000
29.5	550.0000
32	520.0000
39	390.0000
41	350.0000
43.5	300.0000
46	290.0000
48.5	280.0000
51	250.0000
53	200.0000
68	52.0000
76	4.2000
89	0.3500
115	0.1000

### VI.6.3.1. MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA

A cada una de las muestras obtenidas en los tiempos respectivos de la curva de crecimiento se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/ Vis (PERKIN-ELMER) Lambda 40 a 253.7 nm, observándose algo muy particular. Hasta las primeras 12 hs de la experiencia, el valor de la absorbancia es cercano a la del medio de cultivo solo manteniéndose relativamente constante. A las 16 horas aproximadamente este valor se incrementa hasta llegar a un valor de absorbancia mucho mayor que el inicial aproximadamente a las 18 hs, permaneciendo, otra vez, en valores similares (Figura IV.19)

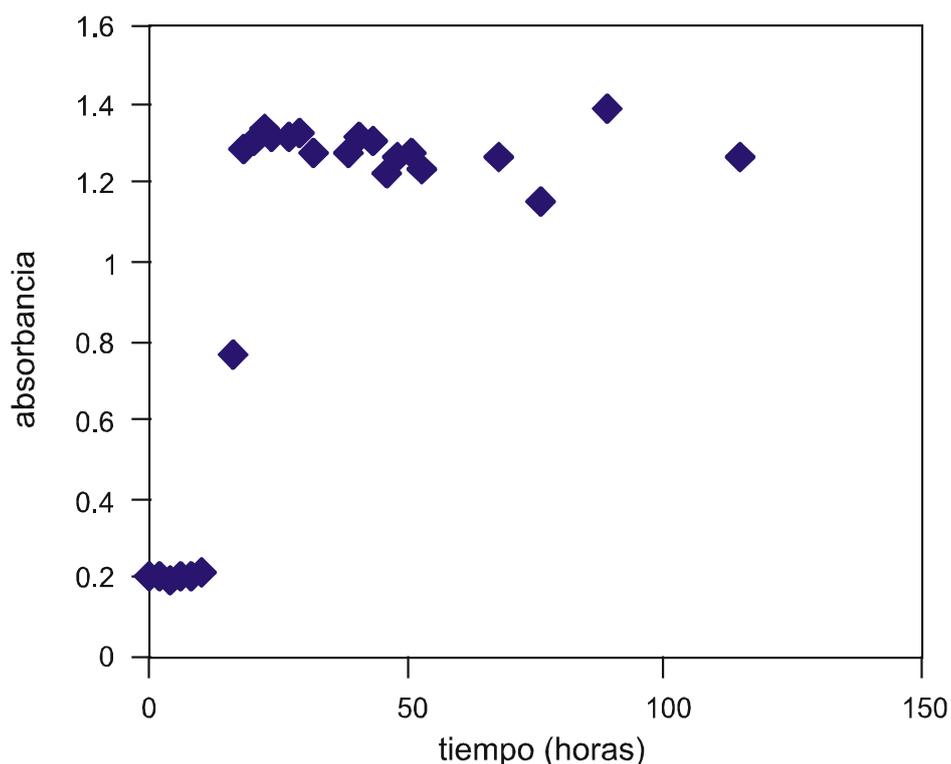


Figura IV.19. Curva de Absorbancia según el crecimiento

Tabla IV.12. Datos experimentales de las absorbancias medidas en la curva de crecimiento

Tiempo (horas)	Absorbancia
0	0.2649
2	0.2599
4	0.2516
6	0.2659
8	0.2657
10	0.2767
12	0.2767
16.5	0.7614
18.5	1.2839
20.5	1.3044
22.5	1.3341
24	1.3149
27	1.3176
29.5	1.3258
32	1.2726
39	1.2771
41	1.3141
43.5	1.3027
46	1.2206
48.5	1.2676
51	1.2763
53	1.2501
68	1.2622
76	1.2535
89	1.3823
115	1.2662

Estos altos valores de absorbancias son posiblemente productos de la fermentación de la glucosa (piruvato que se convierte en ácido láctico, acético y fórmico) pero no presentan inconvenientes en las corridas experimentales ya que la dilución del inóculo final es elevada evitando así probables efectos de “protección” o crecimiento de la bacteria

El propósito de este capítulo fue describir en detalle cada uno de los procedimientos y técnicas de laboratorio utilizadas en esta tesis para evaluar la eficiencia del APA y su combinación con UV como desinfectantes del agua. Han sido descritos los materiales y métodos para la ejecución de los experimentos y los procedimientos de cultivo, siembra y recuento microbiano, además de los ensayos para verificar la pureza de la cepa.

# CAPÍTULO V

DESINFECCIÓN.

ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL  
UV



## CAPÍTULO V. DESINFECCIÓN APA COMERCIAL-UV

### V.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Para estudiar la desinfección de aguas con radiación UV y su combinación con un agente oxidante se realizaron ensayos experimentales en un fotorreactor, utilizando APA comercial combinado con UV.

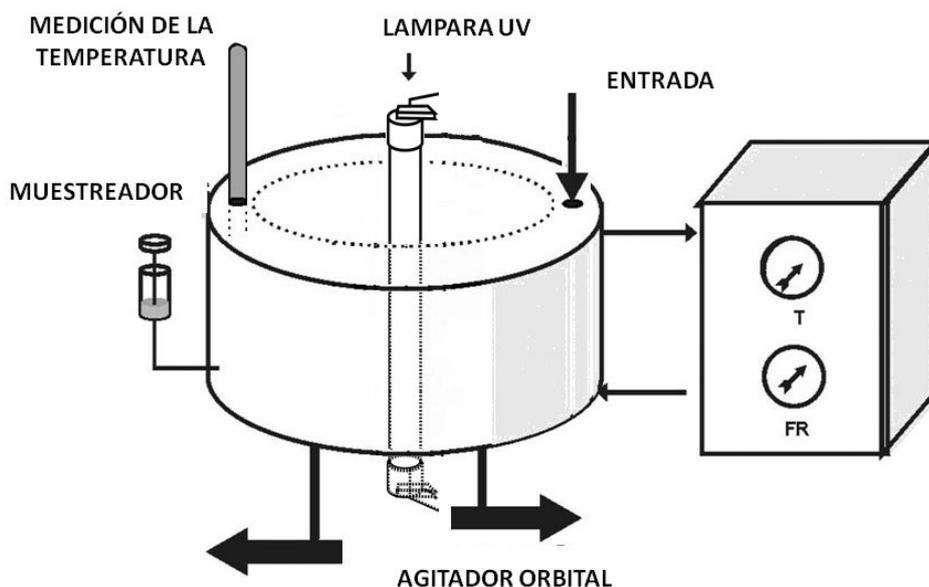
Las corridas experimentales se realizaron de acuerdo a lo descrito en el *Capítulo IV. Desarrollo Experimental. Técnicas Analíticas*. Una corrida experimental típica para la desinfección de agua utilizando radiación UV y UV+APA comercial consta de varias etapas que se mencionan a continuación:

1. Acondicionamiento del dispositivo experimental.
2. Preparación del inóculo.
3. Encendido de la lámpara 30 minutos antes de los ensayos.
4. Lavado del dispositivo experimental.
5. Valoración de la solución comercial de APA 15% (v/v).
6. Preparación de la muestra (Agregado del volumen de APA correspondiente).
7. Toma de Muestra.
8. Siembra
9. Recuento

En estos ensayos se trabaja con un medio complejo (Caldo nutritivo), la dilución del inóculo final fue de 1/1000 para lograr que la solución que se introdujo en el dispositivo se asemeje a "aguas claras", previo a un proceso de desinfección y para evitar inconvenientes, como reproducción bacteriana. El detalle a destacar en estos experimentos es la limpieza y el encendido de la lámpara UV, Philip TUB de 15 W30 minutos antes de los ensayos, para lograr la estabilidad (Figura V.1 Esquema del dispositivo experimental).

Los tiempos de toma de muestra y las condiciones experimentales son detallados extensamente en el *Capítulo IV*. La toma de muestra se realiza cada 1

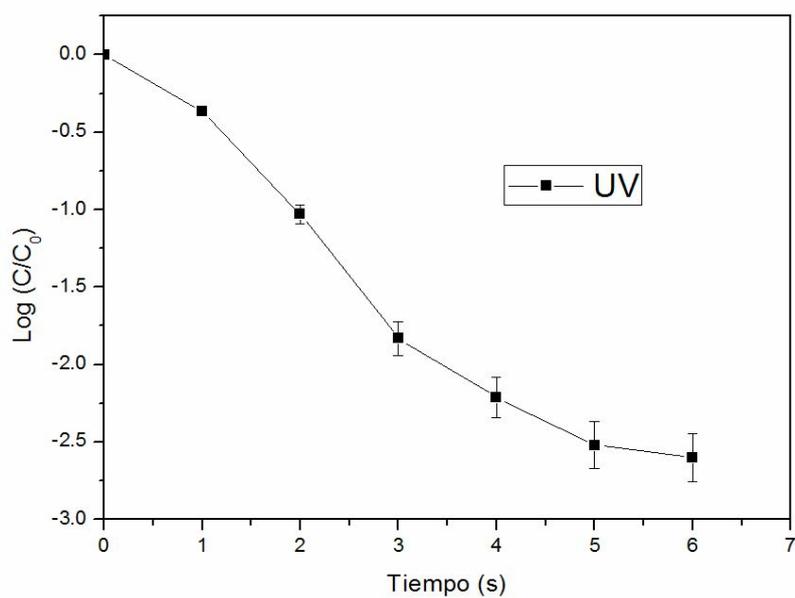
segundo, con un dispositivo desarrollado para tal fin. Los frascos colectores poseen tiosulfato de sodio y catalasa para inhibir la acción del APA y del HP respectivamente e impedir así, que sigan ejerciendo su poder oxidante antes del sembrado.



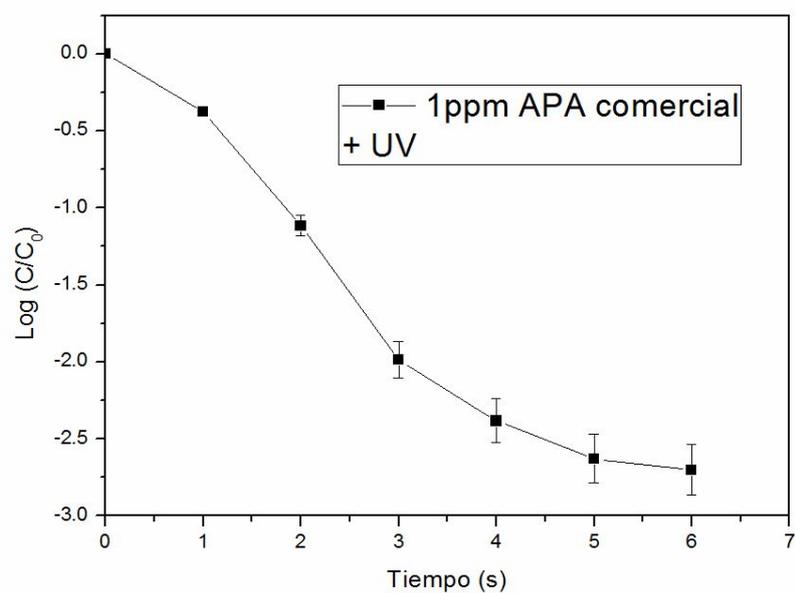
**Figura V.1. Esquema del Reactor experimental.**

Luego del recuento en placas de Petri se grafica la concentración bacteriana ( $\log C/C_0$ ) de *E. coli* versus tiempo(s). En las figuras V. 2 a V. 11 a manera de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en una corrida utilizando lámparas germicidas UVC (Philips) de 15 W. Como se notará el último recuento válido es a los 7 segundos, en tiempos posteriores los valores no cumplían las reglas de recuento en placa o no se obtenía desarrollo de bacterias. Los ensayos experimentales se realizaron por triplicado y la siembra por duplicado.

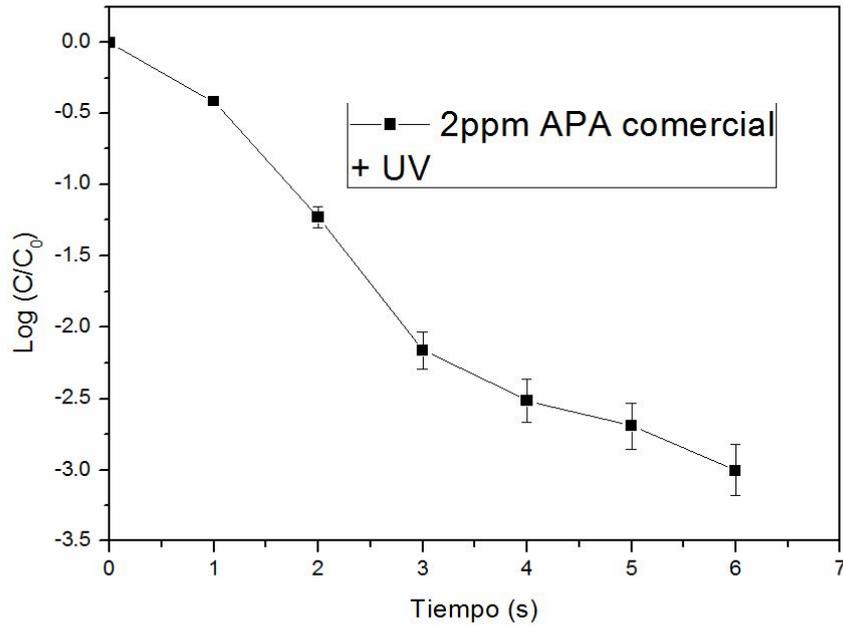
Se presentan las figuras correspondientes a los ensayos experimentales con UV y UV+APA comercial.



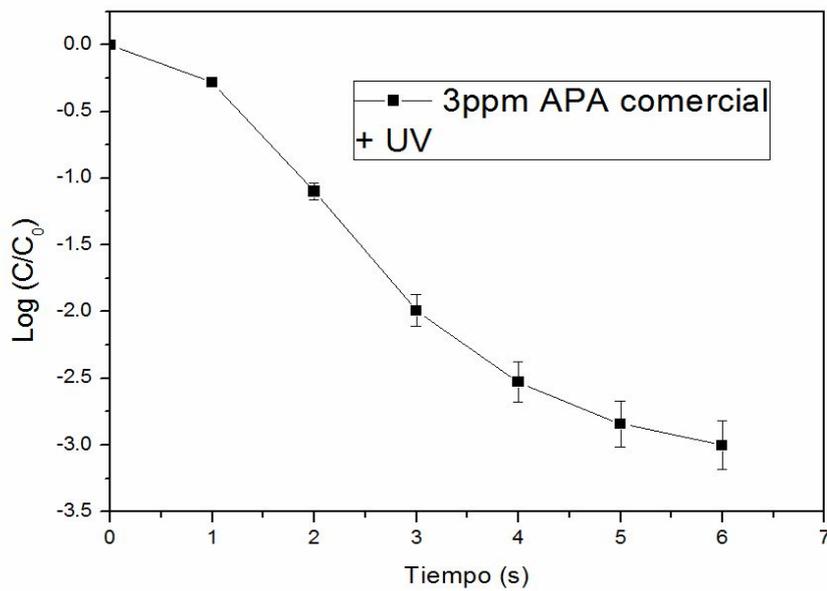
**Figura V.2. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV C**



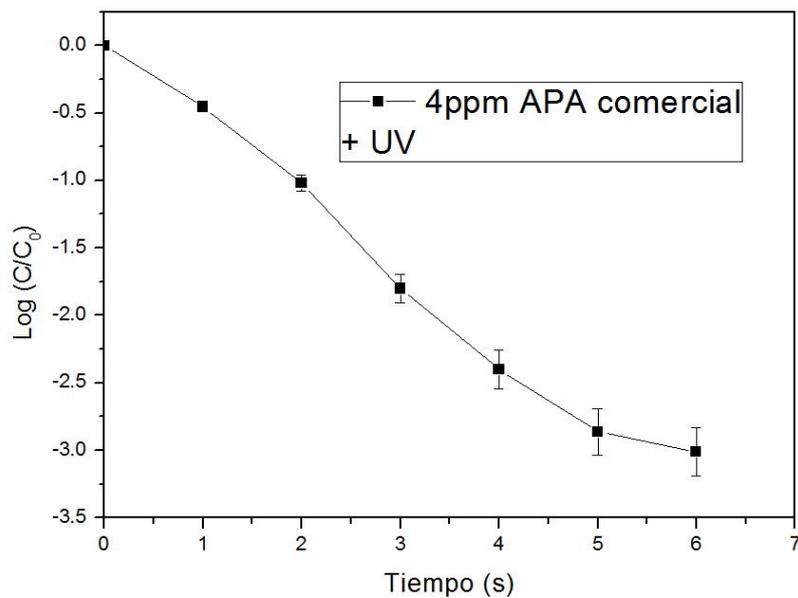
**Figura V.3. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 1ppm de APA comercial**



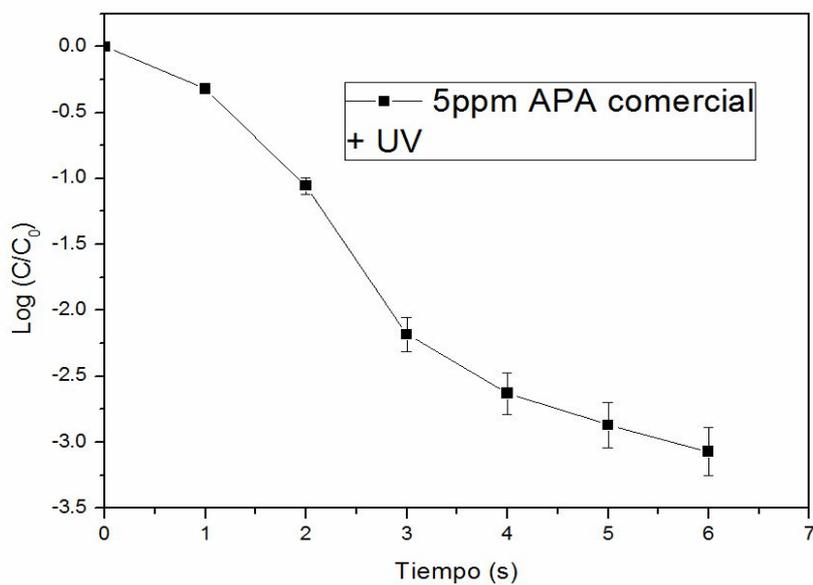
**Figura V.4. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 2ppm de APA comercial**



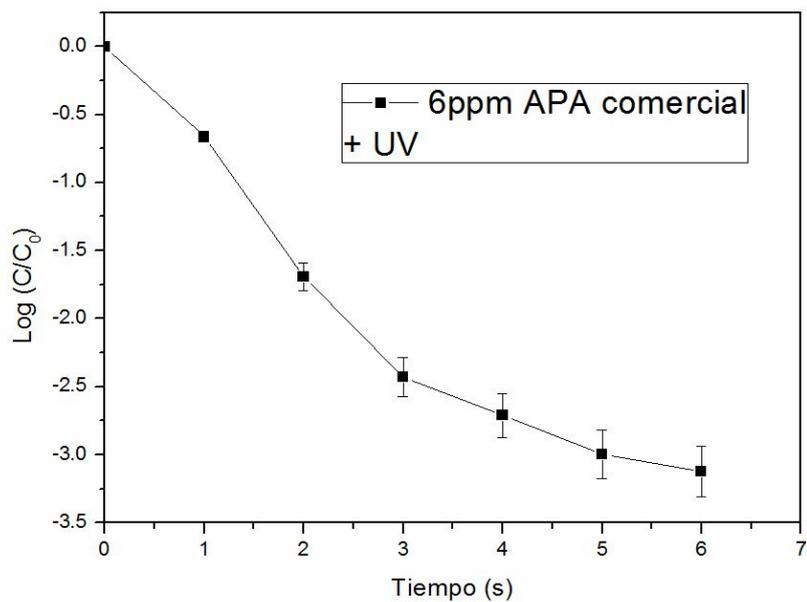
**Figura V.5. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 3 ppm de APA comercial**



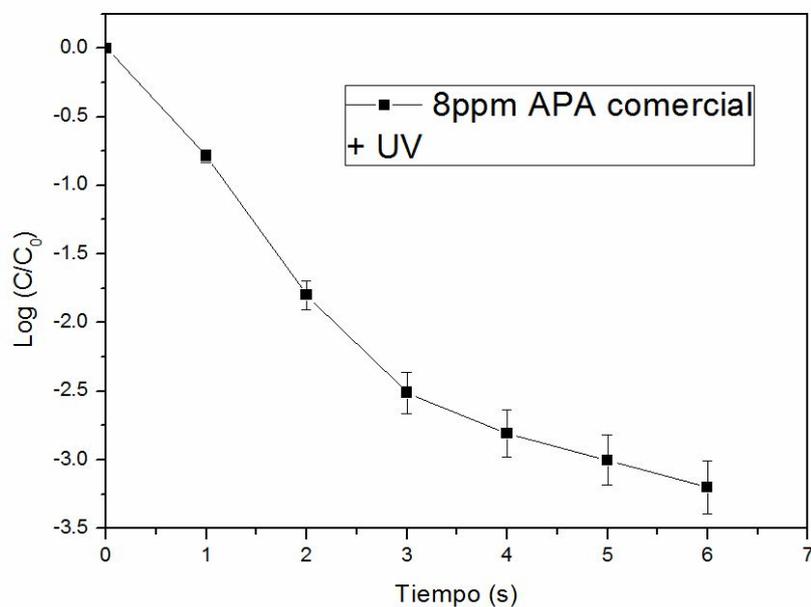
**Figura V.6. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 4 ppm de APA comercial**



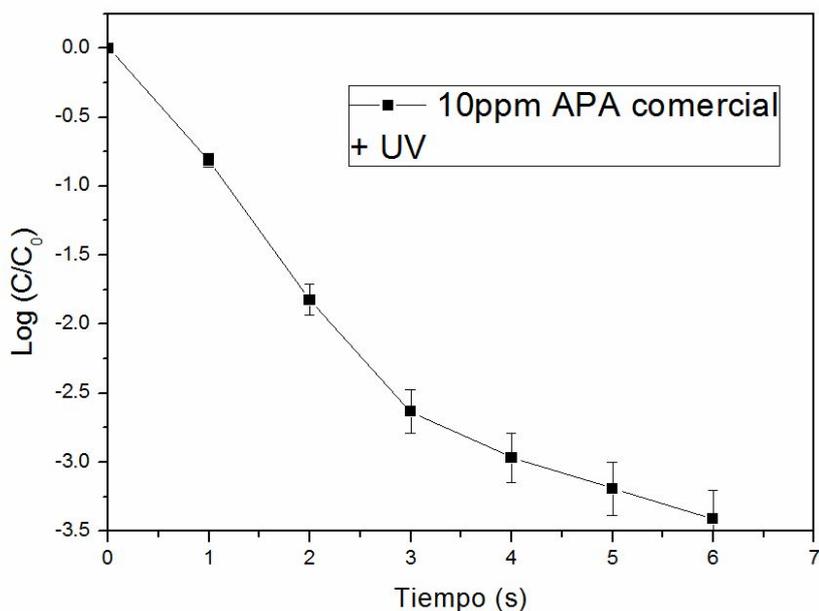
**Figura V.7. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 5 ppm de APA comercial**



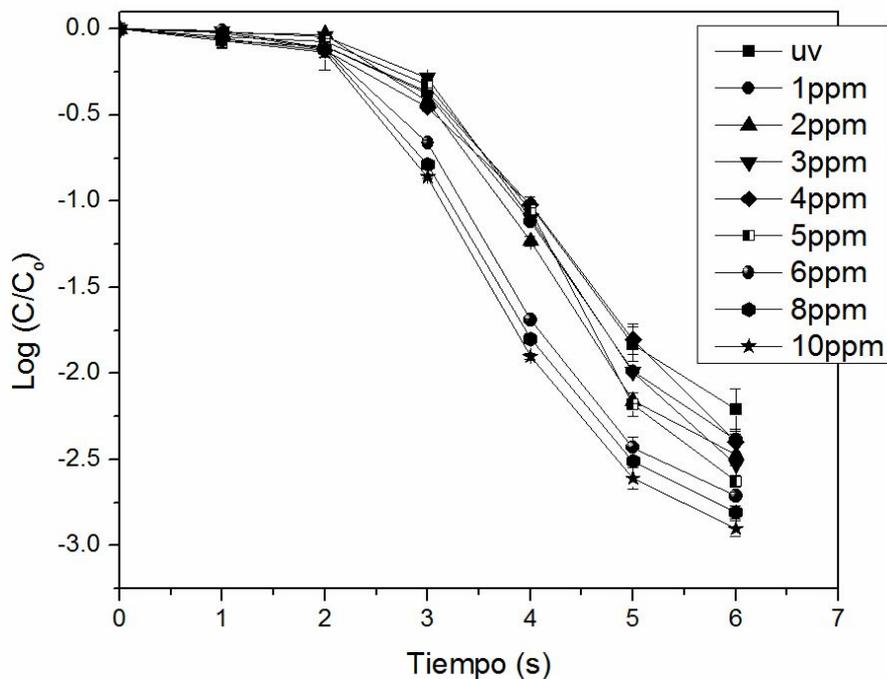
**Figura V.8. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 6 ppm de APA comercial**



**Figura V.9. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 8 ppm de APA comercial**



**Figura V.10. Corrida Experimental. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y 10 ppm de APA comercial**



**Figura V. 11. Corridas Experimentales. Inactivación de *E. coli* con radiación UV y diferentes concentraciones de APA comercial.**

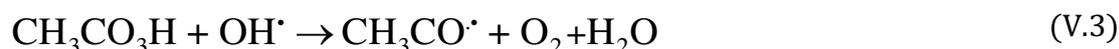
### V.1.1. ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE INACTIVACIÓN

Como se observa en las figuras (V.2-V.11) el empleo de luz ultravioleta (UV-C) para la desinfección de aguas claras es sumamente efectivo, obteniéndose un porcentaje de inactivación del 99,99% en tan solo 6 segundos. Cuando se utilizó luz UV en presencia de diferentes concentraciones de APA, se esperaba la existencia de un efecto sinérgico entre ambos desinfectantes, sin embargo los resultados obtenidos demuestran el agregado de APA a la solución no conduce a un aumento de la efectividad del proceso. Esto puede deberse a que la luz UV-C tiene un efecto casi inmediato sobre *E. coli*.

Se puede sugerir que la rápida inactivación bacteriana y la pérdida de la capacidad de fotorrepararse es debido a las especies activas generadas por la presencia de la irradiación UV, (los radicales pueden ser producidos fotoquímicamente por la escisión del enlace O-O del APA) cuyas formulas son presentadas a continuación:



Donde el radical  $\text{CH}_3\text{CO}_2^\bullet$  disminuye rápidamente formando  $\text{CH}_3^\bullet$  y  $\text{CO}_2^\bullet$  permitiendo a la molécula de ácido peracético posteriormente puede reaccionar con los radicales producidos, de acuerdo con las siguientes reacciones de adición y sustracción de hidrógeno lábil:



La presencia de peróxido de hidrógeno, presente en la mezcla comercial, no sólo contribuye a la formación de una nueva molécula de ácido peracético tan

pronto como se consume, sino también favorece a la formación de nuevos radicales hidroxilo (Caretti and Lubello, 2003).

Es importante también la acción del peróxido presente en la mezcla comercial, ya que un mecanismo de inactivación puede ser atribuible a las reacciones foto-fenton, lo que podría contribuir a la aceleración de la inactivación bacteriana, ya que una vez perforada la membrana, los iones ferrosos y férricos, presentes intracelularmente, son liberados al medio, catalizando la formación de radicales  $\text{OH}^\bullet$ .

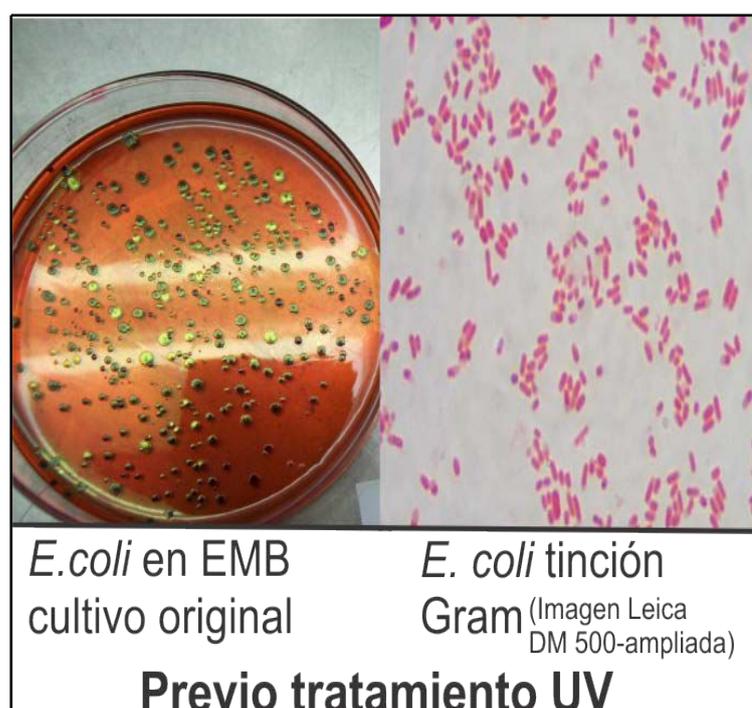
Sin embargo, el principal beneficio de esta combinación es el aporte del APA residual, previniendo el recrecimiento bacteriano, tornando la condición celular de dañada a daño irreversible/ muerte. En la tabla V.1 puede observarse que la ausencia de recrecimiento luego de 24, 48 y 72 horas de la corrida experimental. La inactivación celular causada por el APA, hace perder a la célula su capacidad de reproducirse, evitando el recrecimiento por foto reactivación.

**Tabla V.1. Recrecimiento Bacteriano**

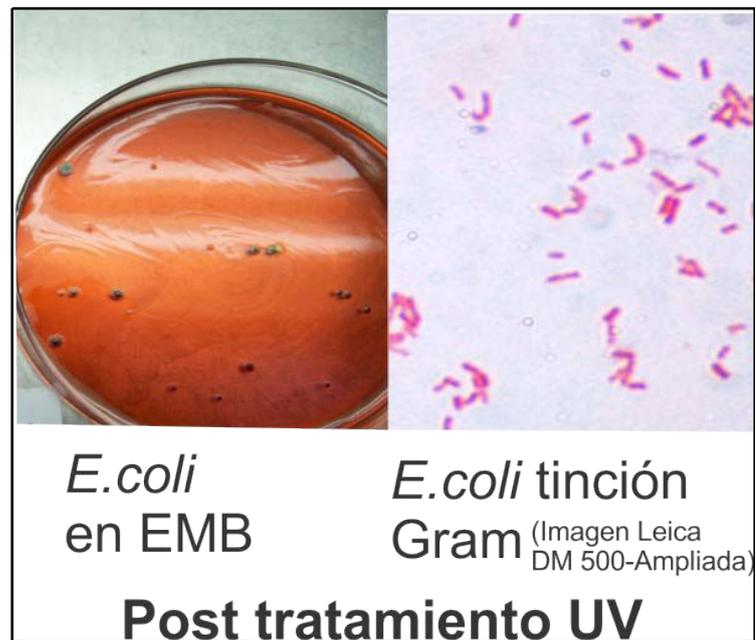
Concentración bacteriana inicial	Combinación APA+UV	Recrecimiento	Recrecimiento	Recrecimiento
		24 horas	48 horas	72 horas
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W - 1 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-2 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-3 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-4 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-5 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-6 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-8 ppm	S/R	S/R	S/R
$10^5 \text{ UFC cm}^{-3}$	15 W-10 ppm	S/R	S/R	S/R

Nota: S/R: sin recrecimiento

La morfología de las colonias sometidas a la acción de ambos agentes, al ser comparadas con el cultivo original (que no fue sometido a la acción desinfectante), presentó diferencias de tamaño y pérdida de coloración: pudiéndose observar macroscópicamente colonias más pequeñas y microscópicamente formas bacilares disminuidas (Figura V.12 a y b), también otros autores han comprobado la disminución del tamaño celular al ser expuesto a una situación de estrés con radiación UV (Li et al, 1997). Las sinergias logradas en los tratamientos de APA / UV pueden deberse a la interacción entre el APA y los rayos UV que generan la producción de radicales reactivos y microbicidas ( $\text{OH}^\bullet$ ) debido a la fotólisis del APA (Caretti y Lubello , 2003; Lubello et al., 2002 ).



**Figura V. 12 a) *E. coli* previo tratamiento UV**



**Figura V.12 b). *E. coli* post tratamiento UV**

Se puede observar en la figura V.11 una separación de las curvas de inactivación correspondientes a las concentraciones de 6, 8 y 10 ppm de APA, una tabla comparativa, para los 4 segundos del ensayo experimental (franja de mayor separación), puede ser confeccionada para analizar los resultados (Tabla V.2).

Tabla V. 2 Logaritmo de inactivación de *E. coli* a los 4 s del ensayo experimental.

<b>Concentración de APA /UV UV</b>	<b>Log de inactivación a los 4 segundos de ensayos experimentales</b>
<b>UV (sin APA)</b>	0,99
<b>1 ppm APA (+ UV)</b>	1,03
<b>2 ppm APA (+ UV)</b>	1,1
<b>3 ppm APA (+ UV)</b>	1,2
<b>4 ppm APA (+ UV)</b>	1.2
<b>5 ppm APA (+ UV)</b>	1.25
<b>6 ppm APA (+ UV)</b>	1.7
<b>8 ppm APA (+ UV)</b>	1.89
<b>10 ppm APA (+ UV)</b>	1.99

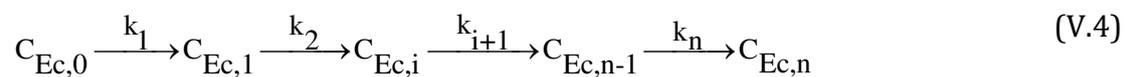
En síntesis, un análisis a las curvas de inactivación permite observar que la combinación de la radiación UV / APA logra altos niveles de inactivación a tiempos de contacto muy bajos, el proceso de inactivación utilizando radiación UV solamente posee una alta eficiencia, dada por la intensidad de la iluminación y la alta sección eficaz de absorción del H<sub>2</sub>O a las longitudes de onda usadas, donde se logra el 99.99% de inactivación a los 6 segundos, resultando un método de desinfección competitivo y simple, sin embargo, la utilización de APA comercial garantiza que no habrá recrecimiento porque han sido inhibidos los mecanismos de reparación y defensa bacterianos.

## V.2. MODELO CINÉTICO PROPUESTO. DESINFECCIÓN CON RADIACIÓN UV SIN EL AGREGADO DE AGENTES OXIDANTES.

La cinética de la inactivación de microorganismos utilizando radiación UV (sin agregado de agentes químicos desinfectantes) puede representarse con una modificación del modelo de Eventos en Serie desarrollado por Severin (1982).

En el *Capítulo III. Modelado de la Desinfección* se enumeraron varios modelos cinéticos hasta ahora conocidos, entre los que se desarrolló el modelo cinético de Eventos en Serie. En este modelo, la bacteria, al ser expuesta a la radiación UV va sufriendo daños a través de pasos consecutivos que se acumulan hasta que alcanzan un umbral donde se produce la muerte del microorganismo (cada uno de estos “daños” produce una alteración parcial en la estructura de los diferentes bloques químicos que constituyen la secuencia del ADN y ARN bacteriano). Todas las bacterias que no alcanzan ese nivel umbral de daño, son sobrevivientes. De esta manera el umbral determina un número mínimo de eventos ( $n$ ) necesarios para la inactivación irreversible de un microorganismo.

La cinética de Eventos en Serie puede representarse como  $n$  reacciones en serie: Después de un evento perjudicial, se considera que se forma una nueva especie, por tal motivo, el proceso puede ser presentado como una serie de  $n$  reacción según



Con  $i = 0, 1, 2, \dots, i, \dots, n$  y  $k_1 = k_2 = \dots = k_n = k$

Las ecuaciones del modelo planteadas son generales, sin embargo para simplificar la expresión se puede suponer que la constante cinética para cada etapa es la misma ( $k_1 = k_2 = \dots = k_n = k$ ), obteniendo así una única constante llamada constante de inactivación.

Debe tenerse en cuenta que la concentración inicial de bacterias es  $C_{Ec}^0$  mientras que es la concentración de aquellos que no han recibido ningún daño es  $C_{Ec,0}$ . Sólo en  $t = 0$   $C_{Ec}^0 = C_{Ec,0}$ , en cualquier otro momento  $C_{Ec,i} < C_{Ec}^0$ .  $C_{Ec,i}$  es la concentración de un determinado estado de daño (estado  $i$ ) en el microorganismo que se ha alcanzado el nivel de daño " $i$ " y " $n$ " es el límite del umbral, este " $n$ " es igual al número de eventos necesarios para llegar a la inactivación por lo tanto  $n$  representa a las especies inactivadas, que han sufrido un daño por lo general casi irreversible. El número total de especies existentes es  $n + 1$  con el fin de dar cuenta de las especies que aún no han recibido ningún daño.

Todas las bacterias, ya sea las que no han sufrido ningún daño, como las que sí, pero no han alcanzado el umbral límite " $n$ ", son las sobrevivientes  $C_{Ec}$ . Debido a que el número de bacterias inactivadas o muertas (dead, por el término en inglés), puede obtenerse a partir de la diferencia entre la concentración inicial de bacterias,  $C_{Ec}^0$  y la concentración de las sobrevivientes  $C_{Ec}$ , se presenta la siguiente ecuación:

$$C_{Ec,dead} = C_{Ec}^0 - C_{Ec} = C_{Ec}^0 - \sum_{i=0}^{n-1} C_{Ec,i} \quad (V.5)$$

Es posible escribir el equivalente a un balance de masas para cada especie:

Para  $i=0$

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = -k_{i+1} (C_{Ec,i})^\delta \langle (\alpha_\lambda E_{\lambda,0}) \rangle^\gamma \quad (V.6)$$

Para  $i = 1, 2, 3 \dots (n-1)$

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = k_i (C_{Ec,i-1})^\delta \langle (\alpha_\lambda E_{\lambda,\delta}) \rangle^\gamma - k_{i+1} (C_{Ec,i})^\delta \langle (\alpha_\lambda E_{\lambda,\delta}) \rangle^\gamma \quad (V.7)$$

Para  $i=n$

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = k_i (C_{Ec,i-1})^\delta \langle (\alpha_\lambda E_{\lambda,o})^\gamma \rangle \quad (V.8)$$

Las ecuaciones (6) a (8) necesitan el valor de la tasa de flujo en función de la posición y tiempo.

$$E_{\lambda,o}(\underline{x}, t) = \int_{\Omega} L_{\lambda,\Omega}(\underline{x}, t) d\Omega \quad (V.9)$$

La ecuación (V.9) se puede obtener si se conoce el valor de la intensidad de radiación:

$$\frac{dL_{\lambda,\Omega}(s,t)}{ds} + \alpha_\lambda(s,t) L_{\lambda,\Omega}(s,t) = 0 \quad (V.10)$$

(para una longitud de onda  $\lambda$  en la dirección de propagación de radiación dada por  $\Omega$  en el tiempo  $t$ )

Con las siguientes condiciones de borde:

$$L_{\lambda,\Omega}(s_R, t) = L_{\lambda,\Omega}^0(t) \quad (V.11)$$

La ecuación (V.10) puede ser integrada y sustituida en la ecuación (V.9). Por conveniencia, el ángulo sólido puede ser escrito en términos de un sistema de coordenadas esféricas, lo que resulta:

$$E_{\lambda,o}(s, t) = \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} \sin\theta \left( L_{\lambda}^0(\theta, \phi) \right) \exp\left[ \int_{s_R}^{s_L} -\alpha_\lambda(s) ds \right] \quad (V.12)$$

Para calcular el campo de radiación dentro del reactor, se necesita un modelo de emisión de la lámpara. Con este fin, la fuente tres dimensiones con el modelo de emisión volumétrica propuesto por Cassano et al. (1995) se aplica:

$$L^0(\theta, \phi) = \Upsilon_w \left( \frac{P_{\lambda,L}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \right) \frac{2 \left[ r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2 \right]^{0.5}}{\sin\theta} \quad (V.13)$$

$\Upsilon_w$  es un valor promedio de la transmitancia pared del reactor. (Debe notarse  $\lambda$  es un subíndice porque este trabajo se lleva a cabo con radiación monocromática).

Para los ángulos limitantes son:

$$\theta_1(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{(L_L - z)} \right\} \quad (V.14)$$

$$\theta_2(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{-z} \right\} \quad (V.15)$$

$$-\phi_1 = \phi_2 = \cos^{-1} \left[ \frac{(r^2 - r_L^2)^{1/2}}{r} \right] \quad (V.16)$$

La ecuación final puede ser resuelta con la ayuda de integraciones numéricas

$$E_o(r, z, t) = \frac{(\Upsilon_w P_{\lambda, L}) (4\pi^2 r_L^2 L_L)}{2[r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5}} \left\{ \int_{\phi_1}^{\phi_2} (d\phi) \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \ 2 \times \right. \\ \left. [r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s, t) ds \right] \right\} \quad (V.17)$$

Sin embargo, el valor de  $P_{\lambda, L}$  no es siempre conocido (es un valor proporcionado por el fabricante de la lámpara) y cambia invariablemente a lo largo del tiempo de la vida útil de la fuente de radiación. Es posible medir utilizando métodos actinómetro (Murov et al, 1993; Zalazar et al, 2005), es conveniente utilizar una forma alternativa de la ecuación (V. 17). (Esto es particularmente siempre es posible en el trabajo de investigación de laboratorio).

$$E_{\langle \theta | w \rangle} = f \left[ \begin{array}{l} \text{lamp reactor characteristics} \\ \text{System geometry} \end{array} \right] \quad (\text{V.18})$$

Con la ayuda elaborados artificios algebraicos es posible transformar la ecuación 17 en la siguiente expresión:

$$E_o(r, z, t) = \frac{\langle E_o | w \rangle}{\Psi} \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \left[ r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2 \right]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s, t) ds \right] \quad (\text{V.19})$$

Por último, ya que para un reactor de área de sección transversal constante, la media de volumen se reduce a una integral sobre la longitud del reactor, el promedio de volumen se debe calcular de acuerdo con:

$$\langle E_o(r, z, t) \rangle = \frac{1}{L_R} \int_0^{L_R} E_o(r, z, t) dz \quad (\text{V.20})$$

La ecuación final, para ser utilizada en las ecuaciones (V.6) a (V.8) es.

$$\langle E_o^{\gamma} \rangle = \frac{2}{(r_o^2 - r_i^2) L_R} \left( \frac{E_o | w}{\Psi} \right)^{\gamma} \int_0^{L_R} dz \int_{r_i}^{r_o} r dr \left\{ \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \left[ r^2 (\cos^2 \phi - 1) + r_L^2 \right]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s, t) ds \right] \right\}^{\gamma} \quad (\text{V.21})$$

El coeficiente neperiano de absorción del sistema,  $\alpha$ , está definido por la ecuación (V.22). Muchas especies contribuyen a este coeficiente, como el caso de las bacterias y del medio de cultivo (c).

$$\alpha = \alpha_{Ec} + \alpha_c \quad \text{with} \quad \alpha_{Ec} = \sum \kappa_{Ec,i} C_{Ec,i} \quad (\text{V.22})$$

Y

$$\alpha_c = \frac{1}{P_c} \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} P_{\lambda} d\alpha \quad (V.23)$$

Donde:  $\hat{\kappa} [=] \text{cm}^2 (\text{CFU})^{-1}$  and  $C_{Ec,i} [=] \text{CFU cm}^{-3}$ .

### V.3. SOLUCIÓN NUMÉRICA

El objetivo de esta parte del trabajo es la obtención de los parámetros cinéticos derivados de las ecuaciones del modelo que mejor se ajusten a los resultados experimentales. Para la estimación de estos parámetros cinéticos se realizó un programa en Matlab. El núcleo del programa básicamente es un estimador de parámetros que utiliza una rutina de optimización paramétrica no lineal por cuadrados mínimos. Para obtener los parámetros cinéticos correspondientes al modelo, descritos por las ecuaciones (6), (7) y (8), los datos experimentales se comparan con los valores obtenidos en las simulaciones del modelo, empleando un estimador multiparamétrico no-lineal (rutina de Gauss-Newton) junto con un programa de optimización (algoritmo Levenberg-Marquart) para la convergencia global. El método también proporciona los valores residuales de la matriz jacobiana para calcular los resultados dentro de un 95% intervalo de confianza. La ecuación (6), (7) y (8) se resuelve con el método Runge-Kutta.

### V.4 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO

Los valores de los parámetros obtenidos son:

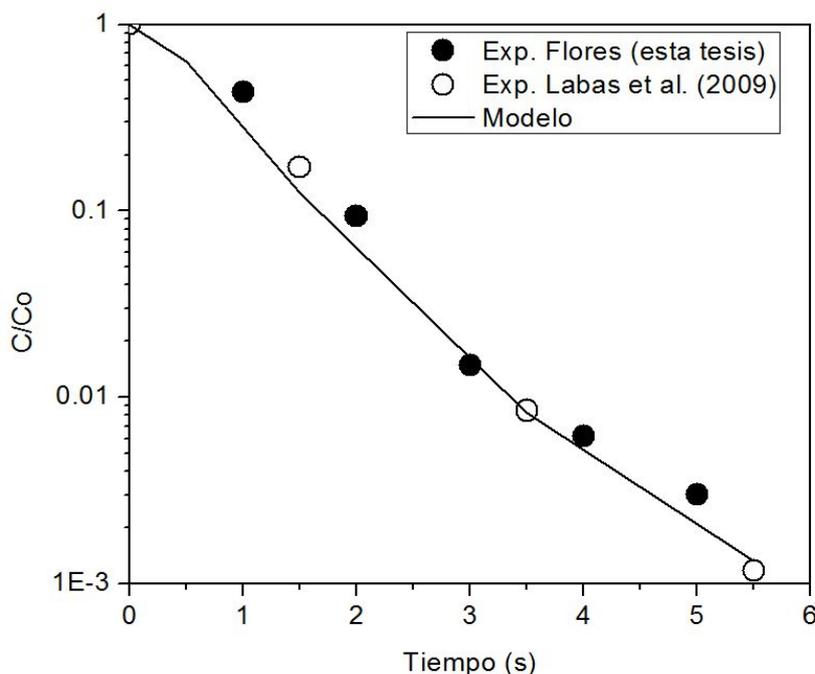
$$\gamma=0.5$$

$$N=4$$

$$K=(1.31\pm 0.18) \times 10^8 \text{ s}^{-1} (\text{cm}^3 \text{ s einsteins}^{-1})^{\gamma} (\text{CFU cm}^{-3})^{1-\gamma}$$

$$\delta=(0,7\pm 0,02)$$

En la figura V.13 se observa la evolución en función del tiempo de las concentraciones de *E. coli* experimentales de Labas (2004) y Flores (esta tesis) con el ajuste del modelo propuesto por Labas et al (2009).



**Figura V.13 Evolución de las concentraciones experimentales, - o-(Labas), -•-(Flores) y la simulación del modelo (línea sólida) para la desinfección con UV.**

El buen ajuste de los resultados experimentales (Labas, 2004; Flores, este trabajo) con el modelo propuesto (Labas et al, 2009) puede ser observado en la figura V.13.

En esta gráfica puede notarse además que la inactivación tiene un tiempo de inducción. El hombro inicial típico que corresponde al valor de  $n = 4$  no se puede notar claramente en el plot de los resultados experimentales debido a las dificultades en la toma de muestras para  $t=0$  y  $t=1$  segundos.

## V.5 CONCLUSIONES DEL CAPITULO

Se realizaron experiencias en un fotorreactor de desinfección con radiación UV y la combinación de UV con el agregado de distintas concentraciones de una mezcla comercial de ácido peracético (APA). Se observó que con el agregado del APA, la velocidad de inactivación presentó un leve aumento con respecto a las corridas con radiación UV solamente.

Este comportamiento fue explicado teniendo en cuenta que, por un lado, la mezcla del APA absorbe radiación UV, por lo tanto consume una parte de fotones que podrían ser utilizados para inactivar al microorganismo (efecto de competencia) y por otro lado la fotodegradación del APA facilita la producción de especies oxidantes que atacan al microorganismo. Estos dos efectos son antagónicos y el resultado final es un efecto sinérgico. El mecanismo de la sinergia también podría explicarse por un mecanismo de daño múltiple de dos métodos de desinfección diferentes, que causan diferentes tipos de lesiones en los microorganismos, y estos daños, acumulativos, pueden acoplarse. Los principales objetivos de la radiación UV son los ácidos nucleicos, mientras que los desinfectantes químicos, tales como el APA y de  $H_2O_2$ , son las paredes celulares microbianas, las membranas y los sistemas enzimáticos o de transporte. Como resultado de ello, los mecanismos de reparación microbianos, necesarios para reparar daños menores, pueden sobrecargarse, lo que lleva a su incapacidad para reparar las lesiones y posteriormente se produce la muerte celular. En el caso del único desinfectante, el daño es menor y susceptible de reparación.

La combinación del UV con el uso de la mezcla comercial del APA muestra una leve mejora en la eficiencia del proceso de desinfección, pero a los fines de aplicación práctica, el agregado del agente desinfectante, podría encarecer el proceso sin aumentar significativamente el porcentaje de inactivación. Sin embargo existe la ventaja adicional: que el agregado del desinfectante químico tiene un efecto residual, que no posee la aplicación de radiación UV.

Se aplicó el modelo de Eventos en Serie modificado (Labas, 2004; 2007) a los datos experimentales utilizando solamente radiación UV, la bondad del ajuste entre las predicciones del modelo y los datos experimentales obtenidos de la inactivación de *E. coli* utilizando la solución comercial de APA a diferentes concentraciones + UV ha sido obtenida.

Para un estudio completo del sinergismo UV-APA es necesario estudiar previamente el comportamiento cinético del desinfectante comercial, este estudio será realizado en el *Capítulo VI*.

**ACRONIMOS CAPITULO IV**

$e_{\lambda}^a$	Velocidad volumétrica de absorción de fotones
C	Concentración
$C_{Ec}$	Concentración de los microorganismos
$C_i$	Concentración del componente i
E	energía radiante, einstein $s^{-1}$
G	radiación incidente, einstein $s^{-1} m^{-2}$
h	constante de Planck, J s
I	intensidad específica de radiación, einstein $s^{-1} m^{-2} sr^{-1}$
K	Constante cinética las unidades dependen de la reacción en estudio y de la etapa de la reacción
L	longitud, m
t	Tiempo(s)
V	Volumen

**LETRAS GRIEGAS**

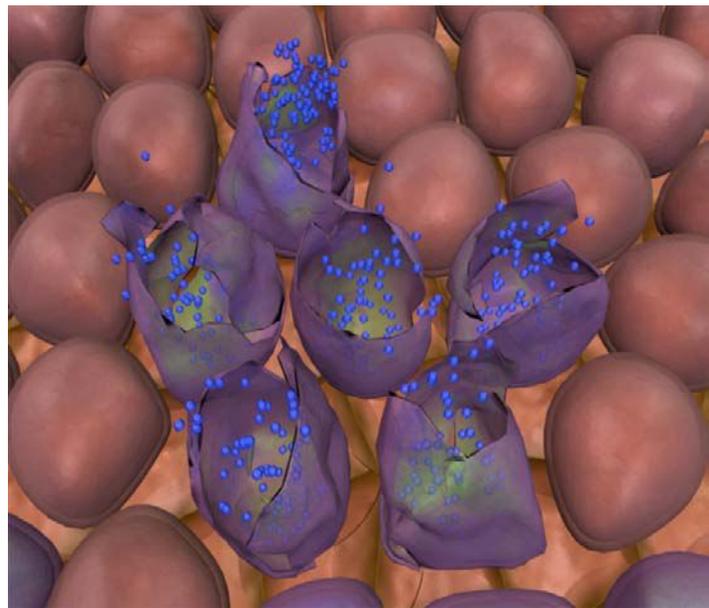
$\gamma$	Frecuencia, $s^{-1}$
$\alpha$	absortividad molar neperiana, $m^2 mol^{-1}$
$\lambda$	longitud de onda, m
$\sigma$	coeficiente volumétrico de scattering, $m^{-1}$

---

$\kappa$	coeficiente volumétrico de absorción, $m^{-1}$
$\varphi$	coordenada esférica, rad
$\theta$	coordenada esférica, rad
$\rho$	coordenada esférica, rad
$\Omega$	ángulo sólido, sr
$\Upsilon$	Parámetros del modelo

## CAPÍTULO VI

# PROCESOS DE DESINFECCIÓN. UTILIZANDO ÁCIDO PERACÉTICO COMERCIAL



## **CAPÍTULO VI. PROCESOS DE DESINFECCIÓN USANDO ÁCIDO PERACÉTICO.**

### **VI.1. METODO EXPERIMENTAL**

Con el objetivo de estudiar la desinfección de aguas con ácido peracético comercial, se han llevado a cabo diferentes ensayos experimentales. El esquema de las condiciones en las cuales se desarrolló cada ensayo, la toma de muestras, así como el detalle de cada etapa del proceso, han sido presentados en el *Capítulo IV*.

Cada ensayo experimental de ácido peracético (APA) consta los siguientes pasos:

1. Acondicionamiento del dispositivo experimental.
2. Preparación del inóculo.
3. Lavado del dispositivo experimental.
4. Valoración de la solución comercial de APA 15% (v/v). Selección de la concentración a trabajar.
5. Preparación de la muestra (Agregado del volumen de APA correspondiente).
6. Desinfección bacteriana en el Reactor.
7. Toma de Muestra.
8. Siembra.
9. Recuento.

En cada ensayo experimental, se trabajó con un medio complejo (caldo nutritivo), la dilución del inóculo final fue de 1/ 1000 para lograr que la solución a introducir en el reactor sea semejante a “aguas claras”. Este paso se hace

previo al proceso de desinfección, propiamente dicho, para evitar tales inconvenientes, como la reproducción bacteriana. La temperatura de trabajo es de 20 °C y el pH es de 6, manteniéndose constantes durante los ensayos experimentales.

La concentración de APA comercial cuyo poder de inactivación se quiere evaluar es seleccionada. En el caso de las corridas experimentales donde se inhibe el peróxido de hidrógeno presente en la solución comercial, (HP), debe inactivarse el mismo con catalasa y volver a realizar la titulación hasta que el viraje del indicador sea inmediato, indicando la ausencia del HP.

Durante cada ensayo experimental se estudia además, independientemente al poder de inactivación, la variación en la concentración de los agentes desinfectantes, a lo largo de las experiencias.

Las corridas experimentales se realizan por triplicado y las siembras en placa se realizan por duplicado, estas se describen en el *Capítulo IV*.

## **VI.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES**

### **VI.2.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES CON APA COMERCIAL.**

Luego del recuento en placas de Petri se grafica la concentración bacteriana de *E. coli* ( $\log (C/ C_0)$ ) versus el tiempo (s). En las figuras (VI.1) a (VI.9) se muestran los resultados obtenidos utilizando la mezcla comercial de APA a diferentes concentraciones. Se contabilizó el último recuento válido, de acuerdo a las reglas de recuento en placa descriptas en el *Capítulo IV*.

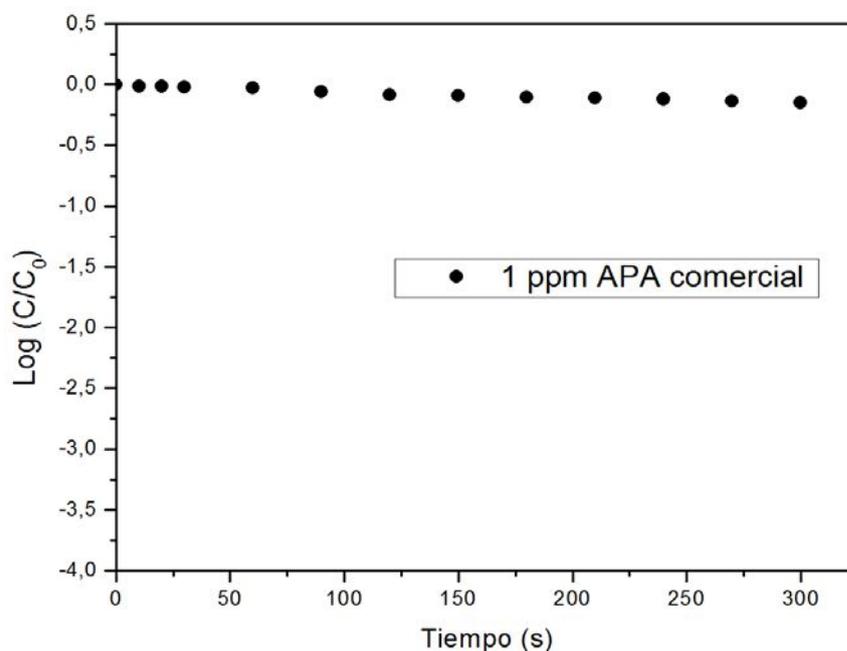


Figura VI.1. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (1 ppm). Las barras de error están contenidas dentro del símbolo.

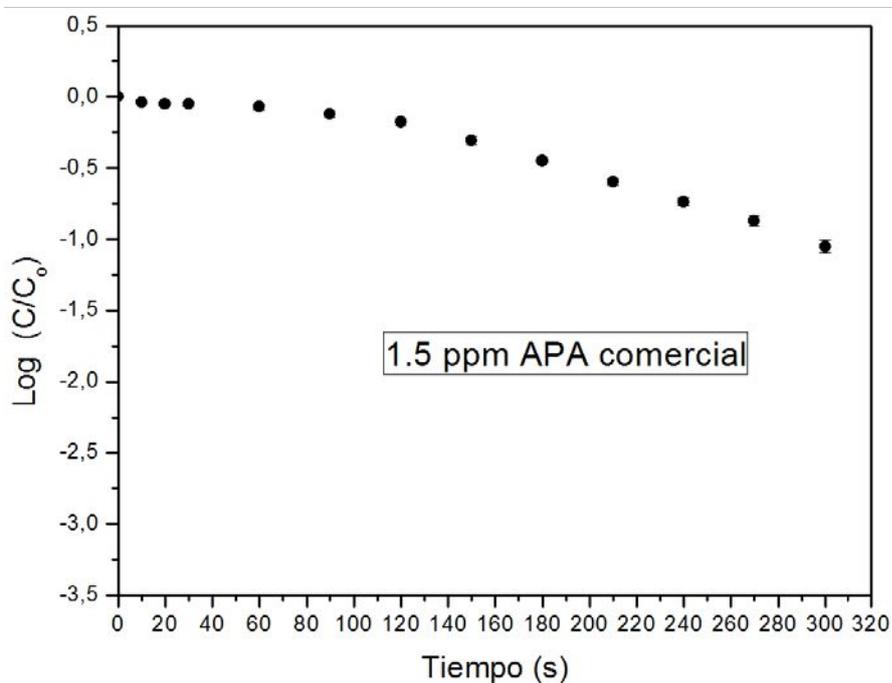


Figura VI.2. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (1.5 ppm). Las barras de error están contenidas dentro del símbolo.

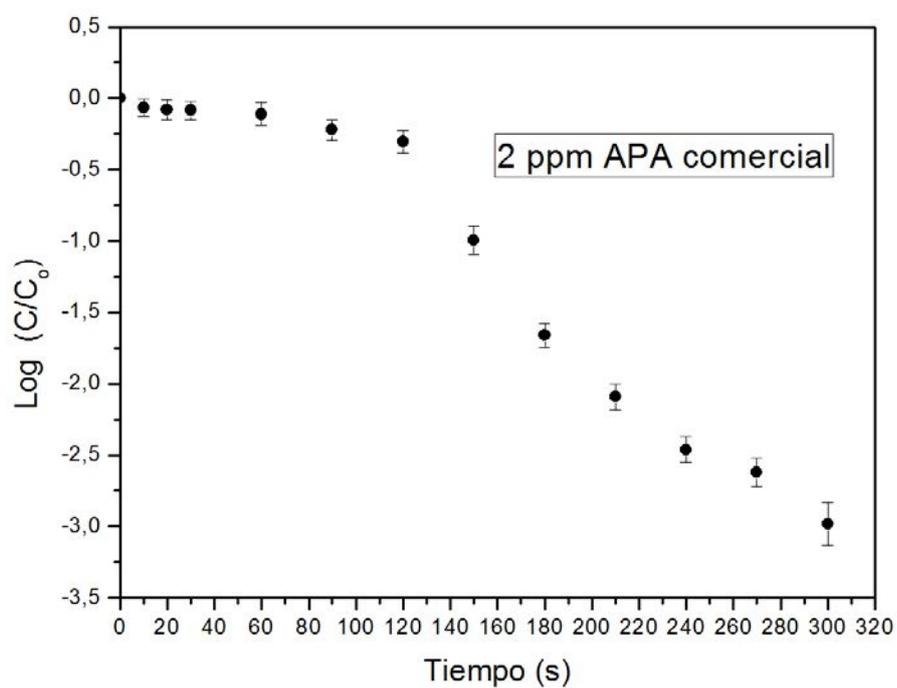


Figura VI.3. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (2 ppm)

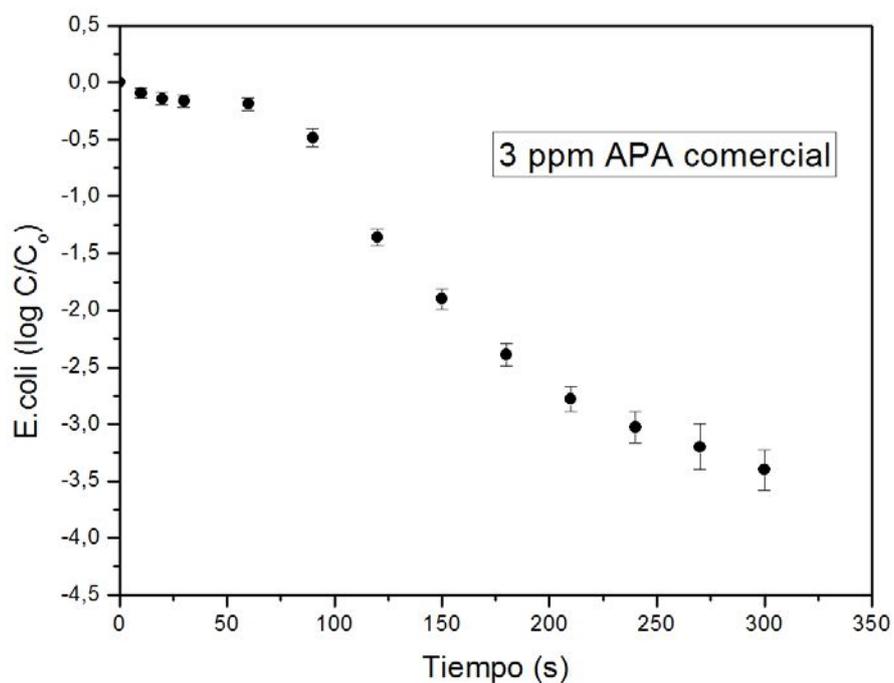


Figura VI.4. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (3 ppm).

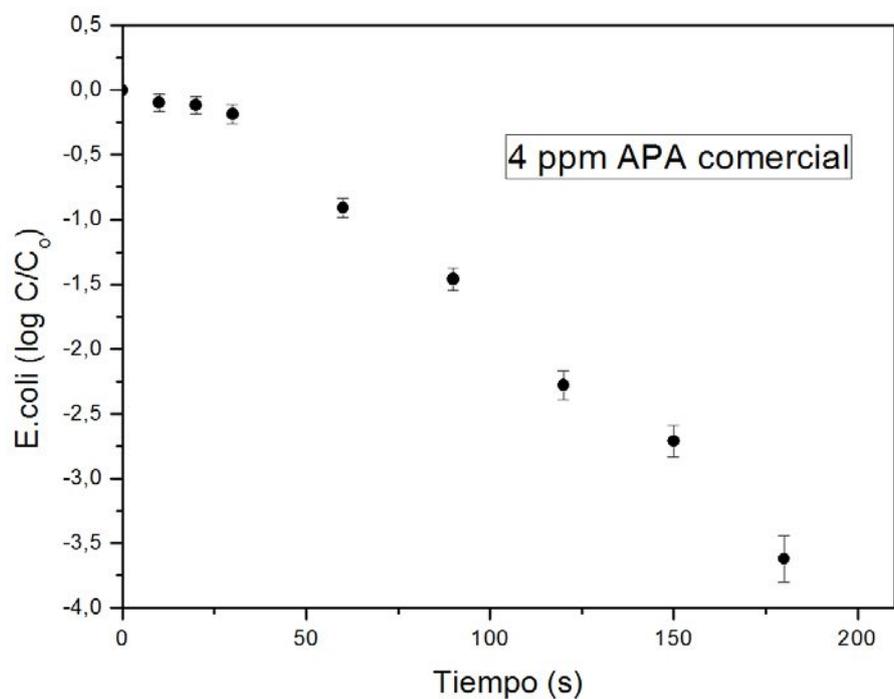


Figura VI.5. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (4 ppm).

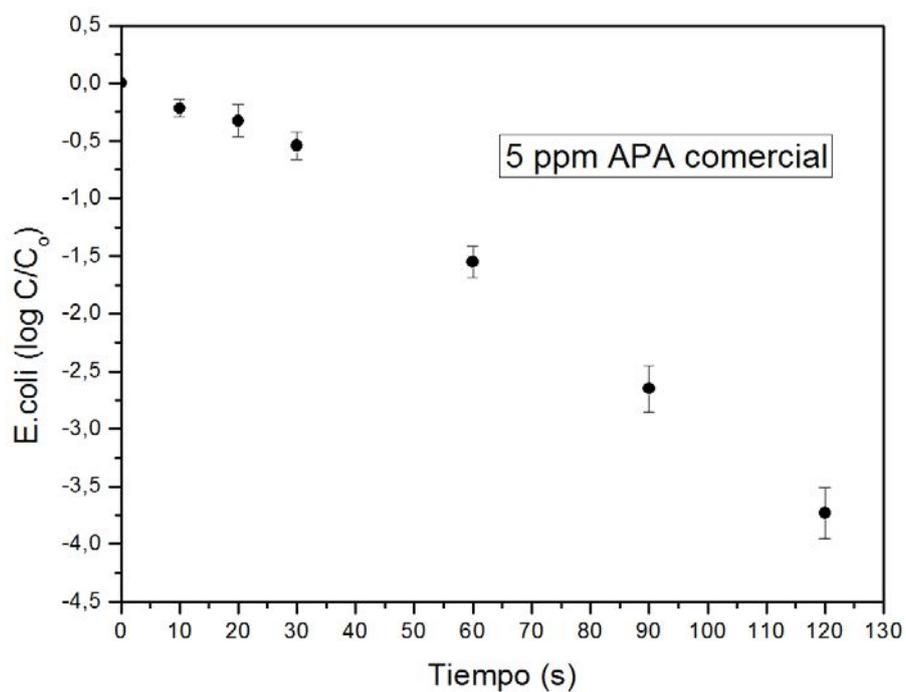


Figura VI.6. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (5 ppm).

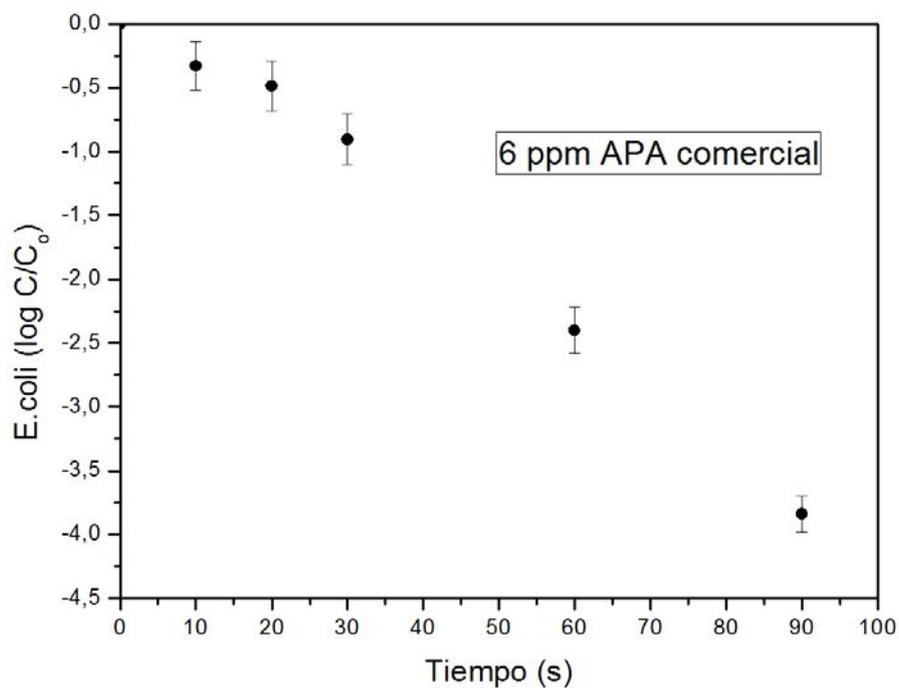


Figura VI.7. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (6 ppm).

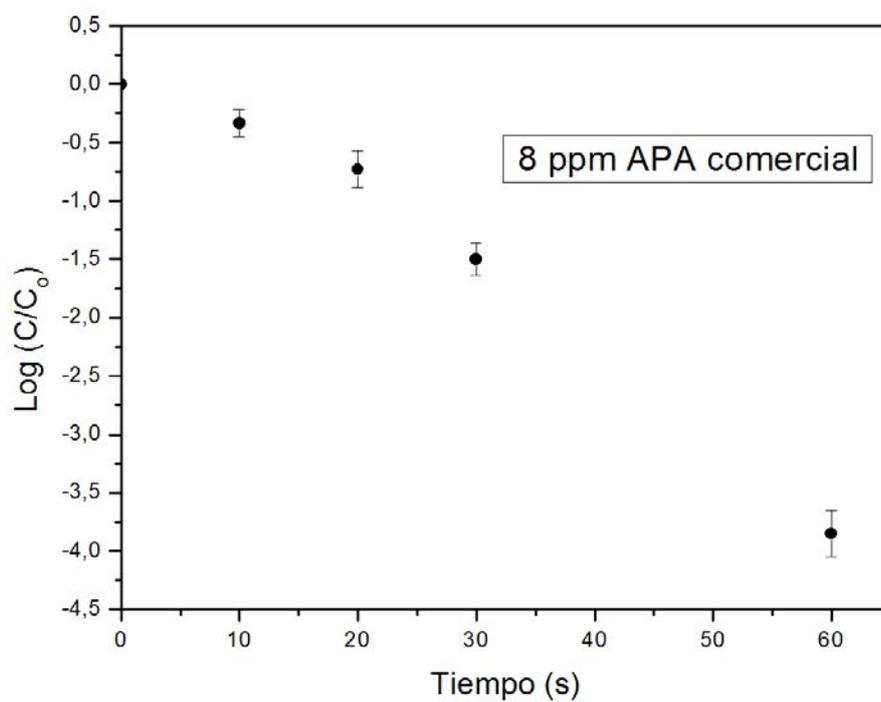
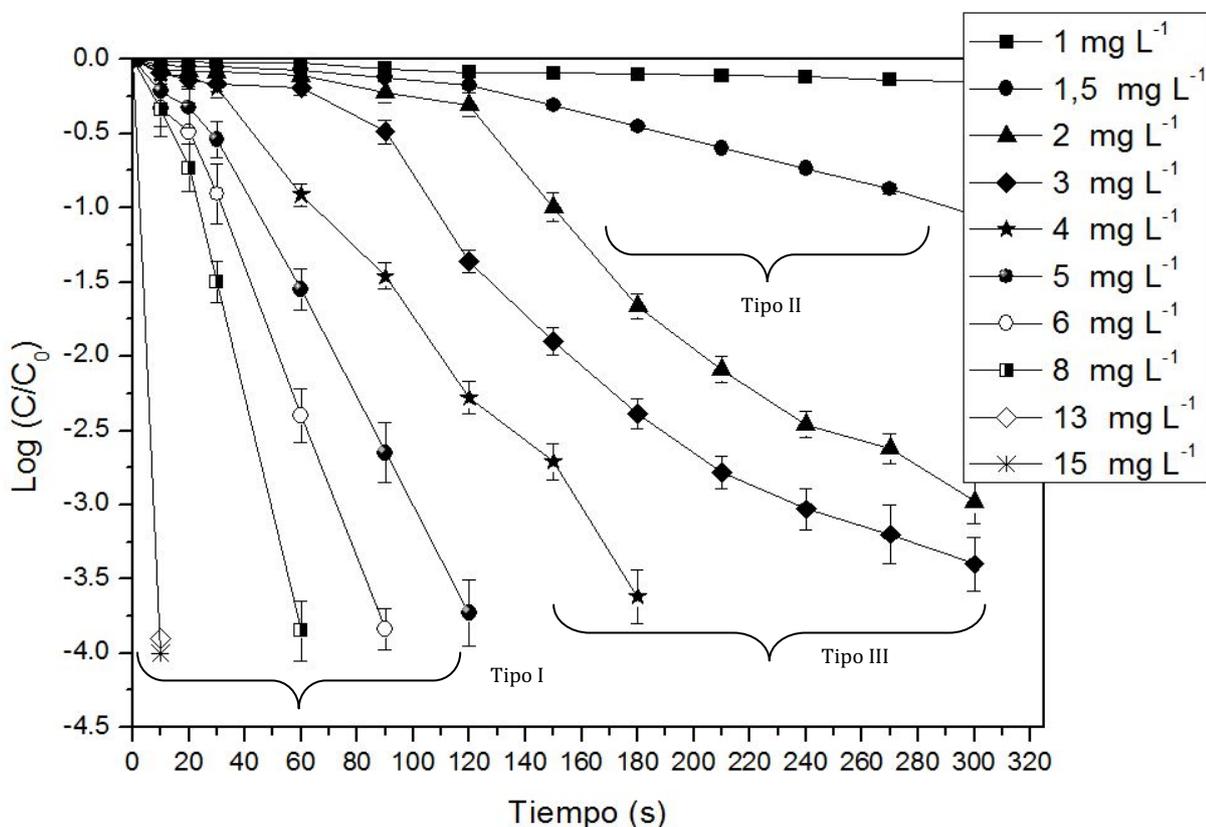


Figura VI.8. Inactivación de *E. coli* con solución comercial de APA (8 ppm).



**Figura VI.9. Inactivación de *E. coli* con diferentes concentraciones de solución comercial de APA**

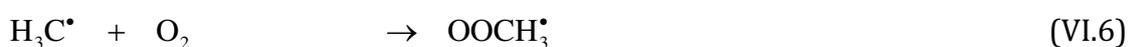
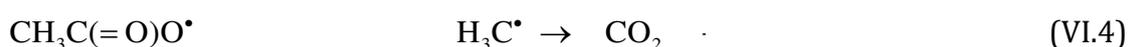
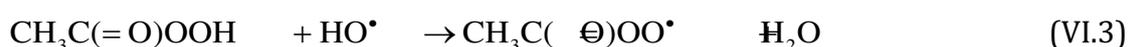
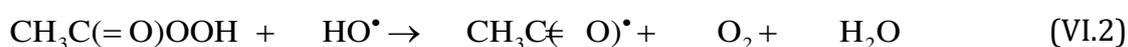
El proceso de inactivación bacteriana incluye una gran variedad de reacciones de distinta naturaleza y fenómenos de transferencia de materia. Los mecanismos de inactivación no han sido completamente dilucidados, y generalmente, los ataques de los agentes desinfectantes, que no presentan sitios específicos tan puntuales como los antibióticos, pueden interaccionar con la célula bacteriana de diferentes maneras: difusión transmembrana, oxidación radicalaria, cambio de potencial, etc. (Russell 2003; Denyer y Maillard, 2002; Denyer, 1995). Las moléculas del desinfectante una vez que interaccionan con el microorganismo tienen como objetivo interrumpir alguna función vital de importancia celular, que luego de algunas o varias etapas, de acuerdo a la

concentración, al microorganismo y a cuestiones ambientales, se alcanza la lisis celular (Chapman, 2003; Denyer y Stewart, 1998).

Una de las explicaciones más razonables que se encuentran en la literatura química para explicar la rápida velocidad de desinfección del APA se puede encontrar en la reacción de ruptura homolítica del ácido peracético propuesta por Bach et al., (1996) y estudiada en detalle por Rokhina et al., (2010). La propuesta de un posible mecanismo de interacción entre las especies químicas y microbianas es importante con el fin de optimizar la acción del biocida. (Flores et al., 2013)

Existen registros bibliográficos donde se menciona la acción del ácido peracético como agente oxidante, según Baldry (1983) el APA disrumpe los enlaces -SH y -SS de enzimas y paredes celulares (Kitis, 2004), además causa dislocación las funciones quimiosmóticas del transporte de membrana y desnaturalización de proteínas (Liberti, 1999). El APA intracelular puede oxidar las enzimas esenciales impidiendo los procesos bioquímicos, alternando los niveles de solutos (Malchesky, 1992). El mecanismo de acción es desnaturalizar las proteínas y enzimas y así incrementar la permeabilidad celular (Small, 2007).

Las reacciones de oxidación química en cadena se describen en las ecuaciones (VI.1.) a (VI.7.). Estas reacciones fueron propuestas por Rokhina (2010) en la oxidación de componentes orgánicos con APA.





La reacción de la ecuación (VI.1), que representa la etapa de iniciación, es muy importante debido a que forma el radical  $\text{OH}^\bullet$  y además es la etapa controlante de la velocidad de reacción. La ecuación (VI.6) sólo es importante en ambientes saturados de oxígeno.

Si bien todas las especies radicalarias generadas en estas reacciones (VI.1-VI.7) son contribuyentes activas a cualquier mecanismo de oxidación, son los radicales  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{CH}_3^\bullet$  los más significativos. Según Block (2001), en el apartado de “compuestos peroxigenados” del libro Esterilización desinfección y antisepsia, los radicales orgánicos  $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{O}^\bullet$  y  $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})^\bullet$  le confieren al APA su amplio poder esporicida, ya que estos radicales poseen una vida media ampliamente superior al radical  $\text{OH}^\bullet$ .

Debe ser tenido en cuenta, además el sinergismo de la mezcla comercial ácido peracético-peróxido de hidrógeno, Alarsi et al. (1992) estudiaron la inactivación de *E. coli* con peróxido de hidrógeno, y cuando este oxidante se usó en combinación con el APA el efecto fue notablemente mayor, indicando así un sinergismo entre ambos agentes oxidantes. Según Liberti (1999), el poder biocida de la mezcla es mucho más fuerte que la del APA o del peróxido solo, indicando su sinergismo.

La Figura VI.9 muestra los resultados obtenidos durante la serie de ensayos de inactivación bacteriana, donde las concentraciones empleadas varían de 1 a 15 ppm de solución comercial. Está bien documentado que las curvas de inactivación, donde se grafica el logaritmo de la concentración de las bacterias sobrevivientes versus el tiempo de los ensayos experimentales, pueden aproximarse a una línea recta (tipo I); curvas con diferentes hombros (tipo II) o curvas con hombros y colas (tipo III). Por lo tanto, cuando se cambia la concentración del desinfectante, cada familia de curvas representa más notablemente el fenómeno, que prevalece en las diferentes circunstancias del proceso. Generalmente las curvas de inactivación del logaritmo de las sobrevivientes versus el tiempo, se alejan de la línea recta, es por lo tanto,

factible pensar que la fase “lag” que se observa en estas curvas no-lineales representa la serie de etapas y condiciones que conllevan a la muerte celular, siendo una de las condiciones más importantes la concentración del desinfectante.

En esta figura, las curvas señaladas como “tipo I” muestran claramente una rápida inactivación, con un pequeño hombro y con una parte importante de su trayectoria que presenta las características de una línea recta.

Las figuras representadas por las curvas de "tipo II" no permiten diferenciar con precisión si son el resultado de una inactivación muy lenta o un hombro que se extiende por un tiempo muy largo. A bajas concentraciones de desinfectante, la inactivación es muy lenta, podría considerarse como un periodo de inducción, donde el desinfectante ataca la membrana, pero este ataque no es suficiente para causar un daño severo en la estructura celular.

Las curvas de inactivación que corresponden al “tipo III”, muestran un hombro y una cola muy marcados, y por lo tanto este tipo de curva no puede ser representada, en ningún tramo por una línea recta, en este tipo de curvas, puede pensarse que la acción de los agentes oxidantes ataca a la membrana conduciendo lentamente a la pérdida de su permeabilidad, es decir que la membrana se oxida gradualmente y el microorganismos se resiste a este ataque desplegando sus mecanismos de defensa propios como son la actividad enzimática (catalasa); la bomba de protones, etc., hasta que una vez agotados estos mecanismos se consigue el daño irreversible o la muerte.

Debe notarse, que para las concentraciones superiores a los 5 mg L<sup>-1</sup>, las gráficas son líneas rectas y se obtiene el 99,99 % de inactivación en menos de 2,1 minutos. Es interesante destacar que aproximadamente 6 mg L<sup>-1</sup> es la concentración usualmente aplicada en la desinfección de aguas cuando se utiliza APA como agente desinfectante (Colgan y Gehr, 2001, Lefevre et al. 1992). Al trabajar con estas concentraciones, es acertado pensar que los agentes oxidantes atacan las moléculas más externas de la membrana, generando un subsecuente rompimiento de enlaces alcanzando rápidamente la lisis celular. De esta

manera, el nivel de daño crítico se alcanza a medida que se llega a la descomposición lipídica. Por lo tanto, podemos afirmar que la velocidad y tiempo requerido para llegar al umbral límite de daño crítico también depende de la velocidad en que se lleve a cabo la descomposición de la membrana. Además esta velocidad obedece a la concentración del desinfectante, a las condiciones ambientales de trabajo (pH, temperatura) y a las propiedades del agua analizada.

En la figura VI.9, se pueden observar dos tipos de comportamientos característicos: los hombros y las colas marcados para las curvas Tipo III. Hay varias razones para explicar el hombro: si se inactiva un *clump* de microorganismos que existe en suspensión, todas las células presentes en el grupo deben ser inactivadas antes de que la capacidad de formación de colonias de la agrupación esté totalmente inactivada. Otra posible explicación es que las poblaciones de bacterias expuestas a bajas concentraciones de desinfectante requieren una acumulación sucesiva de lesiones para llegar a su límite de umbral. Generalmente, cuando se trabaja con concentraciones bajas de desinfectantes, los mecanismos de protección de las bacterias son capaces de contrarrestar el daño celular causado por las especies oxidantes. Una vez pasado el límite umbral la resistencia disminuye notablemente, desapareciendo el hombro, y mostrando así que los mecanismos de reparación bacteriana no han sido capaces de evitar el efecto del desinfectante. No obstante, la velocidad y tiempo requerido para llegar al umbral límite también dependerá, como se mencionó anteriormente, de la velocidad en que se lleve a cabo la descomposición de la membrana.

La presencia de colas en una curva de inactivación puede tener una interpretación plausible distinta: si algunos de los actuales microorganismos son intrínsecamente más resistentes que otros, pueden sobrevivir en las condiciones estudiadas y mostrar una reducción en la tasa de inactivación y, en consecuencia, la desaparición de las colonias será sensiblemente más lenta. Además, la competencia por los productos de la oxidación subsiguiente del lisado (productos resultantes de las bacterias muertas) con las bacterias activas,

pueden contribuir también a la aparición de colas. Algunos autores (Benabbou et al., 2007; Coleman et al., 2005) sugieren que este comportamiento se debe al aumento de compuestos producidos por la lisis bacteriana, que causan protección a las bacterias no lastimadas, de modo que no son atacadas efectivamente.

Es importante destacar que por los resultados obtenidos, si se busca las concentraciones más efectivas que hacen al proceso más eficiente, se debería optar por las que generan curvas del tipo I. Es decir en aplicaciones prácticas se debería trabajar con concentraciones por arriba de las 5ppm de solución comercial de APA.

### **VI.2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES INHIBIENDO EL PERÓXIDO.**

Para evaluar la participación del peróxido de hidrógeno (HP) como desinfectante en la mezcla comercial, se procedió a su inhibición con catalasa bovina al 0,1% (Sigma Aldrich), continuando luego con el procedimiento de una corrida experimental típica (*Técnicas Analíticas. Procedimiento Experimental, capítulo IV*). Las corridas experimentales seleccionadas a modo de ejemplo son 3, de diferentes concentraciones de APA: de 4, 5, 6 ppm de ácido peracético, en solución con el HP inhibido. Estas concentraciones no fueron seleccionadas al azar, sino que se pretende estudiar concentraciones efectivas, con una alta tasa de inactivación y una baja concentración de desinfectante.

Luego del recuento en placas de Petri se grafica la concentración bacteriana de *E. coli* versus tiempo, en las figuras VI. 10. a VI. 12. se muestran los resultados obtenidos en una corrida experimental inhibiendo el peróxido de hidrógeno de la solución comercial, en las figuras VI.13 a VI. 15 se compararon los resultados de la inhibición del peróxido versus los resultados obtenidos en las corridas experimentales de la solución comercial de APA. Las condiciones ambientales de los ensayos fueron las mismas, pH, temperatura constante, y mezcla perfecta. Se contabilizó el último recuento válido, de acuerdo a la técnica de recuento en placa referenciada en el *Capítulo IV*.

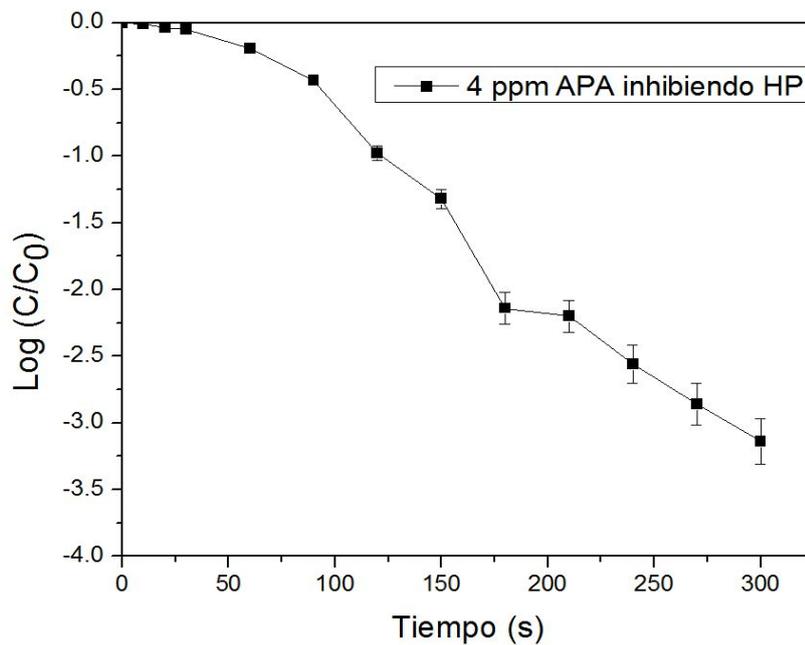


Figura VI. 10 Inactivación de *E. coli* con 4ppm de APA inhibiendo peróxido de hidrógeno.

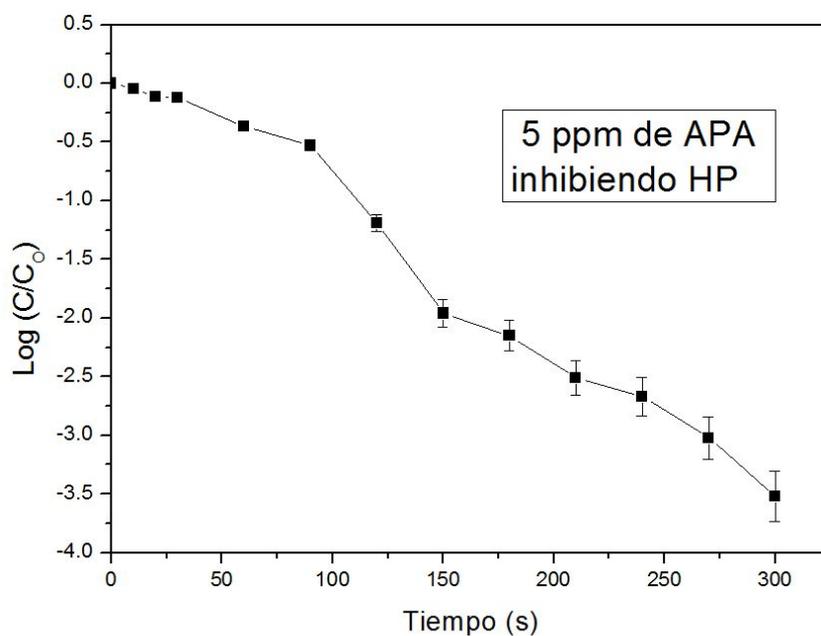
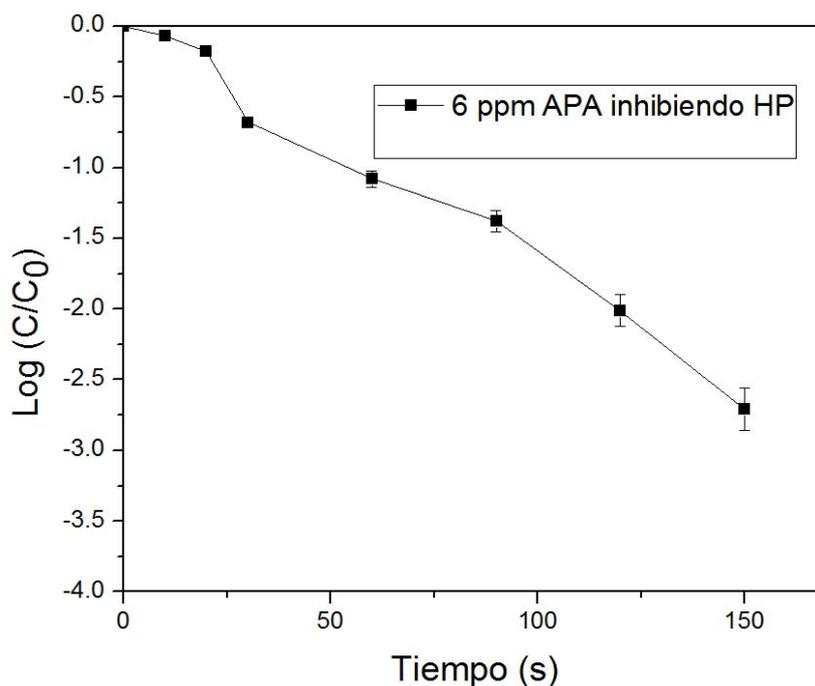


Figura VI.11. Inactivación de *E. coli* con 5ppm de APA inhibiendo peróxido de hidrógeno.



**Figura VI.12. Inactivación de *E. coli* con 6ppm de APA inhibiendo peróxido de hidrógeno.**

Para visualizar el efecto del aporte desinfectante del HP a la solución comercial APA, se cotejaron los valores obtenidos en la bibliografía (Labas et al. 2006; 2009) con los resultados obtenidos durante nuestros experimentos. En las figuras VI.13. a VI.15. se muestran corridas experimentales (de la misma concentración) donde se exhibe el poder desinfectante del APA solo (cuando el HP es inhibido) versus el poder desinfectante de la solución comercial.

Para la misma concentración de APA (4, 5 y 6 mg L<sup>-1</sup>) se grafica la concentración de *E. coli* versus tiempo.

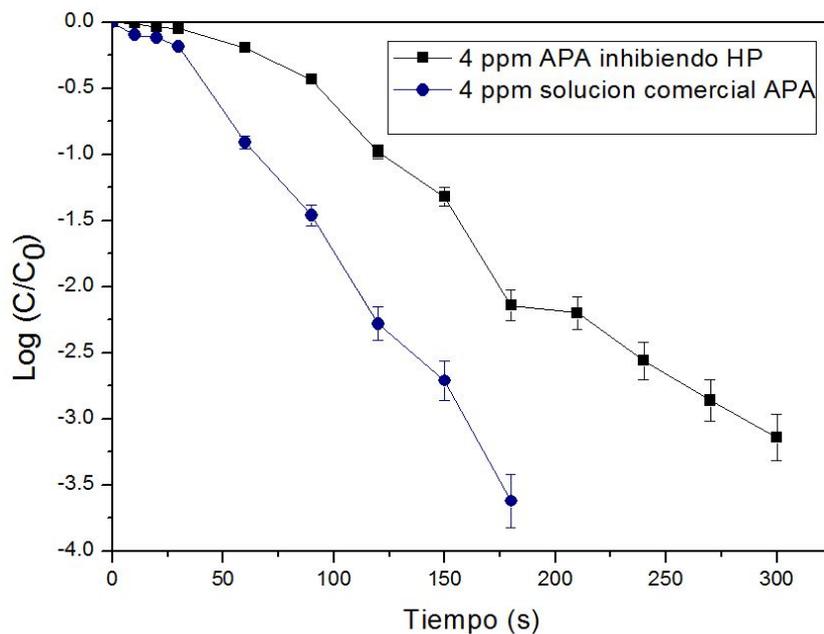


Figura VI. 13. Comparación de la velocidad de inactivación de *E. coli* con 4 ppm de solución APA comercial vs 4ppm APA inhibiendo peróxido.

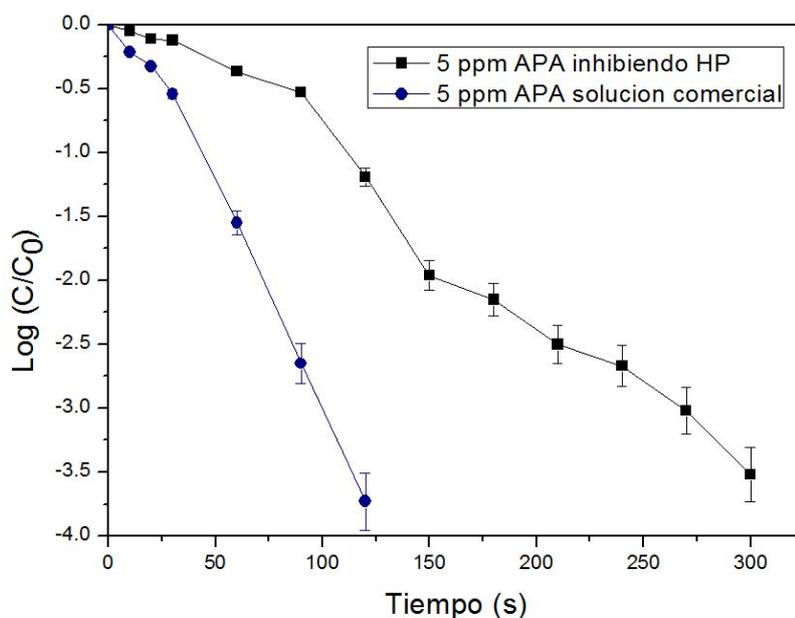
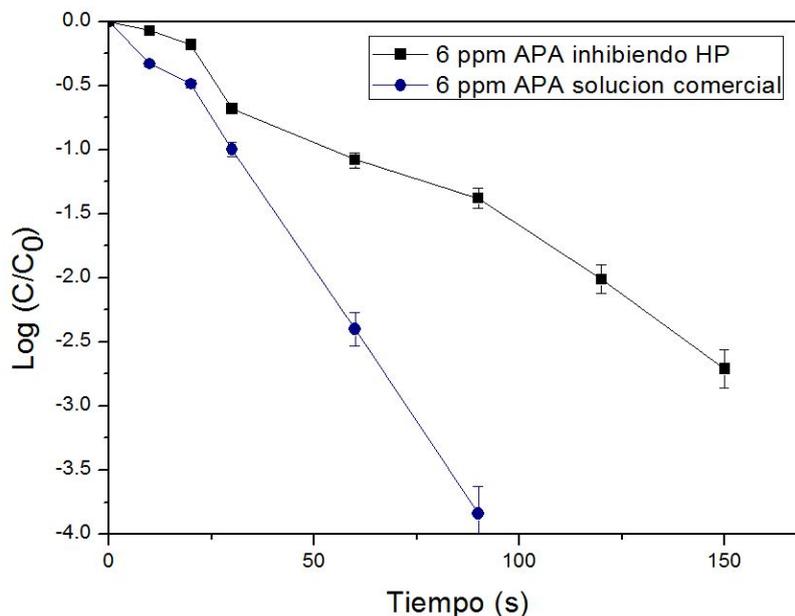


Figura VI.14. Comparación de la velocidad de inactivación de *E. coli* con 5 ppm APA solución comercial vs 5 ppm APA inhibiendo peróxido.



**Figura VI.15. Comparación de la velocidad de inactivación de *E. coli* con 6 ppm APA solución comercial vs 6 ppm APA inhibiendo peróxido.**

Del análisis de las figuras VI.13. a VI.15. se puede observar que para obtener el mismo nivel de desinfección (99,9%) logrado por la mezcla comercial de APA es necesario duplicar el tiempo de contacto cuando se utiliza APA solo. Esto puede ser visualizado claramente en la tabla VI.1.

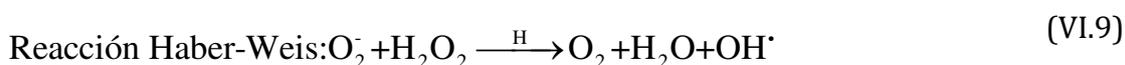
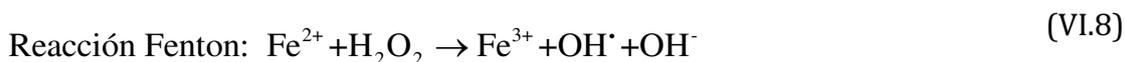
**Tabla VI.1. Tiempo necesario para lograr el mismo nivel de inactivación: solución comercial de APA versus APA inhibiendo peróxido.**

<i>APA solución comercial</i>		<i>APA inhibiendo HP</i>	
<i>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Tiempo de Inactivación (s)</i>	<i>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Tiempo de Inactivación (s)</i>
<b>4</b>	<b>180</b>	<b>4</b>	<b>300</b>
<b>5</b>	<b>120</b>	<b>5</b>	<b>290</b>
<b>6</b>	<b>90</b>	<b>6</b>	<b>150</b>

Este resultado muestra claramente un mayor incremento en la tasa de desinfección cuando se trabaja con la mezcla comercial. Este fenómeno se explica por el efecto sinérgico generado por la presencia de HP en la mezcla.

Puede considerarse que el sinergismo se ve beneficiado, en parte, por el aporte de los radicales OH• por parte del peróxido. La generación de radicales fuertemente oxidantes formados a partir del HP es el resultado de un/os mecanismo/ s bien conocido/ s.

El HP no es por sí mismo un radical, pero se convierte por medio de reacciones Fenton o Haber-Weis en el radical OH• en presencia de los iones Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> prevaecientes en las células (Deblin et al., 1981), las reacciones pueden visualizadas en las ecuaciones (VI. 8) y (VI.9)



Los radicales formados afectan a la célula en diferentes niveles (cambio de permeabilidad, alternación de las funciones vitales), siendo el radical OH• uno de los agentes que produce mayor daño celular.

Es importante destacar, el rol activo que juega la enzima catalasa ante la presencia del peróxido de hidrógeno, como ya se mencionó en el *Capítulo II*, el peróxido puede formar especies reactivas de oxígeno, donde el radical hidroxilo es el oxidante más activo. Estas especies reactivas de oxígeno dañan las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos en las bacterias, necesitándose sistemas antioxidantes eficientes para contrarrestar este daño, entre los que incluyen las enzimas. Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las catalasas, las peroxidasas y las peroxirredoxinas; mientras que las peroxidasas eliminan el HP usándolo para oxidar a otros sustratos y a diferencia de otras enzimas que requieren sustratos reducidos, las catalasas

(presente en *E. coli*) dismutan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Díaz, 2002).

Este mecanismo protector que exhiben las bacterias aerobias, se ve inhibido ante la presencia del APA, cuyo poder oxidante es tan fuerte que oxida los enlaces terminales de los aminoácidos presentes en esta enzima, impidiéndole desarrollar su mecanismo protector. La acción de la HP se basa principalmente en la oxidación causada por los radicales hidroxilos en forma casi exclusiva. Hay abundante bibliografía donde se menciona la acción del ácido peracético como agente oxidante, desnaturizado de proteínas, produciendo cambios de potencial en las membranas celulares y generando radicales  $\text{OH}^\bullet$ , esta bibliografía ha sido presentada a lo largo de este capítulo y de capítulos anteriores (*Capítulo I, Capítulo II*). Es interesante la comparación de los resultados obtenidos con ensayos experimentales donde se utiliza solamente HP como agente inactivante.

La tabla VI 2 muestra la comparación de los resultados obtenidos con los ensayos experimentales donde se utiliza solamente HP como agente inactivante. En esta tabla los valores de la izquierda fueron extraídos de los resultados publicados por Labas et al. (2008, 2009) para un tiempo de reacción total de 9000 s, empleando el mismo procedimiento experimental, también fueron publicados y analizados por Flores et al., 2014. De los resultados obtenidos con APA comercial se puede observar que a bajas concentraciones ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) se obtuvo una inactivación alta (99,9%) en sólo 300 s. Para alcanzar el mismo nivel de inactivación, en corridas experimentales que duraron 2,5 h, utilizando HP se requiere una concentración de  $160 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Tabla VI.2. Resultados de inactivación empleando peróxido de hidrógeno y APA comercial.**

<b>HP solo(*)</b> <b>(t = 9000 s)</b>		<b>APA solución comercial</b> <b>(t = 300 s)</b>	
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Inactivación</i> <i>(%)</i>	<i>APA</i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Inactivación</i> <i>(%)</i>
15	80	1	28.4
45	92	2	99.9
160	99.9	5	>99.99
185	99.99	15	>99.99

(\*) Labas, 2009

La mezcla comercial presenta un resultado único, que permite inferir en la existencia de diferentes mecanismos de acción de los desinfectantes desarrollándose en serie y en paralelo. Los hidroperóxidos orgánicos como el APA contienen grupos peróxidos que son una fuente indiscutible de alto potencial de oxidación, esto hace que la mezcla comercial sea altamente efectiva. Los daños a la membrana celular, por diversos mecanismos como procesos oxidativos, cambio de potencial, penetración transmembrana, etc., hacen que se pierda el transporte activo celular, provocan la disipación de la bomba de protones dejando debilitada a la bacteria, mientras que el APA inhibe los procesos catabólicos y anabólicos en el citoplasma, es probable que el HP produzca una oxidación radicalaria.

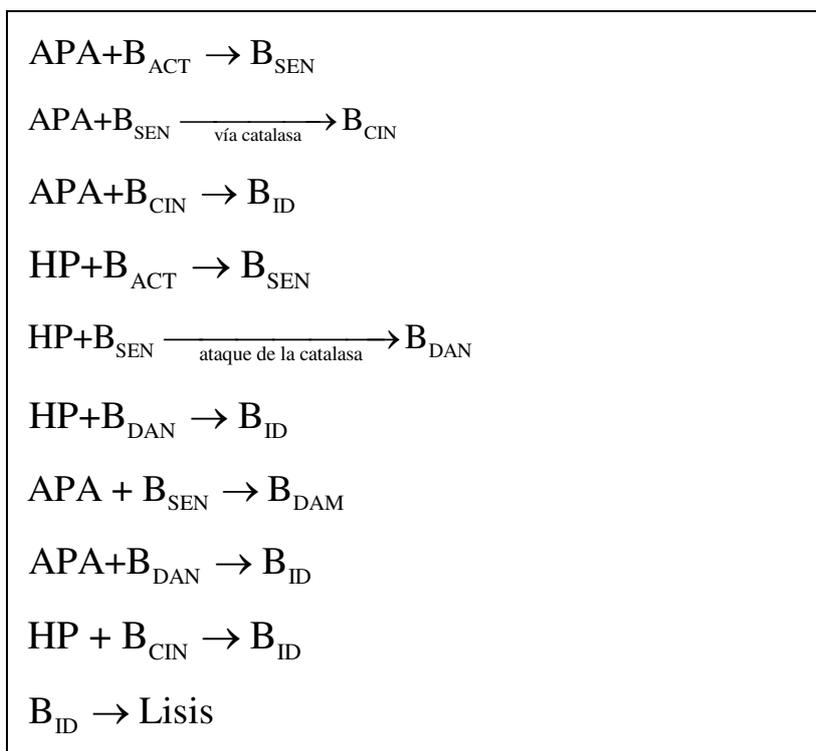
Si bien la naturaleza de las interacciones no ha sido completamente dilucidadas, existen referencias al respecto de la combinación de agentes biocidas que poseen mecanismos bioquímicos o fisicoquímicos complementarios que pueden conducir a una actividad sinérgica (Denyer y Maillard, 2002).

### VI.3. MODELO CINETICO

Con los resultados de corridas peróxido hidrógeno extraídos de un trabajo previo, las corridas con ácido peracético inhibiendo peróxido de hidrógeno y las corridas experimentales con la solución comercial de APA, se desarrolló un esquema cinético del proceso de inactivación de *E. coli*.

En la Tabla VI.3. se muestra el esquema de reacción del proceso de inactivación, mientras que el aporte de los agentes desinfectantes en forma individual y la reacción global de ambos desinfectantes se analizarán por separado. En principio, es posible modelar cada etapa del ataque con una expresión cinética de primer orden con respecto a la concentración del microorganismo y de primer orden respecto a la concentración del agente atacante.

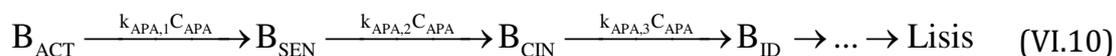
***TABLA VI.3 Etapas de reacción propuestas***



### VI.3.1. MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON APA (PERÓXIDO DE HIDRÓGENO INHIBIDO).

Para modelar la cinética de la desinfección del agua con APA habiéndose inhibido el peróxido de hidrógeno, se seleccionaron los ensayos experimentales de tres concentraciones diferentes de APA donde se inhibe el peróxido de hidrógeno de la mezcla comercial; estas concentraciones corresponden a: 4, 5, 6 ppm, la selección de estas concentraciones responde al rango de concentraciones que pueden ser usadas en aplicaciones prácticas (alta velocidad de inactivación a bajos tiempo de contacto). Es decir, se tomaron las curvas de inactivación más efectivas, aquellas que no presentaron hombro y cola marcados al momento de graficar los resultados, correspondientes al Tipo I de curvas de desinfección.

El esquema cinético se basa en proponer un ataque donde intervienen distintas etapas en serie.



En cada una de estas etapas, la especie bacteriana cambia de estado y la magnitud del daño para producir estos cambios de estado difiere de una etapa a otra.

El primer contacto del APA, representado por la ecuación (VI.11), con la célula bacteriana es con la membrana externa, esta constituye una verdadera red de peptidoglicano y lipopolisacáridos, que le proveen integridad estructural y la aíslan del medio circundante. Esta estructura es el “target” principal de los biocidas fuertemente oxidantes. (Los componentes estructurales de la membrana que son atacados por el ácido peracético, son los grupos tiol, presente en las proteínas y enzimas transmembrana). También es posible prever que esta alteración al normal funcionamiento celular, produzca la fosforilación

oxidativa y a la alteración del transporte activo (Rusell, 2003, Maillard, 2002; Denyer y Maillard, 2002)



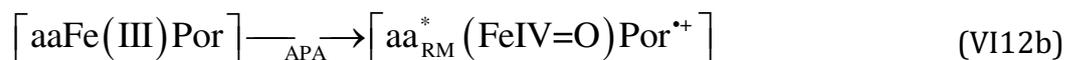
Donde  $B_{ACT}$  es la bacteria activa, viable con la pared celular intacta y  $B_{SEN}$  es la bacteria que ha sufrido una alternación en los sitios target de la membrana, cambiando su permeabilidad, el gradiente de pH, dejándola sensibilizada para un posterior ataque.

En una segunda etapa, una vez alterada la permeabilidad de la membrana, el ácido peracético tiene un rápido y fácil acceso a los mecanismos de defensa que exhibe la bacteria, como la enzima catalasa. El estado celular ahora es una bacteria sensibilizada, cuyas funciones metabólicas han sido alteradas (presenta inhibida la actividad de la enzima catalasa).



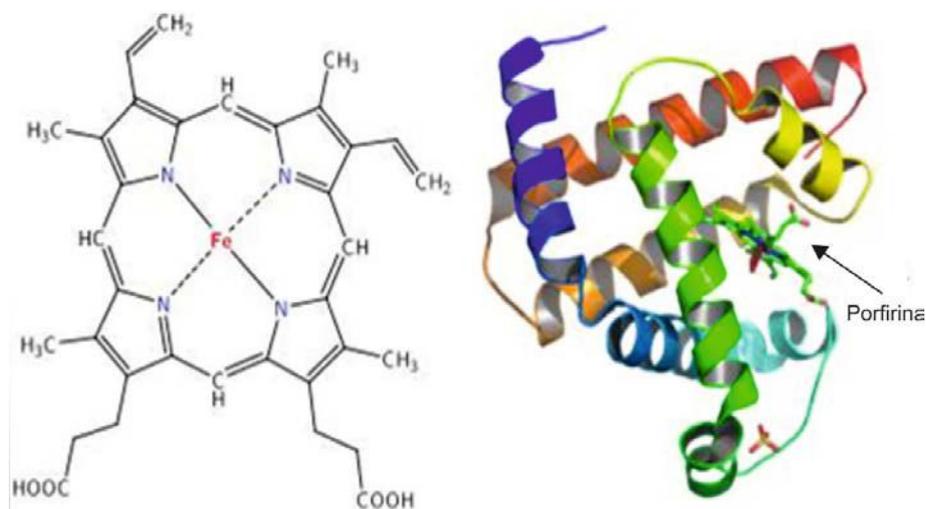
donde  $B_{CIN}$  es la bacteria (sensibilizada) catalasa inhibida.

Una propuesta plausible para la acción del APA con la catalasa es que produce una oxidación en los enlaces de los residuos de las proteínas, cambiando el estado de oxidación e impidiendo que esta cumpla su función como antioxidante. Es posible pensar en la siguiente etapa de reacción para la inhibición del poder antioxidante de la enzima.



Donde aa son los aminoácidos que constituyen la enzima y  $aa_{RM}$  son los aminoácidos cuyos residuos han sido modificados (subíndice RM).

Fe(III) y (Fe IV=O) representan diferentes estados de oxidación del hierro presente en el grupo hemo y Por simboliza a la porfirina. En la Figura VI.16 se puede observar el grupo hemo, este está formado un anillo orgánico complejo, la porfirina, a la que se une un átomo de hierro en estado ferroso, este átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro en el plano de la molécula plana de pofirina y unidos a ella, dos perpendiculares.



**Figura VI.16. El grupo hemo (adaptada de Lehninger, 2005)**

Una vez ocurrida la reacción enzimática, la bacteria, con el mecanismo de defensa inhibido y con la pérdida de la integridad de la membrana celular, (lo que permite el pasaje del agente oxidante al interior del citoplasma), queda irreversiblemente dañada. El ataque del agente oxidante a la bacteria con la catalasa inhibida resulta en la ruptura de sus constituyentes esenciales como pentosas, nucleótidos y proteínas. Es importante recordar que la bacteria está en contacto permanente con el APA debido a la característica de mezcla perfecta del espacio de reacción.



Esto se representa en la reacción (VI.13) donde  $\text{B}_{\text{ID}}$  es bacteria irreversiblemente dañada

Una vez producido el daño irreversible, la subsiguiente interacción produce la lisis celular, donde el agente oxidante sigue reaccionando luego con los componentes celulares.



El daño irreversible se representa en la ecuación (VI. 14).

El esquema de las etapas de reacción puede ser representado por la figura VI.17.

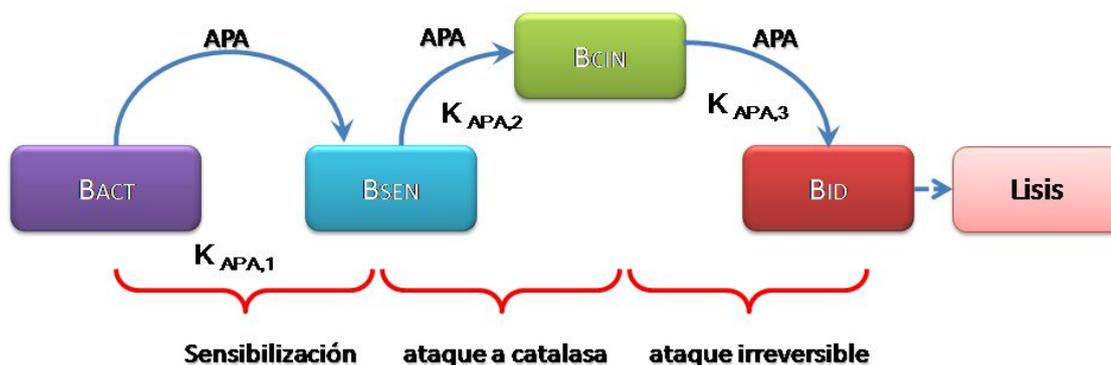


Figura VI.17. Esquema de reacción APA inhibiendo HP

### VI.3.1.1. BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR

Para hallar las expresiones que permiten obtener los parámetros del modelo, es necesario plantear el balance de materia correspondiente. Dado que el reactor es un tanque de 2 litros de capacidad, que se encuentra perfectamente mezclado, la concentración de APA se considera uniforme en todo el volumen del reactor. Además el reactor opera en forma isotérmica, ya que la temperatura permanece constante a 20°C mediante el uso de una camisa refrigerante.

La concentración del agente desinfectante (APA inhibiendo peróxido) puede suponerse siempre en exceso frente a la concentración de microorganismos. Esto implica que prácticamente la concentración del agente desinfectante se conserva constante a lo largo de toda la reacción. Este comportamiento fue verificado experimentalmente, comprobando que no se

producen variaciones en la concentración durante los ensayos experimentales (*Capítulo IV*).

Bajo las suposiciones mencionadas, se plantea el balance de materia en el reactor batch para cada una de las especies involucradas (como se trabaja con un sistema totalmente mezclado, la concentración de bacterias es uniforme en todo el volumen del reactor). Así podemos escribir:

$$\frac{dC_{B_{ACT}}}{dt} = -(k_{APA,1} C_{APA}) C_{B_{ACT}} \quad (VI.15)$$

$$\frac{dC_{B_{SEN}}}{dt} = -(k_{APA,2} C_{APA}) C_{B_{SEN}} + (k_{APA,1} C_{APA}) C_{B_{ACT}} \quad (VI.16)$$

$$\frac{dC_{B_{CIN}}}{dt} = -(k_{APA,3} C_{APA}) C_{B_{CIN}} + (k_{APA,2} C_{APA}) C_{B_{SEN}} \quad (VI.17)$$

$$\frac{dC_{B_{ID}}}{dt} = +(k_{APA,3} C_{APA}) C_{B_{CIN}} \quad (V.18)$$

Con sus correspondientes condiciones iniciales, a tiempo igual a cero:

$$C_{B_{ACT}} = C_{B_{ACT}}^0 ; C_{B_{SEN}} = C_{B_{CIN}} \quad C_{B_{ID}} = 0 \quad (VI.19)$$

Es importante destacar la siguiente relación donde:

$$C_{B_{VIA}} = C_{B_{ACT}} + C_{B_{SEN}} + C_{B_{CIN}} = C_{B_{ACT}}^0 - C_{B_{ID}} \quad (VI.20)$$

La concentración de las bacterias viables ( $C_{B_{VIA}}$ ) es la diferencia existente entre las bacterias activas (concentración inicial experimental) y las bacterias irreversiblemente dañadas, siendo estas concentraciones las que se puede determinar experimentalmente.

### *VI.3.1.2. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO*

Un paso determinante en el modelado y simulación de las etapas de desinfección, lo constituye la estimación de parámetros, dado que los resultados obtenidos dependen en gran medida del rigor con que se haga esta estimación.

Los parámetros cinéticos del modelo fueron estimados siguiendo el esquema de trabajo que se muestra en la figura VI.18. El objetivo de esta parte del trabajo es la obtención de los parámetros cinéticos derivados de las ecuaciones del modelo que mejor se ajusten a los resultados experimentales. Para la estimación de estos parámetros cinéticos se realizó un programa en MATLAB.

Los correspondientes balances de materia, se resolvieron numéricamente utilizando un Método de Runge-Kutta de cuarto orden. Los parámetros cinéticos del modelo son obtenidos mediante un procedimiento de regresión de mínimos cuadrados no lineal (NLLS) basado en el algoritmo de optimización de Levenberg-Marquardt. Este procedimiento encuentra aquellos valores de los parámetros que minimizan la suma de cuadrados de las diferencias entre los logaritmos de las concentraciones predichas por el modelo y de las concentraciones obtenidas a partir de los datos experimentales. Como resultado de la simulación numérica, se obtuvieron valores de concentración de las cuatro especies  $B_{ACT}$ ,  $B_{SEN}$ ,  $B_{CIN}$ ,  $B_{ID}$  para diferentes tiempos de reacción.

Siguiendo el esquema de trabajo, la raíz del error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) se calculó en base del logaritmo de las concentraciones utilizadas en la estimación de parámetros y las concentraciones experimentales, este RMSE que se define entonces como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N \left( \frac{\ln(C_{B_{VIA},i}^{EXP}) - \ln(C_{B_{VIA},i}^{MOD})}{\ln(C_{B_{VIA},i}^{EXP})} \right)^2} \quad (VI.21)$$

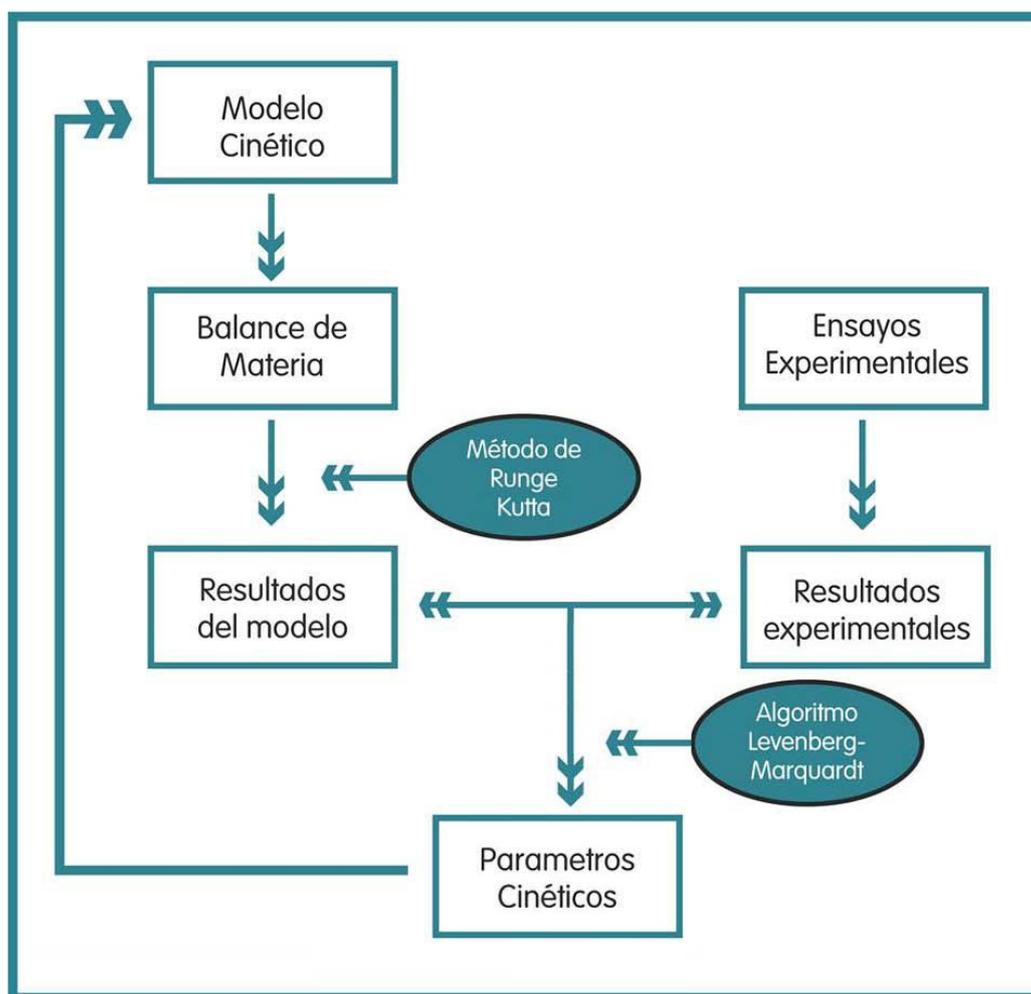


Figura VI. 18. Esquema para la obtención de parámetros cinéticos

En las figuras VI. 19. a VI. 21. se observa la historia temporal de la concentración de *E. coli* experimental para diferentes valores de APA conjuntamente con el ajuste del modelo propuesto.

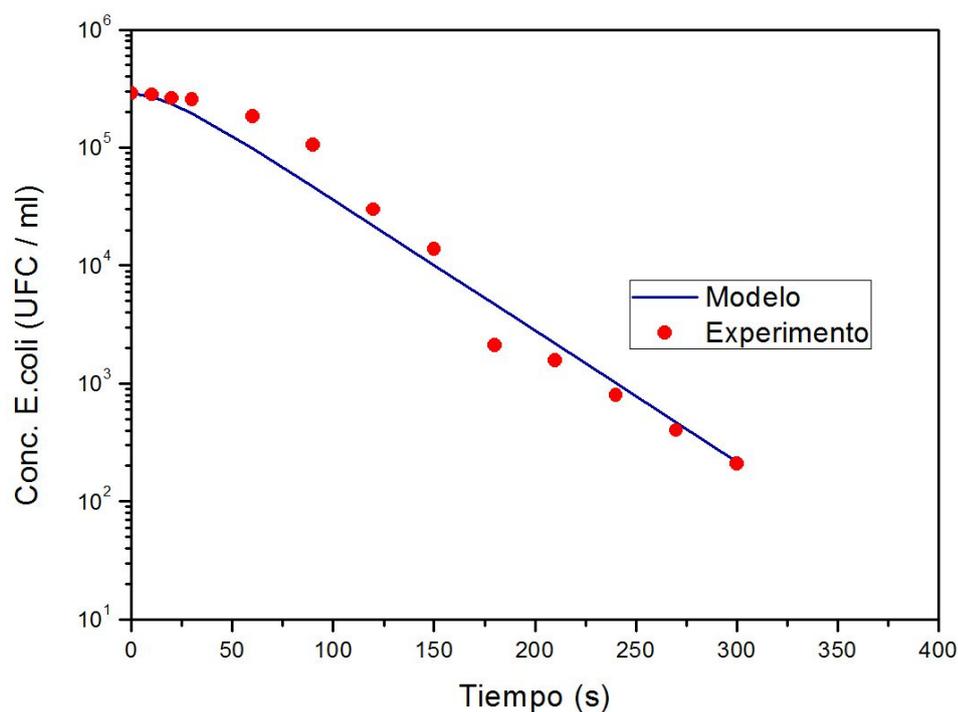


Figura VI.19. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y del modelo (línea sólida) para una concentración de APA inhibiendo peróxido de 4 ppm.

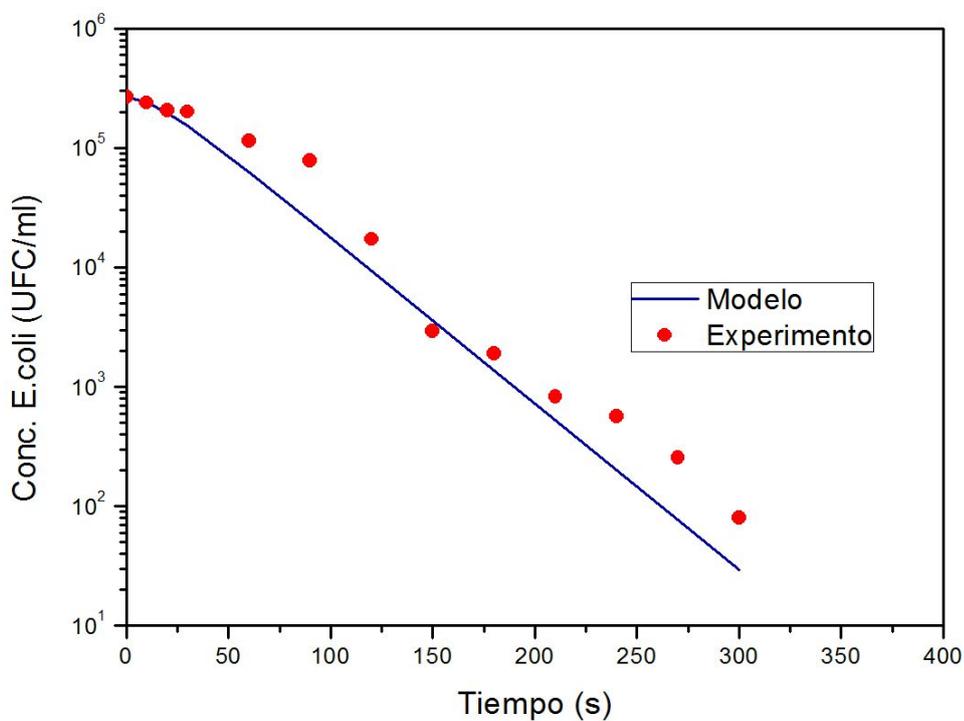


Figura VI.20. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y del modelo (línea sólida) para una concentración de APA inhibiendo peróxido de 5 ppm.

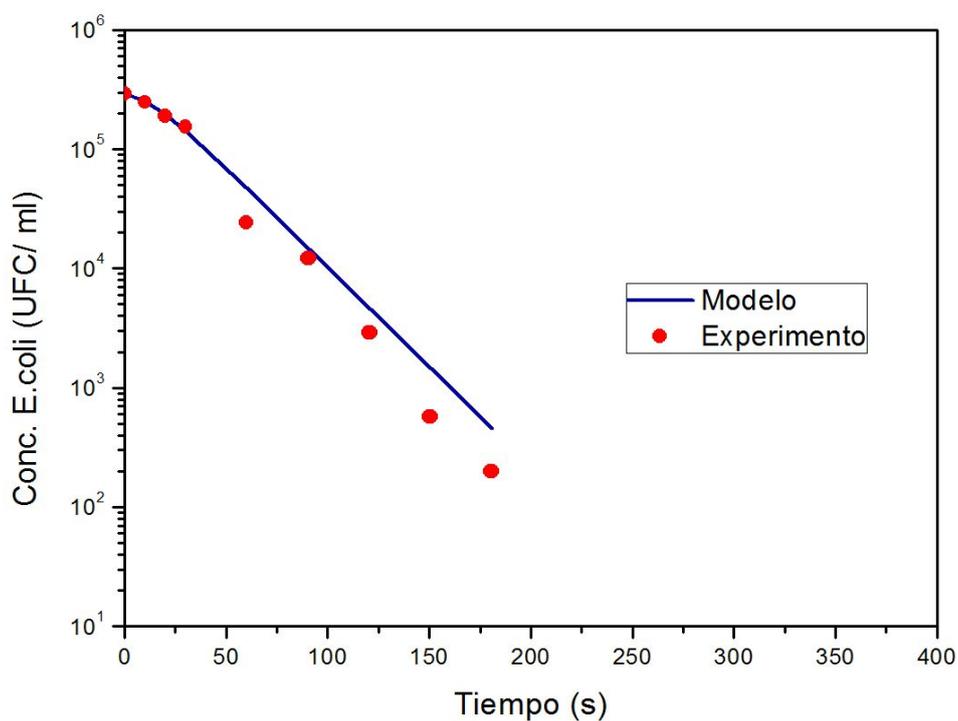


Figura VI. 21 Evolución de las concentraciones experimentales (•) y del modelo (línea sólida) para una concentración de APA de 6 ppm inhibiendo HP.

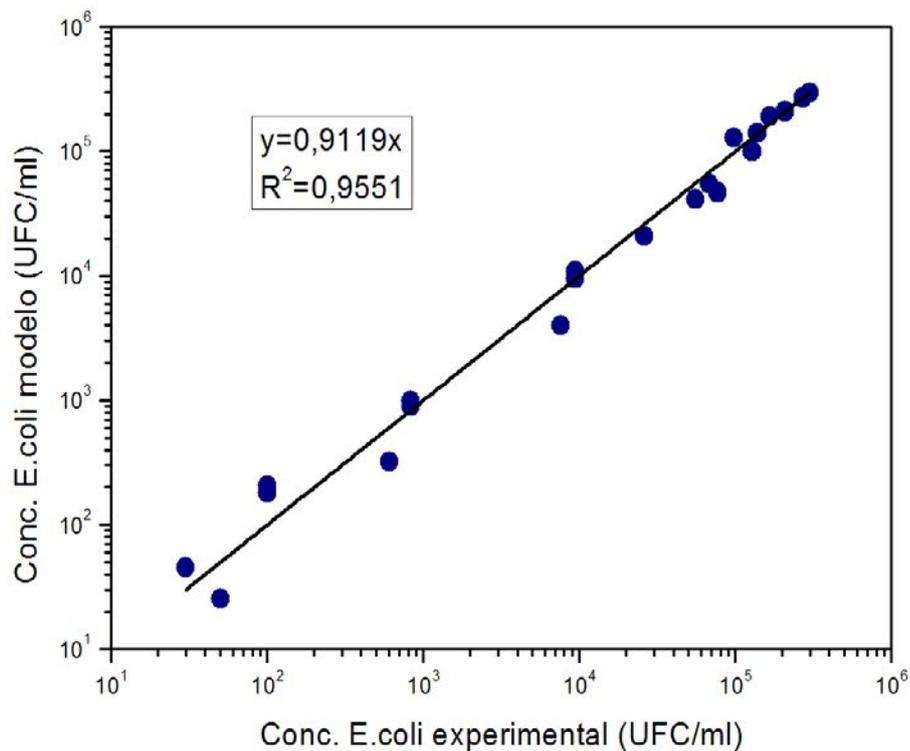


Figura VI. 22. Comparación de las concentraciones de *E. coli* del modelo propuesto versus concentración *E. coli* experimental.

Aplicando regresión lineal simple se obtiene el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9767, lo que indica que el modelo representa adecuadamente lo obtenido experimentalmente.

Las figuras VI. 19. a VI. 22. muestran el buen ajuste entre las predicciones del modelo y los datos experimentales obtenidos de la inactivación de *E. coli* utilizando APA como único agente oxidante.

Los valores de los parámetros cinéticos, que representan los ensayos experimentales y la raíz del error cuadrático medio son:

$$K_{APA,1}=(4.8629 \pm 0.2553) \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{APA,2}=(1.2480 \pm 0.1857) \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{APA,3}=(8.3489 \pm 2.0282) \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$RMSE= 8,6\%$$

Del análisis de los parámetros obtenidos en este proceso surgen diferentes observaciones: la constante  $K_{APA, 1}$ , etapa controlante, coincide con los postulados teóricos, donde se presenta como la etapa más lenta de la inactivación bacteriana a la primer interacción biocida-bacteria. En la literatura, se muestra a la membrana externa celular como la primera barrera a franquear por el agente desinfectante (Ortega Morente et al., 2013; Block, 1991). La bacteria exhibe, en este paso sus primeros mecanismos de defensa, como cambios en la permeabilidad celular, y reducción de actividades metabólicas. Los mecanismos de reacción bacteria-APA, una vez realizado el primer contacto, no están completamente dilucidados, pero se ha comprobado, para los compuestos peroxigenados reacciones radicalarias con los grupos tiol y de oxidación-reducción con los metales de transición presentes en la superficie celular (Block, 2001; Marquis et al., 1995). Ninguna de estas reacciones son instantáneas y dependen de varios factores como son: la concentración celular, la concentración del biocida, el biocida en sí, el pH y la temperatura (Denyer, 1995). Una vez alterada la homeostasis celular, se produce la penetración al interior de la célula (Russell, 2003).

El parámetro  $K_{APA,2}$  representa una reacción de sensibilización más una reacción de inhibición enzimática no competitiva, donde la estructura proteica que determina la actividad enzimática de la catalasa es perturbada (oxidada por el APA). Esto afecta a la tasa de la reacción catalizada por la enzima ya que la presencia del inhibidor produce un cambio en su estructura y su forma. Este cambio en la forma implica que la catalasa deja de ser capaz de unirse correctamente al sustrato (peróxido de hidrógeno). Esto reduce la concentración de enzima "activa" resultando en una disminución de la velocidad máxima enzimática ( $V_{max}$ ).

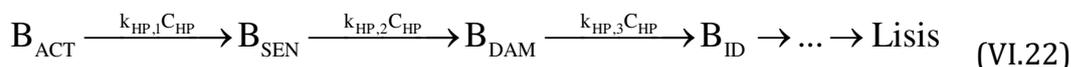
El último parámetro obtenido,  $K_{APA,3}$ , constituye la etapa más veloz del mecanismo propuesto para APA, esto es coincidente con los resultados esperados y los resultados propuestos por la literatura: el APA ya ha alterado la membrana celular e inhibido los mecanismos principales de defensa, como la actividad de la catalasa, y la fuerza protón motriz (PMF, proton motive force, por sus siglas en inglés), esta última ha sido documentada como uno de los targets del ácido orgánico (Ortega Morente et al., 2013; Hugo, 1978). Una vez penetrado el citoplasma, el APA interacciona velozmente con los constituyentes vitales de la célula causando un daño irreversible, siendo destacable la reacción con los nucleótidos de purina y los ácidos nucleídos por su interacción con los grupos aminos y sulfidrilos (Adams et al., 1981; Vosberg and Hoffman, 1971)

### **VI.3.2. MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

Se seleccionaron ensayos experimentales con tres concentraciones diferentes de peróxido de hidrógeno (15, 25, 33 ppm) utilizando *E. coli* como microorganismo modelo. La selección de estos valores, responde a que a concentraciones menores, la tasa de inactivación del HP es sumamente baja y los tiempos experimentales son prolongados (superiores a las 3 horas). La realización del esquema cinético con estas concentraciones permite lograr una mayor eficiencia en el cálculo del poder desinfectante, esto es un aspecto muy

importante, ya que la velocidad de reacción se ve afectada considerablemente por la concentración.

El esquema cinético se basa en proponer un ataque donde intervienen distintas etapas en serie.



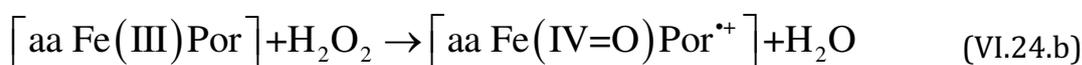
La bacteria activa ( $B_{ACT}$ ) sufre una sensibilización por parte del ataque del peróxido quedando sensibilizada para un posterior embate del desinfectante



La bacteria sensibilizada ( $B_{SEN}$ ) continua reaccionando con la molécula de peróxido de hidrógeno hasta producirse un daño considerable ( $B_{DAN}$ ) que, si bien altera las funciones celulares, no produce la muerte de la misma, ni altera su viabilidad y cultivabilidad. Debe destacarse que en esta etapa la bacteria posee enzimas específicas que le permiten defenderse del ataque del peróxido, como la enzima catalasa.



Se propone el siguiente esquema de reacción para representar la interacción peróxido de hidrógeno-enzima catalasa. Este esquema fue realizado de acuerdo a los expuesto en diferentes bibliografías (Battistuzzi et al, 2010; Galvan et al., 2010; Ghiladi et al., 2005, ) sobre las reacciones de las hemo enzimas.

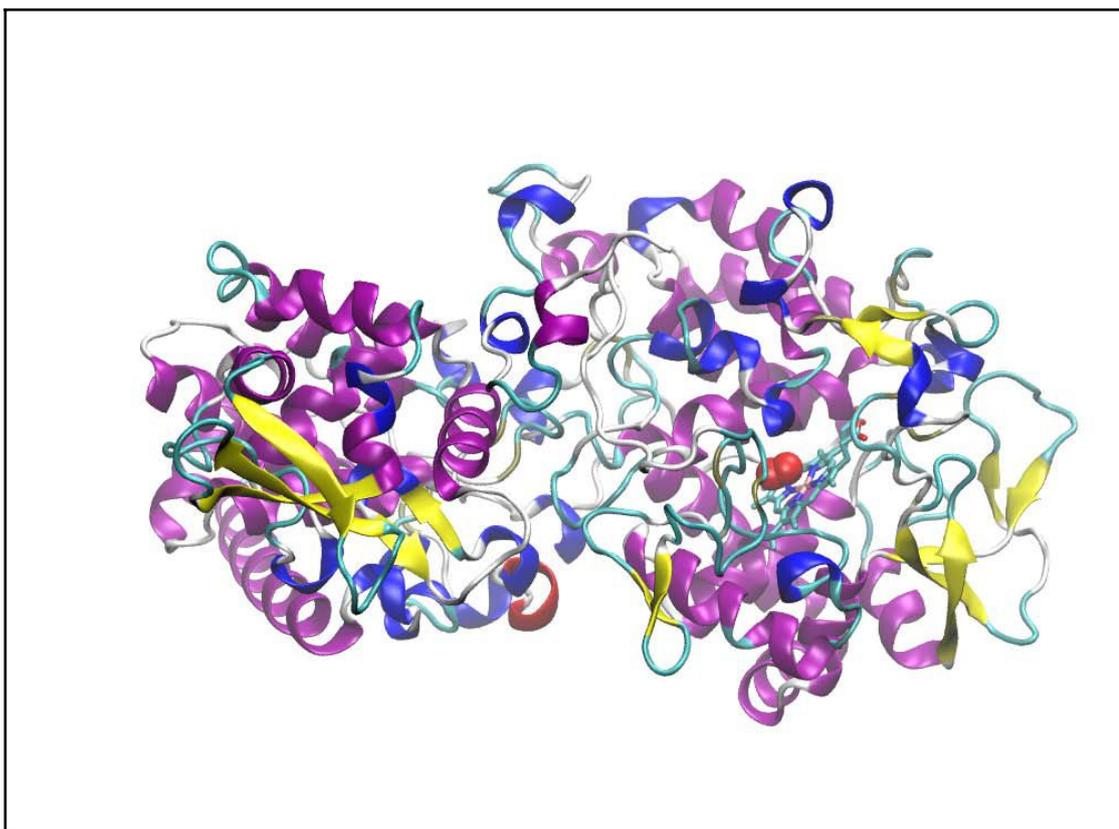


donde aa: son los aminoácidos que rodean al grupo hemo. El hierro se encuentra en estado de oxidación 3+ ( $Fe^{3+}$ ) y es el elemento principal del grupo. Además, se puede observar una reacción redox, donde las especies oxidantes son reducidas luego a su estado original.

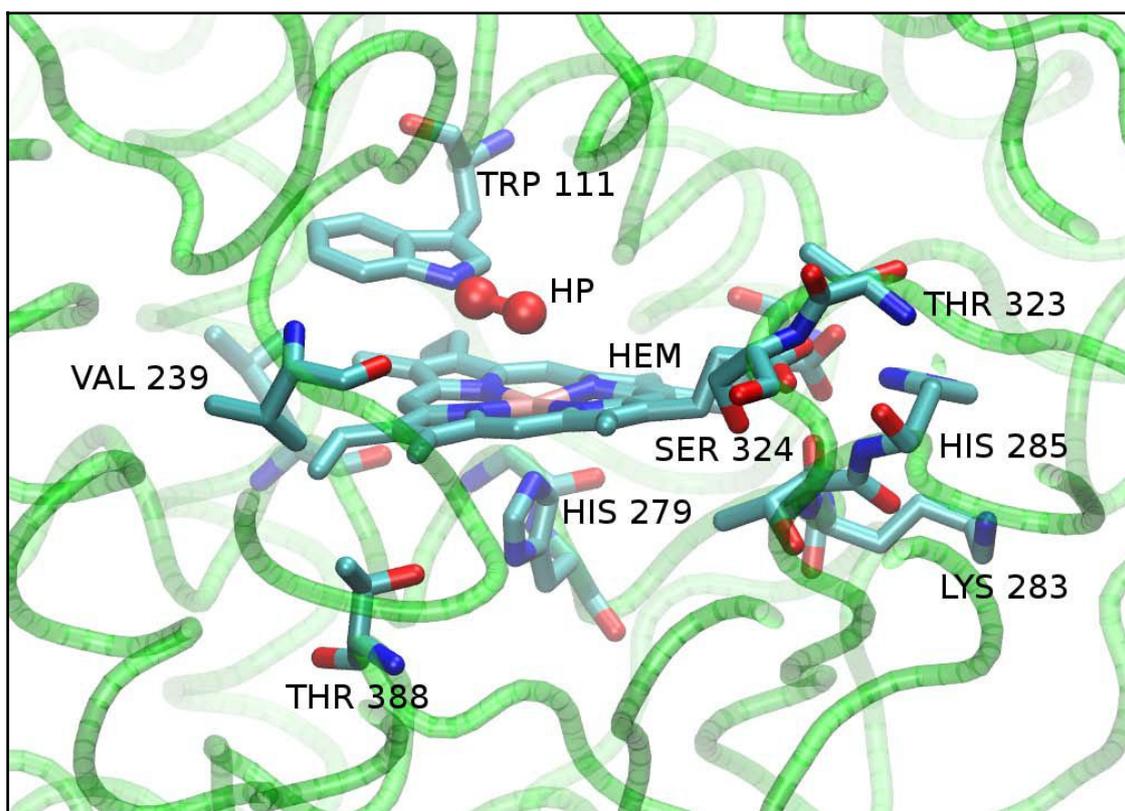
La reacción general puede resumirse de la siguiente forma:



Si bien se ensayó experimentalmente el poder inactivante de la catalasa sobre el peróxido, se estudió también la reacción enzimática mediante un programa de visualización molecular, VMD (VMD es un programa de visualización y análisis estructural de proteínas de dominio público). Se obtuvo del Protein Data Bank (PDB) una enzima catalasa cristalizada mediante la técnica de Rayos X (doi.10.1038) y se visualizaron los sitios de interés para la reacción, destacándose las interacciones de la molécula de peróxido con el grupo hemo (Fe (III)) de la enzima. Las imágenes VI.23 y VI. 24 son el resultado de esta etapa (Apéndice III. VMD).



**Figura VI.23. Estructura en forma de cinta de la enzima catalasa (en el extremo inferior derecho se observa la molécula de peróxido de hidrógeno).**



**Figura VI.24. Imagen de la molécula de peróxido sobre el grupo hemo presente en la enzima. Representación de los residuos de aminoácidos.**

La bacteria dañada, pierde su viabilidad luego de que sus constituyentes vitales dentro de la célula sufren un daño irreversible ( $B_{ID}$ ). La disrupción de la membrana citoplasmática a menudo es ejemplificada por la fuga de los componentes intracelulares, como el potasio ( $K^+$ ) seguido de fosfatos inorgánicos, el pool de aminoácidos y los materiales de absorción en 260nm: ácidos nucleicos y proteínas (Lambert y Hammond 1973).



Una vez causado el daño irreversible, un subsiguiente ataque del agente oxidante causa el lisado celular, expresándose finalmente como:



**VI.3.2.1. BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR.**

Las suposiciones del modelo son las mismas desarrolladas en el inciso VI.3.1.1 El balance de materia para cada especie es el siguiente:

$$\frac{dC_{B_{ACT}}}{dt} = -(k_{HP,1} C_{HP}) C_{B_{ACT}} \quad (VI.28)$$

$$\frac{dC_{B_{SEN}}}{dt} = -(k_{HP,2} C_{HP}) C_{B_{SEN}} + (k_{HP,1} C_{HP}) C_{B_{ACT}} \quad (VI.29)$$

$$\frac{dC_{B_{DAM}}}{dt} = -(k_{HP,3} C_{HP}) C_{B_{DAM}} + (k_{HP,2} C_{HP}) C_{B_{SEN}} \quad (VI.30)$$

$$\frac{dC_{B_{ID}}}{dt} = +(k_{HP,3} C_{HP}) C_{B_{DAM}} \quad (VI.31)$$

La concentración de bacterias viables puede ser obtenida mediante la relación:

$$C_{B_{VIA}} = C_{B_{ACT}} + C_{B_{SEN}} + C_{B_{DAM}} = C_{B_{ACT}}^0 - C_{B_{ID}} \quad (VI.32)$$

El esquema del ataque en serie propuesto es representado en la Figura VI. 25

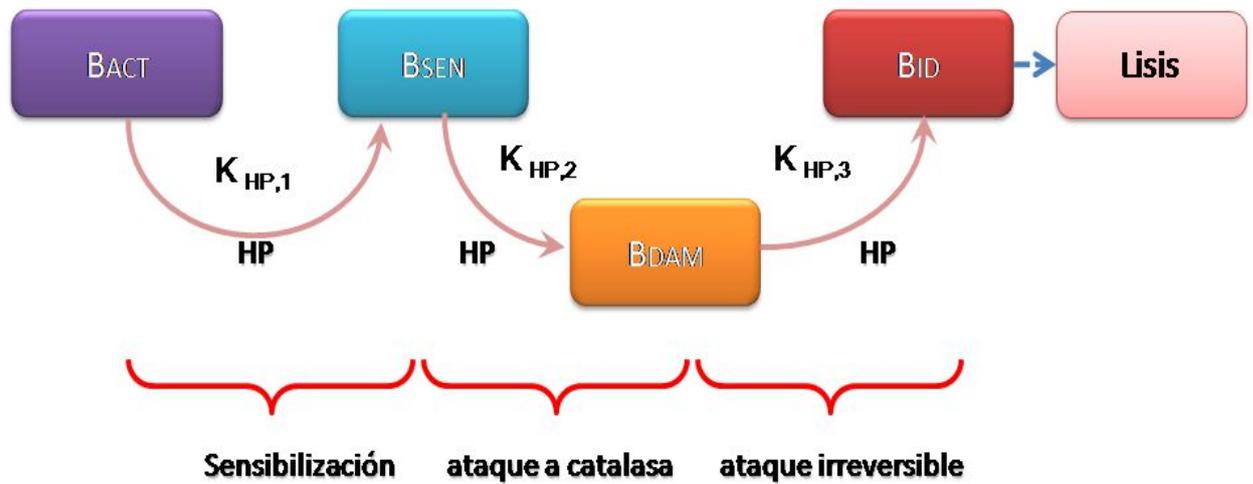


Figura VI.25 Esquema de Ataque: Peróxido de Hidrógeno

### VI.3.2.2. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS

#### DEL MODELO:

Para la estimación de los parámetros cinéticos del modelo se repite la metodología de trabajo propuesta en el inciso VI.3.1.2 representada en el esquema VI.18.

En las figuras VI. 26. a VI. 29. se observa la evolución en función del tiempo de las concentraciones de *E. coli* experimentales con el ajuste del modelo propuesto.

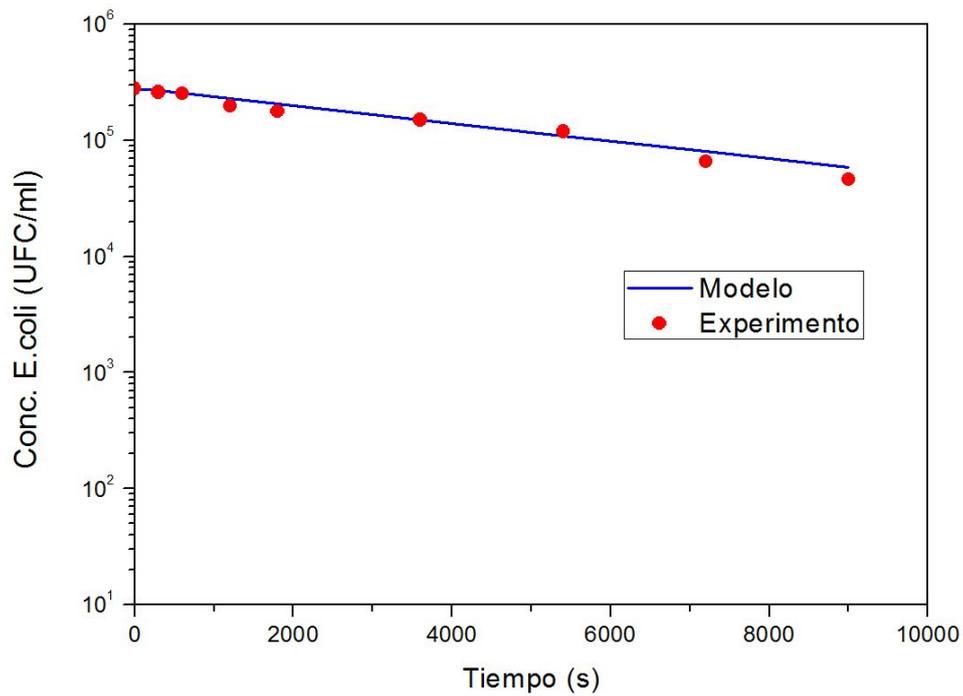


Figura VI.26. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de 15 ppm de HP

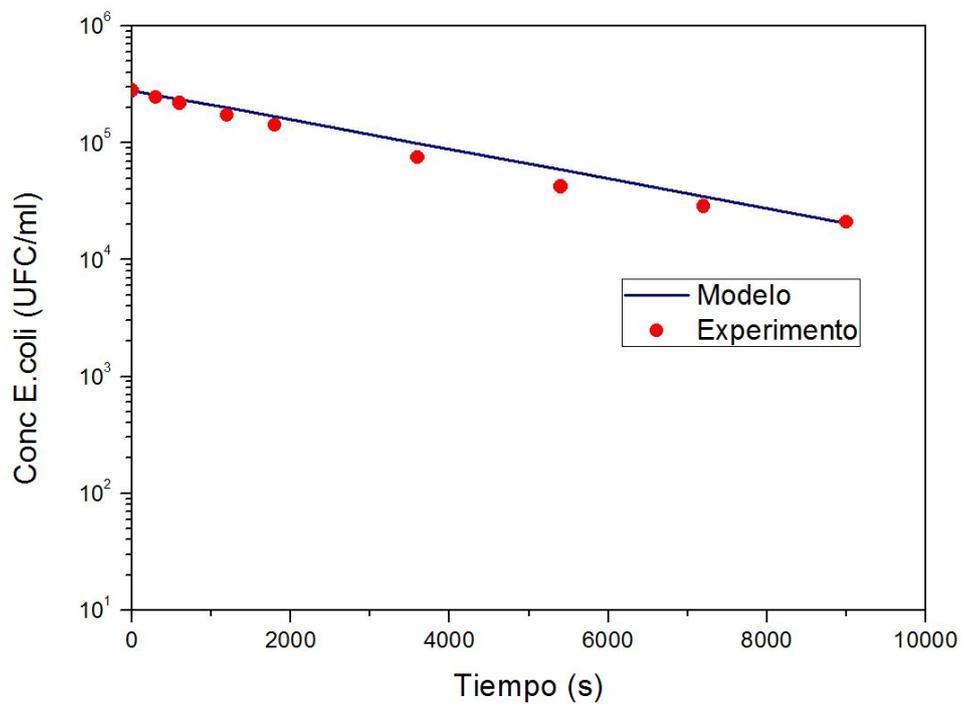


Figura VI.27. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de 25 ppm de HP

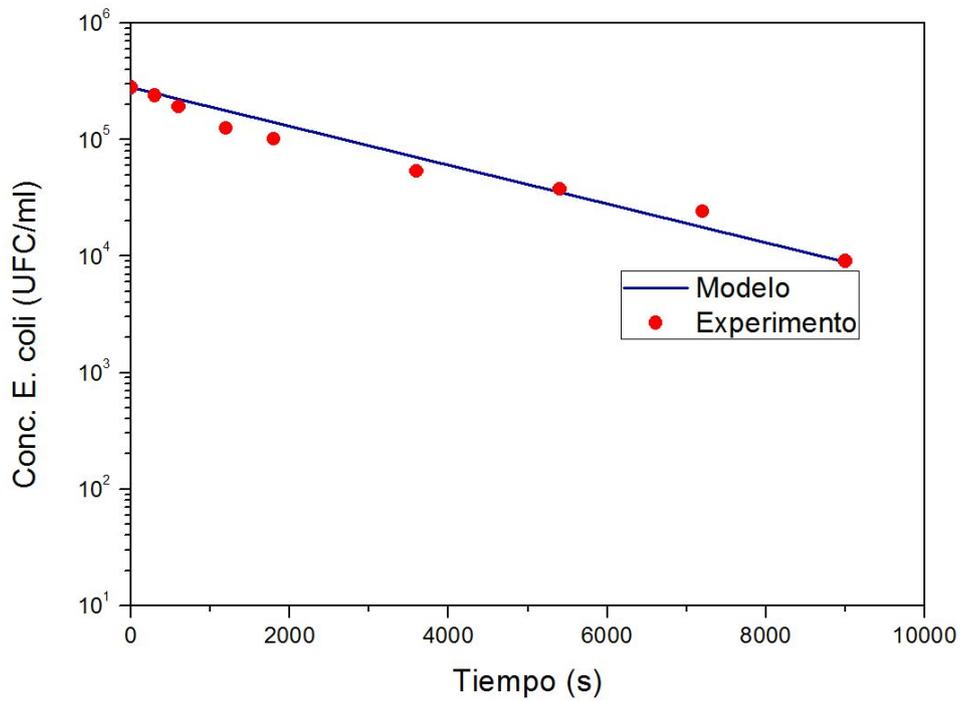


Figura VI.28. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de 33 ppm de HP

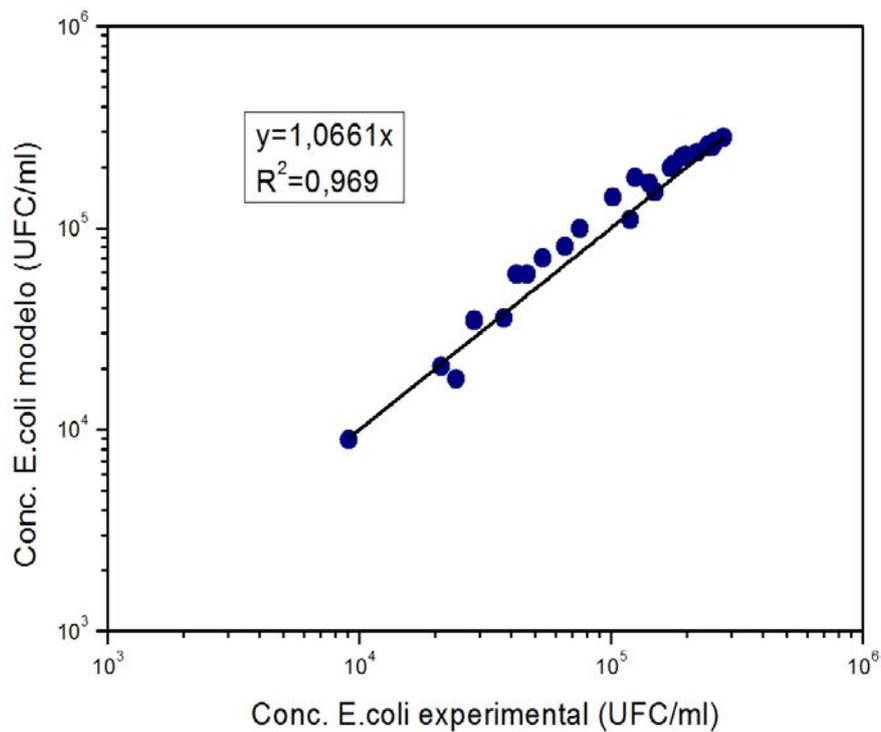


Figura VI.29. Concentración de *E. coli* del modelo versus concentración de *E. coli* experimental

El coeficiente de correlación tiene un valor de 0,969 lo que indica que el modelo predice adecuadamente lo que ocurre en las experiencias.

Las figuras VI. 26. a VI. 29. muestran la bondad del ajuste entre las predicciones del modelo y los datos experimentales obtenidos de la inactivación de *E. coli* utilizando HP como único agente oxidante, a diferentes concentraciones.

Los valores de los parámetros cinéticos y la raíz del error cuadrático medio son:

$$k_{HP,1}=(4.9327 \pm 0.6072) \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{HP,2}=(3.9437 \pm 0.1999) \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{HP,3}=(8.0495 \pm 3.6625) \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

*RSM*: 1,6%

El primer parámetro cinético obtenido en esta etapa  $k_{HP,1} = (4.9327 \pm 0.6072) \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  se encuentra en el mismo orden que el parámetro  $k_{APA,1} = (4.8629 \pm 0.2553) \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , (cuando se utiliza APA como único agente oxidante), en un análisis a primera vista se podría pensar que esta constante no era la esperada, ya que, siendo el APA un oxidante más potente que el peróxido de hidrógeno, se esperarían obtener una diferencia en el orden de magnitud de las constantes. No obstante, haciendo un análisis más profundo, se encuentran varias explicaciones para ocurra este fenómeno:

- i) ambos son compuestos peroxigenados y actúan en forma similar en el primer contacto con la membrana celular. El mecanismo de acción ante las células bacterianas se basa principalmente en el oxígeno activo y la capacidad de formar especies radicalarias (Ortega Morente et al., 2013; Russell, 2003, Denyer, 1995).
- ii) el peróxido de hidrógeno reacciona con los metales biodisponibles en la membrana celular, catalizando estos su velocidad de reacción;
- iii) la célula bacteriana exhibe los mismos mecanismos de defensa ante todos los biocidas. La membrana de las bacterias Gram-

negativas actúa como una barrera semipermeable y es la responsable de de la resistencia intrínseca de estos microorganismos ante diferentes compuestos antimicrobianos. La membrana externa de la familia de bacterias *Enterobacteriaceae* actúa como una barrera limitando o previniendo el ingreso de una gran diversidad de compuestos químicos, sin importar su composición (Gilbert et al., 1990; Nikaido y Vaara, 1985).

El parámetro  $k_{HP,2}=(3.9437 \pm 0.1999)\times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  es la etapa controlante de este mecanismo. Se caracteriza por una reacción de sensibilización en la bacteria y una reacción catalizada por enzimas. El mecanismo ya ha sido desarrollado en el ítem VI.3.2.1 de este capítulo. El peróxido se consume en parte, liberando agua y oxígeno, al reaccionar con la catalasa pierde gran parte de su efectividad. Como la concentración de desinfectante está en exceso, el HP, reacciona con la bacteria sensibilizada, alterando sus funciones vitales y dejándola dañada.

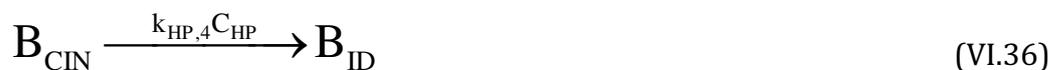
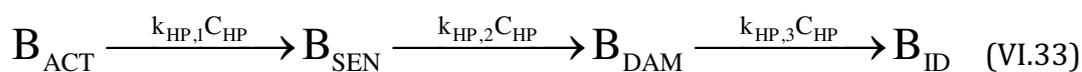
El parámetro  $k_{HP,3}=(8.0495 \pm 3.6625)\times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  representa el cambio de estado de bacteria dañada a bacteria irreversiblemente dañada. Al comparar este parámetro con el obtenido al utilizar APA como agente desinfectante, (ambos actuando sobre una bacteria injuriada), el valor del parámetro  $K_{APA,3}=(8.3489 \pm 2.0282)\times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , muestra que, una vez vencida la primer resistencia ambos desinfectantes actúan a diferentes velocidades, siendo el APA un agente oxidante más fuerte que el HP en estas condiciones de trabajo.

### **VI.3.3. MODELO CINÉTICO DE LA DESINFECCIÓN DE AGUA CON APA COMERCIAL**

Se seleccionaron corridas experimentales con tres concentraciones diferentes de APA comercial: 5, 6, 8 ppm. Estas concentraciones corresponden a

las más efectivas y aplicables en la práctica ya que se logran altas tasas de inactivación (99.99%) en cortos periodos de tiempo.

El esquema cinético propuesto para la solución comercial de APA se representa mediante etapas en serie, donde se considera la acción del ácido peracético y del peróxido de hidrógeno en conjunto. Así se puede escribir el siguiente sistema:



El esquema cinético propuesto es representado en la figura VI.30.

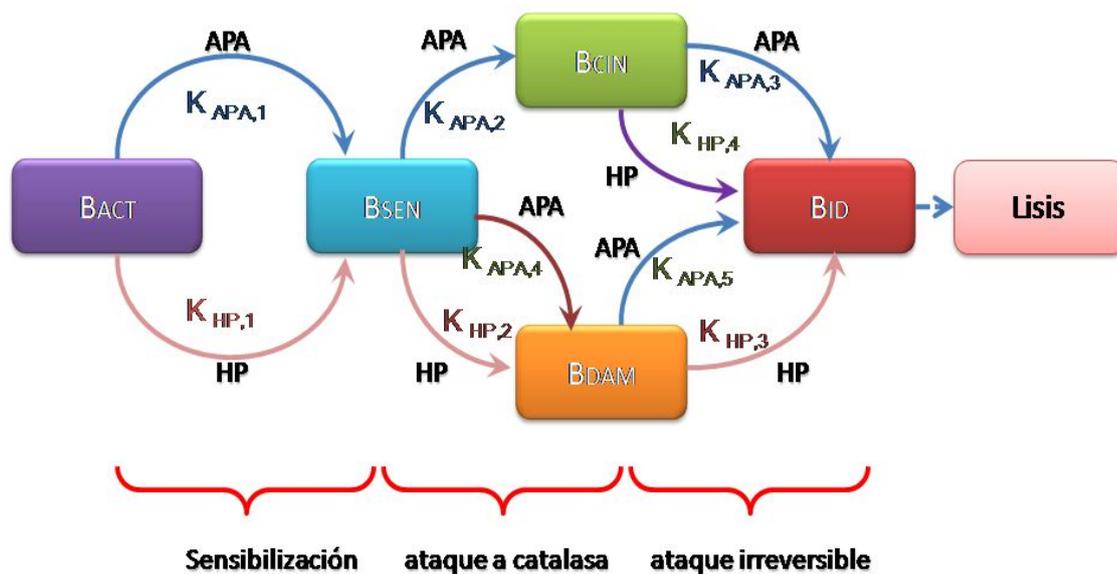


Figura VI.30. Esquema cinético: ataque de APA comercial

### VI.3.3.1. BALANCE DE MATERIA EN EL REACTOR.

Los presupuestos del modelo son los mismos que se desarrollaron en el inciso VI.3.1.1 El balance de materia para cada especie es el siguiente:

$$\frac{dC_{B_{ACT}}}{dt} = -\left[ (k_{APA,1} C_{APA}) + (k_{HP,1} C_{HP}) \right] C_{B_{ACT}} \quad \text{VI.38)}$$

$$\frac{dC_{B_{SEN}}}{dt} = \left[ (k_{APA,1} C_{APA}) - (k_{HP,1} C_{HP}) \right] C_{B_{ACT}} - \left[ (k_{APA,2} C_{APA}) + (k_{HP,2} C_{HP}) \right] C_{B_{SEN}} + \left[ (k_{APA,5} C_{APA}) \right] C_{BDAM} \quad \text{(VI.39)}$$

$$\frac{dC_{B_{CIN}}}{dt} = (k_{APA,2} C_{APA}) C_{B_{SEN}} - [(k_{APA,3} C_{APA}) + (k_{HP,4} C_{HP})] C_{B_{CIN}} \quad (VI.40)$$

$$\frac{dC_{B_{DAM}}}{dt} = [(k_{APA,5} C_{APA}) + (k_{HP,2} C_{HP})] C_{B_{SEN}} - [(k_{APA,4} C_{APA}) + (k_{HP,3} C_{HP})] C_{B_{DAM}} \quad (VI.41)$$

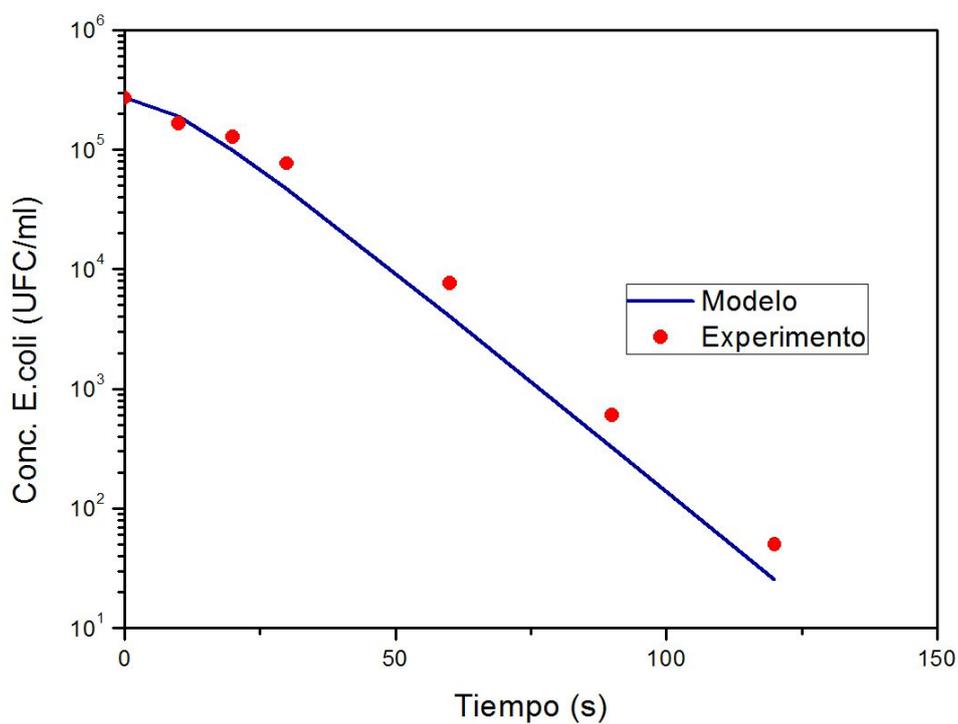
La concentración de bacterias viables puede ser obtenida mediante la relación:

$$C_{B_{VIA}} = C_{B_{ACT}} + C_{B_{SEN}} + C_{B_{DAM}} = C_{B_{ACT}}^0 - C_{B_{ID}} \quad (VI.42)$$

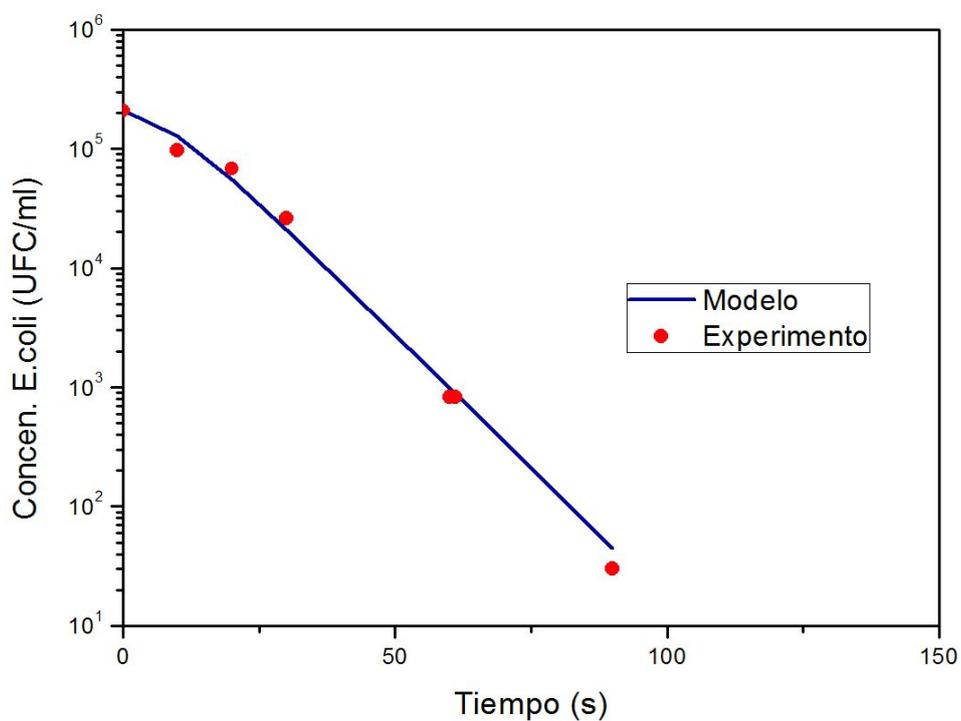
### ***VI.3.3.2. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y RESULTADOS DEL MODELO.***

Para la estimación de los parámetros cinéticos del modelo se repite la metodología de trabajo propuesta en el inciso VI.3.1.2 representada en el esquema VI.18.

En las figuras VI. 31. a VI. 34. se observa la evolución en función del tiempo de las concentraciones de *E. coli* experimentales con el ajuste del modelo propuesto.



**Figura VI.31. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de APA comercial de 5 ppm**



**Figura VI.32. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de APA comercial de 6 ppm**

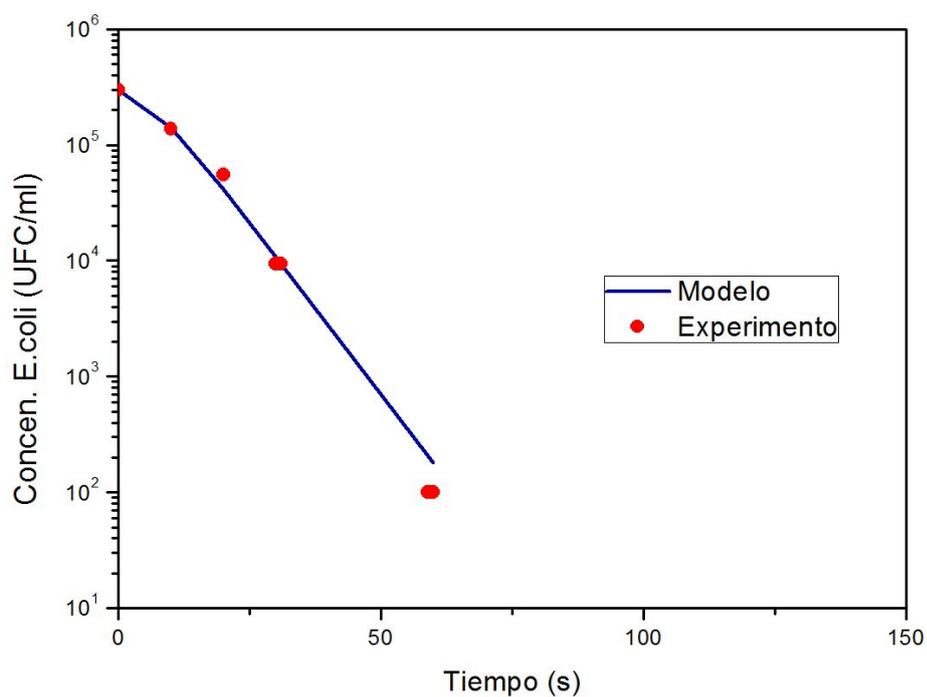


Figura VI.33. Evolución de las concentraciones experimentales (•) y la simulación del modelo (línea sólida) para una concentración de APA comercial de 8 ppm

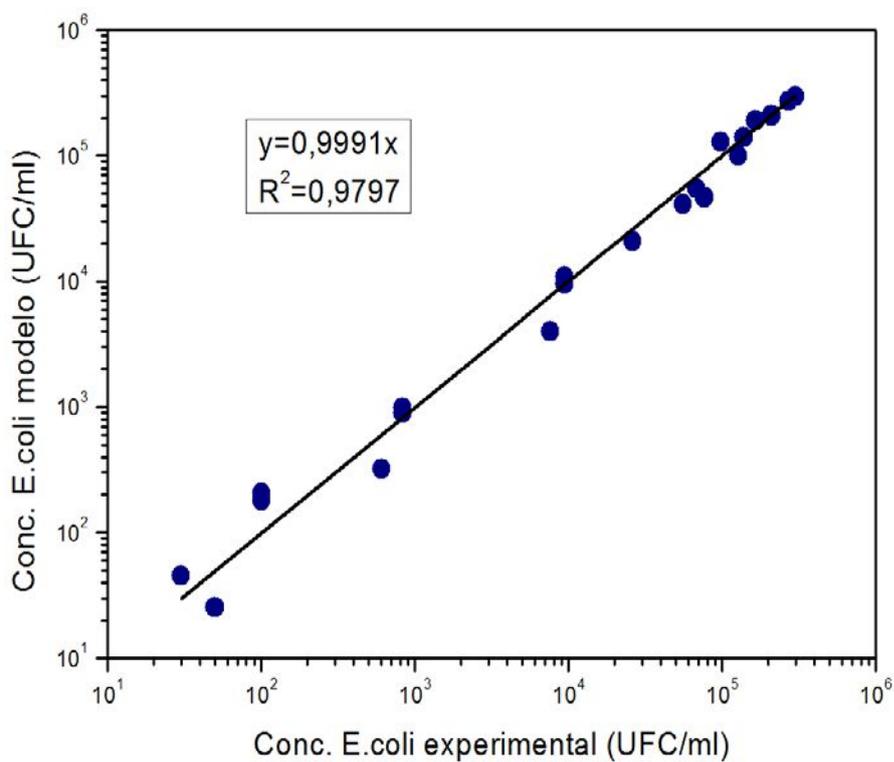


Figura VI.34. Concentración de E.coli del modelo versus concentración de E.coli experimental

El coeficiente de correlación  $R^2= 0,991$  indica que el modelo representa adecuadamente lo obtenido experimentalmente.

Las figuras VI. 31. a VI. 34. muestran la bondad del ajuste entre las predicciones del modelo y los datos experimentales obtenidos de la inactivación de *E. coli* utilizando la solución comercial de APA a diferentes concentraciones.

Los valores de los parámetros cinéticos son los siguientes:

$$K_{APA,4}=(1.0035 \pm 0.0747) \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{HP,4}=(5.1731 \pm 2.3537) \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{APA,5}=(2.4664 \pm 0.5124) \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$RMSE: 7.1\%$$

Se hace notar que los parámetros aquí estudiados corresponden a las reacciones de interacción entre el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno, donde se pone de manifiesto el sinergismo de la mezcla comercial.

Sin duda, el resultado más destacable del estudio del sinergismo, es el valor  $K_{HP,4}=(5.1731 \pm 2.3537) \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , donde el peróxido de hidrógeno, una vez que el APA inhibió la catalasa, exhibe una alta velocidad e reacción, oxidando los múltiples targets celulares, incluyendo la peroxidación y la disrupción de la bacteria, oxidación por los capturadores de oxígeno (oxígenos “scavengers”), los grupos tiol, alteración en los procesos energéticos, alteración de la síntesis de proteínas, culminado con la muerte celular.

Los parámetros  $K_{APA,5}$  y  $K_{HP,2}$  representan el cambio del estado celular de bacteria sensibilizada a bacteria dañada,  $B_{SEM} \rightarrow B_{DAM}$ , cuando se utiliza la mezcla comercial y cuando solo se utiliza el peróxido de hidrógeno respectivamente. Del análisis de estos parámetros, se puede observar que con HP solo, la etapa  $B_{SEM} \rightarrow B_{DAM}$  es la más lenta de todo el proceso de desinfección, sin embargo en presencia de APA esta etapa es muy rápida, la velocidad de ataque del APA en esta etapa es 6175 veces más rápida que con HP solo. En esta comparación de parámetros es considerable el sinergismo de la solución comercial ( $K_{APA,5}$ )

donde es claramente visible el efecto supra aditivo de la acción bactericida de ambos desinfectantes.

Los parámetros  $K_{HP,4}$  y  $K_{APA,3}$  corresponden al estado celular  $B_{CIN} \rightarrow B_{ID}$ , donde la bacteria, con el mecanismo de defensa inhibido pasa a un estado de daño irreversible. De la comparación de los valores:  $K_{HP,4} = (5.1731 \pm 2.3537) \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $K_{APA,3} = (8.3489 \pm 2.0282) \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  se observa que si bien la etapa con APA solo es muy rápida, una vez que el APA ha inhibido la catalasa, la interacción bacteria-peróxido que culmina en un daño bacteriano letal es aún más veloz (6.2 veces). Similares situaciones han sido reportadas para el peróxido de hidrógeno (Block 2001), donde la actividad bactericida ha sido mejorada mediante la combinación de catalizadores que aceleran la formación de las especies reactivas de oxígeno, mejorando la performance del peróxido como oxidante. La acción conjunta del APA-HP solo ha sido estudiada cualitativamente en la bibliografía existente. El sinergismo APA-HP puede explicarse como un mecanismo de daño múltiple, donde los agentes biocidas generan diferentes tipos de lesiones a los microorganismos, y el perjuicio causado se ve incrementado por la participación de ambos.

#### VI.4. CONCLUSIONES

Se ha propuesto un modelo cinético químico para representar la inactivación bacteriana de un indicador de contaminación biológica en aguas. Se obtuvieron los parámetros necesarios para completar el modelo, donde el esquema cinético propuesto ajusta apropiadamente con los resultados experimentales previamente obtenidos.

En esta parte del trabajo se ha estudiado la acción en conjunto y por separado de dos agentes desinfectantes tales como el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético, a fin de evaluar el efecto sinérgico. Solo hay precedentes de un estudio de sinergismo de la mezcla comercial (Alasri et al., 1992) donde solamente se realiza una evaluación experimental, la literatura sobre acción en

conjunta del APA y el HP es escasa y no se encontraron registros de un modelo cinético que considere el sinergismo de la mezcla.

De acuerdo a los ensayos experimentales realizados, y a los resultados presentados en la Tabla VI. 2, se puede concluir claramente que la eficiencia del HP es mucho menor que la APA por sí solo. No obstante, el aporte del HP es de suma importancia cuando forma parte de la mezcla comercial. Se debe señalar que esta “mejora” ocurre sólo después de la APA ha iniciado el ataque contra la célula, lo que indica que los sistemas de protección que existían antes (catalasa) han sido inhibidos o eliminados y sólo entonces, el HP puede participar activamente en la reacción de inactivación rápida.

Cuando se utiliza solamente el HP la tasa de inactivación es lenta, siendo la interacción peróxido-catalasa, la etapa de controlante de la reacción. Para el caso de la inactivación con APA inhibiendo peróxido, la etapa más veloz es la etapa de inactivación bacteriana, donde la membrana ha sido penetrada y oxidados los mecanismos de defensa. Cuando se trabaja con la mezcla comercial de APA, la contribución de HP para el proceso se vuelve importante, pero solamente después de que ha ocurrido un ataque rápido del APA, produciendo daños en los targets vitales del metabolismo de la célula, y en particular oxidando los aminoácidos presentes en la catalasa, impidiendo de esta forma, que el microorganismo puede defenderse. Por lo tanto, el APA ataca a las bacterias en la primera etapa, facilitando el subsiguiente ataque a las bacterias dañadas por HP. En una segunda etapa, tanto el APA y el HP, actuando en conjunto, producen rápidamente el daño irreversible en la bacteria, con un notable incremento en la tasa de inactivación en comparación a la observada cuando el APA actúa solo (sinergismo potenciador).

En resumen, se llevó a cabo un extenso estudio teórico - experimental utilizando la mezcla comercial de ácido peracético (APA) como agente desinfectante. En base a los estudios experimentales, se postuló un mecanismo de desinfección, nunca antes propuesto, considerando el poder oxidante de cada uno de los agentes de la mezcla por separado y el efecto sinérgico de estos. El mecanismo de este modelo comprende a través de ecuaciones matemáticas

simples, los procesos fisicoquímicos y enzimáticos involucrados en la inactivación bacteriana, como oxidación de enlaces proteicos, inhibición de mecanismos de defensa bacterianos y alteración en las funciones metabólicas vitales en los microorganismos. Se obtuvieron las concentraciones de desinfectantes ideales y las condiciones de trabajo óptimas para lograr altas tasas de inactivación (99.99%) en cortos períodos de tiempo.

## ACRONIMOS CAPITULO VI

aa	Aminoácidos
APA	Ácido Peracético
B	Bacteria
HP	Peróxido de Hidrógeno
K	Constante cinética
Por	Porfirina
V	velocidad

## SUFIJOS

ACT	Activa
CIN	Catalasa inhibida
DAM	Dañada
ID	Irreversiblemente Dañada
RM	Residuos de aminoácidos
SEN	Sensibilizada

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Y

PERSPECTIVAS FUTURAS



## VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

### VII.1 CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis Doctoral en Tecnología Química se procura ofrecer una tecnología alternativa al problema que genera la utilización de cloro y sus derivados en la desinfección de aguas debido a la formación de los subproductos de desinfección (DBP's). Para ello, se estudian los aspectos relevantes de procesos alternativos de desinfección, como agentes oxidantes amigables con el ambiente, como es el ácido peracético, y su combinación con radiación UV, utilizando procesos avanzados de oxidación.

La combinación de un adecuado diseño de las experiencias, un modelado de la cinética de desinfección y el análisis de los resultados permitieron obtener las siguientes conclusiones:

Se realizaron experiencias en un fotorreactor de desinfección con radiación UV y la combinación de UV con el agregado de distintas concentraciones de una mezcla comercial de ácido peracético (APA). Se observó que con el agregado del APA, la velocidad de inactivación presentó un muy leve aumento con respecto a las corridas con UV sola.

Este comportamiento fue explicado teniendo en cuenta que por un lado, la mezcla del APA absorbe radiación UV, por lo tanto consume una parte de fotones que podrían ser utilizados para inactivar al microorganismo (efecto de competencia) y por otro lado la fotodegradación del APA facilita la producción de especies oxidantes que atacan al microorganismo. Estos dos efectos son antagónicos y el resultado final es un efecto sinérgico leve.

En resumen, la combinación del UV con el uso de la mezcla comercial del APA muestra una leve mayor eficiencia, sin embargo a los fines de aplicación práctica, el agregado del agente desinfectante, hace más complejo al proceso de desinfección. Puede, por otro lado, existir la ventaja adicional que el agregado del desinfectante tiene un efecto residual, que no posee la aplicación de radiación UV.

Se realizaron experiencias de inactivación con una mezcla comercial de APA y se realizaron corridas inhibiendo la acción del peróxido de hidrógeno (HP) presente en la mezcla. La velocidad de inactivación con la mezcla comercial es muy rápida con respecto a la obtenida con el HP inhibido. Lo cual demuestra que el HP desempeña un rol importante en el proceso de inactivación.

El uso de la solución comercial de APA garantiza que no haya recrecimiento bacteriano, luego de 24, 48 y 72 horas de realizadas las pruebas de desinfección, esto es atribuible a que el agente químico oxidante, inhibe las funciones enzimáticas de defensa que poseen las bacterias y oxida las proteínas esenciales, necesarias para realizar las funciones metabólicas.

Comparando con resultados obtenidos previamente utilizando Peróxido de hidrógeno solo como agente desinfectante, puede concluirse que la velocidad de inactivación con HP es mucho más lenta que usando la mezcla comercial de APA y que la velocidad de inactivación utilizando la mezcla comercial de APA es mucho mayor que la suma de las velocidades de inactivación con APA solo (inhibiendo el HP) y el HP solo, mostrando un notable efecto sinérgico de potenciación.

Este sinergismo de potenciación puede explicarse a partir del distinto comportamiento del APA y del HP. Se ha postulado un ataque rápido por parte del APA en una primera etapa, lo que facilita el subsiguiente ataque a las bacterias dañadas por HP. Entonces la contribución de HP para el proceso se vuelve importante, pero solamente después de que ha ocurrido el mencionado ataque rápido del APA, produciendo daños en los targets vitales del metabolismo de la célula, y en particular oxidando los aminoácidos presentes en la catalasa, impidiendo de esta forma, que el microorganismo puede defenderse. En una segunda etapa, tanto APA y HP, actuando en conjunto, producen rápidamente el daño irreversible en la bacteria, con un notable incremento en la tasa de inactivación en comparación a la observada cuando el APA actúa solo (sinergismo potenciador).

Se propuso un esquema cinético y se realizó el modelado cinético completo. Este modelo comprende a través de ecuaciones matemáticas simples, los procesos fisicoquímicos y enzimáticos involucrados en la inactivación bacteriana.

El modelo descrito se basa en una descripción idealizada de la desinfección química. Por consiguiente, los parámetros cinéticos obtenidos son independientes del tipo y el tamaño del reactor de laboratorio empleado, siempre y cuando se reproduzcan las condiciones de funcionamiento reportados; es decir, las concentraciones del oxidante, pH y condiciones isotérmicas.

El modelo se ajusta adecuadamente a lo observado experimentalmente, permitiendo describir y explicar mecanísticamente lo que sucede durante el proceso de inactivación.

El modelo cinético propuesto será de suma utilidad para el diseño de nuevos reactores y su aplicación en cambios de escala del proceso.

## **VII.2 PERSPECTIVAS FUTURAS**

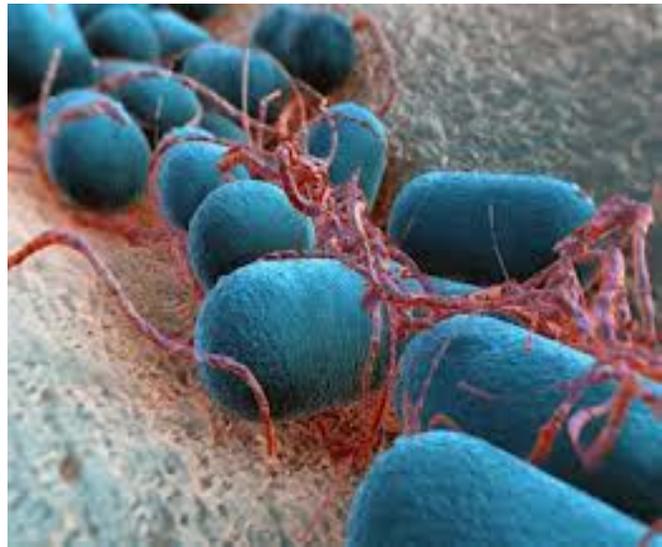
A partir de los estudios realizados y de las conclusiones obtenidas, surgen nuevas líneas a seguir en estudios futuros en la desinfección de aguas.

1.- Una de ellas es ampliar el estudio de procesos de desinfección de aguas para la eliminación de microorganismos patógenos utilizando diferentes agentes oxidantes, catalizadores y sus combinaciones, con y sin radiación UV, poniendo énfasis en la descripción mecanística de los procesos de transporte y de reacción que gobiernan la acción de los agentes utilizados, la comparación de la eficiencia de los desinfectantes más utilizados, el conocimiento de la forma en que se produce la alteración de la composición biológica que conduce a estos resultados y finalmente verificar la huella ecológica de los desinfectantes sobre el ambiente, realizando estudios comparativos entre los distintos procesos, lo que requiere la búsqueda de las condiciones operativas óptimas para brindar la mayor eficiencia desinfectante del o los agentes utilizados.

2.-Cuantificar la forma y el grado en que se produce el daño sobre los microorganismos durante proceso de desactivación y/o muerte a través de técnicas de PCR-electroforesis y microscopía de epifluorescencia.

3.- Realizar ensayos de toxicidad de los distintos desinfectantes con microcrustáceos u otros indicadores de toxicidad característicos de la región litoral argentina.

# APENDICE I



## APENDICE I. ENSAYOS EXPERIMENTALES *Escherichia coli*

### AI.1 GRILLAS EXPERIMENTALES APA COMERCIAL

<b>Corrida N° 1 – 1 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA – 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 1 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 2,84 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,75E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,75E+05	2,75E+05	2,75E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	2,64E+05	2,70E+05	2,67E+05	9,71E-01	-1,28E-02
20	2,63E+05	2,70E+05	2,66E+05	9,67E-01	-1,45E-02
30	2,59E+05	2,67E+05	2,63E+05	9,56E-01	-1,94E-02
60	2,51E+05	2,67E+05	2,59E+05	9,42E-01	-2,60E-02
90	2,38E+05	2,40E+05	2,39E+05	8,69E-01	-6,09E-02
120	2,29E+05	2,20E+05	2,25E+05	8,18E-01	-8,72E-02
150	2,29E+05	2,15E+05	2,22E+05	8,07E-01	-9,30E-02
180	2,36E+05	2,00E+05	2,18E+05	7,93E-01	-1,01E-01
210	2,18E+05	2,10E+05	2,14E+05	7,78E-01	-1,09E-01
240	2,20E+05	1,98E+05	2,09E+05	7,60E-01	-1,19E-01
270	2,04E+05	1,95E+05	2,00E+05	7,27E-01	-1,38E-01
300	2,00E+05	1,93E+05	1,97E+05	7,16E-01	-1,45E-01
600	6,54E+03	6,46E+03	6,50E+03	2,36E-02	-1,63E+00
Remoción/Inactivación(300 seg)=28,36% - Remoción/Inactivación(600 seg)=97,64%					
<b>Corrida N° 2 – 1,5 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 684,9 ppm APA – 1130,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 1,5 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 4,38 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,80E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,80E+05	2,80E+05	2,80E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	2,60E+05	2,51E+05	2,56E+05	9,14E-01	-3,89E-02
20	2,51E+05	2,50E+05	2,51E+05	8,96E-01	-4,75E-02
30	2,50E+05	2,48E+05	2,49E+05	8,89E-01	-5,10E-02
60	2,45E+05	2,33E+05	2,39E+05	8,54E-01	-6,88E-02
90	2,20E+05	2,04E+05	2,12E+05	7,57E-01	-1,21E-01
120	1,94E+05	1,80E+05	1,87E+05	6,43E-01	-1,75E-01
150	1,49E+05	1,27E+05	1,38E+05	4,93E-01	-3,07E-01
180	1,08E+05	9,08E+04	9,94E+04	3,55E-01	-4,50E-01
210	7,16E+04	6,96E+04	7,06E+04	2,52E-01	-5,98E-01
240	5,29E+04	4,99E+04	5,14E+04	1,84E-01	-7,36E-01
270	3,92E+04	3,60E+04	3,76E+04	1,34E-01	-8,72E-01

300	2,71E+04	2,29E+04	2,50E+04	8,93E-02	-1,05E+00
Remoción/Inactivación(300 seg)= 91,07%					
<b>Corrida N° 3 - 2 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1156 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 2 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 6,19 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,86E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,86E+05	2,86E+05	2,86E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	2,40E+05	2,52E+05	2,46E+05	8,60E-01	-6,54E-02
20	2,31E+05	2,42E+05	2,37E+05	8,29E-01	-8,16E-02
30	2,32E+05	2,40E+05	2,36E+05	8,25E-01	-8,35E-02
60	2,19E+05	2,24E+05	2,22E+05	7,76E-01	-1,10E-01
90	1,80E+05	1,63E+05	1,72E+05	6,01E-01	-2,21E-01
120	1,42E+05	1,42E+05	1,42E+05	4,97E-01	-3,04E-01
150	2,89E+04	2,90E+04	2,90E+04	1,01E-01	-9,94E-01
180	2,98E+03	3,00E+03	2,99E+03	1,05E-02	-1,98E+00
210	2,35E+03	2,26E+03	2,31E+03	8,08E-03	-2,09E+00
240	1,02E+03	9,50E+02	9,85E+02	3,44E-03	-2,46E+00
270	6,10E+02	7,50E+02	6,80E+02	2,38E-03	-2,62E+00
300	3,00E+02	3,00E+02	3,00E+02	1,05E-03	-2,98E+00
Remoción/Inactivación(300 seg)= 99,90%					
<b>Corrida N° 4 - 3 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,80 ppm APA – 1156 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 3 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 9,28 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,80E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,80E+05	2,80E+05	2,80E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	2,41E+05	2,10E+05	2,26E+05	8,07E-01	-9,30E-02
20	2,11E+05	1,93E+05	2,02E+05	7,21E-01	-1,42E-01
30	1,97E+05	1,89E+05	1,93E+05	6,89E-01	-1,62E-01
60	1,90E+05	1,71E+05	1,81E+05	6,46E-01	-1,89E-01
90	1,02E+05	8,00E+04	9,10E+04	3,25E-01	-4,88E-01
120	5,10E+03	1,95E+04	1,23E+04	4,39E-02	-1,36E+00
150	3,55E+03	3,55E+03	3,55E+03	1,27E-02	-1,90E+00
180	1,19E+03	1,08E+03	1,14E+03	4,07E-03	-2,39E+00
210	7,22E+02	7,16E+02	7,19E+02	2,57E-03	-2,59E+00
240	3,80E+02	3,30E+02	3,55E+02	1,27E-03	-2,90E+00
270	3,70E+02	2,00E+02	1,95E+02	6,96E-04	-3,16E+00
300	7,00E+01	1,08E+02	8,90E+01	3,18E-04	-3,50E+00
Remoción/Inactivación(300 seg)= 99,97%					

<b>Corrida N° 5 – 4 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA – 1122 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 4 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 11,39 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,45E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,45E+05	2,45E+05	2,45E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	1,98E+05	1,91E+05	1,95E+05	7,96E-01	-9,91E-02
20	1,70E+05	1,68E+05	1,69E+05	6,90E-01	-1,16E-01
30	1,60E+05	1,57E+05	1,59E+05	6,49E-01	-1,88E-01
60	3,17E+04	2,85E+04	3,01E+04	1,23E-01	-9,11E-01
90	9,80E+03	7,30E+03	8,55E+03	3,49E-02	-1,46E+00
120	1,38E+03	1,20E+03	1,29E+03	5,27E-03	-2,28E+00
150	4,30E+02	5,30E+02	4,80E+02	1,96E-03	-2,71E+00
180	3,00E+01	3,00E+01	3,00E+01	1,22E-04	-3,91E+00
210	x	x	x	x	X
240	x	x	x	x	X
270	x	x	x	x	X
300	x	x	x	x	X
Remoción/Inactivación(180 seg)= 99,99%					
<b>Corrida N° 6 – 5 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA – 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 5 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 14,22 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,70E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,70E+05	2,70E+05	2,70E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	1,70E+05	1,59E+05	1,65E+05	6,11E-01	-2,14E-01
20	1,35E+05	1,21E+05	1,28E+05	4,74E-01	-3,24E-01
30	8,00E+04	7,30E+04	7,65E+04	2,83E-01	-5,41E-01
60	7,90E+03	7,30E+03	7,60E+03	2,81E-02	-1,55E+00
90	6,10E+02	6,00E+02	6,05E+02	2,24E-03	-2,65E+00
120	5,00E+01	5,00E+01	5,00E+01	1,85E-04	-3,73E+00
150	x	x	x	x	X
180	x	x	x	x	X
210	x	x	x	x	X
240	x	x	x	x	X
270	x	x	x	x	X
300	x	x	x	x	X
Remoción/Inactivación(90 seg)= 99,77%					

<b>Corrida N° 7 – 6 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 656,36 ppm APA – 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 6 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 18,30 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,09E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,09E+05	2,09E+05	2,09E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	9,60E+04	9,90E+04	9,75E+04	4,67E-01	-3,31E-01
20	6,20E+04	7,40E+04	6,80E+04	3,25E-01	-4,88E-01
30	2,20E+04	3,00E+04	2,60E+04	1,24E-01	-9,05E-01
60	7,00E+02	2,00E+03	1,35E+03	6,46E-03	-2,19E+00
90	3,00E+01	3,00E+01	3,00E+01	1,44E-04	-3,84E+00
120	x	x	x	x	X
150	x	x	x	x	X
180	x	x	x	x	X
210	x	x	x	x	X
240	x	x	x	x	X
270	x	x	x	x	X
300	x	x	x	x	X
Remoción/Inactivación(90 seg)= 99,99%					
<b>Corrida N° 8 – 8 ppm Solución de APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 656,36 ppm APA – 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 8 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 24,40 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,98E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,98E+05	2,98E+05	2,98E+05	1,00E+00	0,00E+00
10	1,26E+05	1,50E+05	1,38E+05	4,63E-01	-3,34E-01
20	5,50E+04	5,60E+04	5,55E+04	1,86E-01	-7,30E-01
30	1,30E+03	2,00E+03	1,65E+03	5,54E-03	-2,26E+00
60	1,00E+02	1,30E+02	1,15E+02	3,86E-04	-3,41E+00
90	x	x	x	x	X
120	x	x	x	x	X
150	x	x	x	x	X
180	x	x	x	x	x
210	x	x	x	x	x
240	x	x	x	x	x
270	x	x	x	x	x
300	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(60 seg)= 99,96%					

**Tabla 9. Fracción de Remoción/Inactivación**

Tiempo (s)	C/C <sub>0</sub>							
	1 ppm	1,5 ppm	2 ppm	3ppm	4 ppm	5 ppm	6ppm	8 ppm
0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0	1,00E+0
10	9,71E-1	9,14E-1	8,60E-1	8,07E-1	7,96E-1	6,11E-1	4,67E-1	4,63E-1
20	9,67E-1	8,96E-1	8,29E-1	7,21E-1	6,90E-1	4,74E-1	3,25E-1	1,86E-1
30	9,56E-1	8,89E-1	8,25E-1	6,89E-1	6,49E-1	2,83E-1	1,24E-1	5,54E-3
60	9,42E-1	8,54E-1	7,76E-1	6,46E-1	1,23E-1	2,81E-2	6,46E-3	3,86E-4
90	8,69E-1	7,21E-1	6,01E-1	3,25E-1	3,49E-2	2,24E-3	1,44E-4	x
120	8,18E-1	6,36E-1	4,97E-1	4,39E-2	5,27E-3	x	x	x
150	8,07E-1	2,86E-1	1,01E-1	1,27E-2	1,96E-3	x	x	x
180	7,93E-1	9,11E-2	1,05E-2	4,07E-3	1,22E-4	x	x	x
210	7,78E-1	7,93E-2	8,08E-3	2,57E-3	x	x	x	x
240	7,60E-1	5,11E-2	3,44E-3	1,27E-3	x	x	x	x
270	7,27E-1	4,14E-2	2,38E-3	6,96E-4	x	x	x	x
300	7,16E-1	2,75E-2	1,05E-3	3,18E-4	x	x	x	x

## AI. 2GRILLA EXPERIMENTAL UV Y UV/APA

**Corrida N° 1 – UV-C.**

**Concentración de E. coli: 2,91E+05 UFC/cm<sup>3</sup>**

Tiempo de Retención Hidráulico (s)	Concentración de E. coli (UFC/cm <sup>3</sup> )				
	Corrida N° 1	Corrida N° 2	Media [C]	C/C <sub>0</sub>	Log [C/C <sub>0</sub> ]
0	2,91E+05	2,91E+05	2,91E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,47E+05	2,53E+05	2,50E+05	8,59E-01	-6,59E-02
2	2,26E+05	2,36E+05	2,31E+05	7,95E-01	-9,98E-02
3	1,21E+05	1,31E+05	1,26E+05	4,32E-01	-3,65E-01
4	2,68E+04	2,76E+04	2,72E+04	9,33E-02	-1,03E+00
5	4,20E+03	4,40E+03	4,30E+03	1,48E-02	-1,83E+00
6	1,75E+03	1,83E+03	1,79E+03	6,17E-03	-2,21E+00
7	8,60E+02	9,00E+02	8,80E+02	3,02E-03	-2,52E+00
8	x	x	x	x	x

Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,70%

<b>Corrida N° 2 – UV-C / 1 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 637,34 ppm APA – 1028,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 1 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 3,14 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,90E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,90E+05	2,90E+05	2,90E+05	1,00E+0	0,00E+00
1	2,66E+05	2,31E+05	2,49E+05	8,57E-01	-6,71E-02
2	2,46E+05	2,12E+05	2,29E+05	7,90E-01	-1,03E-01
3	1,25E+05	1,19E+05	1,22E+05	4,21E-01	-3,76E-01
4	2,26E+04	2,18E+04	2,22E+04	7,66E-02	-1,12E+00
5	3,00E+03	2,96E+03	2,98E+03	1,03E-02	-1,99E+00
6	1,26E+03	1,14E+03	1,20E+03	4,14E-03	-2,38E+00
7	7,50E+02	6,10E+02	6,80E+02	2,34E-03	-2,63E+00
8			x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,76%					
<b>Corrida N° 3 – UV-C / 2 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1028,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 2 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 6,19 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,96E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,96E+05	2,96E+05	2,96E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,89E+05	2,73E+05	2,81E+05	9,49E-01	-2,26E-02
2	2,79E+05	2,72E+05	2,76E+05	9,32E-01	-3,12E-02
3	1,18E+05	1,08E+05	1,13E+05	3,82E-01	-4,20E-01
4	1,82E+04	1,66E+04	1,74E+04	5,88E-02	-1,23E+00
5	2,10E+03	2,00E+03	2,05E+03	6,93E-03	-2,16E+00
6	1,10E+03	9,00E+02	1,00E+03	3,38E-03	-2,47E+00
7	7,00E+02	6,60E+02	6,80E+02	2,30E-03	-2,64E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,77%					

<b>Corrida N° 4 – UV-C / 3 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1037 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 3 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 9,28 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,90E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,90E+05	2,90E+05	2,90E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,84E+05	2,74E+05	2,80E+05	9,67E-01	-1,45E-02
2	2,67E+05	2,57E+05	2,62E+05	9,03E-01	-4,42E-02
3	1,54E+05	1,48E+05	1,51E+05	5,22E-01	-2,83E-01
4	2,36E+04	2,26E+04	2,31E+04	7,96E-02	-1,10E+00
5	2,97E+03	2,95E+03	2,96E+03	1,02E-02	-1,99E+00
6	9,60E+02	7,60E+02	8,60E+02	2,97E-03	-2,53E+00
7	3,10E+02	3,00E+02	3,05E+02	1,05E-03	-2,98E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,89%					
<b>Corrida N° 5 – UV-C / 4 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1037 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 4 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 12,38 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 3,16E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	3,16E+05	3,16E+05	3,16E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,80E+05	2,74E+05	2,77E+05	8,75E-01	-5,80E-02
2	2,40E+05	2,35E+05	2,38E+05	7,52E-01	-1,24E-01
3	1,15E+05	1,07E+05	1,11E+05	3,52E-01	-4,54E-01
4	3,04E+04	3,00E+04	3,02E+04	9,55E-02	-1,02E+00
5	5,70E+03	4,30E+03	5,00E+03	1,58E-02	-1,80E+00
6	1,41E+03	1,10E+03	1,26E+03	3,97E-03	-2,40E+00
7	8,00E+02	7,30E+02	7,65E+02	2,42E-03	-2,61E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,76%					

<b>Corrida N° 6 – UV-C / 5 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1062,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 5 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 15,47 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 3,42E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	3,42E+05	3,42E+05	3,42E+05	0,00E+00	0,00E+00
1	3,18E+05	3,00E+05	3,09E+05	9,04E-01	-4,41E-02
2	2,89E+05	2,89E+05	2,89E+05	8,45E-01	-7,31E-02
3	1,68E+05	1,58E+05	1,63E+05	4,77E-01	-3,22E-01
4	3,10E+04	2,90E+04	3,00E+04	8,77E-02	-1,06E+00
5	2,50E+03	2,00E+03	2,25E+03	6,58E-03	-2,18E+00
6	8,50E+02	7,60E+02	8,05E+02	2,35E-03	-2,63E+00
7	5,10E+02	5,00E+02	5,05E+02	1,48E-03	-2,83E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,85%					
<b>Corrida N° 7 – UV-C / 6 ppm.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1062,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 6 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 18,57 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,98E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,98E+05	2,98E+05	2,98E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,94E+05	2,90E+05	2,92E+05	9,80E-01	-8,83E-03
2	2,42E+05	2,16E+05	2,29E+05	7,67E-01	-1,15E-01
3	6,70E+04	6,30E+04	6,50E+04	2,18E-01	-6,61E-01
4	6,16E+03	6,00E+03	6,08E+03	2,04E-02	-1,69E+00
5	1,22E+03	1,00E+03	1,11E+03	3,72E-03	-2,43E+00
6	6,00E+02	5,60E+02	5,80E+02	1,95E-03	-2,71E+00
7	4,40E+02	3,40E+02	3,90E+02	1,31E-03	-2,88E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(90 seg)= 99,87%					

<b>Corrida N° 8 – UV-C / 8 ppm APA.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 637,34 ppm APA – 1037 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 8 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 25,13 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 2,05E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	2,05E+05	2,05E+05	2,05E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	2,00E+05	1,89E+05	1,95E+05	9,51E-01	-2,18E-02
2	1,67E+05	1,44E+05	1,56E+05	7,60E-01	-1,19E-01
3	3,50E+04	3,20E+04	3,35E+04	1,63E-01	-7,87E-01
4	3,40E+03	3,10E+03	3,25E+03	1,58E-02	-1,80E+00
5	6,50E+02	6,20E+02	6,35E+02	3,09E-03	-2,51E+00
6	3,40E+02	3,00E+02	3,20E+02	1,56E-03	-2,81E+00
7	2,10E+02	2,00E+02	2,20E+02	1,07E-03	-2,97E+00
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,89%					
<b>Corrida N° 9 – UV-C / 10 ppm.</b>					
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 637,34 ppm APA – 1037 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				<b>Dosis:</b> 10 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 18,57 ml			<b>Concentración de E. coli:</b> 1,63E+05 UFC/cm <sup>3</sup>		
<b>Tiempo de Retención Hidráulico (s)</b>	<b>Concentración de E. coli (UFC/cm<sup>3</sup>)</b>				
	<b>Corrida N° 1</b>	<b>Corrida N° 2</b>	<b>Media [C]</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>	<b>Log [C/C<sub>0</sub>]</b>
0	1,63E+05	1,63E+05	1,63E+05	1,00E+00	0,00E+00
1	1,49E+05	1,31E+05	1,40E+05	8,62E-01	-6,47E-02
2	1,40E+05	1,00E+05	1,20E+05	7,38E-01	-1,32E-01
3	2,30E+04	2,22E+04	2,26E+04	1,39E-01	-8,57E-01
4	2,10E+03	2,00E+03	2,05E+03	1,26E-02	-1,90E+00
5	4,40E+02	3,60E+02	4,00E+02	2,45E-03	-2,61E+00
6	2,20E+02	1,90E+02	2,05E+02	1,26E-03	-2,90E+00
7	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x
Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,99% - Remoción/Inactivación(7 seg)= 99,87%					

**AI. 3 DATOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN EL MODELO CINETICO**

**AI.3.1 ACIDO PERACÉTICO INHIBIENDO PERÓXIDO**

<b>C<sub>APA</sub> (ppm)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>C<sub>Ec</sub> (UFC/ml)</b>	
4	0	2.88E+05	2.88E+05
	1.00E+01	2.82E+05	2.70E+05
	2.00E+01	2.63E+05	2.34E+05
	3.00E+01	2.57E+05	1.94E+05
	6.00E+01	1.84E+05	9.82E+04
	9.00E+01	1.06E+05	4.67E+04
	1.20E+02	2.99E+04	2.18E+04
	1.50E+02	1.38E+04	1.01E+04
	1.80E+02	2.10E+03	4.70E+03
	2.10E+02	1.56E+03	2.18E+03
	2.40E+02	7.95E+02	1.01E+03
	2.70E+02	4.00E+02	4.68E+02
	3.00E+02	2.10E+02	2.17E+02
	5	0	2.66E+05
1.00E+01		2.39E+05	2.42E+05
2.00E+01		2.06E+05	1.97E+05
3.00E+01		2.01E+05	1.53E+05
6.00E+01		1.15E+05	6.28E+04
9.00E+01		7.85E+04	2.44E+04
1.20E+02		1.72E+04	9.35E+03
1.50E+02		2.93E+03	3.58E+03
1.80E+02		1.90E+03	1.37E+03
2.10E+02		8.30E+02	5.24E+02
2.40E+02		5.65E+02	2.00E+02
2.70E+02		2.55E+02	7.67E+01
3.00E+02		8.00E+01	2.93E+01
6		0	2.92E+05
	1.00E+01	2.48E+05	2.57E+05
	2.00E+01	1.89E+05	1.96E+05
	3.00E+01	1.55E+05	1.42E+05
	6.00E+01	2.42E+04	4.73E+04
	9.00E+01	1.22E+04	1.51E+04
	9.10E+01	1.22E+04	1.45E+04
	1.20E+02	2.88E+03	4.76E+03
	1.21E+02	2.88E+03	4.58E+03

	1.50E+02	5.70E+02	1.50E+03
	1.51E+02	5.70E+02	1.45E+03
	1.80E+02	2.00E+02	4.75E+02
	1.81E+02	2.00E+02	4.57E+02

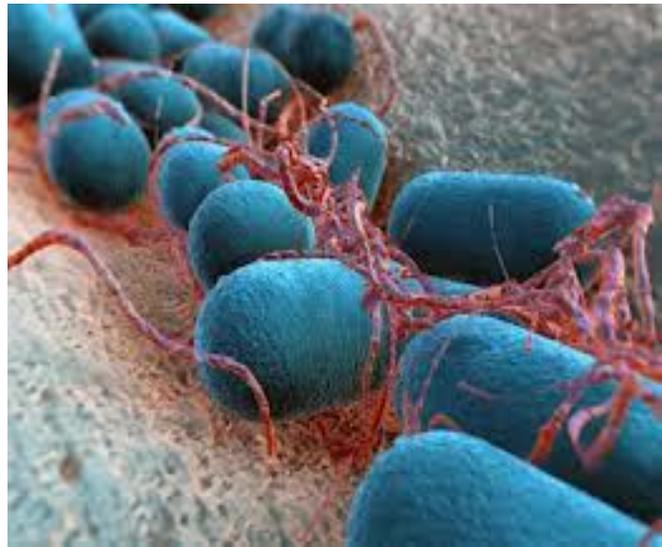
### AI. 3.2 PEROXIDO DE HIDROGENO

<b>C<sub>HP</sub> ppm</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>C<sub>EC</sub> (UFC/ml)</b>	
15	0	2.80E+05	2.80E+05
	3.00E+02	2.60E+05	2.67E+05
	6.00E+02	2.54E+05	2.54E+05
	1.20E+03	1.98E+05	2.29E+05
	1.80E+03	1.78E+05	2.06E+05
	3.60E+03	1.50E+05	1.50E+05
	5.40E+03	1.19E+05	1.10E+05
	7.20E+03	6.56E+04	8.04E+04
	9.00E+03	4.63E+04	5.87E+04
25	0	2.80E+05	2.80E+05
	3.00E+02	2.45E+05	2.58E+05
	6.00E+02	2.19E+05	2.37E+05
	1.20E+03	1.73E+05	1.99E+05
	1.80E+03	1.42E+05	1.67E+05
	3.60E+03	7.52E+04	9.89E+04
	5.40E+03	4.22E+04	5.86E+04
	7.20E+03	2.86E+04	3.47E+04
	9.00E+03	2.11E+04	2.06E+04
33	0	2.80E+05	2.80E+05
	3.00E+02	2.40E+05	2.51E+05
	6.00E+02	1.92E+05	2.24E+05
	1.20E+03	1.25E+05	1.78E+05
	1.80E+03	1.02E+05	1.41E+05
	3.60E+03	5.35E+04	7.08E+04
	5.40E+03	3.76E+04	3.55E+04
	7.20E+03	2.42E+04	1.78E+04
	9.00E+03	9.10E+03	8.91E+03

**AI.3.3 SOLUCION COMERCIAL DE APA**

<b>C<sub>APA</sub> (ppm)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>C<sub>Ec</sub> (UFC/ml)</b>	
5	0	2.70E+05	2.70E+05
	1.00E+01	1.65E+05	1.90E+05
	2.00E+01	1.28E+05	9.93E+04
	3.00E+01	7.65E+04	4.67E+04
	6.00E+01	7.60E+03	4.02E+03
	9.00E+01	6.05E+02	3.22E+02
	1.20E+02	5.00E+01	2.55E+01
	0	2.09E+05	2.09E+05
6	1.00E+01	9.75E+04	1.28E+05
	2.00E+01	6.80E+04	5.46E+04
	3.00E+01	2.60E+04	2.09E+04
	6.00E+01	8.32E+02	9.91E+02
	6.10E+01	8.32E+02	8.94E+02
	9.00E+01	3.00E+01	4.51E+01
	0	2.98E+05	2.98E+05
	8	1.00E+01	1.38E+05
2.00E+01		5.55E+04	4.11E+04
3.00E+01		9.42E+03	1.09E+04
3.10E+01		9.42E+03	9.50E+03
5.90E+01		1.00E+02	2.06E+02
6.00E+01		1.00E+02	1.79E+02

# APÉNDICE II



# TUV T8



TUV 15W SLV

Lámparas de descarga de vapor de mercurio a baja presión con una ampolla tubular de cristal

## Datos del producto

### • Características Generales

Descripción del Sistema	-
Base/Casquillo	G13
Forma de la lámpara	T26
Aplicación Principal	Desinfección
Vida útil	9000 hr

### • Características de la Fuente de Luz

Designación de Color	-
----------------------	---

### • Características Eléctricas

Pot. de la Lámpara Estimada	15 W
Potencia Técnica de la Lámpara	15.9 W
Voltaje de la Lámpara	54 V
Corriente de la Lámpara	0.34 A

### • Características Medioambientales

Contenido de mercurio (Hg)	2.0 mg
----------------------------	--------

### • Características relativas a UV

Radiación UVC	4.9 W
---------------	-------

### • Características de Dimensiones

Longitud Casquillo-Casquillo A	437.4 (max) mm
Longitud B de Inserción	442.1 (min), 444.5 (max) mm
Longitud Total C	451.6 (max) mm
Diámetro D	28 (max) mm

### • Datos Producto

Código de pedido	726179 40
Código de producto	871150072617940
Nombre de Producto	TUV 15W SLV
Nombre de pedido del producto	TUV 15W SLV/25
Piezas por caja	1
Configuración de embalaje	25
Cajas por caja exterior	25
Código de barras del producto	8711500726179
Código de barras de la caja exterior	8711500638618
Código logístico - 12NC	928039004005
Peso neto por pieza	81.600 gr

# PHILIPS

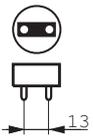
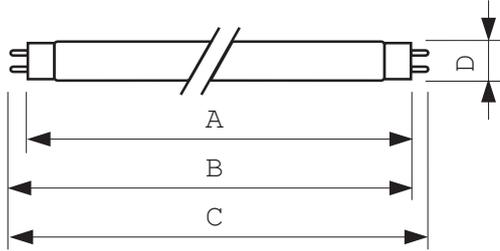
sense and simplicity

TUV T8

Plano de dimensiones

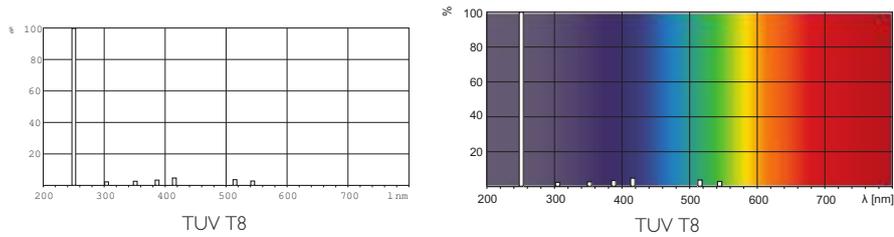
TUV 15W SLV

Product	A (Max)	B (Min)	B (Max)	C (Max)	D (Max)
TUV TL-D 15W	437.4	442.1	444.5	451.6	28



TL-D Coloured Casquillo

Datos fotométricos



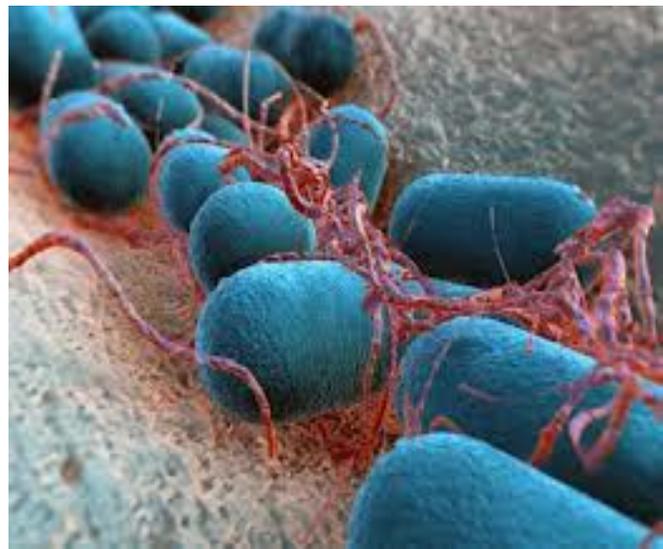
© 2013 Koninklijke Philips Electronics N.V.  
 Todos los derechos reservados.

Las especificaciones están sujetas a cambios sin previo aviso. Las marcas registradas son propiedad de Koninklijke Philips Electronics N.V. o de sus respectivos propietarios.

[www.philips.com/lighting](http://www.philips.com/lighting)

2013, Mayo 9  
 Datos sujetos a cambios

# APÉNDICE III



## APENDICE III. MODELADO MOLECULAR CON VMD

### AIII.1 LECTURA DEL PROGRAMA

Info) VMD for WIN32, version 1.9.1 (February 1, 2012)

Info) <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

Info) Email questions and bug reports to [vmd@ks.uiuc.edu](mailto:vmd@ks.uiuc.edu)

Info) Please include this reference in published work using VMD:

Info) Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., 'VMD - Visual

Info) Molecular Dynamics', J. Molec. Graphics 1996, 14.1, 33-38.

Info) -----

Info) Multithreading available, 4 CPUs detected.

Info) Free system memory: 418MB (21%)

Info) OpenGL renderer: Intel(R) HD Graphics

Info) Features: STENCIL MDE CVA MTX NPOT PP PS GLSL(OVF)

Info) Full GLSL rendering mode is available.

Info) Textures: 2-D (8192x8192), 3-D (256x256x256), Multitexture (8)

Info) Spaceball driver not installed. Spaceball interface disabled.

Info) No joysticks found. Joystick interface disabled.

Info) Dynamically loaded 69 plugins in directory:

Info) C:/Program Files (x86)/University of Illinois/VMD/plugins/WIN32/molfile

Info) File loading in progress, please wait.

Info) Using plugin pdb for structure file C:\Users\marina\Downloads\1DNP.pdb

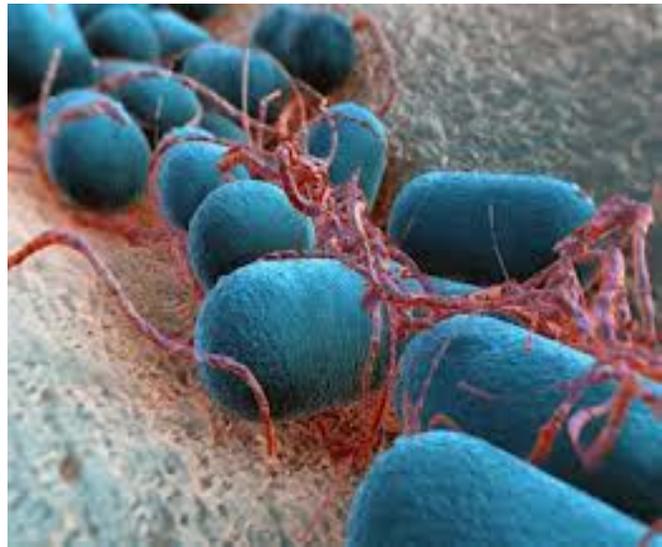
Info) Using plugin pdb for coordinates from file C:\Users\marina\Downloads\1DNP.

pdb

Info) Determining bond structure from distance search ...

Info) Eliminating bonds duplicated from existing structure...  
Info) Finished with coordinate file C:\Users\marina\Downloads\1DNP.pdb.  
Info) Analyzing structure ...  
Info) Atoms: 8081  
Info) Bonds: 7930  
Info) Angles: 0 Dihedrals: 0 Improper: 0 Cross-terms: 0  
Info) Bondtypes: 0 Angletypes: 0 Dihedraltypes: 0 Improper types: 0  
Info) Residues: 1315  
Info) Waters: 373  
Info) Segments: 1  
Info) Fragments: 379 Protein: 4 Nucleic: 0  
vmd >

# APÉNDICE IV



## APENDICE IV

### **CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO MODELO ESTUDIADO (2): *Pseudomonas aeruginosa*. DATOS GENERALES. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo Gram negativo aerobio estricto con único flagelo polar. No muestra metabolismo fermentativo ni forman esporas. Tiene requerimientos nutritivos muy sencillos pues no presenta exigencias nutricionales, crece quimiorganotróficamente a pH neutro y temperaturas en la zona de la mesofilia. Por lo general lo hace muy bien a las 24 horas. En medios como el agar Müeller-Hinton o tripticasa de soja exhiben un pigmento color verde característico. Algunas cepas, en particular las aisladas de pacientes con enfermedades respiratorias, son extremadamente mucosas. El polimorfismo cultural (colonias de diferentes tamaños) es relativamente común.

La mayoría de las cepas son fácilmente reconocidas por la producción de un pigmento verde, que es el resultado de la mezcla de dos pigmentos hidrosolubles: la piocianina (azul) y la pioverdina (amarillo fluorescente). El primero es exclusivo de esta especie, por lo que su presencia basta para la identificación de la misma. La pioverdina, en cambio, es un pigmento común de las especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescente (*P. putida* y *P. fluorescens*, además de *P. aeruginosa*)

*Pseudomonas aeruginosa* produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Las colonias presentan un olor dulzón (frutal) característico debido a la producción del compuesto 2-aminocetofenona.

#### **AIV. 1 HABITAD**

*Pseudomonas aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Se puede aislar de muestras de suelo, aguas puras y contaminadas, así como de plantas y animales (Hardalo y Edberg, 1997). Puede proliferar en ambientes

acuáticos, así como en superficies de materias orgánicas propicias en contacto con el agua. Generalmente se encuentra en aguas superficiales luego de tormentas y lluvias, lo cual sugiere que el suelo y la vegetación son importantes reservorios del agente (Geldreich, 1999).

Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que los nutrientes son escasos.

Esta habilidad para adaptarse y crecer en cualquier hábitat explica su constante presencia en el medio ambiente (Menna y Gerba, 2009).

El hallazgo de *P. aeruginosa* en balones de agua destilada de hospitales y su presencia en reservorios de agua potable (tanques domiciliarios, tanques cisterna, depósitos de medios de transporte) con mayor frecuencia y en concentraciones elevadas, ha sido atribuido a la posible multiplicación y mayor supervivencia de la misma en relación con las demás bacterias comúnmente aisladas del agua (Calderón, 1976). Bajas concentraciones en agua embotellada pueden subsistir por meses dado que esta bacteria tiene la capacidad de enlentecer su metabolismo para perdurar con trazas de carbono y nitrógeno como nutrientes (Geldreich, 1999).

La epidemiología de esta especie refleja una predilección por ambientes húmedos, su identificación y colonización está en función de la humedad. En la comunidad se las puede hallar en piletas de natación, hidromasajes, floreros, soluciones de limpieza, desinfectantes, etc. La colonización en humanos también depende de la humedad, encontrándose en perineo, axilas y oídos.

Contrariamente a lo que parece todos nosotros estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*. Se ha detectado como parte de la flora normal corporal obteniéndose aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de heces de personas sanas (Hardalo y Edberg, 1997) lo que nos muestra que nuestro contacto con la misma es cotidiano y representa una amenaza para la salud en condiciones especiales.

### **AIV.1.1.PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que si bien no está catalogado como agente patógeno en sentido propio, puede causar enfermedades a las personas cuyos mecanismos de defensa locales o generales son deficientes. Es decir ancianos, lactantes, quienes han sufrido quemaduras o heridas extensas, enfermos sometidos a un tratamiento inmunosupresor o que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), patologías que cursan con deterioro del sistema inmunológico como cáncer, desnutrición y diabetes . Una vez que se produce la infección, este microorganismo genera una serie de compuestos tóxicos que no solo causan daño tisular extenso (Britigan et al., 1992) sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Döring et al., 1987).

Existe un grupo poblacional, formado por los enfermos de fibrosis quística, especialmente vulnerable a las infecciones con *P. aeruginosa* (Pier GB., 1985). La misma infecta el tracto respiratorio de 60-87% de los pacientes fibroquísticos convirtiéndose en el microorganismo de infección predominante (Fick, 1992). En este caso los factores de adherencia bacteriana juegan un papel significativo en la patogénesis de la infección respiratoria y están involucrados en la invasión pulmonar de los pacientes.

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales agentes de infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados. Es responsable de alrededor del 20% de las infecciones nosocomiales. Se halla entre los primeros agentes más frecuentes de bacteriemia por gram negativos y se la asocia con una alta tasa de mortalidad (Basualdo, 2006). Ha sido reportada como causante del 11% de infecciones urinarias, 8% de infecciones en el sitio quirúrgico, 16% de neumonías y 3-4% de septicemias nosocomiales (Dembry et al., 1998; Trautmann et al., 2005). Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Hardalo y Edberg, 1997). Se ha sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas debido a la densa capa polisacárida que establece una barrera física como

química capaz de proteger a la bacteria de las moléculas e iones de cloro libre residual (Reilly, 2000).

La mayoría de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* adquiridas en el entorno hospitalario resultan del contacto o del uso de fluidos contaminados como agua, desinfectantes, soluciones de limpieza, etc. (Mena y Gerba, 2009). El agua de canilla es fuente importante de infección nosocomial tanto por contacto directo del paciente como cuando se utiliza para preparación de soluciones o lavado de material y equipamiento médico (Bert et al., 1998, Vanholder et al., 1990). La bacteria se adhiere a la superficie de los instrumentos produciendo una especie de agregado llamado biofilm (Costerton et al., 1994) que contamina por ejemplo catéteres, válvulas cardíacas, sondas urinarias o tubos endotraqueales. Más del 80% de las bacteriemias nosocomiales resultan de la contaminación de catéteres intravasculares (Archibald y Gaynes, 1997). Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo y la presión de selección de los antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes. Este hecho, convierte a la infección por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública que afecta no solo el curso de la evolución del paciente sino que aumenta la estancia hospitalaria, el uso de antibióticos y los costos de los servicios de salud.

En el caso de huéspedes no comprometidos, *P. aeruginosa* es responsable de infecciones en ojo, oído y piel a partir de agua contaminada. La incidencia de colonización por la bacteria en personas sanas es relativamente baja en comparación a las hospitalizadas, siendo del 0-2% en piel, 0-3,3% en mucosa nasal y 0-6,6% en garganta (Pollack 1995).

## **AIV. 2 EXPERIMENTAL *Pseudomonas aeruginosa***

### **A4.2.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA ATCC 15442 *Pseudomonas aeruginosa***

- ***Día 1:***

Acondicionamiento del material de trabajo y preparación de los medios de cultivo necesarios (Ver tabla resumen al final del documento).

A última hora de la tarde, inoculación del medio complejo con la cepa ATCC liofilizada.

***Procedimiento:***

- ✓ Inocular con las células liofilizadas un erlenmeyer con 150 ml de caldo nutritivo.
- ✓ Llevar a estufa a 37°C por 24 horas

- ***Día 2:***

A última hora de la tarde, primeros repiques en erlenmeyer y tubos de ensayo.

***Procedimiento:***

- ✓ Tomar 1ml del caldo nutritivo incubado y descargar en un nuevo erlenmeyer con 150 ml de caldo nutritivo.
- ✓ Tomar otro ml del caldo nutritivo incubado y descargar en un tubo de ensayo con 9 ml de caldo nutritivo.
- ✓ Repetir el paso anterior en 2 nuevos tubos de ensayos con 9 ml de caldo nutritivo.

NOTA: un tubo de ensayo será utilizado al día siguiente para realizar las observaciones microscópicas; otro para realizar estrías en agar cetrimide, y el último para plaqueos en agar cetrimide a partir de diluciones seriadas.

✓ Llevar el erlenmeyer y los tubos a estufa por 24 horas a 37°C.

• **Día 3:**

Primeras horas de la tarde: observaciones microscópicas y pruebas bioquímicas.

Realización de estrías.

Realización de plaqueos

Últimas horas de la tarde: segundos repiques.

**Procedimiento:**

✓ De un tubo de ensayo incubado:

✓ Realizar 10 estrías en agar cetrimide, entre mecheros.

De otro tubo de ensayo incubado:

✓ Tomar 1 ml y llevar a 9 ml de agua de peptona. Homogeneizar en vortex.

✓ Tomar 1 ml del tubo con agua de peptona inoculado y llevar a un nuevo tubo con 9 ml de agua de peptona. Homogeneizar en vortex.

✓ Repetir el procedimiento hasta obtener 9 tubos con agua de peptona inoculados, respetando la secuencia de las diluciones seriadas.

✓ Tomar 0,1ml de las diluciones seriadas y descargar el contenido en las placas de petri con agar cetrimide, comenzando desde el tubo más diluido al más concentrado.

✓ Tomar 0,1 ml del tubo inoculado y descargar en otra placa de petri con agar cetrimide.

✓ Distribuir uniformemente el liquido descargado sobre las placas de petri inoculadas con ansa de vidrio.

- ✓ Dejar secar y llevar luego a estufa a 37°C por 24 horas para incubación (en forma invertida).
- ✓ Llevar a estufa el tubo de ensayo con el inóculo inicial por 24 horas más a 37°C.

De otro tubo de ensayo incubado:

- ✓ Observaciones microscópicas.

Del erlenmeyer incubado:

- ✓ Tomar 1 ml y llevar a 9 ml de caldo nutritivo en tubos de fondo cónico para centrífuga (de 15ml con tapa a rosca).
- ✓ Repetir el procedimiento hasta alcanzar un total de 15 tubos inoculados.
- ✓ Llevar a estufa a 37°C por 12-18 horas.

- **Día 4:**

Primeras horas de la mañana: preparado de los tubos inoculados para su mantención en freezer.

Por la tarde: observación de las placas de petri. Recuentos. Plaqueo a partir de diluciones seriadas del cultivo en tubo de ensayo con 48 horas de incubación.

***Procedimiento:***

Para cada uno de los tubos de centrifuga incubados:

- ✓ Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
- ✓ Descargar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de solución salina. Centrifugar en iguales condiciones (1er lavado).
- ✓ Repetir el paso anterior (2do lavado).
- ✓ Descargar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de caldo nutritivo con

glicerol al 15%.

- ✓ Llevar al freezer.

Para el tubo con 48 hs de incubación:

- ✓ Realizar el plaqueo en placas de petri con agar cetrimide, de igual manera a como fuera realizado el día anterior. Llevar a estufa a 37°C por 24 horas.

- **Día 5:**

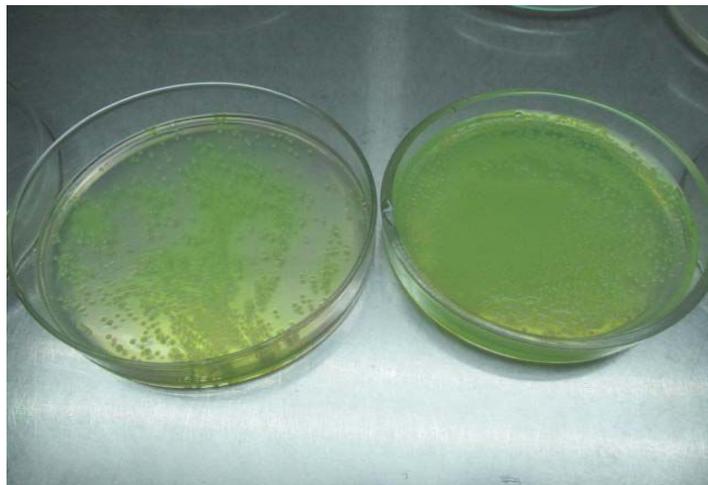
Recuento de las placas.

**Tabla AIV. 1 Material necesario Activación *P. aeruginosa***

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
<b>Caldo Nutritivo en Erlenmeyer</b>	150 ml	150 ml			
<b>Caldo Nutritivo en Tubos</b>		27 ml	135 ml		162 ml
<b>Agar cetrimide para estrías</b>			90 ml		
<b>Agar cetrimide en placas</b>			250 ml	250 ml	500 ml
<b>Agua de peptona para dilución seriada</b>			81 ml	81 ml	162 ml
<b>Solución fisiológica</b>				300 ml	
<b>Caldo Nutritivo + glicerol</b>				75 ml	



**Figura AIV. 1** Estria *P. aeruginosa*



**Figura AIV.2** Comparación de placas de *P aeruginosa*: dilución (izquierda), sin diluir (derecha)



Figura AIV. 3 *P. aeruginosa* bajo luz UV

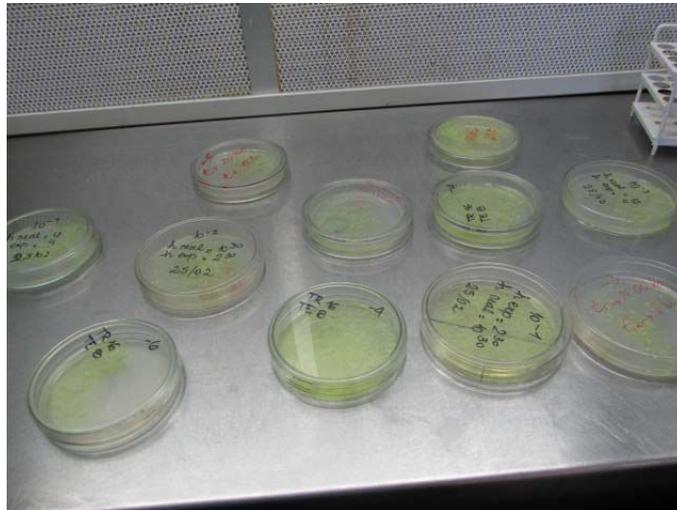


Figura AIV.4 Confección de la curva de calibrado

### AIV.3 ENSAYOS EXPERIMENTALES CON *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Corrida N° 1 – 1 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA – 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Dosis:</b> 1 ppm APA	
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 2,84 ml	<b>Concentración de Ps:</b> 2,77E+05 UFC/cm <sup>3</sup>
Tiempo	Corrida1: Conc. Ps
0	2,77E+05
10	2,60E+05
20	2,59E+05
30	2,57E+05
60	2,50E+05
90	2,29E+05
120	2,27E+05
150	2,27E+05
180	2,24E+05
210	2,15E+05
240	2,15E+05
270	2,04E+05
300	2,00E+05
600	6,10E+03

<b>Corrida N° 2 - 1,5 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 684,9 ppm APA – 1130,5 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>Dosis:</b> 1,5 ppm APA
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 4,38 ml	<b>Concentración de Ps.</b> 2,80E+05 UFC/cm <sup>3</sup>

Tiempo	Corrida 1: Conc. Ps
0	2,80E+05
10	2,62E+05
20	2,50E+05
30	2,48E+05
60	2,45E+05
90	2,18E+05
120	1,90E+05
150	1,30E+05
180	7,28E+04
210	7,16E+04
240	5,00E+04
270	3,70E+04
300	1,00E+04

<b>Corrida N° 3 - 2 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,85 ppm APA – 1156 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>Dosis:</b> 2 ppm APA
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 6,19 ml	<b>Concentración de E. coli:</b> 2,79E+05 UFC/cm <sup>3</sup>

Tiempo	Corrida 1: Conc. Ps
0	2,79E+05
10	2,35E+05
20	2,21E+05
30	2,22E+05
60	2,19E+05
90	1,70E+05
120	1,30E+05
150	2,79E+04
180	2,80E+03
210	2,22E+03
240	1,00E+03
270	4,10E+02
300	3,00E+02

<b>Corrida N° 4 – 3 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 646,80 ppm APA – 1156 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>Dosis:</b> 3 ppm APA
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 9,28 ml	<b>Concentración de E. coli:</b> 2,80E+05 UFC/cm <sup>3</sup>

Tiempo	Corrida 1: Conc. Ps
0	2,80E+05
10	2,20E+05
20	1,99E+05
30	1,97E+04
60	5,10E+03
90	3,55E+03
120	7,22E+02
150	3,80E+02
180	1,19E+03
210	7,00E+01
240	5,00 E +01
270	X
300	X

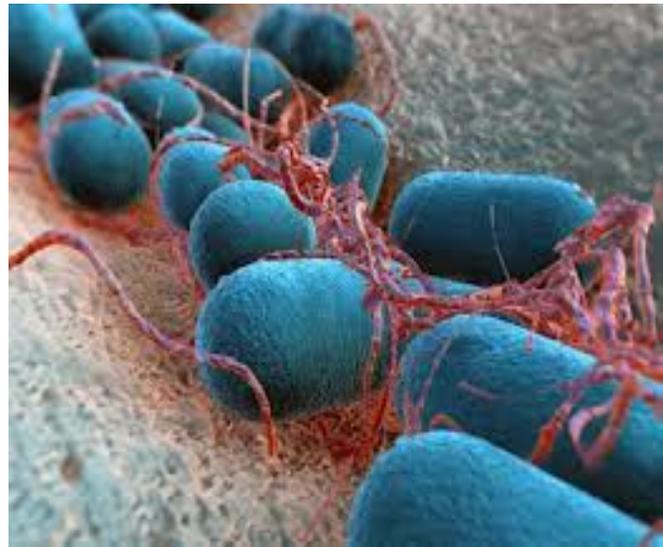
<b>Corrida N° 5 – 4 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA – 1122 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>Dosis:</b> 4 ppm APA
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 11,39 ml	<b>Concentración de E. coli:</b> 2,60E+05 UFC/cm <sup>3</sup>

Tiempo	Corrida 1: Conc. Ps
0	2,60E+05
10	1,70E+05
20	3,10E+04
30	3,17E+04
60	1,38E+03
90	9,80E+03
120	3,30E+02
150	2,00E+01
180	x
210	x
240	x
270	x
300	x

<b>Corrida N° 6 - 5 ppm Solución de APA.</b>	
<b>Concentración de APA (1/200):</b> 703,93 ppm APA - 1105 ppm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>Dosis:</b> 5 ppm APA
<b>Volumen de APA (1/200) agregado:</b> 14,22 ml	<b>Concentración de E. coli:</b> 2,70E+05 UFC/cm <sup>3</sup>

<i>Tiempo</i>	<i>Corrida 1: Conc. Ps</i>
0	2,70E+05
10	8,70E+04
20	8,00E+04
30	7,90E+03
60	5,00E+01
90	x
120	x
150	x
180	x
210	x
240	x
270	x
300	x

# APÉNDICE V





## Chemical disinfection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – The proposal of a reaction kinetic model

Marina J. Flores<sup>a</sup>, Rodolfo J. Brandi<sup>a,b</sup>, Alberto E. Cassano<sup>a,b</sup>, Marisol D. Labas<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>INTEC, Universidad Nacional del Litoral and CONICET, 3000 Santa Fe, Argentina

<sup>b</sup>Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Universidad Nacional del Litoral, 3000 Santa Fe, Argentina

### H I G H L I G H T S

- ▶ *Escherichia coli* inactivation using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is modeled as a chemical-like kinetics.
- ▶ Bacteria death is assumed to be the result of cellular wall break down by OH<sup>•</sup> attack.
- ▶ The first three steps are modeled as pseudo-homogeneous superficial reactions.
- ▶ The next steps are homogeneous oxidations of the lysate chemical components.
- ▶ Simulations using an intrinsic kinetic model are fully validated with experiments.

### A R T I C L E I N F O

#### Article history:

Received 8 February 2012

Received in revised form 29 April 2012

Accepted 30 May 2012

Available online 9 June 2012

#### Keywords:

Disinfection

Hydrogen peroxide

Kinetic model

*Escherichia coli*

### A B S T R A C T

The inactivation (death) of *Escherichia coli* bacteria in water employing hydrogen peroxide has been studied and a five log decrease in CFU cm<sup>-3</sup> was achieved. The reaction kinetics was modeled as a series of biochemical steps represented by pseudo-homogeneous reactions between hydroxyl radicals and the components of the cellular walls. Afterwards, the lysate was supposed to undergo a group of parallel reactions leading to the oxidation of the chemical components of the cell. It was assumed that the initiation step of hydrogen peroxide dissociation is promoted by the presence of iron or iron-superoxide compounds. In addition the model takes into account that the reaction forming the lysate as well as the ones that follow the destruction of the bacterium wall, compete for the available oxidizing radicals with the steps that involve the attack on active and injured bacteria. A four parameter representation shows good agreement for the whole range of employed hydrogen peroxide concentrations. The results are valid for any form and size of the employed reactor as long as the described operating conditions (pH and concentrations) are maintained. This development constitutes a very general model that is capable to describe inactivation processes whose graphical representation also shows the presence of shoulders at the beginning and tailings in the end of the operation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The antimicrobial and/or antiseptic properties of hydrogen peroxide have been known for many years due to its efficacy and reasonable manipulation safety [1,2]. This compound is effective against a wide spectrum of bacteria, yeasts, molds, viruses and spore forming organism [1,3].

Disinfectant agents affect the microorganisms viability and survival by attacking their different structures. Depending on the disinfectant agent capacity to break through the cell wall, the disinfectant can cause sequential damage in the different organelles of the cell, DNA molecules, etc. [4]. The toxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *Escherichia coli* have been extensively studied [5–8]. The cyto-

toxic effect exerted by hydrogen peroxide on microorganisms depends on the cell characteristics, its physiological state, extension of time of exposure, environmental conditions and employed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration [9,10].

The chemical mechanism that promotes the hydrogen peroxide decomposition to produce the highly oxidative OH<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals is well known. However, its effect on different microorganism has been usually inferred but not firmly established.

The damaging strokes to the bacteria cellular components have been attributed to a particular phenomenon called oxidative stress resulting from the action of those reactive oxygen species known as ROS [1,11]. Sies [12] defined the oxidative stress, as a disruption of the prooxidant–antioxidant balance in favor of the former, leading to potential injury. Hydroxyl radicals may impact on different components of the cell producing the above mentioned oxidative stress; i.e., ROS can affect the cell in different levels and there is no doubt that, particularly the OH<sup>•</sup> radical, can produce a severe

\* Corresponding author at: INTEC, Universidad Nacional del Litoral and CONICET, 3000 Santa Fe, Argentina.

E-mail address: [mlabas@santafe-conicet.gov.ar](mailto:mlabas@santafe-conicet.gov.ar) (M.D. Labas).

**Nomenclature**

B	bacteria	$\gamma_0$	kinetic parameter (mol CFU <sup>-1</sup> )
k	kinetic constant, units depend on the specific reaction step of the model	$\gamma_1$	kinetic parameter (mol CFU <sup>-1</sup> )
CFU	colony forming units	$\gamma_2$	kinetic parameter (mol CFU <sup>-1</sup> )
E	generic representation of all the elements that constitute the mathematical representation of the process	$\alpha$	constant related to dead and lysed bacteria
I	generic representation of all the Ac + In elements that constitute the mathematical representation of the process	<i>Subscripts</i>	
R	volumetric reaction rate (CFU cm <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> )	AC	relative to active bacteria
t	time (s)	IN	relative to injured bacteria
HS	hypothetical species of the components of the cell wall	DE	relative to death bacteria
SSA	specific superficial area per unit mass of the cell (cm <sup>2</sup> cm <sup>-3</sup> )	CW	relative to cell wall
LY	products of bacteria lysis	P <sub>N</sub>	relative products of bacteria lysis
Y	oxidation yield of reactions involving OH <sup>•</sup> radicals (CFU mol <sup>-1</sup> )	<i>Superscripts</i>	
<i>Greek letters</i>		0	indicate initial condition
$\gamma_A$	kinetic parameter (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	<i>Special symbols</i>	
$\gamma_{IN}$	kinetic parameter (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	()	concentration of chemical of species (mol cm <sup>-3</sup> ), or concentration of colonial forming units in the bulk (CFU cm <sup>-3</sup> )

cellular damage that leads to an irremediable outcome; i.e., its death.

Moreover, the extreme reactivity of these radicals provides them the means to become major participants in the toxic processes mediated by free radicals [13], a conclusion that has been demonstrated by numerous studies [14–19]. In the spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*, Storz et al. [20] found that OH<sup>•</sup> can produce a break in the double chain and/or some chemical modifications in the nitrogen bases. In a study of the membrane system, Anzai et al. [21] found that hydroxyl radicals increased lipid peroxidation. The toxicity of OH<sup>•</sup> radicals generated in vivo has also been well documented by Nunoshiba et al. [11]. Rincon et al. [22] studied the photocatalytic process with TiO<sub>2</sub> for disinfection of drinking water and postulated that the interaction of hydroxyl radicals with bacteria led to its inactivation.

One of the most logical hypotheses is to consider that a Fenton-like or Haber-Weis-like reactions [11,13,23,24] at low iron concentrations [25,26] could be the main cause of formation of the hydroxyl radical, and that this radical will be the most important product of these reactions. Even if Fenton and Fenton-like reactions are usually conducted at acidic pH, it has been shown that they can also be effective working at circumneutral pHs [27–31]. Moreover, problems usually encountered in large scale applications will never be an important issue in biological systems. However, with respect to the participation of type of reactions, their inclusion does not mean that one will ignore that microorganisms have defensive systems to inhibit the destruction of its internal oxidation–reduction balancing [32] and some competition will always be present. These considerations are one of the principal grounds for the model presented in this report.

For disinfection purposes, the non-persistent characteristic of hydrogen peroxide becomes a disadvantage to maintain the water quality in the distribution system. However, its use is widely spread because it is relatively inexpensive, easily removed when desired and unlikely to be hazardous to health if used properly [33]. In addition, it does not give rise to disinfection byproducts, as it is the case of other strong oxidants. But even more importantly, the consequence of the hydrogen peroxide action leads to a complete and irreversible destruction of the bacteria

components, hindering the possibility of bacteria recovery or resuscitation.

Several kinetic models to represent the disinfection process have been published. Some of them are empirical equations such as for example those proposed Chick [34], Watson [35], Hom [36], Cerft [37], Buchmann et al. [38], Membre et al. [39] while others, very well represented by the work of Severin et al. [40] with their series and multi target events have a more mechanistic approach. Just recently a much direct interpretation of the involved oxidation process has been published by Marugan et al. [41].

In this work we have made an attempt to develop a general model to describe the chemical disinfection reaction based on a simplified generic interpretation of a very difficult and intricate mechanism. Thus, the membrane disruption, the subsequent lysis of the components of the bacteria and the oxidation of the resulting lysate, were modeled as series of episodes followed by a sequence of parallel events, in which the level of damage will increase until the bacteria not only dies or is severely affected in its vital functions but also, given enough time, the chemical components of the cell will be fully oxidized. Hence, this model should be useful to characterize quite accurately simple as well as complex survival curves of inactivation. In fact, in the present context it appears capable of accommodating initial resistances or retards, as manifested by the shoulder which appears in many survival curves as well as the observed tailings at the end of other methods. This detailed description of the possible pathway through different steps, enhances a virtual visualization of the full process and simplifies further actions concerning reactor design, scale-up or optimization procedures.

## 2. Experimental

### 2.1. The reacting system

In all experimental runs we employed a well-stirred, cylindrical batch reactor, having a total reaction volume of 2000 cm<sup>3</sup>. Stirring was achieved with an external orbital shaking device. A cooling jacket connected to a thermostatic bath (Haake) surrounds the reactor to keep the reacting system at a constant temperature of

20 °C. The top of the reactor has provisions for sampling, pH and temperature measurements (see Fig. 1).

## 2.2. Chemicals

The following chemical were used: hydrogen peroxide (Merck, pro-analysis 30%), Catalase (from *Aspergillus niger*, Biochemika), Ammonium molybdate (Cicarelli, pro-analysis), Potassium iodide (Cicarelli, pro-analysis), Potassium acid phthalate (Cicarelli, 95% pro-analysis), Physiological saline solution (Roux-Ocefa), Nutrient broth (Biokar Diagnostics), Sodium hydroxide (Cicarelli, pro-analysis) and Peptone water (Biokar Diagnostic).

## 2.3. Experimental procedure

Throughout this work *E. coli* strain ATCC 8739 was used. The purity of the strain was verified by conventional methods [42,43]. The culture was grown in a complex medium (Nutrient broth) that had beef extract as the main component. Therefore, the broth composition was: tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>, beef extract 5 g L<sup>-1</sup> and NaCl: 5 g L<sup>-1</sup>.

The working solution was prepared from a culture that had reached the stationary phase of growing and, afterwards, was brought to a 1/1000 dilution with physiological saline. This dilution helped to ensure that there was no bacteria growth during the disinfection run due to the fact that the growing culture concentration was sufficiently diluted [44,45]. An atomic spectroscopy analysis (Perkin-Elmer-5000 AAnalyst) detected traces of iron and copper ions in the growing culture (Cu = 7.7 µg g<sup>-1</sup> and Fe = 43 µg g<sup>-1</sup>).

The prepared culture was mixed with the desired amount of hydrogen peroxide and distilled water. The hydrogen peroxide concentrations varied between 15 and 300 ppm. They were measured with colorimetric techniques at 350 nm, according to Allen et al. [46] with a Perkin-Elmer-330 spectrophotometer. All initial concentrations (at  $t = 0$ ) were in the order of 10<sup>5</sup> CFU cm<sup>-3</sup> and afterwards, samples were withdrawn at different time intervals for several determinations. The exact value of the bacteria's initial concentration was measured for each experiment. Runs were duplicated and samples subjected to triplicate determinations. The initial pH was 7 and remained practically constant during all the runs. In addition, experiments were carried out without

hydrogen peroxide to make sure that the starting solution was free from other inactivating agents.

Each sample was examined with the following measurements: absorbance at 350 nm (spectrophotometric analysis) for hydrogen peroxide and CFU counting using specific Petrifilm™ plates (3 M Microbiology Products) for *E. coli* and coliform bacteria. This method has been recognized by the American Public Health Association in Standard Methods for the examination of Dairy Products [43] and the Association of Official Analytical Chemists International in Official Methods of Analysis (AOAC) [47] as equivalent to the conventional plate method for this type of microorganism. Dilutions of the samples to obtain the optimum concentrations for the CFU counting method were made with a sterile peptone water solution. To quench the hydrogen peroxide action during the time interval between sampling and spread plating, a known fraction of the sample was mixed with the required amount of catalase solution. Control experiments were conducted to ensure that the employed concentrations of catalase solutions did not affect bacteria concentrations. After spreading the plates with the appropriate volume of sample they were incubated for 24 h at 37 °C.

## 3. Kinetic model proposal

The key point is to search for one acceptable assumption concerning the possible place where the action of ROS can take place. According to Dalrymple et al. [2] in the case of bacteria there are three sites of the cell that could be the targets for ROS invasion: (1) The peptidoglycan layer, (2) the lipopolysaccharide layer (found only in Gram-negative bacteria) and (3) the phospholipid bilayer. In this study *E. coli* was the chosen bacteria to work with and consequently the three layers will be present. Chemical-reactive agents like hydrogen peroxide may display some target specificity like membrane thiol groups and ribosomes but, frequently, hydroxyl radicals have sufficient reactivity to interact with different cellular components obscuring the direct primary damage. It is very likely that, this could be the way to break down the cell membrane. Once this action occurs, ROS could still act on intracellular vulnerable sites such as enzymes, coenzymes and nucleic acids. The enzymatic system appears to be one of the most important and irreplaceable reconstructive agent for bacteria reactivation in UVC disinfection. Consequently, if the disruption of the cellular wall is not enough, this effect of hydrogen peroxide on intracellular components could explain why oxidative disinfection is always an irreversible process.

With regard to the most plausible mechanisms for producing damage on components of the cell several detailed studies have been reported, many of them still under discussion. Nevertheless, it is recognized that the process constitute a large sequence of a complex network of interconnected steps before reaching what might be called the "final product" (inactivation). The fundamental question is to know if only one simple reaction path is sufficient or if it is necessary to resort to more than one to complete the pursued objective and, in this case, whether or not it is indispensable to model all the steps involved in the oxidation of the lysis products to adequately represent the disinfection operation leading to cell death.

In view of these difficulties, and searching for some form of plausible, simplified and at the same time, conceptually undistorted representation of all these processes, one could try to adopt a model that takes into account the previously mentioned actions on the biological metabolism, without assigning a detailed composition to each of the representative family of cell components. Once this model is mathematically stated, it will be necessary to find out the minimum set of kinetic parameters that are required to depict, within an acceptable error, the series or series-parallel events that

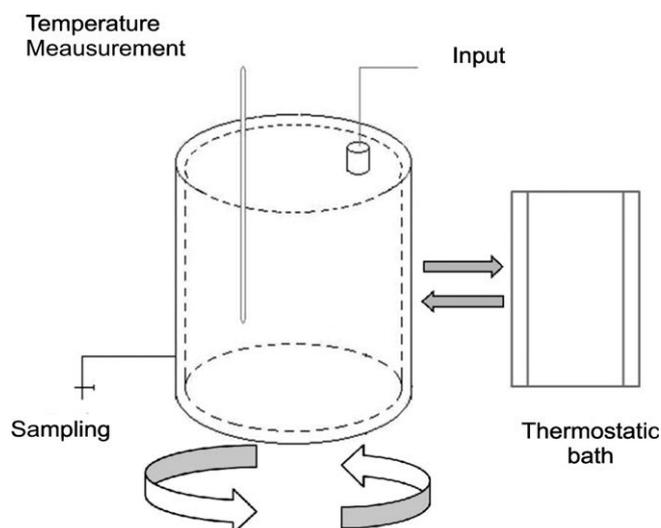
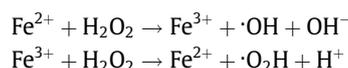


Fig. 1. Schematic representation of the experimental reactor setup.

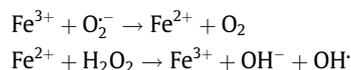
lead to the death of the bacteria. In this sense, the membrane disruption, the subsequent lysis of the components of the bacteria and the oxidation of the resulting lysate, can be modeled as series of episodes followed by a sequence of parallel events, in which the level of damage will increase until the bacteria is severely affected in its vital functions [1,41,48] without pursuing further oxidation reactions if they are not necessary.

The kinetic model put forward here for *E. coli* disinfection is a conceptual modification of the one described by Marugan et al. [41] where a reaction pathway is proposed for the undamaged, damaged and inactivated populations of bacteria and particularly, for the structural mechanism of the bacteria death. Instead of considering the attachment of titanium dioxide particles on the bacterium wall that afterwards is followed by the classical oxidative mechanism of the photocatalytic system, in this work we begin by considering the full sequence of hydroxyl radicals formation and then, explicitly takes into account that there is one attack on the cell membrane components according to Dalrymple et al. [2] that could involve one or more steps until the cell anatomy is disrupted causing the bacteria's death; i.e. it is neither active, nor culturable [49]. At this point a lysate is achieved. Afterwards, the most important families of cells components are involved in a net of parallel-series oxidative reactions that can compete with the active and injured cells for the hydroxyl radicals and thus affecting the disinfection rate.

In modeling the intrinsic reaction kinetics of disinfection with hydrogen peroxide one of the major difficulties is to include the iron or iron-superoxide participation in the mechanism to producing hydroxyl radicals [11,13]; i.e. the Fenton-like or Haber-Weiss-like reactions:



or



There are two reasons for this complication: (1) The real mechanistic interaction of iron compounds inside the cell to explain the effects produced by the oxidative radicals is not fully understood yet and (2) the concentrations of the ferric and the superoxide ions are not precisely known.

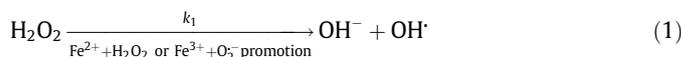
One artificial way to deal with this problem is to assume that the reaction is effectively mediated by iron or the couple ferric-superoxide ions, that they are at constant concentrations and that this process can be included as part of a hypothetical kinetic step. The respective pseudo specific constant of this stage represents the mechanism to generate the hydroxyl radicals.

### 3.1. A proposal of a tentative reaction representation of the bacteria death

The reactions that lead the hydroxyl radical generation are known to the point that, if desired, all the values of the specific kinetic constants of each step have been well established. Assuming

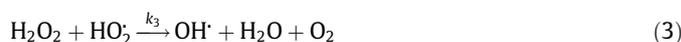
an initiation step promoted by iron (III) or iron (III)-superoxide to split the hydrogen peroxide, the following sequence can be proposed:

#### 3.1.1. Initiation



Note that, when the reaction is written as above, without including specifically the  $\text{Fe}^{3+}$  or the  $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-$  promotion,  $k_1$  is not known.

#### 3.1.2. Propagation



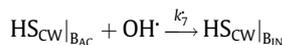
#### 3.1.3. Termination



All these steps have been studied in details for several years now and are fully accepted in the scientific literature Buxton et al. [50], Laa and Gallard [51], Zalazar et al. [52] just to mention a few examples.

#### 3.1.4. Membrane disruption

The process that ends up with the membrane breakdown may be treated by resorting to a pseudo-homogeneous interpretation of the intricate network of superficial reactions that leads to the rupture of the protective envelope. Let  $\text{HS}_{\text{CW}}|_{\text{BAC}}$  represent a hypothetical species of the components of the cell wall of the active bacteria whose concentration can be expressed in units of  $\text{mol cm}^{-2}$  and that reacts with the  $\text{OH}^\cdot$  radical. This composition is the same for every bacterium of a given family of bacteria. Then,



At this point, it is possible to think of  $\text{SSA}|_{\text{BAC}}$  as the specific superficial area per unit volume of one cell (in units of  $\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}$ ),  $V|_{\text{BAC}}$  as the volume of one cell per CFU (in units of  $\text{cm}^3 \text{CFU}^{-1}$ ) and  $[\text{BAC}]$  as the whole instantaneous concentration of the active bacteria (in units of  $\text{CFU cm}^{-3}$  of reacting medium). The concentration of hypothetical species per unit volume of the fluid may be calculated from the above mentioned superficial concentration of this species as:

$$\underbrace{\underbrace{[\text{HS}_{\text{CW}}|_{\text{BAC}}]}_{\text{Superficial concentration of of hypothetical species of one bacterium}} \times \underbrace{\underbrace{\text{SSA}|_{\text{BAC}}}_{\text{Superficial area per unit volume of bacterium}} \times \underbrace{V|_{\text{BAC}}}_{\text{volume of one CFU}} \times \underbrace{[\text{BAC}](t)}_{\text{Instantaneous concentration of active bacteria per unit volume}}}_{\text{Instantaneous representation of the total volumetric concentration of hypothetical species of the active bacteria}}$$

Taking into account averaging values for specific family of bacteria,  $[HS_{CW|BAC}]$  in the cell wall,  $SSA|_{BAC}$  and  $V|_{BAC}$  may be assumed almost constant. Then,

$$[HS_{CW|BAC}] \times SSA|_{BAC} \times V|_{BAC} = \text{constant} \times \underbrace{k_7}_{\text{Pseudo-homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_7^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \times [HS_{CW|BAC}] \times SSA|_{BAC} \times V|_{BAC}$$

However, it is very unlikely that just one hydroxyl radical will produce a serious damage to the cell wall. Neither the number of moles of OH $\cdot$  which are necessary to consider that the bacterium has been injured, nor the number of bacterium that form a CFU are known. It is always possible to conceive an oxidation yield as the ratio of injured CFU with respect to the spent hydroxyl radicals to produce this event:

$$k_7^{\#} = \frac{k_7}{Y_7}; \quad Y_7 = \frac{\text{Injured CFU}}{\text{OH}^{\cdot} \text{ spent this event}} [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}}; \quad k_7^{\#} [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU}_s}$$

In order to have the proper application of this yield as well as achieving unit's homogeneity it must be considered that:

$$R_{7,BAC} = -k_7[BAC][OH^{\cdot}]$$

$$R_{7,OH} = -k_7^{\#}[BAC][OH^{\cdot}]$$

With this pseudo homogeneous, biological reaction approach, step 7 can be finally expressed as:



In a similar way, the same procedure can be applied to the injured bacteria in the reaction with the OH $\cdot$  radicals according to:

$$\underbrace{k_8}_{\text{Pseudo-homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_8^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \times [HS_{CW|B_{IN}}] \times SSA|_{B_{IN}} \times V|_{B_{IN}}$$

$$k_8^{\#} = \frac{k_8}{Y_8}; \quad Y_8 = \frac{\text{Dead CFU}}{\text{OH}^{\cdot} \text{ spent in this event}} [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}}; \quad k_8^{\#} [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU}_s}$$

$$R_{8,B_{IN}} = -k_8[B_{IN}][OH^{\cdot}]$$

$$R_{8,OH} = -k_8^{\#}[B_{IN}][OH^{\cdot}]$$



This step leads to the rupture of the cellular wall and the death of the bacterium.

### 3.1.5. Lysis of dead bacteria

The death of the bacterium implies that the cellular wall has been broken permitting the access of the oxidant to the intracellular components, rendering the lysate:



where:

$$\underbrace{k_9}_{\text{Pseudo-homogeneous volumetric kinetic constant}} = \underbrace{k_9^*}_{\text{Superficial kinetic constant}} \times [HS_{CW|B_{DE}}] \times SSA|_{B_{DE}} \times V|_{B_{DE}}$$

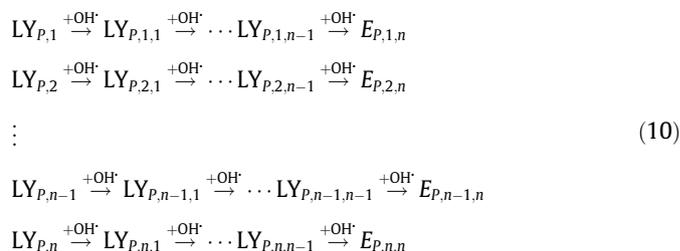
$$k_9^{\#} = \frac{k_9}{Y_9}; \quad Y_9 = \frac{\text{Lysed CFU}}{\text{OH}^{\cdot} \text{ spent in this event}} [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}}; \quad k_9^{\#} [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU}_s}$$

$$R_{9,B_{LY}} = -k_9[B_{DE}][OH^{\cdot}]$$

$$R_{9,OH} = -k_9^{\#}[B_{DE}][OH^{\cdot}]$$

Once the anatomic morphology of the cell has been altered producing the lysate, the OH $\cdot$  can interact with its internal components in typical homogeneous reactions. From the chemical point

of view the activity of the OH $\cdot$  radicals can be interpreted in terms of several parallel-series reactions with an undefined number of hypothetical components of the resulting lysis. In the model they are represented by LY $_{p,1}$ , LY $_{p,2}$ , ... LY $_{p,n-1}$ , LY $_{p,n}$ , that correspond to important groups of compounds which, after ulterior oxidations will produce the end products of the disinfection process:



### 3.2. Mathematical representation of the model

Operational parameters of the process might be obtained from the solution of a kinetic model, derived from the proposed sequence of processes that leads to the cell destruction. The calculation of the reaction rates for each step is carried out in every position of the reactor. However one should note that for a well mixed reactor in the absence of external effects (for example, irradiation or ultrasonic enhancements) compositions are uniform and correspond to the local values. The reaction's kinetics was formulated in terms of the mass action law for all the proposed steps to generate bacterial destruction by hydrogen peroxide. We can assume that:

- (i). The system is isothermal with perfectly mixed compositions.
- (ii). The micro steady state approximation is valid.
- (iii). The first set of lysate products oxidation is enough to represent the disinfection process (to be confirmed with the results).

If our third assumption is valid, considering only the first oxidation reaction of lysate byproducts should be sufficient to represent the disinfection reaction even if it does not reach the total oxidation of the cell's chemical components.

From the reaction scheme we can derive the following expressions:

$$\begin{aligned} R_{OH^{\cdot}} &= k_1[H_2O_2] - k_2[H_2O_2][OH^{\cdot}] + k_3[H_2O_2][HO_2^{\cdot}] - k_4[OH^{\cdot}]^2 \\ &\quad - k_6[OH^{\cdot}][HO_2^{\cdot}] - k_7^{\#}[BAC][OH^{\cdot}] - k_8^{\#}[B_{IN}][OH^{\cdot}] \\ &\quad - k_9^{\#}[B_{DE}][OH^{\cdot}] - \sum_{i=1}^n k_{10,i}[LY_{p,i}][OH^{\cdot}] \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} R_{HO_2^{\cdot}} &= k_2[H_2O_2][OH^{\cdot}] - k_3[H_2O_2][HO_2^{\cdot}] - k_5[HO_2^{\cdot}]^2 - k_6[OH^{\cdot}] \\ &\quad \times [HO_2^{\cdot}] \end{aligned} \quad (12)$$

The reaction rate expression for the Active and Injured bacteria are:

$$R_{B_{AC}} = -k_7[B_{AC}][OH^*] \quad (13)$$

$$R_{B_{IN}} = k_7[B_{AC}][OH^*] - k_8[B_{IN}][OH^*] \quad (14)$$

Applying the Micro Steady State Assumption (MSSA), from steps (1) to (6) the hydroxyl radical concentration ( $OH^*$ ) can be readily calculated.

Additionally, on the basis of previous confirmed evidences it is assumed that the rates of termination steps (4) and (6) are negligible as compared with (5) that is the predominant chain termination step and that stage (2) is the predominant propagation step [53–55]; then the hydroxyl radical concentration is:

$$[OH^*] = \frac{k_1[H_2O_2]}{k_2[H_2O_2] + k_7^{\#}[B_{AC}] + k_8^{\#}[B_{IN}] + k_9^{\#}[B_{DE}] + \sum_{i=1}^n k_{10,i}[LY_{p,i}]} \quad (15)$$

The value of  $\sum_{i=1}^n k_{10,i}[LY_{p,i}]$  may be considered proportional to the concentration of dead bacteria. This simplification is possible because it involves the same level of arbitrariness that all the terms included in the summation symbol.

$$\sum_{i=1}^n k_{10,i}[LY_{p,i}] = \alpha k_{10}[B_{DE}] \quad (16)$$

$$[OH^*] = \frac{k_1[H_2O_2]}{k_2[H_2O_2] + k_7^{\#}[B_{AC}] + k_8^{\#}[B_{IN}] + (k_9^{\#} + \alpha k_{10})[B_{DE}]} \quad (17)$$

Replacing Eq. (17) in into Eq. (13) and rearranging the result the final expression for the disappearance rate of Active bacteria is:

$$R_{B_{AC}} = -\frac{\gamma_A[B_{AC}][H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_0[B_{AC}] + \gamma_1[B_{IN}] + \gamma_2[B_{DE}]} \quad (18)$$

where

$$\gamma_A = \left(\frac{k_1 k_7}{k_2}\right); \quad \gamma_0 = \frac{k_7^{\#}}{k_2}; \quad \gamma_1 = \frac{k_8^{\#}}{k_2}; \quad \gamma_2 = \frac{(k_9^{\#} + \alpha k_{10})}{k_2}$$

Similarly, replacing Eq. (17) into Eq. (14) and operating on the result, the final expression for the disappearance rate of injured bacteria is:

$$R_{B_{IN}} = \frac{[B_{AC}][H_2O_2]\gamma_A - [B_{IN}][H_2O_2]\gamma_{IN}}{[H_2O_2] + \gamma_0[B_{AC}] + \gamma_1[B_{IN}] + \gamma_2[B_{DE}]} \quad (19)$$

where  $\gamma_{IN} = \left(\frac{k_1 k_8}{k_2}\right)$

#### 4. Results and discussion

Fig. 2 displays all the experimental data obtained in this work. Two direct conclusions can be extracted from these results. The first is that concentrations of hydrogen peroxide below approximately 300 ppm are impractical regardless the disinfection time. The second is that in all cases, the required processing extent does not appear to offer an attractive prospect for large-scale applications.

Moreover, from these results, it was not considered necessary a further increase in the concentration of hydrogen peroxide because, having reached five orders of magnitude in the change of the CFU population, the evolution of the figure suggests that a small reduction in the processing time would not have introduced a major improvement in the above mentioned disadvantageous circumstance.

A significant portion of the curves exhibits a linear behavior. However, simple first-order kinetics, as one knows, cannot represent the shoulder that is shown at the beginning of all experiments. Later we will see another advantage that has this model showing some aspects of the process that the first-order approximation would not be able to unveil.

Experiments were carried out in an isothermal, well mixed, batch reactor. Then the analysis was made with a very simple mass balance:

$$R_j = \frac{d[E]}{dt} \quad E = B_{AC}, B_{IN}, B_{DE}, LY_{p,i} \quad (20)$$

$$t = 0 \begin{cases} [B_{AC}] = [B_{AC}]^0 & \text{for } B_{AC} \\ [E] = 0 & \text{for } E = B_{IN}, B_{DE}, LY_{p,i} \end{cases}$$

The simulation results for  $I = B_{AC} + B_{IN}$  (surviving bacteria) were compared with the data obtained from the cell culture of the sampling employing a non-linear, multiparameter optimization computer program, in order to obtain the values of the kinetic constants  $\gamma_k$  for  $k = A, B, O, 1$  and  $2$ .

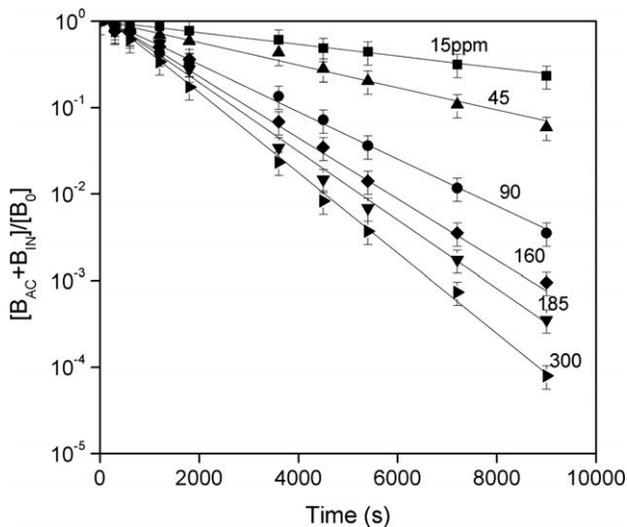


Fig. 2. Simulation results with the five parameters model (solid lines) compared with experimental data. The plot portrays the values of culturable cells.

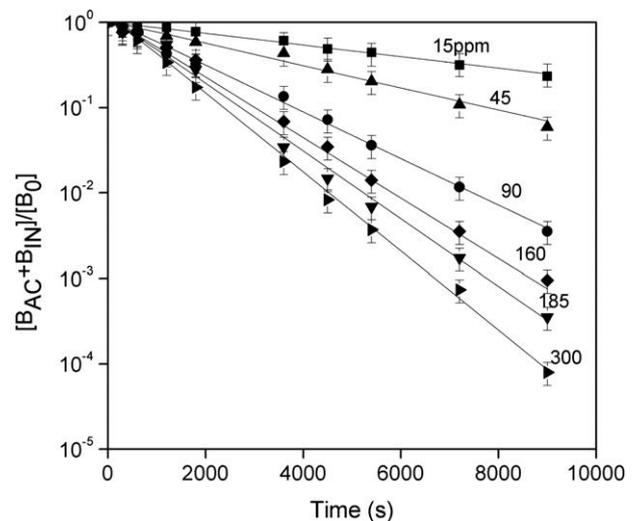


Fig. 3. Simulations results with the four parameters model (solid lines) compared with experimental data. The plot portrays the values of culturable cells.

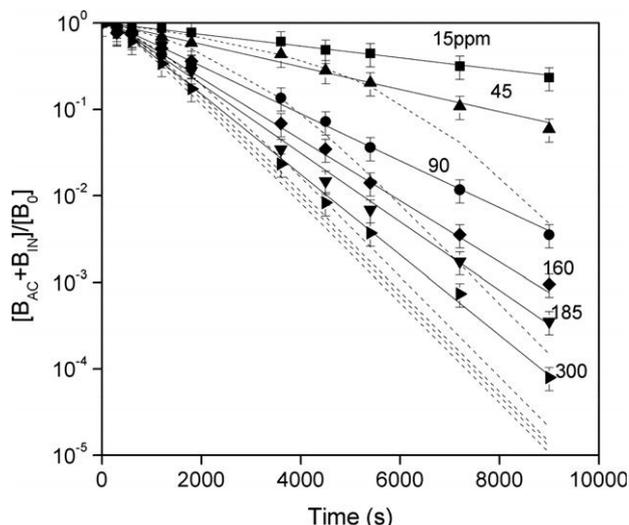


Fig. 4. Results assuming that the step producing the lysate of the dead bacteria is omitted. For  $[B_{AC}+B_{IN}]/[B_0]$  vs. time: solid lines: complete model; broken lines:  $\gamma_2 = 0$ .

The obtained values of the kinetics parameters were

$$\begin{aligned} \gamma_A &= (2.7 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ \gamma_{IN} &= (9.6 \pm 3.1) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ \gamma_0 &= (1.5 \pm 0.2) \times 10^{-10} \text{ mol CFU}^{-1} \\ \gamma_1 &= (4.9 \pm 2.2) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1} \\ \gamma_2 &= (1.7 \pm 0.2) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1} \end{aligned}$$

With these parameters, the agreement with the experimental data is shown in Fig. 3. The simulation results fit quite well all the experimental data for the whole range of explored hydrogen peroxide concentrations.

However, it can be seen that the value of  $\gamma_0$  is rather small. It is possible to reduce the parameters of the model if we assume that:

$$\gamma_0[B_{AC}] \ll [H_2O_2] + \gamma_1[B_{IN}] + \gamma_2[B_{DE}] \quad (21)$$

Rearranging the resulting equations, the final expressions for Active and Injured bacteria result:

$$R_{B_{AC}} = - \frac{\gamma_A[B_{AC}][H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_1[B_{IN}] + \gamma_2[B_{DE}]} \quad (22)$$

$$R_{B_{IN}} = \frac{\gamma_A[B_{AC}][H_2O_2] - \gamma_{IN}[B_{IN}][H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_1[B_{IN}] + \gamma_2[B_{DE}]} \quad (23)$$

Using this assumption, a new set of four kinetic constants was obtained:

$$\begin{aligned} \gamma_A &= (2.7 \pm 0.0) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ \gamma_{IN} &= (10.0 \pm 2.8) \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ \gamma_1 &= (5.3 \pm 2.0) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1} \\ \gamma_2 &= (1.7 \pm 0.1) \times 10^{-8} \text{ mol CFU}^{-1} \end{aligned}$$

The new plot is shown in Fig. 3.

It can be observed that the four parameters model also renders a good agreement with the experimental data. In this process exists a competition for the  $OH^\cdot$  radicals between two groups: (1) the dead bacteria and the compounds resulting from the lysate formation and (2) the active and the injured bacteria. The important question is to know to what extent the subsequent reactions after the bacteria's death affect the disinfection rate. These reactions correspond to the kinetic constants  $k_9$  and  $\alpha k_{10}$ . Both are grouped in  $\gamma_2$ . The importance of this conflict can be seen by making

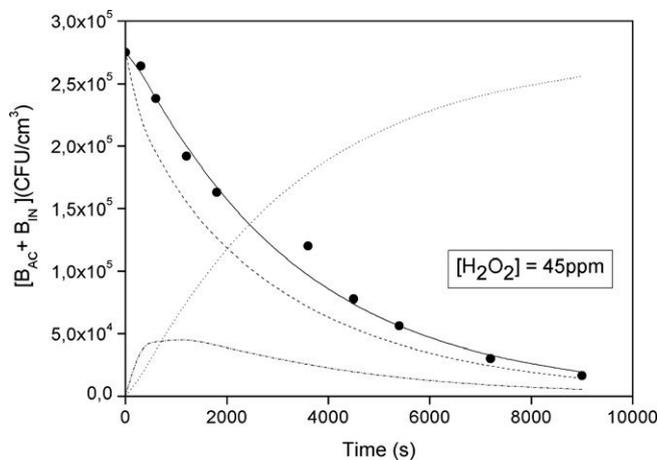


Fig. 5. A graphical description of the concentration evolution of the principal species existing in the reacting medium as seen by the model. The plot follows changes in concentration of the active, injured and dead bacteria at 45 ppm concentration of  $H_2O_2$ . Experimental data: solid line: culturable bacteria  $[B_{AC} + B_{IN}]$ ; broken line: active bacteria; broken and dotted line: injured bacteria; dotted line: dead bacteria.

$\gamma_2 = 0$  (either because  $k_9 = 0$  or  $\alpha k_{10} = 0$  or both are zero). The results are shown in Fig. 4.

It becomes clear that with this assumption the model predicts a much faster degradation of the bacteria. The implication is that the existing competition for the  $OH^\cdot$  radicals should have been wrongly disregarded if  $\gamma_0$  is made equal to zero, permitting to conclude that at least the step corresponding to the formation of the lysate cannot be ignored. The isolation of the effect corresponding to either  $k_9$  or  $\alpha k_{10}$  cannot be obtained from this model, but certainly  $\alpha k_{10}$  cannot be different from zero if  $k_9$  is equal to zero before.

The model also provides good information about the way in which the inactivation reaction proceeds. With the obtained parameters it is possible to follow the changes in concentration of the active, injured and dead bacteria. They are shown in Figs. 5 and 6 for two different concentrations of hydrogen peroxide.

It becomes clear that the life of the injured bacteria is very short and its concentration never reaches very high values. This effect can be seen by looking at the values of the obtained parameters.

From these two figures it can also be observed a consistent behavior. When lower concentrations of hydrogen peroxide are

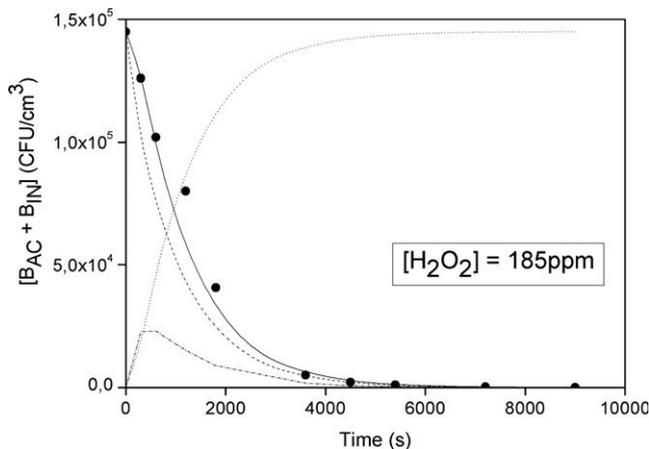


Fig. 6. A graphical description of the concentration evolution of the principal species existing in the reacting medium as seen by the model. The plot follows changes in concentration of the active, injured and dead bacteria at 185 ppm concentration of  $H_2O_2$ . Experimental data: solid line: culturable bacteria  $[B_{AC} + B_{IN}]$ ; broken line: active bacteria; broken and dotted line: injured bacteria; dotted line: dead bacteria.

used (45 ppm) the survival of a major number of active and injured bacteria is seen, indicating that the oxidation is not sufficiently intense to overcome the resistance of the cell wall. Conversely, at higher concentrations, (185 ppm) the number of survival and undamaged bacteria gradually decreases and there is a breaking of the bacteria envelope in a shorter time. Then, very rapidly, it changes from the state of injured bacteria to one of irreversible death. For that reason, the concentration of injured bacteria is always low. This is, at the same time, a confirmation that oxidant concentration is the most important factor to affect bacterial target sites [56].

Both figures show in the curves represented by the solid lines, the small shoulder mentioned in the beginning of this section.

It is also very interesting to note that taking the ratio between  $k_7$  and  $k_8$  (which is equal to 0.28) one gets the relationship between injured bacteria and fully active bacteria. This is shown more clearly by setting Eq. (14) equal to zero resulting  $[B_{IN}]/[B_{AC}] = 0.28$ . This is good evidence that the first stage is slower than the second. But this relationship is not much less than one to allow grouping both stages is a single one. Consideration of the mechanistic series process, allows unequivocally demonstrating the existence of the initial resistance observed in the shoulders of the figures.

## 5. Conclusions

A new kinetic model for chemical disinfection with hydrogen peroxide has been developed. It was validated with experiments using *E. coli* as a surrogate bacterium. Simulation results with a four parameters mathematical description provide very good agreement with the experimental data for a wide range of hydrogen peroxide concentrations.

The proposed mechanism involves a series of three heterogeneous steps (analyzed as pseudo-homogeneous reactions) followed by a group of parallel-series oxidation reactions in the homogeneous phase.

The disinfection process is characterized by the following steps: (1) Production of the hydroxyl radicals which is supposed to be promoted by a Fenton like or Haber-Weiss-like reactions; (2) A first attack by the hydroxyl radical to damage the cellular wall; (3) A second attack by the same oxidant, that produces the complete destruction of the bacterium envelope; (4) The formation of a lysate with all the cell components; (5) Subsequent oxidation of the chemical species resulting from the lysis of the bacterium.

The reactions leading to the formation of the lysate and the further oxidation of the cells components compete with the active and injured bacteria for the hydroxyl radical, a phenomenon that with the help of the model can be clearly unveiled.

In accordance with the model, the action that leads to the complete destruction of the bacterium cell wall is faster than the one that produces the initial damage that transforms the active bacterium into injured bacterium.

The reported model is based on an idealized description of the chemical disinfection, but does not introduce a conceptually distorted representation of the processes involved in the bacterium death. Consequently, the obtained kinetic parameters should be independent of the type and size of the employed laboratory reactor, as long as the reported operating conditions are reproduced; i.e. isothermal performance, pH and oxidant concentrations. Then, they should be useful for scale-up or reactor design as well as optimization procedures.

Finally, it should be remarked that this is a very general model that by the simple expedient of adding one set of parallel reactions (that were not needed in this work) it is possible to represent typical tailings of disinfection curves very often shown when a different disinfectant is used.

## Acknowledgments

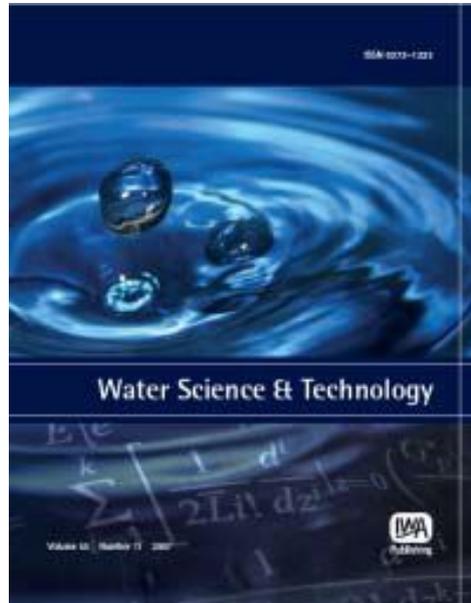
The authors are grateful to Universidad Nacional del Litoral (UNL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) for its financial support.

## References

- [1] M.D. Labas, C.S. Zalazar, R.J. Brandi, A.E. Cassano, Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide, *Biochem. Eng. J.* 38 (2008) 78–87.
- [2] O.K. Dalrymple, E. Stefanalos, M.A. Troitz, D.Y. Goswami, A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection, *App. Catal. B* 98 (2010) 27–38.
- [3] B.R. Cords, S.L. Burnett, J. Hilgren, M. Finley, J. Magnuson, Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides, in: P.M. Davidson, J.N. Sofos, A.L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in Food*, 3rd ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Florida, 2005.
- [4] S. Malato, P. Fernandez-Ibañez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, *Catal. Today* 147 (2009) 1–59.
- [5] S. Rafellini, M. Schenk, S. Guerrero, S.M. Alzamora, Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations, *Food Control* 22 (2011) 920–932.
- [6] J.A. Imlay, S. Linn, Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro, *Science* 240 (1988) 640–642.
- [7] G. Brandi, F. Cattabeni, A. Albano, O. Cantoni, Role of hydroxyl radicals in *Escherichia coli* killing induced by hydrogen peroxide, *Free Radic. Res. Commun.* 6 (1989) 47–55.
- [8] J.J. Schurman, Antibacterial Activity of Hydrogen Peroxide Against *Escherichia coli* 2001.
- [9] B.J. Juven, M.D. Pierson, Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantization, *J. Food Prot.* 59 (1996) 1233–1241.
- [10] B. Halliwell, Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?, *FEBS Lett* 540 (2003) 3–6.
- [11] T. Nunoshiba, F. Obata, A.C. Boss, S. Oikawa, T. Mori, S. Kawanishi, K. Yamamoto, Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions and mutagenesis in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 34832–34837.
- [12] H. Sies, Role of the reactive oxygen species in biological process, *Klin. Wochenschr.* 69 (1991) 965–968.
- [13] J.P. Kehrer, The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology* 149 (2000) 43–50.
- [14] E.B. Freese, J. Gerson, H. Taber, H.J. Rhaese, E. Freese, Inactivating DNA alterations induced by peroxides and peroxide-producing agents, *Mutat. Res.* 4 (1967) 517–531.
- [15] S.P. Wolff, A. Garnera, R.T. Dean, Free radicals, lipids and protein degradation, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 27–31.
- [16] V. Vallyathan, Generation of oxygen radicals by minerals and its correlation to cytotoxicity, oxygen radicals and lung injury, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 111–115.
- [17] P.J. Barnes, Reactive oxygen species and airway inflammation, *Free Radical. Biol. Med.* 9 (1990) 235–243.
- [18] A.R. Krapp, V.B. Tognetti, N. Carrillon, A. Acevedo, The role of ferredoxin-NADP reductase in the concerted cell defense against oxidative damage. Studies using *Escherichia coli* mutants and cloned plant genes, *Eur. J. Biochem.* 249 (1997) 556–563.
- [19] F. Buyuksonmez, T.F. Hess, R.L. Crawford, R.J. Watts, Toxic effects of modified fenton reaction on *Xanthobacter flavus* FB 71, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3759–3764.
- [20] G. Storz, M.F. Christman, H. Sies, B.N. Ames, Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*, *Proc. Natl. Acad.* 84 (1987) 8917–8921.
- [21] K. Anzai, M. Hamasuna, H. Kadono, S. Lee, H. Aoyagi, Y. Kirino, Formation of ion channels in planar lipid bilayer membranes by synthetic basic peptides, *Biochem. Biophys. Acta* 1064 (1991) 256–266.
- [22] A.G. Rincón, C. Pulgarin, N. Adler, P. Peringe, Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors-dihydroxybenzene isomers – in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with  $\text{TiO}_2$ , *J. Photochem. Photobiolog. A: Chem.* 139 (2001) 233–241.
- [23] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Biologically relevant metal ion-depend hydroxyl radical generation. An update, *FEBS* 307 (1992) 108–112.
- [24] R.J. Watts, D. Washington, J. Jowsawkung, F.L. Loge, A.L. Tell, Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and superoxide anion to *Escherichia coli*, *Adv. Environ. Res.* 7 (2003) 961–968.
- [25] I. Yamazaki, L.H. Piette, EPR spin-trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7588–7593.
- [26] S. Croft, B.C. Gilbert, J.R. Lindsay Smith, A.C. Whitwood, An E.S.R. investigation of the reactive intermediate generated in the reaction between  $\text{Fe(II)}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in aqueous solution. Direct evidence for the formation of the hydroxyl radical, *Free Radicals Res.* 17 (1992) 21–39.

- [27] Y. Sun, J.J. Pignatello, Chemical treatment of pesticide wastes, evaluation of iron(III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 322–327.
- [28] S.S. Lin, M. Gurol, Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on iron oxide: kinetics, mechanism, and implications, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1417–1423.
- [29] R.J. Watts, M.K. Foget, S.H. Kong, A.L. Teel, Hydrogen peroxide decomposition in model subsurface systems, *J. Hazard. Mater.* B69 (1999) 229–243.
- [30] W. Kwan, M. Voelker, Decomposition of hydrogen peroxide and organic compounds in the presence of dissolved iron and ferrihydrite, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1467–1476.
- [31] Romero, A. Santos, T. Cordero, Soil remediation by Fenton-like process: phenol removal and soil organic matter modification, *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 36–43.
- [32] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1–85.
- [33] A. Romero, A. Santos, F. Vicente, S. Rodríguez, A. Lopez Lafuente, In situ oxidation remediation technologies: kinetic of hydrogen peroxide decomposition on soil organic matter, *J. Hazard. Mater.* 170 (2009) 627–632.
- [34] H. Chick, An investigation into the laws of disinfection, *J. Hyg.* 8 (1908) 92–158.
- [35] H.E. Watson, A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant, *J. Hyg.* 8 (1908) 536–542.
- [36] L.W. Hom, Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem, *J. Environ. Div. ASCE* 98 (1972) 183–194.
- [37] O. Cerf, Tailing of survival curves of bacterial spores, *J. Appl. Bacteriol.* 42 (1977) 1–19.
- [38] R.L. Buchanan, M.H. Golden, J.G. Philips, Expanded safety concerns, the proposed method should be used models for non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Microbiol.* 82 (1997) 567–577.
- [39] J.M. Membre, V. Majchrzak, I. Jolly, Effects of temperature, pH, glucose, and citric acid on the inactivation of *Salmonella typhimurium* in reduced calorie mayonnaise, *J. Soc. Chem. London. Food Prot.* 60 (1997) 1497–1501.
- [40] B. Severin, M. Suidan, R. Engelbrecht, Kinetic modeling of U.V. disinfection of water, *Water Res.* 17 (1983) 1669–1678.
- [41] J. Marugan, R. van Grieken, C. Pablos, M.L. Satuf, A.E. Cassano, O.M. Alfano, Rigorous kinetic modeling with explicit radiation absorption effects of the photocatalytic inactivation of bacteria in water using suspended titanium dioxide, *Appl. Catal. B: Environ.* 102 (2011) 404–416.
- [42] M.L. Speck (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, second ed., APHA, American Public Health Association, Washington, DC, 1984.
- [43] R. Marshall, *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16th ed., Editorial APHA, American Public Health Association, Washington, DC, 1992.
- [44] M.D. Labas, C.A. Martin, A.E. Cassano, Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium, *Chem. Eng. J.* 114 (2005) 87–97.
- [45] M.D. Labas, R.J. Brandi, C.S. Zalazar, A.E. Cassano, Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a comparative study, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 670–676.
- [46] A.O. Allen, C.J. Hochanadel, J.A. Ghormley, T.W. Davis, Decomposition of water and aqueous solution under mixed fast neutron and gamma radiation, *J. Phys. Chem.* 56 (1952) 575–586.
- [47] *Official Methods of Analysis*, 15th ed., AOAC, Arlington, VA, 1990.
- [48] J. Marugan, R. van Grieken, C. Sordo, C. Cruz, Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions, *Appl. Catal. B: Environ.* 82 (2008) 27–36.
- [49] D.B. Kell, A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.R. Harwood, M.R. Barer, Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues, *Antonier van Leeuwenhoek* 73 (1998) 169–187.
- [50] G. Buxton, C. Greenstock, W. Helman, A. Ross, A critical review of data constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17 (1988) 513–886.
- [51] H. Gallard, J. De Laat, Kinetic modelling of Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation reactions in dilute aqueous solution using atrazine as a model organic compound, *Water Res.* 34 (2000) 3107–3116.
- [52] C.S. Zalazar, M.D. Labas, R.J. Brandi, A.E. Cassano, Dichloroacetic acid degradation employing hydrogen peroxide and UV radiation, *Chemosphere* 66 (2007) 281–286.
- [53] C.H. Liao, M.D. Gurol, Chemical oxidation by photolytic decomposition of hydrogen peroxide, *Environ. Sci. Tech.* 29 (1995) 3007–3014.
- [54] O.M. Alfano, R.J. Brandi, A.E. Cassano, Degradation kinetics of 2–4-D in water employing hydrogen peroxide and UV radiation, *Chem. Eng. J.* 82 (2001) 209–218.
- [55] C.S. Zalazar, M.E. Lovato, M.D. Labas, R.J. Brandi, A.E. Cassano, Intrinsic kinetics model of the oxidative reaction of dichloroacetic acid employing hydrogen peroxide and ultraviolet radiation, *Chem. Eng. Sci.* 62 (2007) 5840–5853.
- [56] A.D. Russell, G. McDonnell, Concentration: a major factor in studying biocidal action, *J. Hosp. Infect.* 44 (2000) 1–3.

**Provided for non-commercial research and educational use only.  
Not for reproduction or distribution or commercial use.**



This article was originally published by IWA Publishing. IWA Publishing recognizes the retention of the right by the author(s) to photocopy or make single electronic copies of the paper for their own personal use, including for their own classroom use, or the personal use of colleagues, provided the copies are not offered for sale and are not distributed in a systematic way outside of their employing institution.

Please note that you are not permitted to post the IWA Publishing PDF version of your paper on your own website or your institution's website or repository.

Please direct any queries regarding use or permissions to [wst@iwap.co.uk](mailto:wst@iwap.co.uk)

## A novel approach to explain the inactivation mechanism of *Escherichia coli* employing a commercially available peracetic acid

Marina J. Flores, Maia R. Lescano, Rodolfo J. Brandi, Alberto E. Cassano and Marisol D. Labas

### ABSTRACT

The chemical inactivation of *Escherichia coli* employing a commercial mixture of peracetic acid (PAA) was studied. For this purpose, experiments were carried out using dilutions of the unmodified mixture, and also the same mixture but altered with hydrogen peroxide (HP) previously inhibited. Also, these results were compared to those obtained before employing HP alone. It was found that the mixture is much more efficient than HP and PAA acting separately. Furthermore, it was found that PAA without HP is much more efficient than HP alone. A plausible explanation is presented. The homolysis of PAA would give rise to a chain reaction that generates a significant number of highly oxidizing radicals. An attacking scheme to bacteria in two stages is proposed, where the initial step, mainly caused by PAA, is very fast and eliminates some specific components of the bacteria that would otherwise inhibit the parallel action of HP. Thereafter, the emergence of a potentiating synergetic action of the second oxidant seems to be immediately unveiled.

**Key words** | commercial peracetic acid, *Escherichia coli*, hydrogen peroxide, synergism, water disinfection

Marina J. Flores  
Maia R. Lescano  
Rodolfo J. Brandi  
Alberto E. Cassano  
Marisol D. Labas (corresponding author)  
INTEC (Universidad Nacional del Litoral and CONICET),  
Guemes 3450-CP 3000,  
Santa Fe,  
Argentina  
E-mail: mlabas@santafe-conicet.gov.ar

Rodolfo J. Brandi  
Alberto E. Cassano  
Marisol D. Labas  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas (FICH),  
Universidad Nacional del Litoral,  
Ciudad Universitaria,  
Ruta Nacional N° 168 – Km 472,4,  
(3000) Santa Fe,  
Argentina

### INTRODUCTION

Water disinfection is carried out to prevent the spread of human pathogens that may be present in wastewater effluents. The efficient inactivation of pathogenic bacteria, viruses and protozoan parasites from water and wastewaters is critical, since sewage discharges may increase the risks of waterborne infections. Studies have pointed out that untreated wastewater is the first contributor of bacteria to the aquatic ecosystem. Chlorine is the most commonly used disinfectant but can also have an important drawback such as disinfection by-products (Nieuwenhuijsen *et al.* 2000).

Peracetic acid (PAA) is a strong oxidant. Its oxidation potential is larger than the one of chlorine or chlorine dioxide (Kitis 2004; Rossi *et al.* 2007) and it is a much more potent antimicrobial agent than hydrogen peroxide (HP), being rapidly active at low concentrations. The equilibrium state of commercial PAA is a mixture of peracetic and acetic acid, as well as water and HP. Although HP also contributes to the inactivation power of the mixture and to the formation

of hydroxyl radicals (Caretti *et al.* 2002; Caretti & Lubello 2003), PAA is a stronger biocide for a wide spectrum of microorganisms (Baldry 1983; Baldry & French 1989), while HP requires much larger doses for the same level of inactivation (Wagner *et al.* 2002). Some of the desirable attributes of PAA are the easiness of treatment implementation, its broad spectrum of activity even in the presence of heterogeneous organic matter, and a minor dependence on the pH.

Regarding the specific mechanism of the PAA attack against microorganisms, one may speculate that PAA functions in a similar way to other peroxides and oxidizing agents; thus, possibly PAA disrupts sulfhydryl (–SH) and disulphide (S–S) bonds in proteins and enzymes, and then breaks important components in the membranes and inside the cell by oxidative disruption (Malchesky 1993). An important advantage of PAA is that it inactivates catalase, an enzyme that is known to act by inhibiting highly oxidant hydroxyl radicals (Block 1991). Additionally, intracellular PAA action may oxidize essential enzymes,

impairing vital biochemical pathways, active transport across membranes and intracellular solute concentrations (Kitis 2004).

Different ways have been proposed to explain the chemical inactivation process. It can be thought that the oxidizing action takes place on the cellular wall or that, after regular or facilitated diffusion, the oxidant acts on the components of the interior of the bacteria or that in fact it operates with a combination of both processes. However, for optimization purposes, it is also very relevant to explain why PAA behaves in a manner so different than the one observed applying other disinfectants, for example, HP.

Research studies that show the synergistic effect between the PAA and HP are virtually non-existent, with the exception of the work of Alasri et al. (1992). In this work an experimental study adding different amounts of HP to a PAA solution was performed in order to observe those synergistic effects.

Therefore, for practical purposes, it is important to study the inactivation results produced by the mixture and identify the mechanism of the observed oxidation activity. Due to this fact, the use of commercial PAA as an alternative disinfectant was studied in this report. Its efficiency was tested employing a microbial indicator of water contamination, *Escherichia coli*, commonly used in this process.

## MATERIALS AND METHODS

In all experiments, a well-stirred batch annular reactor having a total reaction volume of 2 L was employed. Stirring was achieved with an external orbital shaking device. A cooling jacket connected to a thermostatic bath surrounds the reactor to keep the reacting system at a constant temperature of 20 °C. The top of the reactor has provisions for sampling, pH and temperature measurements. For the experimental runs, a PAA commercial mixture (Química Agroindustrial Neo: PAA 15% v/v; HP 20%; acetic acid 25% and water 40%) was used. It is important to study separately the effect of the two oxidizing components of the mixture. Therefore, the reactant was also investigated free from HP. Inhibition of HP was achieved using catalase (from *Aspergillus niger*, Biochemika), allowing in this way the study of the efficiency of PAA alone.

*Escherichia coli* strain ATCC 8739 was used throughout this work. The culture was grown in a complex medium: a nutrient broth. The complete broth composition was: tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>; beef extract: 5 g L<sup>-1</sup>; and NaCl: 5 g L<sup>-1</sup>.

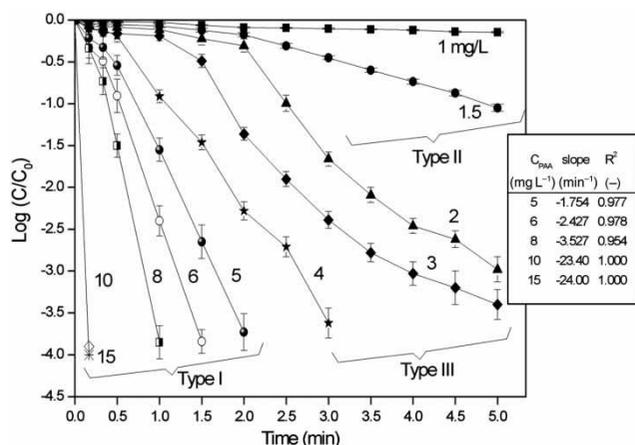
The bacterial inoculums remained in the stove for 24 hours at a constant temperature of 37 °C. The solution used for the experimental runs was prepared from a culture that had reached the beginning of the stationary phase of growth and afterwards was brought to a 1/1000 dilution with physiological saline. This dilution ensured that there was no bacteria growth during the inactivation run because the growing culture concentration was sufficiently diluted. The prepared culture was mixed with the desired concentration of PAA in the reactor.

The initial concentrations of bacteria at  $t = 0$  were always around 10<sup>5</sup> CFU (colony forming units) mL<sup>-1</sup>. Afterwards, samples were withdrawn at different intervals. To quench the PAA and HP action during the time interval between sampling and spread plating, a known volume of the sample was mixed with the required amount of sodium thiosulfate (200 µL) and catalase (500 µL) solutions respectively. These experiments were very effective in achieving their goals, which were twofold. Different concentrations of catalase and thiosulfate were tested until the obtained combination of the concentration of both compounds showed that (i) the desired inhibition was obtained and (ii) this combination did not affect in any way the existing population of bacteria. The plates were incubated for 24 h at 37 °C in an EMB (Eosin Methylene Blue) plate. Runs were duplicated and samples were subjected to triplicate determinations.

## RESULTS AND DISCUSSION

### PAA inactivation effects

Figure 1 shows the average results obtained during a series of inactivation tests that employed concentrations from 1 to 15 mg L<sup>-1</sup> using the commercial PAA mixture. It is well documented that a plot of log of survivors versus time may give a straight line (type I), or curves with different shoulders (type II), or curves with shoulders and tails (type III). Thus, when the disinfectant concentration is changed, each family of curves represents more markedly the phenomenon that prevails in the different circumstances of the process. Curves named 'Type I' show clearly a rapid inactivation, with a small shoulder and an important portion of their trajectory having the characteristics of a straight line. Those of 'Type II' do not allow distinguishing with precision if they are the result of a very slow inactivation or a shoulder that extends for a very long time. Those of 'Type III' show a marked shoulder and tail, and therefore these cannot be represented by a straight line.



**Figure 1** | Decrease in CFU as a function of time employing the commercial mixture of PAA. (Slope and R<sup>2</sup> for those plots that show features corresponding to a straight line in a significant portion of their trajectory.)

Notice, however, that for concentrations larger than 5 mg L<sup>-1</sup>, the plots are straight lines and 99.99% inactivation is obtained in less than 2.1 minutes. It may be interesting to note that approximately 6 mg L<sup>-1</sup> is coincident with the concentration usually applied in water disinfection processes when PAA is employed (Lefevre *et al.* 1992; Colgan & Gehr 2001). In the inactivation curves of Figure 1, two typical deviations from a straight line can be observed: shoulders and tails. There are several reasons for the shoulder: if clumps of microorganisms exist in the suspension, all cells in the clump needed to be inactivated before the colony-forming ability of the cluster is fully inactivated. Another possible explanation is that the bacteria populations exposed to low concentrations of disinfectant required a successive accumulation of injuries to reach their threshold limit.

The presence of tailing in an inactivation curve may have a different plausible interpretation: if some of the existing microorganisms are intrinsically more resistant than others, they can survive under the studied conditions and display a reduction in the inactivation rate and, consequently, the disappearance of the CFU will be appreciably slowed down. Additionally, the competition for the subsequent oxidation of the lysate (products resulting from the dead bacteria lysis) with the active bacteria for the existing oxidizing agents can contribute also to the tailings appearance.

Organic peroxides as PAA contain peroxide groups that are an indisputable source of high oxidation potential. In any event, these results should be compared with those obtained employing HP alone. They are summarized in Table 1. Values on the left were extracted from results published by Labas *et al.* (2008, 2009) for a total reaction time of

**Table 1** | Inactivation results employing HP and commercial PAA

HP alone <sup>a</sup> (t = 150 min)		Commercial PAA (t = 5 min)	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Inactivation (%)	PAA (mg L <sup>-1</sup> )	Inactivation (%)
15	80	1	28.4
45	92	2	99.9
160	99.9	5	> 99.99
185	99.99	15	> 99.99

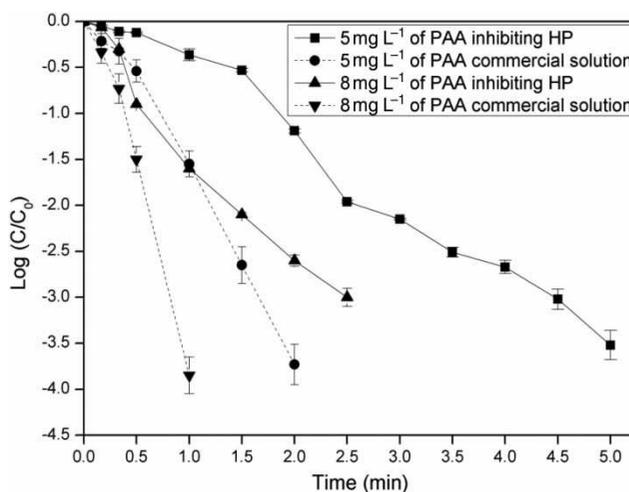
<sup>a</sup>From Labas *et al.* (2009).

150 minutes, employing the same experimental procedure. From Table 1, in the experiments with the commercial PAA (2 mg L<sup>-1</sup>) a much greater inactivation was obtained (99.9%) in just 5 minutes. To reach the same level of inactivation, in runs that lasted 2.5 h, using HP, a concentration of 160 mg L<sup>-1</sup> was required.

### Synergetic effect of the mixture

The next step is to elucidate if, when employing commercial PAA in the absence of HP, the experimental results show significant differences. Two sets of experiments were performed inhibiting HP activity. For PAA concentrations of 5 and 8 mg L<sup>-1</sup> the results are shown in Figure 2. It can be seen that, to get the same level of inactivation (99.9%) achieved by the mixture of PAA without inhibition of the HP, it is necessary to increase the contact time by approximately three times.

This outcome implies a larger increase in the inactivation rate operating with the mixture. This is explained by the synergistic effect generated by the presence of HP.



**Figure 2** | Decrease in CFU as a function of time employing PAA without the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and using the commercial PAA.

### Interpretation of the obtained results

The following explanation of the results is based on the hypothesis that chemical inactivation is just a particular case of a rather unusual oxidation reaction mechanism. Table 2 shows an interesting comparison between the inactivating activity using HP intervening solely, PAA acting alone and the commercial mixture of HP and PAA.

From Table 2, it can be seen that to achieve 99.9% inactivation, the dose required is 24,000 and 22.5 mg min L<sup>-1</sup> for HP and PAA respectively (the HP is 1,067 times slower than the PAA alone), and the inactivation process with the mixture requires a dose of 8.16 mg min L<sup>-1</sup> and inactivation is 2.76 times faster than with PAA alone. Furthermore it can be seen that the effect of the mixture is greater than the sum of the individual effects of the two isolated disinfectants. Clearly there is a potentiating synergistic effect between HP and PAA.

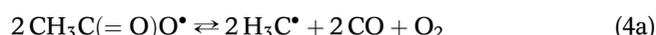
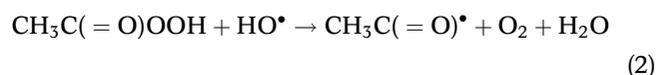
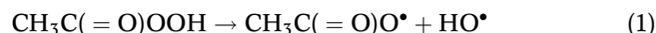
The commercial mixture shows a unique result, which raises the thought of the existence of a very distinct mechanism of action. The generation of strong oxidative radicals from HP results from a well-known mechanism. The action of the HP is based primarily on the oxidation caused by hydroxyl radicals almost exclusively. On the other hand, one can venture to say that, in the case of the PAA, something substantially different takes place.

### PAA oxidation mechanism

There may be more than one possible explanation to interpret the results of inactivation of *Escherichia coli* with the PAA. In this work, a tentative interpretation of the data is proposed, which advances a new approach to explain chemical inactivation processes for microorganisms. It is the result of adapting chemical oxidation reactions produced by the presence of hydroperoxide groups on organic substances.

The explanation proposed for the fast oxidation rate of PAA considers the homolytic PAA reaction proposed by Bach et al. (1996) and studied and confirmed in details by

Rokhina et al. (2010). These authors have shown that a chain reaction occurs with a pathway described as follows:



Reaction (1), which represents the initiation step, is very important because it forms the radical HO<sup>•</sup> and it was found to be the rate controlling step. The authors claim that all the generated radical species are active contributors to any oxidation mechanism but HO<sup>•</sup>, and to some extent the H<sub>3</sub>C<sup>•</sup> radicals, are the most significant ones. The reaction requires the presence of an eligible catalyst that should be of the types usually encountered in Fenton or Fenton-like reactions (Bianchini et al. 2002). It has been shown that the existing intra- or extra-cellular Fe<sup>2+</sup> is able to produce this type of reaction (Imlay & Linn 1988). It is important to note that only traces of some transition metal compounds are needed to induce the reactions mentioned above (Li et al. 1997; Nieto-Juarez et al. 2010; Jung et al. 2012).

Free radicals such as peroxy radicals, the superoxide anion, and the hydroxyl radical are responsible for many of the possible damaging reactions (McDonell & Russell 1999; Denyer & Maillard 2002). The chain reactions represented by Equations (1)–(6) may provide an adequate explanation for the rapid kinetics of inactivation by PAA.

Table 2 | Comparison of efficiencies of different processes of *Escherichia coli* inactivation (Temperature: 20 °C)

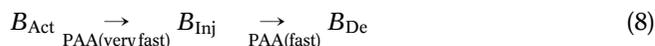
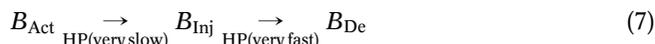
Disinfectant	Percent inactivation	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Reaction time (min)	Dose; D <sub>99.9</sub> (mg min L <sup>-1</sup> )	Reference
HP	99.9%	160	150	24.000	Labas et al. (2009) <sup>a</sup>
PAA alone	99.9%	5	4.5	22.5	This work
PAA commercial mix	99.9%	5	1.6	8.16	This work

<sup>a</sup>From Labas et al. (2009).

### Potentiated, synergetic effect of HP

From the dose results presented in Table 2, it can be concluded that the efficiency of HP is much lower than that of PAA acting alone. Moreover, a potentiating synergistic effect when working with the commercial mixture, having both PAA and HP, can be surely inferred. From the results presented in Figure 2, it should be noted that this enhancement happens only after the PAA has initiated the attack against the cell, indicating that the protecting systems that existed before have been removed and only then can HP participate actively in the rapid inactivation reaction.

Considering the above reasoning, as a first approximation to the inactivation reaction modeling with the PAA commercial mixture, the following scheme incorporating the bacteria attack in two stages can be proposed:



Here,  $B_{Act}$  represents an active bacteria and  $B_{Inj}$  and  $B_{De}$  portrait injured bacteria and dead bacteria respectively. In this process, injured bacteria have suffered a certain level of damage, but they are not lysate. So, active bacteria plus injured bacteria are considered as viable bacteria.

When HP is used alone (reaction (1)), the inactivation rate is slow, since the first stage (from active bacteria to damaged bacteria) is the controlling step. In the case of the mixture of PAA having HP inhibited (reaction (8)), the reaction is much faster and the controlling step is the second (from bacteria damaged to dead bacteria). This can be explained because it is known that some microorganisms may be protected against HP by their catalase enzymatic activity. This enzyme does not act against PAA; in fact, this compound can also inactivate or inhibit catalase activity (Malchesky 1993; Wagner et al. 2002; Galvan et al. 2010).

When working with the commercial mixture of PAA (having HP), the contribution of HP to the process becomes important, but only after a fast PAA attack has occurred, producing damage in vital parts of the cell metabolism, particularly inactivating catalase. Therefore, PAA rapidly attacks the bacteria in the first stage, facilitating the subsequent attack of the damaged bacteria by HP. In a second stage, both PAA and HP, acting together, produce the very fast death of the bacteria, with a notable increase

in the rate of inactivation as compared with the one observed when PAA acts alone (potentiating synergism).

### CONCLUSIONS

Water disinfection employing a commercial mixture of PAA was studied. Experiments have demonstrated that there is a much greater inactivation efficiency of PAA (after inhibition of HP existing in the mixture) than that of HP alone.

The inactivation process with the commercial mixture of PAA (5 to 8 mg L<sup>-1</sup>) is 2.76 times faster than with PAA alone. It can be seen that the effect of the mixture is greater than the sum of the individual effects of the two isolated disinfectants. A potentiating synergetic effect of the existing HP in the commercial mixture was found.

A tentative interpretation for the formation of strong oxidant species, based on a chain reaction and a scheme of attack on bacteria in two stages, has been proposed to explain the observed results.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Universidad Nacional del Litoral (UNL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) for their financial support. Thanks are also given to Lic. Pablo D. Nieres for his valuable help in some experimental essays.

### REFERENCES

- Alasri, A., Roques, C., Michel, G., Cabassud, C. & Aptel, P. 1992 Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Canadian Journal Microbiology* **38** (7), 635–642.
- Bach, R. D., Ayala, P. Y. & Schlegel, H. B. 1996 A reassessment of the bond dissociation energies of peroxides: an ab initio study. *Journal American Chemical Society* **118** (50), 12758–12765.
- Baldry, M. G. C. 1983 The bactericidal, fungicidal, and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology* **54** (3), 417–423.
- Baldry, M. G. C. & French, M. S. 1989 Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Science and Technology* **21** (3), 203–206.
- Bianchini, L., Carlucci, L., Caretti, C., Lubello, C., Pinzino, C. & Piscitelli, M. 2002 An EPR study of wastewater disinfection by

- peracetic acid, hydrogen peroxide and UV. *Annali di Chimica* **92** (9), 783–793.
- Block, S. S. 1991 Peroxygen compounds. In: *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (S. S. Block, ed.). 4th edn, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 185–201.
- Caretti, C. & Lubello, C. 2003 Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study. *Water Res.* **37** (10), 2365–2371.
- Caretti, C., Lubello, C. & Gori, R. 2002 Comparison between PAA/UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV disinfection for wastewater reuse. *Water Supply* **2** (1), 205–212.
- Colgan, S. & Gehr, R. 2001 Disinfection. *Water Environmental Technology* **13** (11), 29–33.
- Denyer, S. P. & Maillard, J. Y. 2002 Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-negative bacteria. *Journal Applied Microbiology Symposium Supplement* **92** (1), 35–45.
- Galvan, J., Sanz, V. & de Marcos, S. 2010 Selective peracetic acid determination in the presence of hydrogen peroxide using a label free enzymatic method based on catalase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398** (5), 2127–2124.
- Imlay, J. A. & Linn, S. 1988 Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240** (4852), 640–642.
- Jung, Y., Park, J. Y., Ko, S. O. & Kim, Y. H. 2012 Stabilization of hydrogen peroxide using phthalic acid in the Fenton and Fenton-like oxidation. *Chemosphere* **90** (2), 812–819.
- Kitis, M. 2004 Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environmental International* **30** (1), 47–55.
- Labas, M. D., Zalazar, C. S., Brandi, R. J. & Cassano, A. E. 2008 Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochemical Engineering Journal* **38** (1), 78–87.
- Labas, M. D., Brandi, R. J., Zalazar, C. S. & Cassano, A. E. 2009 Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, A comparative study. *Photochemical Photobiology Sciences* **8** (5), 670–676.
- Lefevre, F., Audic, J. M. & Ferrand, F. 1992 Peracetic acid disinfection of secondary effluents discharged off coastal seawater. *Water Science Technology* **25** (12), 155–164.
- Li, B., Gutierrez, P. & Blought, N. 1997 Trace determination of hydroxyl radical in biological systems. *Analytical Chemistry* **69** (21), 4295–4302.
- Malchesky, P. S. 1993 Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. *Artificial Organs* **17** (3), 147–152.
- McDonell, G. & Russell, D. 1999 Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiological Review* **12** (1), 147–179.
- Nieto-Juarez, J., Pierzchala, 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.
- Nieuwenhuijsen, M. J., Toledano, M. B. & Elliott, P. 2000 Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for exposure assessment in epidemiologic studies. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **10** (6), 586–599.
- Rokhina, E. V., Makarova, K., Golovina, E. A., Van As, H. & Virkutyte, J. 2010 Free radical reaction pathway thermochemistry of peracetic acid homolysis, and its application for phenol degradation: spectroscopic study and quantum chemistry calculations. *Environmental Science & Technology* **44** (17), 6815–6821.
- Rossi, S., Antonelli, M., Mezzanote, V. & Nurizzo, C. 2007 Peracetic acid disinfection: a feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environmental Research* **79** (4), 341–350.
- Wagner, M., Brumelis, D. & Gehr, R. 2002 Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. *Water Environmental Research* **74** (1), 33–50.

First received 30 June 2013; accepted in revised form 15 October 2013. Available online 29 October 2013

## CHAPTER 15

### Water disinfection with UVC and/or chemical inactivation. Mechanistic differences, implications and consequences

Marina Flores, Rodolfo Brandi, Alberto Cassano & Marisol Labas

#### 15.1 INTRODUCTION

Human society requires water for drinking, sanitation, cleaning, production of food and energy, and support of commercial and industrial activities.

Water in nature can contain a variety of contaminants such as minerals, salts, heavy metals, organic compounds, radioactive residues and living materials, for example parasites, fungi, and bacteria (US EPA, 2003). In rural and urban areas of low-income countries, millions of the most vulnerable people lack access to improved water, sanitation and hygiene (WASH) services. Unsafe water from all sources contributes significantly to the global burden of disease, principally through the waterborne transmission of gastrointestinal infections such as cholera, typhoid, hepatitis, and a wide range of agents that cause diarrhea and even death. Thus, cheap and effective water treatment systems that can be used at different scales, from single-point water sources to small-community water supplies, can make a valuable contribution to reducing the burden of disease by improving access to safe water (Ahmed *et al.*, 2011).

Microbiological contamination is a widespread problem and water is one of the most important vehicles for disseminating this type of pollution, contributing to the dispersion of bacteria, yeasts, fungi, spores, etc. Part of this contamination is the product of an uncontrolled discharge of biological wastes or the usage of domestic sewage systems without the corresponding treatment.

Typically, these problems are very often solved with chlorine (or its derivatives) disinfection, an old, low cost water treatment technology that is very efficient and has an extensive use. Alongside these advantages, it is well-known the existence of an important drawback resulting from the toxicity of some of the chlorine disinfection by-products (DBPs) produced by the interaction of chlorine and chlorine derivatives with organic substances either naturally existing in water, or resulting from improperly treated industrial or sanitary wastes (McDonnel and Russell, 1999). Some of these DBPs have been already included in the existing lists of substances having mutagenic or carcinogenic properties.

During the last years, organizations of different origin have insisted in the need for a gradual substitution of chlorine for water disinfection and requested for more research efforts aimed at developing efficient alternatives having reasonable costs (Ahmed *et al.*, 2010). Global reduction of chemical deposition into the environment is necessary.

Addressing these problems calls out for a tremendous amount of research to be conducted to identify robust new methods of purifying water at lower cost and with less energy, while at the same time minimizing the use of chemicals and impact on the environment.

In the latest advances in water purification and disinfection, mainly in the oxidation of toxic organic compounds, persistent and cumulative, are used the new technologies of advanced oxidation processes (AOPs), which are methods that involved chemical or photochemical generation and use of species transitional powerful as the hydroxyl radical (OH•).

This work contains a comprehensive, albeit reduced, report on some of the processes in use, the kinetic modeling that accompany several of them and the theories behind those proposals, especially when they have been developed by us, in relation to technologies for water disinfection.

Five disinfection methods were compared: (i) UV disinfection, (ii) hydrogen peroxide disinfection, (iii) peracetic acid disinfection (iv) peracetic acid + UV disinfection and (v) Hydrogen peroxide + UV disinfection. The main target of the study was trying to understand and interpret the differences that exist between the different procedures. In addition, we were searching for quantitative information in order to get an idea, as approximate as possible, about operating conditions and final results, with the aim of being able to distinguish among them, which might be the most efficient, economical and environmentally friendly method.

## 15.2 DISINFECTION

Disinfection is the process used to reduce the number of pathogenic microbes in the water (US EPA, 2003).

The most common and widespread health risk associated with drinking water is contamination, either directly or indirectly, by human or animal excreta and the microorganisms contained in feces. Drinking such contaminated water or using it in food preparation may cause new cases of infection. Pathogenic (disease-causing) organisms of concern include bacteria, viruses and protozoa.

The disinfection process has been routinely carried out since the dawn of the 20th century to eradicate and inactivate the pathogens from water used for drinking purpose. Disinfectants in addition to removing pathogens from drinking water, serve as oxidants in water treatment. They are also used for (i) removing taste and color; (ii) oxidizing iron and manganese; (iii) improving coagulation and filtration efficiency; (iv) preventing algal growth in sedimentation basins and filters, and (v) preventing biological regrowth in the water distribution system (US EPA, 1989).

Disinfection may be chemical, physical or a combination of both. Many disinfectants are used alone or in combinations (e.g. hydrogen peroxide and peracetic acid) in the health-care setting. These include alcohols, chlorine and chlorine compounds, formaldehyde, glutaraldehyde, ortho-phthalaldehyde, hydrogen peroxide, iodophors, peracetic acid, phenolics, and quaternary ammonium compounds. A viable alternative could be the use of chemical agents plus UV radiation to avoid revival of microorganisms. Disinfection kinetic models are the basis for assessing the disinfection performance and the design of contactor systems (Trussell and Chao, 1977). Over the years, a number of kinetic models have been proposed for the formulation of disinfection design criteria.

Model adequacy is dependent upon the robustness of the underlying inactivation rate law. If the model accounts for the disappearance, the most cited are: Chick (1908); Watson (1909); Gard (1957); Selleck *et al.* (1978); Hom (1972), Hass (1999); Severin *et al.* (1983) among others.

A summary of some water disinfection processes with kinetic modeling and used devices that have been developed by us (case studies) in Table 15.1.

All these experiments were conducted with pure water. In practical cases, usually the water will have impurities. Both organic residues as well as inorganic salts affect the efficiency of the process, either because they consume the oxidizing agent (when applicable) or because according to their size, they can help bacteria to be concealed behind these substances affecting the capacity of penetration of radiation when this treatment is applied. In any practical application, these considerations will have to be born in mind.

## 15.3 UV DISINFECTION

UV disinfection is using the ultraviolet light with appropriate wavelengths to penetrate the cells of microorganisms and destroying the molecular structure of DNA (deoxyribonucleic acid) or RNA (ribonucleic acid). It results in growing cell death and (or) regenerative cell death. Thereby, the microorganism cannot reproduce (Smith, 2011). UV disinfection is a physical method. It does not add any substance to the water, and operates without any side effects. It is better than chlorination

Table 15.1. Summary of cases in study.

Disinfection process	Microorganism model	Reactor	Kinetic model/mechanism approach
UVC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Well stirrer batch annular reactor(*)	Modified Severin model (proposed by Labas <i>et al.</i> , 2009).
Hydrogen peroxide	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Well stirrer batch annular reactor(*)	Series parallel pseudo-chemical steps (proposed by Flores <i>et al.</i> , 2012).
Peracetic acid	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Well stirrer batch annular reactor(*)	An extended series parallel pseudo-chemical steps (described in this work).
UV/Hydrogen peroxide	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Well stirrer batch annular reactor(*)	Modified Severin model (proposed by Labas <i>et al.</i> , 2009).
UV/Peracetic acid	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Well stirrer batch annular reactor(*)	Mechanistic approach (described in this work).

(\*) In all experiments, a well-stirred batch annular reactor having a total reaction volume of 2000 cm<sup>3</sup> was employed. The internal radius is  $r_i = 3.7$  cm and the external one is  $r_o = 7.5$  cm. Stirring was achieved with a custom made, strong, eccentrically operated, orbital shaking device. A cooling jacket connected to a thermostatic bath (Haake) surrounds the reactor to keep the reacting system at a constant temperature of 20°C. See also Figure 15.1.

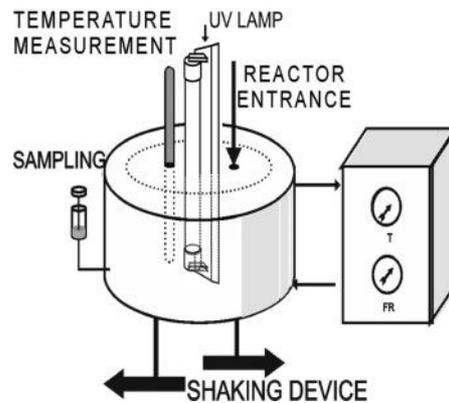


Figure 15.1. Experimental reactor. The lamp shown in the figure was used only in those experiments that required UVC radiation.

about in that aspect. It is usually combined with other substances, for example: UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + O<sub>3</sub>, UV + TiO<sub>2</sub>, in order to obtain better disinfection results (US EPA, 2006). Among the advantages of the use of UV disinfection of water can be mentioned:

- No addition of chemicals.
- Neither pH nor temperature-dependent.
- Specific inactivation mechanism.
- Effective against parasites

### 15.3.1 The principle of UV disinfection

According to Bolton and Cotton (2008), the mechanism of UV disinfection depends on the absorption of radiation in proteins and nucleic acids (RNA and DNA) of a given microorganism.

256 M. Flores et al.

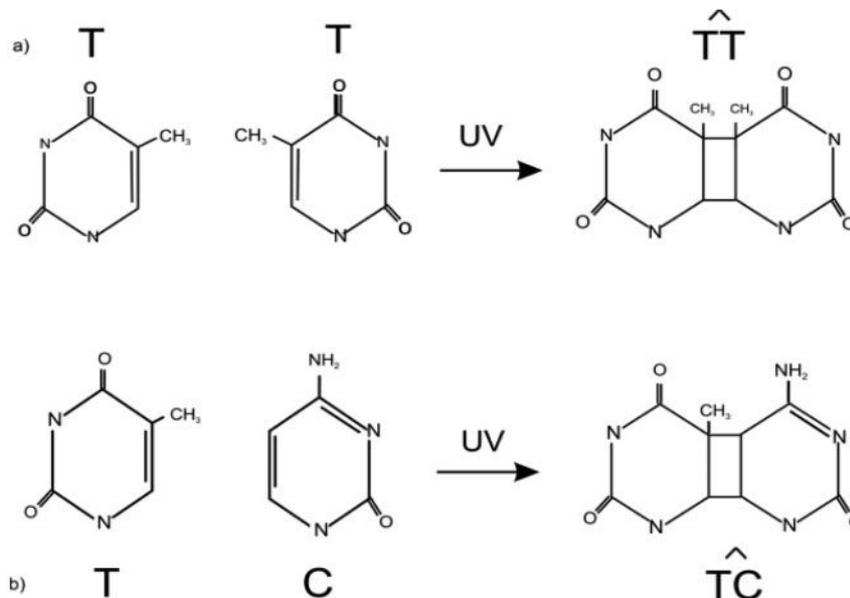


Figure 15.2. DNA damage UV-induced. (a) thymine-thymine cyclobutane pyrimide dimer and (b) thymine-cytosine dimer. Where T: thymine and C: cytosine.

The absorption of large UV doses of the proteins present in the cell membranes leads to rupture of these membranes and, consequently, to cell death. In contrast, absorption of lower UV doses of the DNA may disrupt the ability of the microorganism to reproduce, preventing ulterior infection of the medium.

The effective UV wavelength range can be divided into four different bands: UVA (400–315 nm), UVB (315–280 nm), UVC (280–200 nm) and vacuum ultraviolet light (200–100 nm). UVB and UVC light are always used for the disinfection of drinking water treatment, since they have higher germicidal properties (Harm, 1980). However, the lamp market has been moving slowly toward sources of radiation usually known as germicidal lamps with preponderant almost monochromatic radiation in the UVC ( $\lambda = 253.7$ ).

Different forms of DNA lesion have been found to result from UVC-induced damage: some molecules present in the DNA, such as purines and pyrimidines, absorb strong ultraviolet radiation (maximum at 254 nm) and undergo chemical changes, such as dimers and hydrates. The two major UV-induced DNA lesions are cyclobutane-pyrimidine dimers, CPDs, (see also Fig. 15.2) and Dewar valence isomers (Häder and Sinha, 2005). The dimerization has been considered the main cause of mutagenic effects resulting from UV radiation.

#### 15.3.1.1 Repair mechanisms

Many organisms have developed active and passive preventive measures to minimize or repair phototoxic DNA damage and can be repaired following UV disinfection by light-dependent (photoreactivation) and light-independent (dark repair) mechanisms found in many organisms, such as fecal coliforms, which include *Escherichia coli*. The repair mechanisms are:

**Photoreactivation:** The photoreactivation process is catalyzed by enzymes known as photolyases, which directly reverse DNA damage, and consequently recovers microbial viability (Weber, 2005).

**Recombination repair:** recombination repair fills the daughter strand gap by moving a complementary strand from homologous region of DNA to the site opposite the damage (Häder and Sinha, 2005).

*Excision repair*: Dark repair pathway function by replacing the damaged DNA with a new, undamaged nucleotides based on the information on the complementary DNA strand (Britt, 1996; Hader and Sinha, 2005).

### 15.3.2 Case study: UV disinfection in clear water conditions

This section work presents a detailed kinetic study of the rate of removal of a model bacteria (*Escherichia coli*) employing UV radiation (253.7 nm) in a laboratory reactor where all the significant operating variables were carefully measured and controlled. A significant modification of the Series-Event Model was used to interpret the experimental data. The developed model is based on a rather complex dependence with respect to the *Escherichia coli* concentration and to the radiation that is effectively absorbed by the bacteria which was precisely quantified. The concentration evolution was analyzed employing the plate count method with Petrifilm<sup>(TM)</sup> specific plates.

#### 15.3.2.1 Experimental procedure

*Escherichia coli* strain ATCC 8739 was used throughout this work. The purity of the strain was verified by conventional methods (APHA, 1984; Marshall, 1992).

The culture was grown in a complex medium (Nutrient broth) that had beef extract as the main component. Therefore, the broth composition was: tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>, beef extract 5 g L<sup>-1</sup> and NaCl: 5 g L<sup>-1</sup>.

The working solution was prepared from a culture that are in the beginning of the stationary phase and afterwards was brought to a 1/1000 dilution with physiological saline to simulate clear, transparent waters. The specific absorption coefficients of the two culture media and *E. coli* were measured in a UV-Vis Lambda 40 Perkin-Elmer Spectrophotometer at 253.7 nm. An atomic spectroscopy analysis (Perkin-Elmer-5000 AAnalyst) detected traces of iron and copper ions in the growing culture (Cu = 7.7 μg g<sup>-1</sup> and Fe = 43 μg g<sup>-1</sup>).

Initial *E. coli* concentrations ranged from 10<sup>4</sup> to 10<sup>6</sup> CFU cm<sup>-3</sup> (CFU = colony forming unit).

Notice that, in this case, the system was irradiated, in distinct experiments, with two tubular lamps of different power, placed on the centerline of the annular space and separate from the polluted water by a concentric quartz tube.

#### 15.3.2.2 Experimental runs

The lamps were turned on, allowing 30 minutes for stabilizing their operation. The sample at  $t = 0$  was taken at the same time that the lamp shutters were taken off. Afterwards, samples were taken at different time intervals for several measurements.

The exact value of the initial concentration of bacteria was measured for each experiment. Runs were duplicated and samples subjected to triplicate determinations. The initial pH was 7 and remained practically constant during all the runs. It is necessary to emphasize that none of these experiments was done in the presence of any oxidizing agent as for example, hydrogen peroxide, in order to make sure that only the effect of the ultraviolet radiation was observed.

The CFU counting method was made with a sterile peptone water solution. Dilutions of the samples to obtain the optimum concentration for the CFU counting were used. Each sample was subjected to the following measurements: absorbance a 253.7 nm and CFU counting using specific Pretrifilm<sup>(TM)</sup> plates (3 M Microbiology Products) for *E. coli* and coliform bacteria. The plates were incubated during 24 hours at 37°C.

After one experimental run was completed, the UV lamp was turned on for 30 minutes. Afterwards, the reactor was washed with distilled water. This operation was repeated three times. Then the reactor remained kept with a mixture of distilled water and alcohol until the next experimental run. Before starting a new experiment, the reactor was washed again twice with distilled water to remove any residual alcohol. Before beginning with the usual protocol corresponding to the characteristics of every experiment, the UVC radiation source was turned on again for a period

258 *M. Flores et al.*

of an hour with the reactor completely empty. This procedure was applied in the four different cases described in this work.

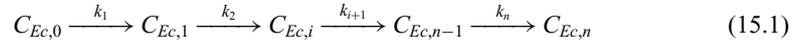
### 15.3.2.3 Kinetic model

The developed model is a modification of the Series-Event one originally proposed by Severin (1982). The model is thought of as a series of consecutive “damaging reactions” each one of them producing a partial alteration on the structure of the different chemical blocks that construct the DNA and RNA sequence of the bacteria. However, it exist a threshold limit. Organisms which have reached an event level greater than the threshold limit are inactivated and those which are below this level survive. For this reason, part of the information needed for the model is to know this threshold limit.

The original kinetic model was formulated in terms of mixed second order kinetics with respect to the local light intensity and the concentration of microorganisms existing in each event level. However, in the experiments performed in a batch reactor, assumption was made that the light intensity was uniform and constant and the hypothesis was incorporated in the kinetic model (uniform intensity).

Experiments were also carried out in a completely mixed, annular, flow-through reactor. This assumption was fully removed in our work.

After a damaging event, it is considered that a new species is formed. Then, the process can be presented as a series of  $n$  reactions according to (Labas *et al.*, 2009):



with  $i = 0, 1, 2, \dots, i, \dots, n$  and  $k_1 = k_2 = k_n = k$

It should be noticed that the initial concentration of bacteria is  $C_{Ec}^0$  whereas  $C_{Ec,0}$  is the concentration of those that have not received any damage. Only at  $t = 0$ ,  $C_{Ec}^0 = C_{Ec,0}$ . At any other time  $C_{Ec,i} < C_{Ec}^0$ .  $C_{Ec,i}$  is the concentration of a given state of damage (state  $i$ ) in the microorganism that has reached the level of injured “ $i$ ” “and “ $n$ ” is the threshold limit” equal to the number of events needed to reach inactivation thus  $n$  represents inactivated “species” that have suffered an usually quasi-irreversible damage an can be counted as dead bacteria. The total number of existing “species” is  $n + 1$  in order to account for the species that have not yet received any injury.

All bacteria, either the ones that have no damage or the others that have received some level of damage, but have not reached the threshold limit “ $n$ ”, are survival bacteria  $C_{Ec}$ . Because the number of inactivated or death bacteria can be obtained from the difference between the initial concentration  $C_{Ec}^0$  and the concentration of survival bacteria  $C_{Ec}$

$$C_{Ec,dead} = C_{Ec}^0 - C_{Ec} = C_{Ec}^0 - \sum_{i=0}^{n-1} C_{Ec,i} \quad (15.2)$$

It is possible to write the equivalent to a mass balance (bacteria inventory) for each species:

For  $i = 0$ :

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = -k_{i+1}(C_{Ec,i})^\delta ((\alpha_\lambda E_{\lambda,o})^\gamma) \quad (15.3)$$

For  $i = 1, 2, \dots, n - 1$ :

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = k_i(C_{Ec,i-1})^\delta ((\alpha_\lambda E_{\lambda,o})^\gamma) - k_{i+1}(C_{Ec,i})^\delta ((\alpha_\lambda E_{\lambda,o})^\gamma) \quad (15.4)$$

For  $i = n$ :

$$\frac{dC_{Ec,i}}{dt} = k_i(C_{Ec,i-1})^\delta ((\alpha_\lambda E_{\lambda,o})^\gamma) \quad (15.5)$$

Equations (15.3) to (15.5) need the value of the fluence rate as a function of position and time. From the definition of the fluence rate:

$$E_{\lambda,o}(\underline{x}, t) = \int_{\Omega} L_{\lambda,\Omega}(\underline{x}, t) d\Omega \quad (15.6)$$

Thus, it can be obtained if the value of the radiance (radiation power) is known. From the radiative transfer equation for homogeneous media:

$$\frac{dL_{\lambda,\Omega}(s,t)}{ds} + \alpha_{\lambda}(s,t)L_{\lambda,\Omega}(s,t) = 0 \quad (15.7)$$

where  $L_{\lambda,\Omega}$  is the spectral radiance of wavelength  $\lambda$  and direction  $\underline{\Omega}$ .

With the boundary condition:

$$L_{\lambda,\Omega}(s_R,t) = L_{\lambda,\Omega}^0(t) \quad (15.8)$$

Equation (15.7) can be formally integrated and substituted into Equation (15.6). For convenience, the solid angle may be written in terms of a spherical coordinate system, resulting in the following result:

$$E_{\lambda,o}(s,t) = \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \sin \theta (L_{\lambda}^0(\theta, \phi, t)) \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s,t) ds \right] \quad (15.9)$$

To calculate the radiation field inside the reactor, an emission model for the lamp is needed. With this purpose, the three dimensional source with volumetric emission model proposed by Cassano *et al.* (1995) will be applied. As shown in the Appendix for integrating Equation (15.9) the following boundary conditions apply:

For the value of:  $L^0(\theta, \phi)$

$$L^0(\theta,\phi) = \Upsilon_w \left( \frac{P_{\lambda,L}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \right) \frac{2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5}}{\sin \theta} \quad (15.10)$$

$\Upsilon_w$  is an average value of the reactor wall transmittance. (Notice that the subscript  $\lambda$  has been dropped because this work is carried out with monochromatic radiation).

And for the limiting angles are:

$$\theta_1(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{(L_L - z)} \right\} \quad (15.11)$$

$$\theta_2(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{-z} \right\} \quad (15.12)$$

$$-\phi_1 = \phi_2 = \cos^{-1} \left[ \frac{(r^2 - r_L^2)^{1/2}}{r} \right] \quad (15.13)$$

The final equation that can be solved with the help of numerical integration is:

$$E_o(r,z,t) = \frac{(\Upsilon_w P_{\lambda,L})(4\pi^2 r_L^2 L_L) \sin \theta}{2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5}} \left\{ \int_{\phi_1}^{\phi_2} (d\phi) \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta 2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s,t) ds \right] \right\} \quad (15.14)$$

However, the value of  $P_{\lambda,L}$  is not always well known (it is provided by the lamp manufacturer) and invariably changes along the time of operation of the useful life of the radiation source. When the fluence rate at the reactor wall can be measured with actinometer methods (Murov *et al.*, 1993; Zalazar *et al.*, 2005), it is convenient to use an alternative form of Equation (15.14). This is particularly always possible in laboratory research work.

$$E_{(0|W)} = f \left[ \begin{array}{l} \text{lamp reactor characteristics} \\ \text{System geometry} \end{array} \right] \quad (15.15)$$

with  $E_{(0|W)}$  being the fluence rate at the reactor wall.

260 *M. Flores et al.*

Therefore, with the help of the elaborate algebraic artifice it is possible to transform Equation (15.14) into the following expression:

$$E_o(r, z, t) = \frac{\langle E_o|_W \rangle}{\psi} \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta 2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s, t) ds \right] \quad (15.16)$$

where  $\psi$  is a geometric factor that always should be computed because  $L_R$ ,  $r_L$  and  $r_i$  are known:

$$\psi = \frac{1}{L_R} \int_0^{L_R} dz \int_{\phi_1(r_i)}^{\phi_2(r_i)} d\phi \int_{\theta_1(\phi, r_i, z)}^{\theta_2(\phi, r_i, z)} d\theta 2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5} \quad (15.17)$$

Notice the difference between Equations (15.14) and (15.16); in the second,  $r_i$  is a constant.  $E_o|_W/\psi$  gives the boundary condition just before the absorption process produced by the reacting medium commences at  $r = r_i$ .  $\psi$  accounts for the geometrical relationship that expresses the relative location of the lamp (with all its dimensions) and the inner wall of the reactor at  $r = r_i$ . It is clear that, with the exception of the wall compound transmission coefficient given by  $\Upsilon_W$ , from the lamp until the point at  $r = r_i$ , the medium is transparent.  $E_o|_W$  is the value that can be obtained with potassium ferrioxalate actinometry (Murov *et al.*, 1993; Zalazar *et al.*, 2005).

Finally, since for a reactor of constant cross sectional area, the volume average is reduced to an integral over the reactor length, the volume average of  $E_o(r, z, t)$  must be calculated according to:

$$\langle E_o(r, z, t) \rangle = \frac{1}{L_R} \int_0^{L_R} E_o(r, z, t) dz \quad (15.18)$$

The final result to be used in Equations (15.3) to (15.5) is:

$$\langle E_o^y \rangle = \frac{2}{(r_o^2 - r_i^2)L_R} \left( \frac{E_o|_W}{\psi} \right)^y \int_0^{L_R} dz \int_{r_i}^{r_o} r dr \left\{ \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta 2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{0.5} \exp \left[ - \int_{s_R}^{s_L} \alpha(s, t) ds \right] \right\}^y \quad (15.19)$$

The linear napierian radiation absorption coefficient of the system ( $\alpha$ ) is defined as:

$$\alpha = \alpha_{Ec} + \alpha_c \quad \text{with } \alpha_{Ec} = \sum \kappa_{Ec,i} C_{Ec,i} \quad (15.20)$$

and

$$\alpha_c = \frac{1}{P_c} \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \alpha_\lambda P_\lambda d\lambda \quad (15.21)$$

where  $\hat{\kappa} [=] \text{cm}^2(\text{CFU})^{-1}$  and  $C_{Ec,i} [=] \text{CFU cm}^{-3}$ .

In order to facilitated the understanding of the development of the limits of integration of Equation (15.19), in the appendix included at the end of the main text, it has been added a figure to explain clearly the meaning of all the variables used to obtain Equations (15.10) to (15.13).

#### 15.3.2.4 *Experimental results*

Disinfection with UV radiation has been effective, achieving high rates of inactivation at short contact times (Fig. 15.3) employed worldwide for decades. The primary advantage of UV disinfection is to control microorganisms without chemicals and it has numerous benefits for municipal, industrial and commercial customers.

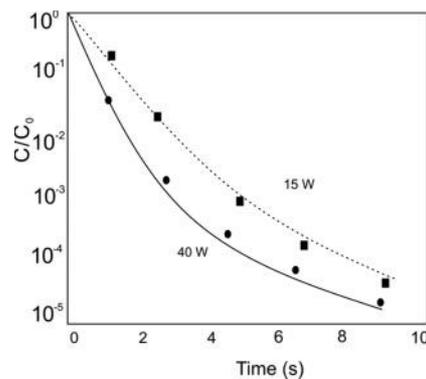


Figure 15.3. Results employing UVC radiation, with different lamps. Dotted lines and solid lines are results from the model. (Reproduced from Photochemical & Photobiological Sciences; Reference: Labas *et al.*, 2009. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: [www.res.org/pbs](http://www.res.org/pbs)).

#### 15.4 HYDROGEN PEROXIDE

The antimicrobial and/or antiseptic properties of hydrogen peroxide have been known for many years because of its efficacy and reasonable manipulation safety (Dalrymple *et al.*, 2010; Labas *et al.*, 2006). It is effective against a wide spectrum of bacteria, yeast, molds, viruses and spore forming organism (Cords *et al.*, 2005; Labas *et al.*, 2008). The cytotoxic effect exerted by hydrogen peroxide on microorganisms depends on the cell type used, its physiological state, length of exposure, environmental condition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration used and the cell culture media employed (Labas *et al.*, 2008; Raffellini *et al.*, 2010). According to its concentration hydrogen peroxide can act as bacteriostatic or as bactericide. The cytotoxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *Escherichia coli* have been extensively studied (Labas *et al.*, 2005; 2008; Raffellini *et al.*, 2010).

For water disinfection purposes, the non-persistent characteristic of hydrogen peroxide becomes a disadvantage to maintain the water quality in the distribution system. However, its use is widely spread because it is relatively inexpensive, is easily removed when desired and is unlikely to be health hazardous if used properly.

##### 15.4.1 The principle of disinfection using hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide is disinfectant with recognized antimicrobial properties that can be used because is effective and easy to manipulate. In addition, the chemical mechanisms that promote the hydrogen peroxide decomposition can be inferred but infrequently established with indisputable certainty. However it is known that is due to its ability to generate strongly oxidant chemical species like the hydroxyl radical OH•. This radical species reacts with almost all biological molecules. The attack by the OH• radical, in the presence of oxygen, initiates a complex cascade of oxidative reactions leading to decomposition of the all the enzymes and organic compounds that result from the rupture of the cell membrane.

##### 15.4.2 Case study: hydrogen peroxide disinfection in clear water conditions

This section is an attempt to model the disinfection process based on a chemical interpretation of the possible mechanism of cell damage. The key point is to search for the most accepted assumptions concerning the possible place where the action of reactive hydroxyl radical can take place. According to literature, (Dalrymple, 2010; Maillar, 2002; Mc Donnell and Russell, 1999) in the case of bacteria three sites of the cell could be the targets for OH• invasion: (i)

262 *M. Flores et al.*

The peptidoglycan layer, (ii) the lipopolysaccharide layer (found only in Gram-negative bacteria) and (iii) the phospholipid bilayer. In this study *Escherichia coli* was the chose bacteria and consequently the three layers will be present.

After the attack to the membrane, the oxidation of the products resulting from the lysis of the bacteria, was modeled as a series of chemical events, which leads to its dead or to an irreversible damage. The pathway of the kinetic model includes: active ( $B_{AC}$ ), inactive ( $B_{IN}$ ) and death ( $B_{DE}$ ) population of bacteria, as well as several additional chemical products of the lysis with the generic denomination of  $LY_{P1}, LY_{P2}, \dots, LY_{Pn}$ .

The kinetic model developed in this work was successfully validated with experimental data.

#### 15.4.2.1 *Experimental procedure*

The experimental procedure, the culture media preparation and handling and conditioning of the bacterium has been detailed in 15.3.2.1.

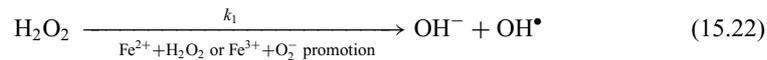
The following chemical were used in this experience: hydrogen peroxide (Merck, pro analysis 30%), Catalase (from *Aspergillus niger*, Biochemika), Ammonium molybdate (Cicarelli, pro-analysis), Potassium iodide (Cicarelli, pro-analysis), Potassium acid phthalate (Cicarelli, 95% pro-analysis), Physiological saline solution (Roux-Ocefa), Nutrient broth (Biokar Diagnostics), Sodium hydroxide (Cicarelli, pro-analysis) and Peptone water (Biokar Diagnostic).

To quench the hydrogen peroxide action during the time interval between sampling and spread plating, a known fraction of the sample was mixed with the required amount of catalase solution. Control experiments were conducted to ensure that the employed concentrations of catalase solutions did not affect bacterial concentrations. After spreading the plates with the appropriate volume of sample they were incubated for 24 h at 37°C.

#### 15.4.2.2 *Kinetic model*

This development is an attempt to model the disinfection process based on a chemical interpretation of the possible mechanism of cell damage.

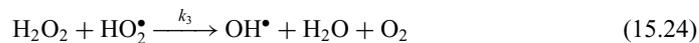
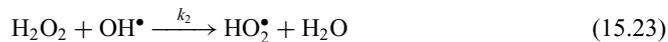
In modeling the intrinsic reaction kinetics of disinfection with hydrogen peroxide one of the major difficulties is to include the iron or iron-superoxide participation in the mechanism to produce hydroxyl radicals (Kehrer, 2000; Sies, 1991); i.e. the Fenton-like or Haber-Weis-like reaction:



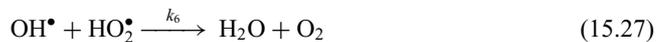
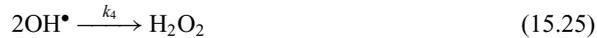
Note that, when the reaction is written as above, without including specifically the  $\text{Fe}^{3+}$  or the  $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-$  promotion,  $k_1$  is not known.

The formation of hydroxyl radicals is proposed according to the following path:

Propagation:



Termination:



##### 15.4.2.2.1 *Membrane disruption*

The process that ends up with the membrane breakdown may be treated by resorting to a pseudo homogeneous interpretation of the intricate network of superficial reactions that leads to the rupture of the protective envelope. Let  $\text{HS}_{\text{CW|B}}$  represent a hypothetical species of the components of the cell wall of the active bacteria whose concentration can be expressed in units of  $\text{mol cm}^{-2}$

and that reacts with the OH• radical. This composition is, on the average, the same one for every specific bacterium species. Then,



At this point, it is possible to think of  $SSA|_{\text{BAC}}$  as the specific superficial area per unit volume of one cell (in units of  $\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}$ ),  $V|_{\text{BAC}}$  as the volume of one cell per CFU (in units of  $\text{cm}^3 \text{CFU}^{-1}$ ) and  $[\text{B}_{\text{AC}}]$  as the whole instantaneous concentration of the active bacteria (in units of  $\text{CFU cm}^{-3}$  of reacting medium). The concentration of hypothetical species per unit volume of the fluid may be calculated from the abovementioned superficial concentration of this species as:

$$\underbrace{[\text{HS}_{\text{CW}|_{\text{BAC}}]}_{\substack{\text{Superficial concentration of} \\ \text{hypothetical species} \\ \text{of one bacterium}}} \times \underbrace{SSA|_{\text{BAC}}}_{\substack{\text{Superficial area per unit} \\ \text{volume of bacterium}}} \times \underbrace{V|_{\text{BAC}}}_{\substack{\text{volume of} \\ \text{one CFU}}} \times \underbrace{[\text{B}_{\text{AC}}](t)}_{\substack{\text{Instantaneous concentration of} \\ \text{active bacteria per unit volume}}} \quad (15.29)$$

Instantaneous representation of the total volumetric concentration of hypothetical species of the active bacteria

Taking into account averaging values specific bacterium species,  $[\text{HS}_{\text{CW}|_{\text{BAC}}}]$  in the cell wall,  $SSA|_{\text{BAC}}$  and  $V|_{\text{BAC}}$  may be assumed almost constant. Then:

$$[\text{HS}_{\text{CW}|_{\text{BAC}}}] \times SSA|_{\text{BAC}} \times V|_{\text{BAC}} = \text{constant} \quad (15.30)$$

$$\underbrace{k_7}_{\substack{\text{Pseudo homogeneous} \\ \text{volumetric kinetic constant}}} = \underbrace{k_7^*}_{\substack{\text{Superficial} \\ \text{kinetic constant}}} \times [\text{HS}_{\text{CW}|_{\text{BAC}}}] \times SSA|_{\text{BAC}} \times V|_{\text{BAC}} \quad (15.31)$$

However, it is very unlikely that just one hydroxyl radical will produce a serious damage to the cell wall. Neither the number of moles of which OH• that are necessary to consider that the bacterium has been injured, nor the number of bacterium that form a CFU are known. It is always possible to conceive an oxidation yield as the ratio of injured CFU with respect to the spent hydroxyl radicals to produce this event:

$$k_7^\# = \frac{k_7}{Y_7}; \quad Y_7 = \frac{\text{Injured CFU}}{\text{OH}^\bullet \text{ spent in this event}} [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}}; \quad k_7^\# [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU s}} \quad (15.32)$$

In order to have the proper application of this yield as well as achieving unit's homogeneity it must be considered that:

$$R_{7,\text{OH}} = -k_7^*[\text{B}_{\text{AC}}][\text{OH}^\bullet] \quad (15.33)$$

With this pseudo homogeneous, biological reaction approach, step 15.28 can be finally expressed as:



In a similar way, the same procedure can be applied to the injured bacteria in the reaction with the OH• radicals according to:

$$\underbrace{k_8}_{\substack{\text{Pseudo homogeneous} \\ \text{volumetric kinetic constant}}} = \underbrace{k_8^*}_{\substack{\text{Superficial} \\ \text{kinetic constant}}} \times [\text{HS}_{\text{CW}|_{\text{BIN}}}] \times SSA|_{\text{BIN}} \times V|_{\text{BIN}} \quad (15.35)$$

$$k_8^\# = \frac{k_8}{Y_8}; \quad Y_8 = \frac{\text{Dead CFU}}{\text{OH}^\bullet \text{ spent in this event}} [=] \frac{\text{CFU}}{\text{mol}}; \quad k_8^\# [=] \frac{\text{cm}^3}{\text{CFU s}} \quad (15.36)$$

$$R_{8,\text{OH}} = -k_8^\#[\text{B}_{\text{IN}}][\text{OH}^\bullet] \quad (15.37)$$



This step leads to the rupture of the cellular wall and the death of the bacterium.

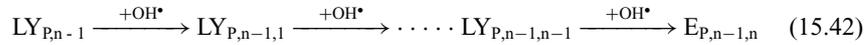
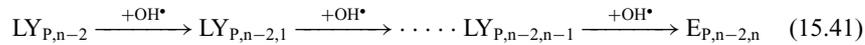
264 *M. Flores et al.*

*Lysis of dead bacteria*

The death of the bacterium implies that the cellular wall has been broken permitting the access of the oxidant to the intracellular components, rendering the lysate:



Once the anatomic morphology of the cell has been altered producing the lysate, the  $OH^\bullet$  can interact with its internal components in typical homogeneous reactions. From the chemical point of view the activity of the  $OH^\bullet$  radicals can be interpreted in terms of several parallel-series reactions with an undefined number of hypothetical components of the resulting lysis. In the model they are represented by  $LY_{P,1}, LY_{P,2}, \dots, LY_{P,n-1}, LY_{P,n}$  that correspond to important groups of compounds which, after ulterior oxidations will produce the end products of the disinfection process:



15.4.2.3 *Mathematical model final equations*

The final expression for the disappearance rate of active bacteria is:

$$R_{B_{AC}} = - \frac{\gamma_A [B_{AC}] [H_2O_2]}{[H_2O_2] + \gamma_0 [B_{AC}] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (15.44)$$

where:

$$\gamma_A = \left( \frac{k_1 k_7}{k_2} \right); \quad \gamma_0 = \frac{k_7^\#}{k_2}; \quad \gamma_1 = \frac{k_8^\#}{k_2}; \quad \gamma_2 = \frac{(k_9^\# + \alpha k_{10})}{k_2} \quad (15.45)$$

The final expression for the disappearance rate of injured bacteria is:

$$R_{B_{IN}} = \frac{[B_{AC}] [H_2O_2] \gamma_A - [B_{IN}] [H_2O_2] \gamma_{IN}}{[H_2O_2] + \gamma_0 [B_{AC}] + \gamma_1 [B_{IN}] + \gamma_2 [B_{DE}]} \quad (15.46)$$

where:

$$\gamma_{IN} = \left( \frac{k_1 k_8}{k_2} \right) \quad (15.47)$$

15.4.2.4 *Experimental results*

According to Figure 15.4, it can be noticed that the model reproduces the experimental results.

The model also provides good information about the way in which the inactivation reaction proceeds. It is possible to follow the changes in concentration of the active, injured and dead bacteria, it is shown in Figures 15.4a,b for two different concentrations of hydrogen peroxide. In the present context, it appears capable of accommodating biological recovery, as manifested by the shoulder which appears in many survival curves.

From these two figures, it can also be observed a consistent behavior. When lower concentrations of hydrogen peroxide are used (45 ppm) the survival of a major number of active and injured bacteria is seen, indicating that the oxidation is not sufficiently intense to overcome the resistance of the cell wall. Conversely, at higher concentrations, (185 ppm) the number of survival and undamaged bacteria gradually decreases and there is a breaking of the bacteria envelope in a shorter time. Then, very rapidly, it changes from the state of injured bacteria to one of irreversible death.

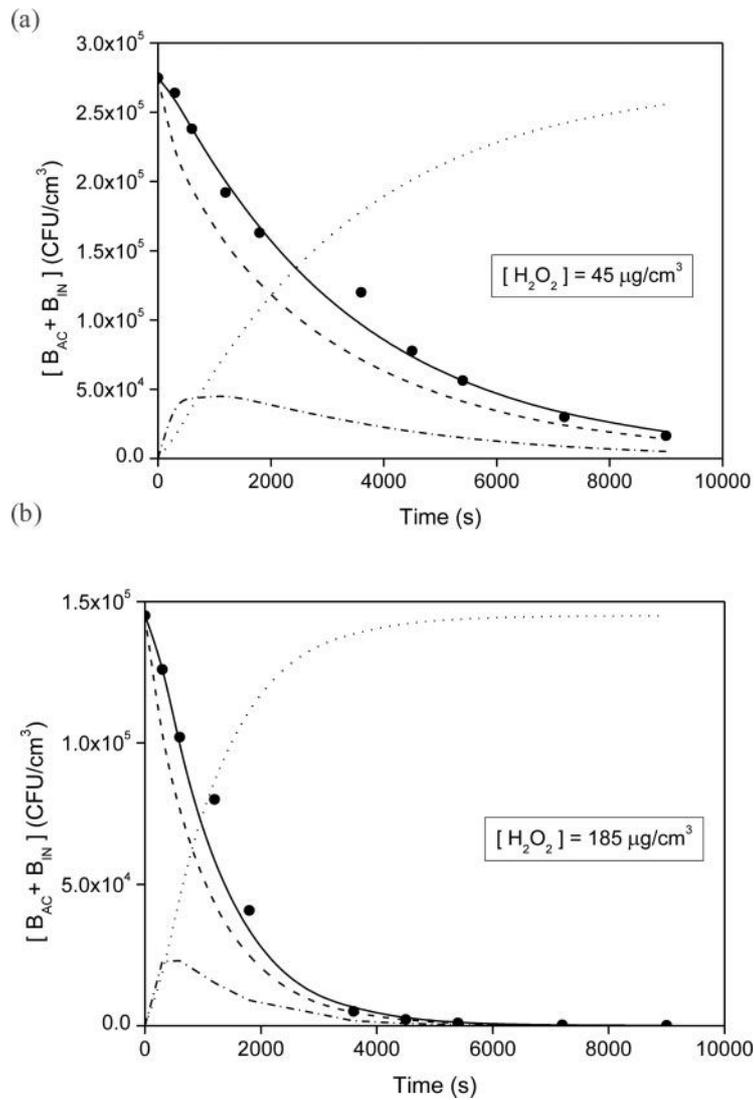
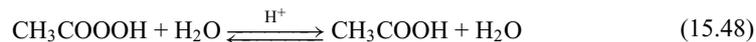


Figure 15.4. Graphical description of the concentration evolution of the principal species existing in the reacting medium as seen by the model. The plot follows changes in concentration of the active, injured and dead bacteria at (a)  $45 \mu\text{g/cm}^3$  and (b)  $185 \mu\text{g/cm}^3$  of concentration of  $H_2O_2$ . Experimental data: Solid line: culturable bacteria ( $B_{AC} + B_{IN}$ ); broken line: Active bacteria; broken and dotted line: Injured bacteria; dotted line: Dead bacteria. (Reproduced from Chemical Engineering Journal, Vol. 198–199/edition N° 1, Flores *et al.*; Pages 388–396; Reproduced with permission from Elsevier).

### 15.5 PERACETIC ACID

Peracetic acid (PAA) use increased in the recent years because of its ecologically beneficial properties (the reaction products are oxygen, water, and acetic acid) and its relative low cost. However, the most remarkable attributes of PAA are: the broad spectrum of activity even in the presence of heterogeneous organic matter, the absence of persistent toxic or mutagenic residual

byproducts, no quenching requisites, small dependence of pH, short contact time requirements and effectiveness for primary and secondary effluents. PAA is also characterized by its easy technical preparation. The equilibrium state of its commercial solution is shown in the following equation:



PAA is a strong oxidant and disinfectant. Its oxidation potential is larger than that of chlorine or chlorine dioxide. PAA is a more potent antimicrobial agent than hydrogen peroxide, being rapidly active at low concentrations against a wide spectrum of microorganisms (Baldry, 1983; Baldry and French, 1989b; Fraser *et al.*, 1984). Its demonstrated effectiveness against *V. cholera* suggested it should be a significant element in cholera control efforts. It is known that the PAA disinfection capabilities are due to its ability to generate strongly oxidant chemical species such as the  $\text{O}_2^-$  superoxide radical or its conjugated base  $\text{HO}_2^\bullet$ , and the hydroxyl radical  $\text{OH}^\bullet$ . The damaging effects of the bacteria cellular components seems to be produced by a particular phenomenon called oxidative stress, resulting from those reactive oxygen species known as ROS (Labas *et al.*, 2006).

#### 15.5.1 PAA mode of action

It is suggested that PAA disrupts the chemiosmotic function of the lipoprotein cytoplasmic membrane and transport through dislocation or rupture of cell walls (Baldry and Fraser, 1988; Leaper, 1984). Thus, it may be that it is equally effective against outer membrane lipoproteins, facilitating its action against Gram negative cells (Leaper, 1984). Its action as a protein denaturant may help to explain its characteristics as a sporicide and ovicide (Block, 1991). Furthermore, intracellular PAA may also oxidize essential enzymes; thus, vital biochemical pathways, active transport across membranes, and intracellular solute levels are impaired (Fraser *et al.*, 1984). It was demonstrated that PAA acts on the bases of the DNA molecule (Tutumi *et al.*, 1973). An important advantage of PAA is that it may inactivate catalase, an enzyme known to hinder free hydroxyl radicals (Block, 1991).

#### 15.5.2 Case study: water disinfection with peracetic acid in clear water conditions

This study was aimed at evaluating the disinfection efficiency of the PAA commercial solution (15%) with the usual indicator of fecal contamination, *Escherichia coli*. The disinfection aptitude of PAA was studied at different concentrations (1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6  $\text{mg L}^{-1}$ ) as well as various inactivation times. The reacting system used in all experiments was an annular, well-mixed batch reactor having a total volume of 2000  $\text{cm}^3$ . The feasibility of PAA for water efficient water disinfection has been verified in this work: a 99.99% reduction of *E. coli* CFU was achieved, with doses ranging from 1 to 6  $\text{mg L}^{-1}$  and 5 minutes of contact time. A kinetic disinfection mechanism is proposed to explain the obtained results.

##### 15.5.2.1 Experimental procedure

The experimental procedure, the culture media preparation and handling and conditioning of the bacterium has been detailed in 15.3.2.1.

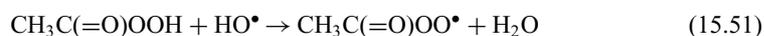
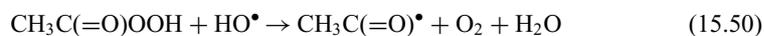
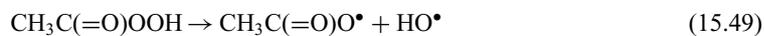
The following chemical were used: Peracetic acid (Quimica Agroindustrial Neo: PAA 15% v/v;  $\text{H}_2\text{O}_2$  20% v/v; acetic acid 25% v/v and water 40% v/v); Catalase (from *Aspergillum niger*, Biochemika); Potassium permanganate solution, 0.1 N (Cicarelli, pro-analysis); Sulfuric acid (Cicarelli, pro-analysis); Sodium thiosulfate (Cicarelli, pro-analysis); Physiological saline solution (Roux-Ocefa); N,N-diethyl-p-phenylene-diamine (DPD) (Hach), Nutrient broth (Biokar Diagnostics), Eosine Methylene Blue (EMB) Agar (Biokar Diagnostics) and Peptone water (Biokar Diagnostic).

To quench the peracetic acid and hydrogen peroxide action during the time interval between sampling and spread plating, a known fraction of the sample was mixed with the required amount

of sodium thiosulfate and catalase solution respectively. Control experiments were conducted to ensure that the employed concentrations of thiosulfate and catalase solutions did not affect bacteria concentrations. The plates were incubated, after spreading them with the appropriate volume of sample, for 24 h at 37°C in EMB plate.

15.5.2.2 *A proposed kinetics of peracetic acid decomposition*

Rokhina *et al.* (2010) developed a complete chain reaction mechanism that originated several radical species, which can oxidize different sites (targets) of the bacteria's cell membrane and its internal constituents. The reaction was applied to advanced oxidation processes (AOPs), such as phenol degradation with the assistance of MnO<sub>2</sub>, and the cycle was analyzed both theoretically and experimentally. The proposed scheme also resorted to previous reports that reinforced their proposal Heywood *et al.* (1961), El-Agamey *et al.* (2003), Shi and Li (2007) and Ciotti *et al.* (2008). Leaving aside the details that can be found in the original publication, the chain reaction pathway is described as follows:



Equation (15.53) is only important in oxygen saturated environments. It was found that Equation (15.49) is the rate controlling step. The authors claim that all the generated radical species are active contributors to the degradation mechanism but OH<sup>•</sup> and to some extent the H<sub>3</sub>C radicals, are the most significant ones. The reaction requires the presence of an eligible catalyst that should be of the types usually encountered in Fenton or Fenton-like reactions. In our reacting system employing AAS (Perkin-Elmer-5000 AAnalyst) we always found traces of cooper and iron species. Thus, this reaction could provide the necessary conditions for a fast attack to different components of the microbial cellular membrane. Additionally, at pH between 5 and 10 the following reaction is also possible (Koubet, 1964; Yuan *et al.*, 1997):



Equation (15.55) contributes to increase the concentration of oxidative radicals.

15.5.2.3 *Experimental results*

In Figure 15.5, it is shown that for concentrations larger than 5 ppm 99.9% disinfection is obtained in less than 2 minutes. It is interesting to note that just small concentrations of PAA are needed to produce these results.

However, it must be noted that these results were obtained using clear water and in the absence of natural organic matter (NOM). PAA has been shown to be a very active oxidant of many organic compounds and, consequently, the presence of this type of impurities in natural waters will certainly have a negative influence in the actual inactivation effectiveness. In fact, they will participate in parallel oxidative pathways competing with the attack produced by the oxidizing species on active and/or partially injured bacteria. Other adverse effects such as for example, the occurrence of inorganic salts, will also affect the disinfection mechanism.

268 M. Flores et al.

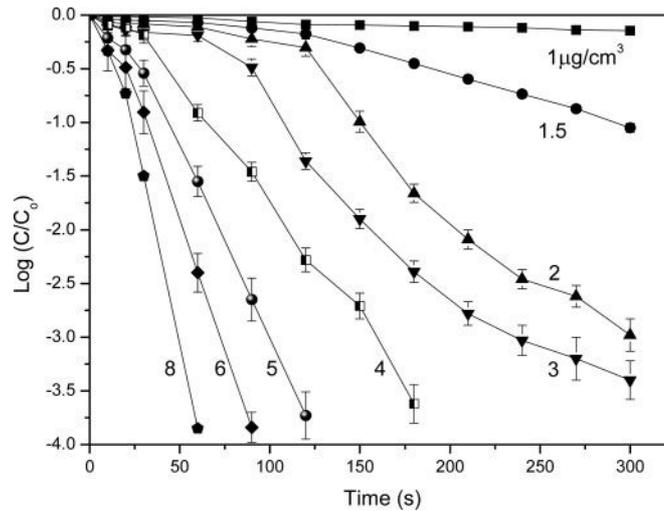


Figure 15.5. Disinfection results as a function of time. PAA is the parameter.

### 15.6 PERACETIC ACID + UV LIGHT

In the literature, the principal applications of these processes refer to the oxidation of organic compounds, dissolved inorganic compounds and other pollutants that are toxic and/or refractory to biological treatments. Few references were found, however, regarding their use for wastewater disinfection (Caretti and Lubello, 2003).

Contrary to other advanced oxidation processes (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV, TiO<sub>2</sub>/UV), numerous bibliographic references for the combined treatment between peracetic acid (PAA) and UV do not exist (Caretti and Lubello, 2003). PAA based product consist of equilibrium mixtures of peracetic acid, hydrogen peroxide, acetic acid and water in different proportions where hydrogen peroxide plays different roles, being implied in the restoration of the equilibrium between the different species after consumption of PAA but also acting as an oxidizing biocide itself (Bianchini et al., 2002).

The biocide action of PAA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be attributed to the production of highly reactive radicals, above all the hydroxyl radical OH• originated by the cleavage of the peroxidic bond. In the absence of UV irradiation, Fenton reactions, which are catalyzed by transition metal ions traces are usually responsible for radical creation. In the presence of UV irradiation, radicals can be photochemically produced by the cleavage of the O-O bond by UV light (Bianchini et al., 2002).

#### 15.6.1 Case study: disinfection of water with peracetic acid and its combination with UVC

##### 15.6.1.1 Experimental procedure

The experimental procedure, the culture media preparation and handling and conditioning of the bacterium has been detailed in Section 15.3.2.1.

Samples were taken every 1 second, with a sampling device especially designed for that purpose. En all the disinfection experiments the plates were incubated, after spreading them with the appropriate volume of sample, for 24 h at 37°C in EMB plate.

As mentioned in 15.3.2.1, in this case, the system was irradiated, in distinct experiments, with two tubular lamps of different power, placed on the centerline of the annular space and separate from the polluted water by a concentric quartz tube. In these cases, the lamps were turned on,

allowing 30 minutes for stabilizing their operation. The sample at  $t = 0$  was taken at the same time that the lamp shutters were taken off. Afterwards, samples were taken at different time intervals for several measurements.

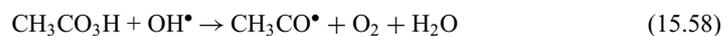
#### 15.6.1.2 *A proposed kinetics of peracetic acid + UV*

There are different possible conceptually different explanations to interpret the result of disinfection of *Escherichia coli* with PAA and UV radiation. We will advance some possibilities and finally propose our tentative explanation of our data.

According to Caretti and Lubello (2003), it is possible to go back to the peroxide acids theory to show how the action of UV produces a homolytic rupture in the O - O bond of the PAA molecule, with the subsequent formation of the hydroxyl radical:

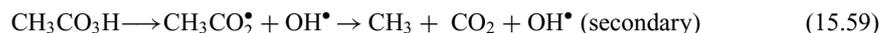


$\text{CH}_3\text{CO}_2^\bullet$  rapidly declines forming  $\text{CH}_3^\bullet$  and  $\text{CO}_2$  while the molecule of peracetic acid can subsequently react with the  $\text{OH}^\bullet$  radicals produced, according to the following reactions of addition and subtraction of labile hydrogen:



The presence of hydrogen peroxide within the commercial product of the PAA contributes not only to the formation of new PAA as soon as it is consumed, but also to the formation of new hydroxyl radicals.

According to Keller *et al.* (2008), the photodissociation of the PAA can follow one or even more than one of the following three possible reaction pathways:

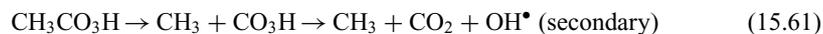


The first reaction (15.59) is initiated by a homolytic O-O bond cleavage to generate two photoproducts.

Equation (15.60) follows a concerted mechanism with simultaneous fission of an O-O bond and a C-C bond:



Equation (15.61) is also stepwise reaction but instead begins with a C-C bond cleavage:



#### 15.6.1.3 *Experimental results*

As shown in Figure 15.6, the combination of UV/PAA achieved higher levels of inactivation at lower contact times.

Results of the microbiological analysis on samples showed that PAA and UV together were very effective in bacteria removal. It can be assumed, in accordance with previous mechanistic proposals, that this very high effectiveness was due to the generation of hydroxyl radicals by the photolysis phenomena, but the obtained inactivation rates were similar to those produced using UV radiation as a single agent (7–8 seconds). This would indicate that the addition of PAA does not lead to a significant increase in the effectiveness of the process. Nevertheless, the benefits of this combination are that peracetic acid would act as a bactericide, preventing bacterial regrowth, turning the bacteria inactivation an irreversible dead.

270 M. Flores *et al.*

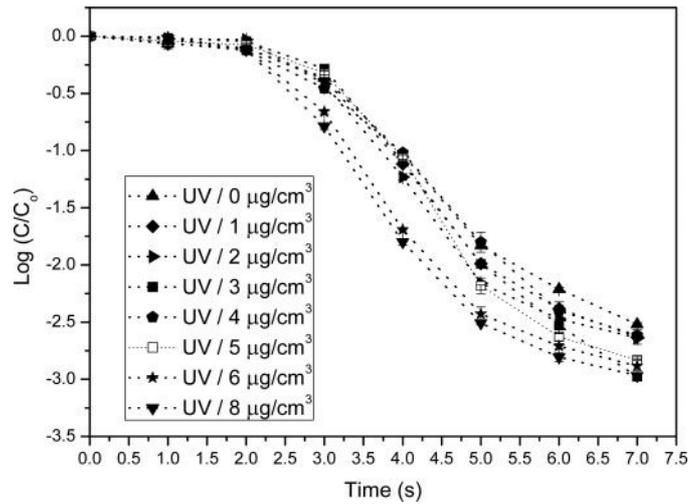


Figure 15.6. Results employing UVC plus PAA.

### 15.7 HYDROGEN PEROXIDE + UV

Publications concerning kinetic studies of the combined use of UVC radiation and hydrogen peroxide are very limited. Sundstrom *et al.* (1992) proposed two kinetic models: a mixed second order model and an application of the typical Series-event model. Later Gardner and Sharma (1992) described the inactivation of spores of *B. subtilis* in terms of a kinetic expression derived from the Multi-Target model. Just recently, Alkan *et al.* (2007) studied inactivation working with coliform bacteria in superficial waters and interpreted their results calculating the coefficients of the Chick–Watson model.

However, there is no consensus concerning the most certain mechanism that explains the action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV in disinfection process. Sundstrom *et al.* (1992) employing bacteria such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* found a beneficial effect on the rate because of the addition of hydrogen peroxide on the other hand, Rajala-Mustonen and Heinonen-Tanski (1995) found the opposite result.

Rincon and Pulgarin (2004) found a synergistic effect of low wavelength UV radiation and low concentrations of hydrogen peroxide (less than 10 ppm). Bayliss and Waites (1979) and Standard *et al.* (1983) found an acceptable effectiveness of the method to inactivate vegetative cells and spores employing rather large concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 15.7.1 Case study: disinfection with hydrogen peroxide and UV light in clear water conditions

##### 15.7.1.1 Experimental procedure

The experimental procedure, the culture media preparation and handling and conditioning of the bacterium has been detailed in 15.3.2.1 and 15.3.2.2.

The lamps were turned on, allowing for 30 minutes stabilizing their operation. The working solution was added to the reactor, immediately after the proper dosage of peracetic acid is added to the reactor and immediately starts stirring to homogenize the medium. Samples were taken every 1 second, with a sampling device designed for that purpose. En all the disinfection experiments the plates were incubated, after spreading them with the appropriate volume of sample, for 24 h at 37°C in EMB plate.

Table 15.2. Processing time to reach 99.99% reduction of the CFU concentration.

Process	Time/s
UVC (40 W) irradiation	10
UVC (15 W) irradiation	14

This table was adapted and modified from Labas *et al.*, 2009. *Photochem. Photobiol. Sci. rsc.org/pps*.

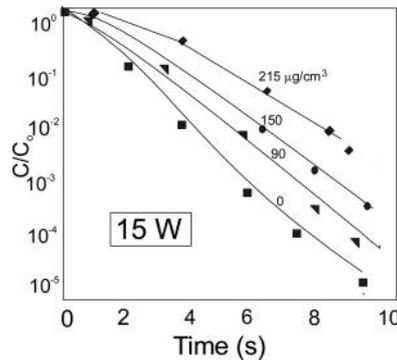


Figure 15.7. Results employing UVC plus hydrogen peroxide. 15 W nominal input power lamp. Dotted lines, dotted and broken lines, broken lines and solid lines are results from the model. (Reproduced from *Photochemical & Photobiological Sciences*; Reference: Labas *et al.*, 2009). Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: [www.res.org/pbs](http://www.res.org/pbs).

15.7.1.2 Kinetic model

The Modified Series-event model was applied once more. The equations for this process are very similar to those derived for the first case (Section 15.3).

However, Equation (15.16) in Section 15.3 must be significantly modified according to (Labas *et al.*, 2009):

$$\alpha = \alpha_{Ec} + \alpha_c + \alpha_p \tag{15.62}$$

where  $\alpha_p = \kappa_p C_p$ . In these equations, the linear napierian radiation absorption coefficients are defined for the bacteria, the aqueous solution and hydrogen peroxide respectively, each one of them derived from the corresponding values of concentrations and  $\kappa$  expressed in terms of  $\text{cm}^2 \text{mole}^{-1}$  or  $\text{cm}^2 \text{CFU}^{-1}$ .

15.7.1.3 Experimental results

Table 15.2 shows the time required to reach the same level of reduction of the microbiological contamination for three of the alternatives explored before. It is clear that the effect produced by hydrogen peroxide alone is negligible compared with the one corresponding to UVC alone.

Then, under these conditions, it is not necessary to consider the existence of two separate reaction kinetics that compete in parallel.

However, a very significant outcome was observed. The time required to reach 99.99% inactivation increases when  $\text{H}_2\text{O}_2$  is added. The larger the added concentration of hydrogen peroxide, the longer is the time to reach the desired inactivation results.

One explanation is immediate: hydrogen peroxide acts as an inner filter, absorbing UVC radiation (at 254 nm, its molar napierian absorption coefficient is not too high but important as compared with the other components of the reacting medium).

The combination of UVC and hydrogen peroxide, under the explored operating conditions, is detrimental to the UVC effectiveness performance (Figs. 15.7 and 15.8).

272 M. Flores et al.

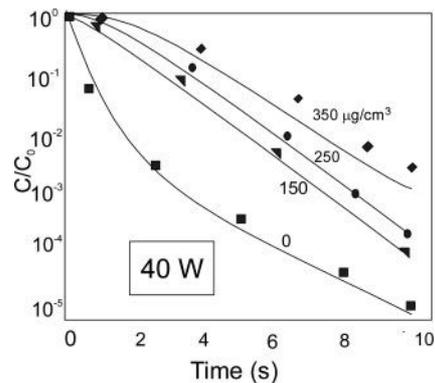


Figure 15.8. Results employing UVC plus hydrogen peroxide. 40 W nominal input power lamp. Dotted lines, dotted and broken lines, broken lines and solid lines are results from the model. (Reproduced from *Photochemical & Photobiological Sciences*; Reference: Labas et al., 2009. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: www.res.org/pbs).

### 15.8 CONCLUSIONS

Disinfection by ultra-violet light (UV) is accepted as being the most effective in removing pathogenic organisms. However, since the process typically consumes a great deal of power it is both expensive to operate and has a large carbon footprint. Depending on the financial resources existing, the water distribution rate needed and the quality of the source water the choice of treatment may vary.

Throughout the industrialized world and advanced developing countries, large efforts are made investigating alternative disinfection/oxidation practices. This chapter is a brief account of the possibilities of peracetic acid and hydrogen peroxide as additional optional choices for water treatment plants.

From this point of view, our preliminary results seem to suggest that peracetic acid may be considered as a good alternative oxidant for water treatment processes of water, since potentially produces less unwanted byproducts, becoming an environmentally friendly agent.

A second final consideration indicates that it is important to complete the development of very rigorous and reliable modeling of all the involved kinetics. This means to carry out work with waters having more realistic compositions; i.e., considering cases that may contain organic matter or inorganic salts that could severely affect the process efficiency. This additional information will facilitate the proposal of reactor design and scaling-up methods that are necessary to help out with the application of commercial competitive processes.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Universidad Nacional del Litoral (UNL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) for its financial support. We also thank the editorials that allowed us the reproduction of some graph.

Graphics 15.4.1 (a) Reprinted from *Chemical Engineering Journal*, Vol. 198–199/edition N° 1, Authors: Marina J. Flores, Rodolfo J. Brandi, Alberto E. Cassano, Marisol D. Labas, “*Chemical disinfection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – The proposal of a reaction kinetic model*”, Pages 388–396, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

Graphics 15.4.1 (b) Reprinted from Chemical Engineering Journal , Vol. 198–199/edition N° 1, Authors: Marina J. Flores, Rodolfo J. Brandi, Alberto E. Cassano, Marisol D. Labas, “*Chemical disinfection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – The proposal of a reaction kinetic model*”, Pages 388–396, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

Graphic 15.3.2 has been reproduced from Photochemical & Photobiological Sciences; Reference: Labas *et al.*, 2009, “*Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A comparative study*”. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: www.res.org/pbs.

Graphics 15.7.1 has been reproduced from Photochemical & Photobiological Sciences; Reference: Labas *et al.*, 2009, “*Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A comparative study*”. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: www.res.org/pbs.

Graphics 15.7.2. has been reproduced from Photochemical & Photobiological Sciences; Reference: Labas *et al.*, 2009, “*Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A comparative study*”. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry: www.res.org/pbs.

## APPENDIX

### Emission model for tubular germicidal lamps

In the integral of Equation (15.9) (Section 15.3), the region of integration for the fluence rate may be divided into two parts: (i) the first, corresponding to the solid angle delimited by the lamp boundaries ( $\Omega_s$ ) that is the solid angle that transports radiative energy coming from the body of the lamp, and (ii) the solid angle corresponding to the remaining of the surrounding space, then:

$$E_{\lambda,0} = \left[ \int_{\Omega_s} L_{\lambda,\Omega}(\underline{x}, t) d\Omega + \int_{4\pi - \Omega_s} L_{\lambda,\Omega}(\underline{x}, t) d\Omega \right] \quad (15.A-1)$$

Obviously, no radiation comes from the space defined by the solid angle  $4\pi - \Omega_s$  and the only non-zero integral is the first. The final result can be written in terms of a spherical coordinate system with origin at the point of incidence I (See Figs. 15.A-1a,b); then:

$$E_{\lambda,o}(\underline{x}, t) = \int_{\phi_1}^{\phi_2} d\phi \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta \sin \theta L_{\lambda,\Omega}(\theta, \phi, t) \exp \left[ - \int_{\bar{s}=s_R(\theta,\phi)}^{\bar{s}=s(\underline{x},\theta,\phi)} \kappa_s(t,\bar{s}) d\bar{s} \right] \quad (15.A-2)$$

Two important observations must be made in connection with Equation (15.A-2):

1. After writing the equation in terms of the spherical coordinate system, the solid angle corresponding to the space defined by the lamp boundaries ( $\Omega_s$ ) originated a first integration in  $\theta(\phi)$  and a second one in  $\phi$ . These integrals have limits of integration that are complex functions of the system geometry. The methodology for obtaining these limits will be illustrated following an approach proposed by Irazoqui *et al.* (1973). For the moment we can say (Fig. 15A-1) that these angles define, in a spherical coordinate system which is the natural system for radiation propagation, the volume of the lamp that is able to send light to the chosen point inside the reactor, the point  $\underline{x}$  at  $s = s$ .
2. In Equations (15.A-1) and (15.A-2) the boundary condition has taken the form of  $L_{\lambda}^0(\phi, \theta, t)$ . This value must be provided by a lamp emission model. At this point it suffices to say that:

$$L_{\lambda}^0(\theta, \phi, t) = f \left[ \begin{array}{l} \text{System geometry} \\ \text{Lamp characteristics} \end{array} \right] \quad (15.A-3)$$

Equation (15.A-2) provides, in mathematical form, all the elements needed to compute the fluence rate in homogeneous media. With an emission model for the lamp and the proper integration limits for the lamp radiation contributions to an arbitrary point of incidence ( $I_n$ ), it is the possible

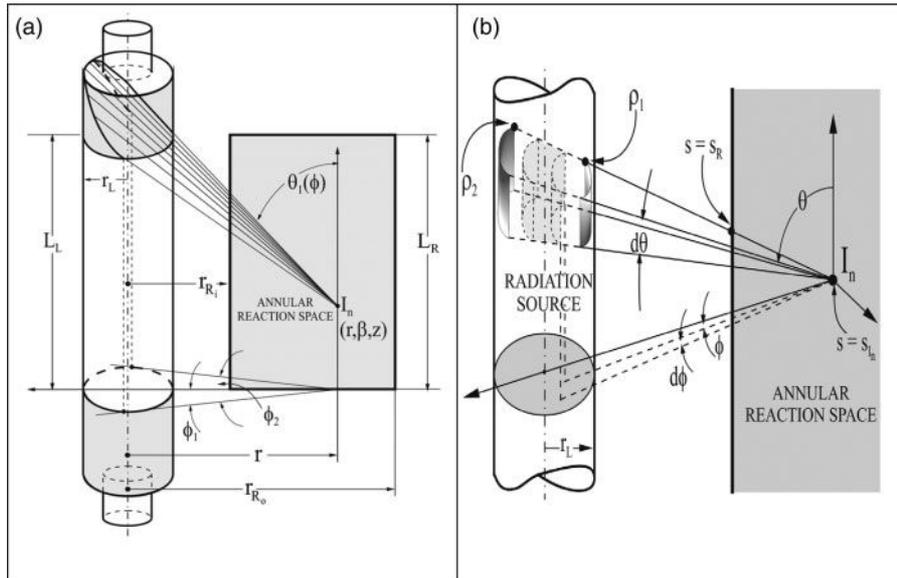


Figure 15.A1. (a) Limits of integration for the source, (b) The extended, voluminal, isotropic emission source model (adapted from Cassano *et al.*, 1995).

to calculate the local value of the radiation energy absorbed per unit time and unit reaction volume at any point of the reactor. For monochromatic radiation, this is the value required to formulate the kinetics expressed by Equations (15.3) to (15.5).

As indicated before, the modeling of the lamp emission should provide the boundary condition for the radiative transfer equation inside the reactor. There are lamps that produce an arc that emits radiation by itself and, consequently, photons come out directly from such an arc. The whole lamp volume makes emission. For example, this is the case of mercury arc low, medium and high-pressure tubular lamps. We speak in these cases of “voluminal emission”. Voluminal emission may be safely modeled as an isotropic emission; in this case the spectral radiance associated with each bundle of radiation originated in some element of volume of the lamp is independent of direction, and the associated emitted energy (per unit time and unit area) is also isotropic.

The following assumptions are made (Cassano *et al.* (1995)):

1. The emitters of the radiation source are uniformly distributed over the region of emission (a volume).
2. In terms of Specific Intensities each elementary extension of emission has an isotropic emission but the outgoing radiation energy is also isotropic when the emitting element is a volume.
3. Any emission element of the lamp emits per unit time, and for a given wavelength, an amount of energy proportional to its extension and independent of its position inside the lamp volume.
4. When emission is voluminal, each of the differential volumes of emission is transparent to the emission of its surroundings (an approximation which is not important if one works with the information about the lamp output).
5. The lamp is a perfect cylinder bounded by mathematical surfaces with zero thickness. Hence, any bundle of radiation coming from inside does not change its intensity or direction when it crosses this boundary (an approximation which is not important if one works with the information about the lamp output).
6. The lamp is long enough; consequently, neglecting end effects, the emission produced by the lamp along its central axis is uniform. This assumption does not impose uniformity on the

radiation field generated along the direction of the central axis. All what is said here is that “end effects” are neglected.

7. Emission from the lamp is at steady state.
8. The lamp has a length  $LL$  and a radius  $rL$ .
9. A spherical coordinate systems located at each point of radiation reception ( $In$ ) inside the reactor can characterize the arriving Specific Intensity (also called radiance). It is necessary to know the distance from such a point to the centerline of the lamp and two pairs of angular coordinates  $[(\theta1, \theta2), (\phi1, \phi2)]$  that define the extension of the useful emitting volume of the lamp.

Since a volume produces emission, the general radiative transfer equation (Alfano and Cassano, 2009) can be applied inside the lamp. There is no absorption (assumption 4) and no scattering. The resulting equation is:

$$\frac{dL_{\lambda, \underline{\Omega}}(s, t)}{ds} = j_{\lambda, \underline{\Omega}}^e(s, t) \quad (15.A-4)$$

Here,  $s$  is a directional coordinate in a three-dimensional space. From assumptions 2, 3 and 6, emission is isotropic (independent of direction) and uniform (independent of position). Hence, at steady state:

$$L_{\lambda, \underline{\Omega}}(0) = 0 \quad (15.A-5)$$

In the lamp, along the direction  $\underline{\Omega}$ , at  $s = 0$ , there is no entrance of radiation; this situation provides the required boundary condition for Equation (15.8):

$$s = 0 \quad L_{\lambda, \underline{\Omega}}(0) = 0 \quad (15.A-6)$$

Integrating from  $s = 0$  to  $s = s_s$  (see Fig. 15.A-1) and using the following change of coordinates:

$$ds = -d\rho \quad (15.A-7)$$

where  $\rho$  corresponds to the spherical coordinate system defined at point  $I_n$ .

$$s = 0 \quad \rho = \rho_2 \quad (15.A-8)$$

$$s = s_s \quad \rho = \rho_1 \quad (15.A-9)$$

$\rho_1$  and  $\rho_2$  are defined in Figure 15.A-1. Then, one gets:

$$L_{\lambda, \underline{\Omega}}(s_s) = j_{\lambda}^e[\Delta\rho_s(x, \theta, \phi)] \quad (15.A-10)$$

with:

$$[\Delta\rho_s(x, \theta, \phi)] = \rho_2(x, \theta, \phi) - \rho_1(x, \theta, \phi) \quad (15.A-11)$$

It must be remarked that, as it should have been expected,  $\Delta\rho_s$  is a function of the position  $x$  in the reactor and the direction of the incoming radiation given by the spherical coordinates  $(\theta, \phi)$ .

Once more, from  $s = s_s$  to  $s = s_R$  there is no emission, no scattering and no absorption (the medium has been assumed to be diatomic); from assumption 5 there is no refraction or reflection at the lamp boundaries, then:

$$\frac{dL_{\lambda, \underline{\Omega}}(s)}{ds} = 0 \quad (15.A-12)$$

Consequently:

$$L_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = L_{\lambda, \underline{\Omega}}(s_R) = L_{\lambda, \underline{\Omega}}(s_s) \Upsilon_{R, \lambda, \underline{\Omega}} \quad (15.A-13)$$

Finally, the boundary condition is:

$$L_{\lambda}^0(\theta, \varphi) = j_{\lambda}^e[\Delta\rho_s(r, \theta, \varphi)] \Upsilon_{R, \lambda, \underline{\Omega}} \quad (15.A-14)$$

Reflection and absorption at the reactor wall were accounted for by means of the wall transmission coefficient  $\Upsilon_{R, \lambda}$ .

276 *M. Flores et al.*

The value of  $j_\lambda^e$  must be related to the monochromatic lamp output power  $P_{\lambda,s}$ . By definition,  $j_\lambda^e$  is the energy emitted per unit volume, unit solid angle of emission and unit time; then:

$$dP_{\lambda,s} = j_\lambda^e dV_e d\Omega \quad (15.A-15)$$

$$P_{\lambda,s} = \int_{\Omega_s} \int_{V_s} j_\lambda^e dV_e d\Omega \quad (15.A-16)$$

Since  $j_\lambda^e$  corresponds to an isotropic and uniform emission:

$$j_\lambda^e = \frac{P_{\lambda,s}}{\int_{V_s} dV_e \int_{\Omega_s} d\Omega} = \frac{P_{\lambda,s}}{4\pi(\pi r_L^2 L_L)} = \frac{P_{\lambda,s}}{4\pi^2 r_L^2 L_L} \quad (15.A-17)$$

From Equations (15.A-11) and (15.A-14) we must know the values of  $\rho_2(\underline{x}, \theta, \phi)$  and  $\rho_1(\underline{x}, \theta, \phi)$ . In order to know these values one must obtain explicit expressions for the independent variable  $\rho$ , at the positions indicated by Equations (15.A-7) and (15.A-8). In the case of our reactor they are seen in Figure 15.A-1. Let us consider a point located in an arbitrary position  $I_n$ , having coordinates  $\underline{x}(r, z, \beta)$ . Let us look at an arbitrary direction  $(\theta, \phi)$ .

Using the nomenclature indicated in Figure 15.A-1, from standard analytic geometry, the equation of the boundary surface of the radiation source (a cylinder) in spherical coordinates is written as follows:

$$\rho^2 \sin^2 \theta - 2\rho(\sin \theta \cos \phi)r + (r^2 - r_L^2) = 0 \quad (15.A-18)$$

The two solutions of this quadratic equation are precisely the values of  $\rho$ ; i.e., they are the intersections of the  $\rho$  coordinate with the front and rear parts of the lamp at any value of  $\theta$  and  $\phi$ :

$$\rho_{1,2} = \frac{r \cos \phi \pm (r^2 \cos^2 \phi - r^2 + r_L^2)^{1/2}}{\sin \theta} \quad (15.A-19)$$

Finally, the following value for  $\Delta\rho_s$  is obtained:

$$\Delta\rho_s = \frac{2[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{\sin \theta} \quad (15.A-20)$$

Equations (15.A-14), (15.A-17) and (15.A-20) provide the boundary condition for the emission model, i.e.:

$$L_\lambda^0(\underline{x}, \theta, \phi) = \frac{P_{\lambda,s} \Upsilon_{R,\lambda,\Omega}}{2\pi^2 r_L^2 L_L} \frac{[r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{\sin \theta} \quad (15.A-21)$$

It must be noticed that either in Equation (15.A-21), all the characteristics of the lamp and the relative position of the reactor with respect to the lamp are included. When this value is used to calculate the photon absorption rate that is required to formulate the reaction rate inside the reactor, this information is fully incorporated into the mass balances, i.e., we have the lamp characteristics and its position inside the reactor incorporated as part of the design methodology.

#### *Limits of integration for the variables $\theta$ and $\phi$*

The spectral radiance is a function of the directional coordinates. The limits of integration for the independent variables  $\theta$  and  $\phi$  must be obtained.

#### *Limits for the independent variable $\theta$*

Limiting rays coming from the lamp and reaching the generic point  $(r, \beta, z)$  inside the reactor must satisfy two conditions:

- (i) if the ray limits the value of  $\theta$ , its equation (a straight line in space) must have a common solution with the equation of the circumference that define the opaque zone (or lamp ends) of the upper and lower parts of the lamp; however, for any plane at constant  $\phi$  (a plane in  $r-z$ ) there are two values of  $\theta$  that satisfy this condition for both the upper and lower boundaries;

(ii) to eliminate this ambiguity a second restriction on  $\theta$  must be imposed: one must choose the angle corresponding to the intersection of the ray with that portion of the circumference that, limited by the two generatrix lines corresponding to the limiting angles of  $\phi$ , is closer to the generic point  $(r, \beta, z)$ , as indicated in the figure.

From Figure 15.A-1:

$$(L_L - z) = \rho_1 \cos \theta_1 \quad (15.A-22)$$

$$-z = \rho_1 \cos \theta_2 \quad (15.A-23)$$

and with Equation (15.A-19):

$$\theta_1(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{(L_L - z)} \right\} \quad (15.A-24)$$

$$\theta_2(\phi) = \tan^{-1} \left\{ \frac{r \cos \phi - [r^2(\cos^2 \phi - 1) + r_L^2]^{1/2}}{-z} \right\} \quad (15.A-25)$$

#### *Limits for the independent variable $\phi$*

The limiting rays in the  $\phi$ -direction, for any value of the angle  $\theta$ , must be tangent to the lamp boundary at points located on the two generatrix lines of the cylinder (see Fig. 15.A-1). These values can be obtained by imposing a restriction in the values of  $\rho_1$  and  $\rho_2$ . At the limiting points, since  $\Delta\rho = 0$ , both intersections of the  $\rho$ -coordinate with the lamp boundary must coincide, i.e., in a projection of the lamp on the  $x$ - $y$  plane, the limiting rays are tangent to the directrix circumference of the lamp. This means that the condition in space is:

$$\rho_1 = \rho_2 \quad (15.A-26)$$

From Equation (15.A-19) the following equation is obtained:

$$r^2 \cos^2 \phi = r^2 - r_L^2 \quad (15.A-27)$$

and since  $\phi$  can only take on values in the first and fourth (negative value) quadrants, we have:

$$-\phi_1 = \phi_2 = \cos^{-1} \left[ \frac{(r^2 - r_L^2)^{1/2}}{r} \right] \quad (15.A-28)$$

#### REFERENCES

- Ahmed, Abd El-Shafey, I., Cavalli, G., Bushell, M.E., Wardell, J. N., Pedley, S., Charles, K. & Hay, N.J.: New approach to produce water free of bacteria, viruses, and halogens in a recyclable system. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3 (2011), pp. 847–853.
- Alfano, O.M. & Cassano, A.E.: Scaling-up photoreactors. Applications to advanced oxidation processes. In: H. De Lasa & B. Serrano Rosales (eds): *Advances in chemical engineering*. Elsevier, New York, 2009, pp. 229–287.
- Alkam, U., Teksoy, A. Atesli, A. & Baskaya, H.: Efficiency of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process for the disinfection of humic surface waters. *J. Environ. Sci. Health A* 42:4 (2007), pp. 497–506.
- APHA: Compendium of Methods for the microbiological examination of Foods, 2nd ed, in M.L Speck (ed). American Public Health Association, Washington, D.C., 1984.
- Baldry, M.G.C.: The bactericidal, fungicidal, and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 54 (1983), pp. 417–423.
- Baldry, M.G.C. & Fraser, J.A.L.: Disinfection with peroxygens. In: K.R. Payne KR (ed): *Industrial biocides*. Wiley, New York, 1988, pp. 91–116.
- Baldry, M.G.C. & French, M.S.: Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Sci. Technol.* 21 (1989b), pp. 203–206.
- Bayliss, C. & Waites, W.: The combined effect of hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 47 (1979), pp. 263–269.

278 *M. Flores et al.*

- Bianchini, L., Carlucci, L., Caretti, C., Lubello C., Pinzino, C. & Piscitelli, M.: An EPR study of wastewater disinfection by peracetic acid, hydrogen peroxide and UV. *An. Chim.* 92:9 (2002), pp. 783–793.
- Block, S.S.: *Disinfection, sterilization, and preservation*. 4th ed. Lea & Febiger Pubs, Philadelphia, 1991, pp. 167–181.
- Bolton, J.R. & Cotton, C.A.: *Ultraviolet disinfection handbook*. American Water Works Association, Denver, CO, 2008.
- Caretti, C. & Lubello, C.: Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: A pilot plant study. *Wat. Res.* 37 (2003), pp. 2365–2371.
- Cassano, A.E., Martin, C.A., Brandi, R.J. & Alfano, O.M.: Photoreactor analysis and design fundamentals and applications. *Ind.Eng. Chem. Res.* 34 (1995), pp. 2155–2201.
- Cerf, O.: Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 42 (1977), pp. 1–19.
- Chick, H.: An investigation of the laws of disinfection. *J. Hygiene* 8 (1908), pp. 92–157.
- Ciotti, C., Baciocchi, R., Cleriti, B. & Chiavola, A.: Peroxy-acids as an innovative oxidant for the remediation of contaminated sediment. *10th International UFZ/TNO Conference on Soil Water systems* (Consoil), 2008.
- Cords, B.R., Burnett, S.L., Hilgren, J., Finley, M., & Magnuson, J.: Sanitizers: Halogens, surface-active agents, and peroxides. In: P.M. Davidson, J.N. Sofos & A.L. Branen (eds): *Antimicrobials in food*. 3rd ed., CRC Press Taylor & Francis Group, FL, 2005.
- Dalrymple, O.K., Stefanalos, E., Trots, M.A. & Goswami, D.Y.: A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *App. Catal. B* 98 (2010), pp. 27–38.
- El-Agamey, A. & McGarvey, D.J.: Evidence for a lack of reactivity of carotenoid addition radicals towards oxygen: A laser flash photolysis study of the reaction of carotenoid with acylperoxy radicals in polar and non-polar-solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), pp. 3330–3340.
- Flores, M.J., Brandi, R.J., Cassano, A.E. & Labas, M.D.: Chemical disinfection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The proposal or a reaction kinetic model. *Chem. Eng. J.* 198–199 (2012), pp. 388–396.
- Fraser, J.A.L., Godfree, A.F. & Jones, F.: Use of peracetic acid in operational sewage sludge disposal to pasture. *Water Sci. Technol.* 17 (1984), pp. 451–466.
- Gard, S.: Chemical Inactivation of viruses. In: G.E.W. Wolstenholme & E.C.P. Millar (eds): *Proceedings of CIBA Foundation Symposium on Nature of Viruses*. Churchill, London, UK, 1957, pp. 123–146.
- Gardner, D.W.M. & Shama, G.: The kinetics of *Bacillus subtilis* spore inactivation on filter paper by UV light and UV light in combination with hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 84 (1992), pp. 633–641.
- Haas, Ch.: *Disinfection*, Chapter 14, Water Quality & Treatment. American Water Works Association (AWWA). Fifth Edition, McGraw-Hill Inc., 1999.
- Häder, D.P. & Sinha, R.P.: Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: Potential environment impact. *Mutat. Res.* 571 (2005), pp. 221–233.
- Harm, W.: *Biological effects of ultraviolet radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 1980.
- Heywood, D. & Phillips, B., Stansbury, J.H.: Communications. Free radical hydroxylations with peracetic acid. *J. Org. Chem.* 26 (1961), pp. 281–281.
- Hom, L.W.: Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *J. of the Environ. Division of the ASCE* 98 (1972), pp. 183–194.
- Irazoqui, H.A., Cerda, J. & Cassano, A.E.: Radiation profiles in an empty annular photoreactor with a source of finite spatial dimensions. *AIChE J.* 19 (1973), pp. 460–467.
- Keller, B.K., Wojcik, M.D. & Fletcher, T.R.: A directly-dissociative stepwise reaction mechanism for gas-phase peroxyacetic acid. *J. Photochem. Photobiolog. A: Chem.* 195 (2008), pp. 10–22.
- Kehrer, J. P.: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 692:149 (2000), pp. 43–50.
- Koubet, E.: *The kinetics and mechanism of the decomposition of aliphatic peroxyacid in aqueous solutions*. PhD thesis, Brown University, New York, 1964.
- Labas, M.D., Martin, C.A. & Cassano, A.E.: Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium. *Chem. Eng. J.* 114 (2005), pp. 87–97.
- Labas, M.D., Brandi, R.J., Martin, C.A. & Cassano, A.E.: Kinetics of bacteria inactivation employing UV radiation under clear water conditions. *Chem. Eng. J.* 121 (2006), pp. 135–145.
- Labas, M.D., Zalazar, C.S., Brandi, R.J. & Cassano, A.E.: Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochem. Eng. J.* 38 (2008), pp. 78–87.
- Labas, M.D., Brandi, R.J., Zalazar, C.S. & Cassano, A.E.: Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, A comparative study. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009), pp. 670–676.
- Leeper, S.: Influence of temperature on the synergistic sporidial effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on *Bacillus subtilis* SA22 (NCA 72–52). *Food Microbiol.* 1 (1984), pp. 199–203.

- Maillard, J.Y.: Bactericidal target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*. 92 (2002), pp. 16–27.
- Marshall, R.: *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed., Editorial APHA, American Public Health Association, Washington D.C., 1992.
- McDonnell, G. & Russell, A.D.: Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:1 (1999), pp. 147–179.
- Murov, S.L., Carmichel, I. & Hug, G.L.: *Handbook of photochemistry: Potassium ferrioxalate actinometry*. 2nd ed, Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
- Raffellini, S., Schenk, M., Guerrero, S. & Alzamora, S.M.: Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations. *Food Control* 22 (2011), pp. 920–932.
- Rajala-Mustonen, R. & Heinonen-Tanski, H.: Effect of advanced oxidation processes on inactivation of coliphages. *Water Sci. Technol.* 31(1995), pp. 131–134.
- Rincon, A. & Pulgarin, C.: Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *Escherichia coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub>. Implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B: Environ.* 51 (2004), pp. 283–302.
- Rokhina, E.V., Makarova, K., Golovina, E.A., Van As, H. & Virkutyte, J.: Free radical reaction pathway thermochemistry of peracetic acid homolysis, and its application for phenol degradation: Spectroscopic study and quantum chemistry calculations. *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010), pp. 6815–6821.
- Selleck, R.E., Saunier, B.M. & Collins, H.F.: Kinetic of bacteria deactivation with chlorine. *J. Environm. Eng.* 104 (1978), pp. 1197–1212.
- Severin, B. *Kinetic modeling of microbial inactivation by ultraviolet*. PhD Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, 1982.
- Severin, B., Suidan, M. & Engelbrecht, R.: Kinetic modeling of U.V. disinfection of water. *Water Res.* 17 (1983), pp. 1669–1678.
- Shi, H.C. & Li, Y.: Formation of nitroxide radicals from secondary amines and peracids: A peroxy radical oxidation pathway derived from electron spin resonance detection and density functional theory calculation. *J. Mol. Catal. A.* 271 (2007), pp. 32–41.
- Sies, H.: Role of the reactive oxygen species in biological process, *Klin. Wochenschr.* 69 (1991) 965–968.
- Smith, G.: UV disinfection explained. UV disinfection & validation. *WaterWork* 2011, pp. 8–12.
- Standard, J., Abbis, S. & Wood, J.M.: Combined treatment with hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation to reduce microbial contamination levels in pre-formed food packaging cartons. *J. Food Protect.* 46 (1983), pp. 1060–1064.
- Sundstrom, D.W., Wier, B.A., Barber T.A. & Klein, H.E.: Destruction of pollutants and microorganisms in water by UV light and hydrogen peroxide. *Water Pollut. Res. J. Can.* 27 (1992), pp. 57–68.
- Trussell, R.R. & Chao, J.-L.: Rational design of chlorine contact facilities. *J. Water Pollut. Control Federation* 49:7 (1977), pp. 659–667.
- Tutumi, M., Imamura, K., Hatano, S. & Watanabe, T.: Antimicrobial action of peracetic acid. *J. Food Hyg. Soc.* 15 (1973), pp. 116–120.
- US EPA: Drinking water, national primary drinking water regulation, final rules. *Fed. Registr.* 54: 27486–27541. U.S. Environmental Protection Agency, 1989.
- US EPA: Small drinking water systems handbook: A guide to “packaged” filtration and disinfection technologies with remote monitoring and control tools. U.S. Environmental Protection Agency, 2003.
- US EPA: Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule. Office of Water (4601), EPA 815-R-06-007, 2006.
- Watson, H.E.: A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *J. Hyg.* 8 (1908), pp. 536–542.
- Weber, S.: Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: A review of recent biophysical studies on photolyase. *BBA-Bioenergetics* 1707:1 (2005), pp. 1–23.
- Yuan, Z., Ni, Y. & Van Heiningen A.R.P.: Kinetics of peracetic acid decomposition. Part I. Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching condition. *Can. J. Chem. Eng.* 75 (1997), pp. 37–41.
- Zalazar, C.S., Labas, M.D., Martin C.A., Brandi, R.J., Alfano, O.M. & Cassano, A.E.: The extended used of actinometry in the interpretation of photochemical reaction engineering data. *Chem. Eng. J.* 109 (2005), pp. 67–81.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams M.R., Moss, M.O., (2008) *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 54, (2), pp 796-799
- Alasri A., Roques C., Michel G., Cabassud C., Aptel P., (1992) *Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains*. Can. J. Microbiol., 38(7), pp 635- 642.
- APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21 st ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- APHA(1984) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2nd ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Asano, T; Burton, F; Leverenz, H; Tsuchihashi, R; Tchobanoglous, G. (2007). *Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications*. Metcalf & Eddy, INC. Mc Graw – Hill, 1st ed.
- Bach R.D., Ayala P. Y., Schlegel H.B. (1996) A reassessment of the bond dissociation energies of peroxides: An ab initio study. *Journal American Chemical Society*, 118(50), pp 12758-12765.
- Baldry M. G. C, French M.S., (1989b) Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Science and Technology*, 21(3), pp 203-206.
- Baldry M. G. C., (1983) The bactericidal, fungicidal, and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), pp 417-423.
- Baldry , M.G.C., French, M.S., (1989a) *Activity of peracetic acid against sewage indicator organism*. *Water Sci Technol* 21, pp 1747-1749.
- Baldry, MGC; Fraser, JAL. (1988). Disinfection with peroxygens. En: Payne KR, editor. *Industrial biocides*. NewYork, USA:Wiley; 91 – 116.
- Ball L.D, Edwards, J., (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, pp 1125-1129.
- Ball, L. D., Edwards, J., Haggett, M.L., Jones, P., (1967) *J. Am. Chem. Soc.* 89, pp 2331-2333.
- Battistuzzi, G; Belleia M, Bortolotti C, Sola M. (2010) *Redox properties of heme peroxidases Heme Peroxidases Heme Peroxidases*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500 (1), pp 21-36.
- Bayliss, C., Waites, W.: *The combined effect of hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on bacterial spores*. *J. Appl. Bacteriol.*, 47 (1979), pp 263-269
- Bellar, T.A., Lichtenber, J.J., Kroner, R.C., (1974). *The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water*. *Journal of American Water Works Association* 66, pp 703 – 706.
- Benabbou AK, Derriche Z, Felix C, Lejeune P, Guillar C (2007) *Photocatalytic inactivation of Escherichia coli effect of concentration of TiO2 and microorganism nature and intensity of UV irradiation*. *Applied Catal B* 76, pp 257-263.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I., (2002) *Enterobacterias: características generales. Género Escherichia In: Manual de Microbiología Veterinaria*, Vadillo S, Píriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España, 301-325.
- Block S.S. 1991 *Peroxygen Compounds*. In *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Lea & Febiger Pubs (ed.), 4th edn., Philadelphia, pp. 185-201.

- Block, S.S., (2001). *Disinfection, sterilization, and preservation*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, INC, Philadelphia.
- Bolton, J.R., Cotton, C.A., (2008) *Ultraviolet Disinfection Handbook*. American Water Works Association. Denver, CO
- Brandi, R., Alfano, O., Cassano A (2000) *Evaluation of Radiation Absorption in Slurry Photocatalytic Reactors. Assessment of Methods in Use and New Proposal*. Environ. Sci. Technol., 34 (12), pp 2623-2630
- Britigan, B., Rasmussen G. T., Cox, C, (1997) *Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the Pseudomonas aeruginosa siderophore pyochelin*. Infect. Immun. 65(3), pp 1071-107
- Cabrera, E., Gomez, F., Zuñiga A., (2007) *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación*. Colombia Médica 38, pp 149-158.
- Camargo Torres, M (2003) *Evaluación de la efectividad de los desinfectantes Fagetrial y Flagequats en la superficie de los mesones de las plantas pilotos del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA, Bogotá)*. Microbiología Industrial. ICTA
- Caretti, C., Lubello, C., (2003) *Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study*. Wat. Res. 37 pp 2365-2371.
- Cassano, A., Alfano, O., Brandi, R., Martín, C., (2001) *Diseño de Reactores para Fotocatálisis: Conceptos fundamentales. En: Eliminación de Contaminantes por fotocátalisis Heterogénea*. M. Blesa (Ed.), Red CYTED VIII-G, Cap. 10, 201-241, Argentina, ISBN 987-4338
- Cassano, A., Martín C., Brandi, R., Alfano, O., (1995) *Photoreactor Analysis and desinfe fundamentes and applications*. Ind. Eng. Chem. Res.34, pp2155-2201
- Cerf, O., (1977) *Tailing of survival curves of bacterial spores*. J of Applied Bacteriol 42, pp 1-19.
- Chapman, J., (2003) *Biocide resistance mechanisms*. International Biodeterioration & Biodegradation Volume 51, (2), pp 133-138
- Chick, H. (1908) *An Investigation of the Laws of Disinfection*. Journal of Hygiene 8 pp 92-157.
- Cho, M., Hyenmi, C., Jeyong, Y., (2003). *Disinfection of Water Containing Natural Organic Matter by Using Ozone-Initiated Radical Reactions*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (4), pp 2284-2291
- Cole, M; Davies, K; Munro, G; Holyoak, C; Kilsby, D. (1993). *A vitalistic model to describe the thermal inactivation of Listeria monocytogenes*. Journal of Industrial Microbiology 12, pp 232 - 239.
- Coleman, H. M., Marquis, C.P., Scott, J.A., Chin, S-S., Amal, R., (2005) *Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts*. Chem Eng J 113, pp 55-63
- Colgan, S., Gehr, R., (2001) *Disinfection*. Water Environ Technol 13, pp 29-33.
- Collin H., Selleck R.. (1972). *Process kinetics of wastewater chlorination*. University of California, Sanitary Engineering Research Laboratory (Berkeley)
- Coyle, J.T., Puttfarcken, P., (1993) *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. Science 29 (5134), pp 689-95.
- Dalrymple, O. K., Stefanalos, E., Trotz, M.A., Goswami, D.Y. (2010) *A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection*. App. Catal. B. 98 pp 27-38.

- Daniel L. A., (2001) *Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável*, 139 pp, ABES, RiMa Artes e Téxtos, Br.
- D'ans, J., Frey, W., (1913) *Z. anorg. allg. Chem.* 84, pp 145-164.
- Denyer S. P. and Maillard J. Y. (2002) *Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-negative bacteria*. *Journal Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92(1),pp 35-45.
- Denyer, S. P., (1995) *Mechanisms of action of antibacterial biocides*. *Int.Biodeterior. Biodegrad.* 36, pp 227-245.
- Denyer, S.P; Stewart G. S., (1998) *Mechanisms of action of disinfectants*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41 ( 3-4), pp 261-268
- Devlin, R. G., Lin, C. S., Perper, R. J., (1981) *Dougherty Evaluation of free radical scavengers in studies of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *Immunopharmacology*, 3(2) pp 147-159
- Diaz, A. (2002) *La estructura de las catalasas*. *REB* 22 (2): 76-84
- Downes, A., Blunt, T.P. 1877. "Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms". *Proceedings of the Royal Society of London*, 26, 488-500.
- ENOHSA. (2000). «*Guías para la Presentación de Proyectos de Agua Potable*», Fundamentaciones, Ente Nacional de Obras Hídricas de Saneamiento de la República Argentina, Cap.10: Desinfección, pp 243.
- Environmental Protection Agency (EPA, EEUU), «*Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*», 346 pp, EPA 815-R-99-014, Abril 1999
- Environmental Protection Agency (EPA, EEUU), *Enhanced Coagulation and Enhanced Precipitative Softening Guidance Manual*, 237 pp, EPA 815-R-99-012, Mayo 1999
- Environmental Protection Agency (EPA, EEUU), *Guidance Manual for Compliance with the Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule. Cap 7: Importance of Turbidity*», 13 pp, EPA Guidance Manual, Turbidity Provisions, Abril 1999.
- Environmental Protection Agency (EPA, EEUU), *Office of Water, Disinfection Profiling and Benchmarking Guidance Manual*, 195 pp, EPA 815-R-99-013, Agosto 1999.
- Falsanisi, D; Gehr, R; Santoro, D; Dell'Erba, A; Notarnicola, M; Liberti, L. (2006). *Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewater*. *Water Quality Research Journal of Canada* 41(4), pp 398 - 409.
- Fernández Cirelli, A., Fernández Reyes L., Volpedo A.,(Ed) (2007) *Efectos de los cambios globales sobre los recursos hídricos y sistemas costeros* RED CYTED 406RT0285 "Efecto cambios globales sobre los humedales de iberoamérica" 1-158 pp
- Finch, G.R., Smith, D.W., Stiles, M.E., (1988). *Dose-response of Escherichia coli in ozone demand free phosphate buffer*. *Water Research* 22, pp 1563 - 1570.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., Emptage, M. H., (1993) *The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide*. *J. Biol.Chem.* 268, pp 22369-22376.
- Flores, M.J., Brandi, R.J., Cassano, A.E., Labas, M.D., *Chemical disinfection with H2O2 (2012). The proposal or a reaction kinetic model*. *Chem. Eng. J.* 198-199, pp 388-396.
- Fraser, J.A.L., Godfree, A.F., Jones, F.: Use of peracetic acid in operational Sewage sludge disposal to pasture. *Water Sci. Technol.* 17 (1984), pp 451-466.

- Freer, P.C., Novy, F.G., (1902). *On the formation, decomposition and germicidal action of benzoylacetyl and diacetyl peroxides*. American Chemical Journal; 27, pp 161 – 193.
- Galvan, J., Sanz, V., de Marcos, S., (2010) *Selective peracetic acid determination in the presence of hydrogen peroxide using a label free enzymatic method based on catalase*. Anal Bioanal Chem 398, pp 2127-2124.
- Gard, S., *Chemical Inactivation of Viruses* (1957) In Proceedings of CIBA Foundation Symposium on Nature of Viruses. G. E. W. Wolstenholme and E. C. P. Millar (Eds), Churchill, London, pp 123-146.
- Gardner, D.W. M., Shama, G., (1992), *The kinetics of Bacillus subtilis spore inactivation on filter paper by UV light and UV light in combination with hydrogen peroxide*. J. Appl. Microbiol. 84 pp 633-641.
- Gehr, R; Cochrane, D; French, M. (2002). *Peracetic acid as a disinfectant for municipal wastewaters: encouraging performance results from physicochemical as well as biological effluents*. Proceeding of the US Water Environment Federation. Disinfection conference.
- Ghiladi R, Knudsen G. Medzihradzky k, Ortiz de Montellano P (2005). *The Met-Tyr-Trp Cross-link in Mycobacterium tuberculosis Catalase-peroxidase (KatG)*. The journal of biological chemistry 280( 24), pp. 22651-22663.
- Gilbert, P., D. Pemberton, and D. E. Wilkinson. (1990) *Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene*. J Appl Bacteriol. 69(4), pp 585-592.
- Gilbert, P., P. J. Collier, and M. R. W. Brown. (1990). *Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response*. Antimicrob. Agents Chemother. 34, pp 1865-1868.
- Glaze, WH.; Kang, JW; Chapin, DH. (1987). *The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation*. Ozone Science & Technology 9, pp 335 – 352.
- Gogate, P.R., Pandit, A.B., (2004). *A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions*. Advances Environmental Research 8, pp 501 – 551.
- Gogate, P.R., Pandit, A.B., (2004). *A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods*. Advances Environmental Research 8, pp 553 – 597
- Gonzalez Garrido, C., (2001) *“La Luz ultraviolet, una solución amigable con el medio ambiente para la desinfección del agua y del aire*. Publicado en Aqua Master.
- Greenspan F.P, MacKellar, D.G., (1948) *Analysis of aliphatic peracids*. Anal Chem 20, pp 1061-1063.
- Greenspan, F.P; MacKellar, D.G., (1951). *The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes*. Food Technology 5, pp 95 –9 7.
- Guimarães, R., Ibáñez, J., Litter, M., Pizarro, R., (2001). *Desinfección*. Capítulo 15. CNEA xxi ambiental-cyted-22
- Gyüerel, L.L., Finch G. R., (1998) *Modeling Water Treatment chemical disinfection kinetics*. Journal of Environmental Engineering, 124(9), pp 783-793
- Haas, Ch., Disinfection, Chapter 14, Water Quality & Treatment. American Water Works Association (AWWA). Fifth Edition, McGraw-Hill Inc., 1999.

- Halliwell B, Gutteridge JM. *Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals*. FEBS Lett. 15:128(2), 347-352.
- Harm, W., (1980) *Biological Effects of Ultraviolet Radiation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hass, C., Karra, S., (1984) *Kinetics of Microbial inactivation by chlorine.II. Kinetic in the presence of chlorine demand*. Water Research 18, pp 1451-1454.
- Hom, L.W.: Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. J. of the Environ. Division of the ASCE 98 (1972), pp 183 -194.
- Hugo, W. B., and A. D. Russell (1999). *Types of antimicrobial agents*. In A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed., in press. Blackwell Science, Oxford, England.
- Hutchings IJ, Xezones H (1949) *Comparative evaluation of the bactericidal efficiency of peracetic acid, quaternaries and chlorine containing compounds*. Proc 49th Annual Meet American Society of Microbiology, Cincinnati, pp 50-51
- Irazoqui, H.A., Cerda, J., Cassano, A.E. (1973) *Radiation profiles in an empty annular photoreactor with a source of finite spatial dimensions*. AIChE J.19, pp 460-467
- Imlay, J.A., Linn, S., (1988) *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro*. Science, 240(4852), pp640-642.
- Jagger, J., (1967) Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- Johnson, J.D., Christman R.F., Norwood, D.L., Millington D.S., (1982) *Reaction products of aquatic humic substances with chlorine*. Environ Health Perspect 46, pp 63-71.
- Johnson, J.R., (2002) *Evolution of pathogenic Escherichia coli*. In: Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Donnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. USA 2002a, pp 55-77
- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K.T., Manna, A.C., (2008) *Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms*. FEMS Microbiol. Lett. 279 (1), pp 71-76.
- Juven, B. Pierson M (1996) *Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation*. Journal of Food Protection, 11, pp. 1153-1247
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., (2004) *Pathogenic Escherichia coli*. Nature 2, pp 123-140.
- Kehrer, J. P., (2000) *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity*. Toxicology 692 (149), pp 43-50.
- Kitis M (2004) *Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review*. Environ Int 30 (1), pp 47-55.
- Koubet, E., (1964) *The kinetics and mechanism of the decomposition of aliphatic peroxyacid in aqueous solutions*. PhD thesis, Brown University, New York.
- Labas M. D., Brandi R. J., Zalazar C. S. and Cassano A. E. (2009) *Water disinfection with UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, A comparative study*. Photochemical Photobiology Sciences, 8(5), pp 670-676.
- Labas M. D., Zalazar C. S., Brandi R. J. and Cassano A. E. (2008) *Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide*. Biochemical Engineering Journal, 38(1), pp 78-87.

- Labas, M.D., Brandi, R.J., Martin, C.A., Cassano, A.E., (2006) *Kinetics of bacteria inactivation employing UV radiation under clear water conditions*. Chem. Eng. J.121, pp 135-145.
- Labas, M.D., (2004) Tesis Doctoral: Desinfección de agua utilizando radiación UV. Estudio cinético. Facultad de Ingeniería Química
- Lambert, P.A., Hammond, S.M., (1973) *Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms*. Biochemical and Biophysical Research Communications 54 (12), pp 796-799.
- Lawryshy, Y. A., Cairns, B., (2003) *UV disinfection of water: the need for UV reactor validation*. Water Supply, 3 (4) pp 293-300.
- Leeper, S. (1984). *Synergistic killing of spores of Bacillus subtilis by peracetic acid and alcohol*. Journal of Food Technology 19:355 – 60.
- Leeper, S., (1984) *Influence of temperature on the synergistic sporicidal effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on Bacillus subtilis SA22 (NCA 72-52)*. Food Microbiol.1, pp 199-203.
- Lefevre F, Audic JM, Ferrand F (1992) *Peracetic acid disinfection of secondary effluents discharged off coastal seawater*. Water Sci Technol 25, pp 155-164.
- Legrini, O., Oliveros, E., Braun, A.,(1993) *Photochemical Processes for Water Treatment*. Chem. Rev. 93(2), pp 671-698
- Lehninger 2006. Principios de Bioquímica. 4ta Edición . Nelson. D, Cox, M (Ed).
- Liberti L, Lopez A, Notarnicola M (1999) *Disinfection with peracetic acid for domestic sewage re-use in agriculture*. Water Environ J 13, pp 262-268.
- Linton, RH; Carter, WH; Pierson, MD; Hackney, CR. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Protection 58:946 – 954.
- Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., Hackney, C.R., Eifert, J.D., (1996). *Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of Listeria monocytogenes Scott A heated in infant formula*. Journal of Food Protection 59, pp 16 – 23.
- Litter, M. I., (2005), *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación de agua*. M.A. Blesa y J. Blanco Gálvez, Editores, Editorial Escuela de Posgrado UNSAM, San Martín, Prov. de Buenos Aires, Argentina, octubre de 2005, Cap. 10, pp. 67-83.
- Lubello C, Caretti C, Gori R. *Comparison between PAA/UV and H2O2/UV disinfection for wastewater reuse*. Water Supply 2 (1), pp 205-212.
- Maillard, J.Y., (2002) Bactericidal target sites for biocide action. *J. Applied Microbiol. Symposium Supplement*. 92 pp 16-27
- Malchesky P. S., (1993) *Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization*. Artificial Organs, 17(3), pp 147-152.
- Marquis, R., Rutherford, G., Faraci, M., Shin S., (1995 ) *Sporicidal action of peracetic acid and protective effects of transition metal ions*. Journal of Industrial Microbiology, 15 (6) pp 486-492
- Meier, J.R., (1988). *Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water*. Mutation Research 196, pp 211 – 245.

- Meier, J.R., Knohl, R.B., Coleman, W.E., Ringhand, H.P., Munch, J.W., Kaylor, W.H., Streicher, R.P., Kopfler, F.C., (1987). *Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxyl-2(5H-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solution*. Mutation Research 189, pp 363 – 373.
- Meier, J.R., Ringhand, H.P., Coleman, W.E., Schenck, K.M., Munch, J.W., Streicher, R.P., Kaylor, W.H., Kopfler, F.C., (1986). *Mutagenic by-products from chlorination of humic acid*. Environmental Health Perspectives 69, pp101 – 107.
- Meulemans, C.C.E., (1986) *The basic principles of UV-sterilization of water*. En: Ozone + Ultraviolet Water Treatment, Aquatec Amsterdam. Paris: International Ozone Association.
- Meyer, E., (1976). *Disinfection of sewage waters from rendering plants by means of peracetic acid*. Journal Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology 21, pp 266 – 73
- Mezzanotte, V., Antonelli, M., Citterio, S., Nurizzo, C., (2007) *Wastewater disinfection alternatives: Chlorine, ozone, peracetic acid, and UV light*. Water Environ Res 79, pp 2373-2379.
- Miller, J.W., Uden, P.C., (1983) Characterization of non-volatile aqueous chlorination
- Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Alberti, A., Richardson, S., (2001). *Studies on mutagenicity and disinfection by-products in river drinking water disinfected with peracetic acid or sodium hypochlorite*. Proceedings of IWA world conference, Berlin, Germany.
- Monarca, S; Richardson, S; Feretti, D; Grottolo, M; Thruston, A; Zani C. (2002). *Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid*. Environmental Toxicology & Chemistry 21, pp 309 – 318.
- Montgomery, J., (1985) *Water treatment principles and design*. Consulting Engineers Wiley, pp 1-696.
- Murov, S.L., Carmichel, I., Hug, G.L., (1993) *Handbook of Photochemistry Potassium Ferrioxalate Actinometry*, 2nd ed, Marcel Dekker Inc., New York.
- Naab, O. A., (2005). Pared celular en Procariotas. Cátedra de Microbiología. Universidad Nacional de la Pampa,
- Neidhardt, F.C., (1999) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2nd edition. ASM Press, Washington.
- Nikolaou, A.D., Golfinopoulos, S.K., Lekkas, T.D., Kostopoulou, M.N., (2004) *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability*. Microbiol Rev. 49(1), pp 1–32.
- Nikaido, H., Vaara, M., (1985). *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability*.
- DBP levels in chlorinated drinking water: effect of humic substances*. Environ Monit Assess 93, pp 301-319.
- Oliver, B. G., (1983) *Dihaloacetonitriles in drinking water: algae and fulvic acid as precursor*. Environ. Sci. Technol., 17 pp. 80–83
- Poffe, R; De Burggrave, A; Houtmeyers, J; Verachtert, H. (1978). *Disinfection of effluents from municipal sewage treatment plants with peroxy acids*. Zentralbl Bakteriol B 167, pp 337–46.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology 5th edition. McGraw-Hill, USA 2002.
- Pretorius P.C., Pretorius W., (1999). *Disinfection a Purified Sewage Effluent with monochloramide*. Water SA, 25 (4), pp 463-472.

- Richardson, S.D., (2003) Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 75, pp 2831-2857.
- Rios, D., *Riesgos biológicos y subproductos de la desinfección en el agua de bebida*. Master Tesis 2003. Obras Sanitarias, Uruguay.
- Rojas, R., (2002) *Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano*. Lima, Peru: CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). IRC-WASH Library.
- Rokhina, E. V., Makarova K., Golovina, E. A., Van As H., Virkutyte, J., (2010) *Free radical reaction pathway thermochemistry of peracetic acid homolysis, and its application for phenol degradation: Spectroscopic study and quantum chemistry calculations*. *Environmental Science & Technology*, 44(17), pp 6815-6821.
- Rook, J.J., (1974). *Formation of haloforms during chlorination of natural water*. *Water Treatment and Examination* 23, pp 234 - 243.
- Rook, J.J., (1976). *Haloforms in drinking water*. *Journal of American Water Works Association* 68, pp 168 - 172.
- Rudd, T., Hopkinson, L.. (1989). *Comparison of disinfection techniques for sewage and sewage effluents*. *Journal of the Institution of Water Environmental Management* 3, pp 612 - 618.
- Rusell, A., (2003) *Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations*. *The lancet infectious diseases* 3 (12), pp 794-803.
- Sadiq, R; Rodriguez, M. (2004). *Disinfection by-products (DBP's) in drinking water and the predictive model for their occurrence: a review*. *Science of the total Environment* 321, pp 21 - 46.
- Sanchez Ruiz, C., Martinez-Royano, S., Tejero-Monzon., I. (1995) *An evaluation of the efficiency and impact of raw wastewater disinfection with peracetic acid prior to ocean discharge*. *Water Science & Technology* 32, pp 159 - 66.
- Schenck, G.O., (1981) *Ultraviolet Sterilization*. En: W. Lorch. *Handbook of Water Purification*. Chichester: Ellis Horwood Ltd.; pp 530-595.
- Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941TAL In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., *Bergey's Manual Trust USA* 2005, 607-624.
- Schurman , J., (2001) *Antibacterial activity of hydrogen peroxide against escherichia coli o157:h7 and salmonella spp. In fruit juices, both alone and in combination with organic acids*. Master Thesis. Blacksburg, Virginia
- Selleck, R.E., Saunier, B.M., Collins, H.F., (1978) *Kinetic of bacteria deactivation with chlorine*. *J. Environm. Eng.* pp 1197-1212.
- Severin, B. (1982) *Kinetic Modeling of Microbial Inactivation by Ultraviolet*, Doctoral Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Severin, B., Suidan, M., Engelbrecht, R. (1984) *Kinetic modeling of U.V. disinfection of water*. *Water Res.* 17 (1983), pp 1669-1678.
- Singer, P. C., (1999) *Humic substances as precursors for potentially harmful disinfection products*. *Water Sci Technol* 40, pp 25-30.

- Smith, K.C., Hanawalt, .PC., (1969) *Molecular Photobiology: Inactivation and Recovery*. New York Academic Press.
- Solsona, F., Méndez J. P., (2002) *Desinfección del agua*, Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (Cepis), visión de Salud y Ambiente. 211 pp
- Sousa, C.P., (2006) *The versatile strategies of Escherichia coli pathotypes: a mini review*. J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 12, pp 363-373.
- Stampi, S; De Luca, G; Zanetti, F. (2001). *Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents*. Journal of Applied Microbiology 91, pp 833 – 841.
- Standard, J., Abbis, S., Wood, J.M.: Combined Treatment with hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation to Reduce microbial contamination levels in pre-formed food packaging cartons. *J. Food Protect.* 46 (1983), pp 1060–1064.
- Stanier, R.Y.; Adelberg, E.A. and Ingraham, J.L. (1976). *Introduction to The Microbial World*. 4th ed. Prentice-Hall. Microbiología.
- Storz, G., Christma, M.F., Sies, H., Ames, B.N., (1987) *Spontaneous mutagenesis and oxidative amage to DNA in Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A. 84, pp 8917–8921.
- Todar K. Pathogenic E. coli in: Online textbook of bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> USA, 2008.
- Tutumi, M; Imamura, K; Hatano, S; Watanabe, T. (1973). *Antimicrobial action of peracetic acid*. Journal of the Food Hygiene Society of Japan 15, pp 116 – 20.
- US EPA. *Drinking Water, national primary drinking water regulation, final rules*. Fed. Registr 54: 27486-27541. U.S. Environmental Protection Agency 1989.
- US EPA. *Small Drinking Water Systems Handbook: A Guide to “Packaged” Filtration and Disinfection Technologies with Remote Monitoring and Control Tools*. U.S. Environmental Protection Agency. 2003.
- US EPA. *Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule*. Office of Water (4601), EPA 815-R-06-007. 2006.
- USEPA. *Ultraviolet light disinfection technology in drinking water application – an overview*. EPA 811-R-96-002 Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Ground Water and Drinking Water, 1996.
- Vosberg, H; Hoffmann-Berling, H., (1971) *DNA synthesis in nucleotide-permeable Escherichia coli cells: I. Preparation and properties of ether-treated cells*. Journal of Molecular Biology 58 (3), pp 739–753
- Wagner, M., Brumelis, D., Gehr, R., (2002) *Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent*. Water Environ Res 74, pp 33-50.
- Watson, H.E., (1908) *A note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant*. J. Hyg. 8 pp536–542.

- Weber, S., (2005) *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase*. BBA-Bioenergetics. 1707 (1), pp 1-23
- Welch, K.D., Davies, T.Z., Van Eden, M.E., Aust, S.D., (2002) *Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules*. Free radical Biolog Medicine 32, pp 577-873.
- White C., (1992) *The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, Third Edition, 1308 pp, Van Nostrand Reinhold.
- WHO. (2003). Quantifying selected major risks to health, environmental risk. En: The World Health Report 2003: Shaping the future (Organization WH ed), World Health Organization, Geneva.
- WHO. (2004). Guidelines for drinking water quality. World health organization, Geneva.
- Wikramanayake, G, Rubin, A.J., Sproul, O.J., (1984) *Inactivation of Naegleria and Giardia cysts in water by ozonation*. J. WPCF, Journal (Water Pollution Control Federation) p 56
- Wolfe, R.L., (1990) *Ultraviolet disinfection of potable water, current technical and research needs*. Envir. Sci. Technol., 1990; vol. 24(6):768-773.
- Wolff, S.P., Garner, A., Dean, R.T., (1986) *Free radicals, lipids and protein degradation*. Trends Biochem Sci. 11, pp 27-31.
- Yuan Z, Ni Y, Van Heiningen ARP (1997) *Kinetics of peracetic acid decomposition. Part I. Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching condition*. Can J Chem Eng. 75, pp 37-41.
- Zalazar, C.S., Labas, M.D., Martin C.A., Brandi, R.J., Alfano, O.M., Cassano, A.E., (2005), *The extended used of actinometry in the interpretation of photochemical reaction engineering data*. Chem. Eng. J. 109, pp 67-81.

**PAGINAS WEB CONSULTADAS:**

[www.oms.org](http://www.oms.org)

[www.who.int/country/arg/es](http://www.who.int/country/arg/es)

<https://www.unicef.org.ar/>

[www.indec.mecon.ar/](http://www.indec.mecon.ar/)

[www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)

<http://www.merckmillipore.com.ar/chemicals/dehydrated-culture-media/>

[www.paho.org/arg/](http://www.paho.org/arg/)