

TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TIANGUISTENCO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA AMBIENTAL

OPCIÓN IXTESIS

PROCESO DE OXIDACIÓN AVANZADA PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS
BACTERIAS *ESCHERICHIA COLI* Y *BACILLUS SUBTILIS*, EN UNA
SOLUCIÓN DE AGUA

**Que para obtener el Título de
INGENIERO AMBIENTAL**

PRESENTA

CITLALLI PASCUAL LOVERA

DIRECTORA:
DRA. ALMA NELI HERNÁNDEZ ARIAS

NOVIEMBRE 2024

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente el apoyo de la Dra. Alma Neli por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de tesis y estar al pendiente, por sus consejos, conocimientos que me compartió a lo largo de la carrera.

Agradezco el apoyo y guía de la Dra. Bethsabet, la Maestra Elena y el biólogo Luis que fueron los asesores y revisores de este trabajo realizado, me dedicaron el tiempo, consejos y sus conocimientos, corrigiéndome y llevando por buen camino, les agradezco de corazón el tiempo invertido.

Dedico este trabajo especialmente a mis padres que estuvieron y están en cada momento para mí, en especial en el trabajo de esta tesis y no desistir de titularme como Ingeniera Ambiental, también a mis hermanos por su apoyo siempre, los amo familia y gracias.

Agradezco principalmente a mi persona porque a pesar de los obstáculos que se me presentaron, se concluyó eficazmente el trabajo de tesis y por dedicarme un tiempo para trabajar en mi persona, que fue el necesario para seguir y no desistir de cumplir mis metas.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
Objetivos generales	10
Objetivos específicos	10
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	11
Antecedentes	11
Marco Teórico	13
1.1 Agua	13
1.2 Fuentes de Agua	14
1.2.1 Fuentes Convencionales	15
1.2.2 Fuentes no convencionales	15
1.3 Las aguas Residuales	16
1.3.1 Composición del agua residual, contaminantes	17
1.4 Microbiología del agua	18
1.4.1 Tipos de microorganismos	18
1.4.1.1 Bacterias	18
1.4.2 Bacterias indicadoras de contaminación de agua	19
1.4.2.1 Indicadores microbiológicos de contaminación fecal	21
1.5 <i>Escherichia coli</i>	22
1.5.1 Características	22
1.5.2 Medio y reproducción	23
1.6 <i>B. subtilis</i>	24
1.6.1 Características	25
1.6.2 Medio y reproducción	25
1.7 Procesos de Oxidación Avanzada	27

1.7.1 Ventajas y desventajas.....	28
1.7.2 Radical OH [·]	29
1.7.3 Procesos fotoquímicos.....	30
1.7.4 Procesos no fotoquímicos.....	31
1.8 Ozonización	32
1.9 Peróxido de Hidrógeno.....	33
1.10 O ₃ / H ₂ O ₂	36
CAPÍTULO 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	37
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
REFERENCIAS	48
ANEXOS	52
Pruebas preliminares.....	52
Preliminar 1 Tratamiento de <i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i> mediante UV/ H ₂ O ₂ /O ₃	52
Preliminar 2 Prueba de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en diferentes agares	52
Preliminar 3 Tratamiento de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> mediante UV/ H ₂ O ₂ /O ₃	53
Preliminar 4 Tratamiento de <i>B. subtilis</i> mediante H ₂ O ₂ /O ₃ obtención de dosis optima de H ₂ O ₂	54

Índice de Figuras y tablas

Fig. 1 Tinción de Gram <i>E. coli</i> _____	23
Fig. 2 Tinción Gram <i>B. subtilis</i> _____	25
Fig. 3 Ciclo de esporulación de <i>B. subtilis</i> (Errington, 2003) _____	26
Fig. 4 Proceso de formación del radical hidroxilo _____	30
Fig. 5 Formas de activación del Peróxido de Hidrógeno (Jones, 1999) _____	34
Fig. 6 Preparación medios de Cultivo _____	37
Fig. 7 Preparación de cultivos de microorganismos _____	37
Fig. 8 Lavado de medios _____	38
Fig. 9 Tratamiento y toma de muestras _____	39
Fig. 10 Diseño de Reactor Batch _____	41
Fig. 11 Tratamiento UV/H ₂ O ₂ /O ₃ (izquierda), tratamiento H ₂ O ₂ /O ₃ (derecha) _____	41
Fig. 12 UFC de <i>E. coli</i> _____	42
Fig. 13 Porcentaje de Supervivencia de <i>E. coli</i> _____	42
Fig. 14 Porcentaje de inactivación de <i>E. coli</i> _____	43
Fig. 15 UFC de <i>B. subtilis</i> _____	43
Fig. 16 Porcentaje de supervivencia de <i>B. subtilis</i> _____	44
Fig. 17 Porcentaje de inactivación de <i>B. subtilis</i> _____	44
Fig. 18 Tratamiento de <i>E. coli</i> mediante el proceso H ₂ O ₂ /O ₃ _____	45
Fig. 19 Tratamiento de <i>B. subtilis</i> mediante el proceso H ₂ O ₂ /O ₃ _____	45
Fig. 20 Tratamiento de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> UV/H ₂ O ₂ /O ₃ _____	52
Fig. 21 Prueba de Agares para <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> a) Agar Luria bertani, b) Agar Verde brillante, c) Agar Soya de Trypticaseina, d) Agar Eosina y Azul de Metileno _____	52
Fig. 22 Tratamiento de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> mediante UV/ H ₂ O ₂ /O ₃ _____	54
Fig. 23 Tratamiento de <i>B. subtilis</i> mediante H ₂ O ₂ /O ₃ con distintas dosis de H ₂ O ₂ _____	55
Tabla 1 Contaminantes del agua residual	17
Tabla 2 Potenciales de Oxidación	29

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

POAs	Procesos de Oxidación Avanzada
O ₃	Ozono
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
UV	Radiación Ultravioleta
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
°C	Grados Celsius
µL	Microlitros
h	horas
mL	Mililitros
LB	Medio Luria- Bertani
EAM	Agar Eosina y Azul de Metileno
ST	Agar soya de Tripticaseina
VB	Agar Verde Brillante
min	Minutos
s	Segundos
T	Tiempo
UFC	Unidades formadoras de colonias
Nm	nanómetros
OH°	iones hidroxilo
Mm	micrómetros
ATP	Trifosfato de adenosina
DOC	Carbono Orgánico Disuelto
MO	Materia orgánica
OD	Oxígeno disuelto
ICC	recuento de células intactas
pKa	logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (Ka)

RESUMEN

El objetivo principal es diseñar y construir un reactor BATCH, para evaluar la eliminación de la bacteria *E. coli* y *B. subtilis*, mediante procesos de oxidación avanzada (O_3/H_2O_2).

La presente investigación se dividió en dos partes: en la primera se establecieron las medidas y diseño del reactor Batch de tratamiento; en seguida se realizó la evaluación de la eliminación de las bacterias, determinando las condiciones óptimas, acondicionamiento del reactor, concentración y tiempo de contacto, como también las condiciones de crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis*.

Se realizaron pruebas preliminares para determinar dosis ideal de peróxido de hidrogeno, medios de cultivo selectivos para cuantificar las bacterias y evaluar el porcentaje de inactivación de cada bacteria. Se obtuvieron resultados eficaces de la eliminación de *E. coli* con un 99.99% de inactivación en un tiempo de tratamiento de 150 segundos, mientras para *B. subtilis* se obtuvo el 98.67% de inactivación con un tiempo de tratamiento de 12 minutos

Palabras claves: *B. subtilis*, eliminación, *E. coli*, Procesos de oxidación avanzada, Reactor Batch.

ABSTRACT

The main objective is to design a BATCH reactor, to evaluate the elimination of the bacteria *E. coli* and *B. subtilis*, through advanced oxidation processes (O_3/H_2O_2).

This research was divided into two parts: in the first, the measurements and design of the Batch treatment reactor were established; then, the evaluation of the elimination of the bacteria was carried out, determining the optimal conditions, reactor conditioning, concentration and contact time, as well as the growth conditions of *E. coli* and *B. subtilis*.

Preliminary tests were carried out to determine the ideal dose of hydrogen peroxide, selective culture media to quantify the bacteria and evaluate the percentage of inactivation of each bacteria. Effective results were obtained for the elimination of *E. coli* with 99.99% inactivation in a treatment time of 150 seconds, while for *B. subtilis* 98.67% inactivation was obtained with a treatment time of 12 minutes.

Keywords: *B. subtilis*, elimination, *E. coli*, Advanced oxidation processes, Batch Reactor.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las condiciones desfavorables en las que se encuentra el agua en estado natural limitan su uso por los seres humanos, debido a que el empleo de esta es capaz de perjudicar la salud de quienes la consumen. Debido a su importancia y vitalidad para los organismos vivos, el agua debe ser sometida a procesos de purificación con los cuales se llega a eliminar las impurezas que atentan contra la vida del consumidor. El agua contaminada por desechos humanos, animales o químicos ha sido la principal causa de graves enfermedades como la malaria, cólera, hepatitis A y E, etc. Los eventos infecciosos más drásticos han sido por el consumo de aguas contaminadas por desechos fecales.

En las aguas residuales existe gran variedad microbiana y dentro de las bacterias existen algunas especies que presentan la formación de estructuras de resistencia como las endoesporas, las cuales poseen un alto rango de resistencia a factores físicos como el calor, la congelación y la radiación. La desinfección es la fase más importante para contrarrestar la contaminación biológica, sin embargo, la desinfección es un proceso selectivo, no destruye ni elimina a todos los organismos presentes en el agua y no siempre elimina a los patógenos.

Por lo tanto, la presente investigación tiene como finalidad establecer las condiciones óptimas, concentración de H_2O_2 y tiempo de contacto para la eliminación de endoesporas de *B. subtilis* y *E. coli* mediante la combinación de proceso de oxidación avanzada O_3/H_2O_2 en un reactor Batch.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua es contaminada diariamente entre ellos principalmente por microorganismos, en algunos casos son patógenos, existen tratamientos para aguas residuales pero no se garantiza la eliminación de todos los microorganismos, ya que existen microorganismos más resistentes al cloro y otras sustancias de desinfección, uno de estos organismos es la bacteria *B. subtilis* que crea resistencia al calor y a la radiación, otra bacteria más común en el agua residual es la *E. coli*; es un parámetro para determinar si existe materia fecal en las aguas, además de que también crea resistencia a la desinfección. El agua contaminada por desechos humanos, animales o químicos ha sido la principal causa de graves enfermedades como la malaria, cólera, hepatitis A y e, meningitis, esticosis, entre otras. Una de las enfermedades más comunes es la diarrea. Para lograr la eliminación de estos organismos se utilizará los procesos de oxidación avanzada para no crear subproductos.

JUSTIFICACIÓN

La contaminación del agua a causa de los humanos, principalmente de desechos fecales representa una importante preocupación para la salud. Las aguas residuales domesticas siempre contienen microorganismos, de origen animal o humano, algunos de ellos son patógenos para el ser humano; Por lo tanto, el tratamiento de dichas aguas residuales debe de garantizar la eliminación de dichos patógenos.

Los tratamientos de aguas residuales y de potabilización de aguas se basan principalmente en el uso de cloro, debido a su efectividad para inactivar microorganismos y bacterias disminuyendo la ocurrencia de enfermedades, sin embargo, el uso de desinfectantes clorados puede resultar en la generación de productos secundarios de toxicidad muy variada. Los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) son alternativas para disminuir el uso de cloro, estos procesos presentan una ventaja en el proceso de tratamiento, al poder remover materiales no biodegradables y no generar subproductos dañinos en comparación con los procesos convencionales de desinfección, debido a su versatilidad permite que sea empleado con mezclas complejas de contaminantes y de organismos vivos. La mayoría de POAs puede aplicarse a la remediación de aguas, especialmente en pequeña o mediana escala. Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos o con métodos convencionales.

La *E. coli* es un patógeno entérico que vive en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, su presencia en el agua, es un indicador de contaminación fecal, es uno de los microorganismos más resistentes a la desinfección.

Las esporas de varias especies de *Bacillus* están metabólicamente latentes y extremadamente resistentes a una variedad de tratamientos severos, incluidos el calor, la radiación y productos químicos. Esta resistencia extrema es la principal razón por la que las esporas son los principales agentes causantes del deterioro de los alimentos y enfermedades transmitidas por los alimentos. Estas especies se detectan a menudo en suministros de agua potable, incluso en suministros tratados y desinfectados mediante procedimientos aceptables.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Diseñar un reactor BATCH, para evaluar la eliminación de la bacteria *E. coli* y *B. subtilis*, mediante procesos de oxidación avanzada (O_3/H_2O_2).

Objetivos específicos

- a) Diseñar y construir un reactor BATCH para la eliminación de la bacteria *E. coli* y *B. subtilis*, mediante procesos de oxidación avanzada (POAs) en específico O_3/H_2O_2 .
- b) Evaluar la eliminación de la bacteria *E. coli* y *B. subtilis* en una solución acuosa, mediante procesos de oxidación avanzada (POAs) en específico O_3/H_2O_2 .

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

Antecedentes

Los investigadores evaluaron la eficacia de la desinfección mediante la combinación de UV/O₃ en la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) en un poli reactor, utilizando una lámpara UV de baja presión (luz UV-C a 253,7 nm), el ozono se suministró a una concentración de 1.5 L/min, todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y pH 7,1. Los porcentajes calculados de UV, O₃ y HO° en la inactivación de *E. coli* fueron 58,1 %, 25,8% y 16,1% ; Las pruebas inactivaron 6.3 log, 6.0 log, 7.2 log y 7.6 log de células a los 80 s de tratamiento (Wu et al.,2015).

Se evaluaron la mejora de los efectos del H₂O₂ en el proceso de desinfección solar de aguas húmicas para la inactivación de esporas de *E. coli* y *B. subtilis*, se determinaron en muestras de agua con concentraciones de 0.2 y 6 mg/L de ácido fulvico. Se obtuvieron que las esporas de *B. subtilis* fueron más resistentes que las de *E. coli* contra los procesos de desinfección solar y solar/ H₂O₂, las esporas de ambas bacterias se vieron afectadas al aumento de la concentración de H₂O₂ a diferentes niveles. Fue encontrado los aumentos en la reducción logarítmica de *E. coli* y *B. subtilis* fueron de 1.67 log y 0.5 log, cuando la concentración de H₂O₂ fue elevada a 50 mg/L (Alkan et al., 2014).

Se comparó la inactivación de *E. coli* y bacteriografo MS2 por UV, O₃ y UV/O₃, los experimentos se realizaron con una longitud de onda de 254 nm de radiación UV, se dosificaron con una solución madre de ozono. Se encontró inactivación de *E. coli* después de la secuencia de O₃, UV o exposiciones al O₃-UV, los efectos sinérgicos de 0.5-0.9 log en la inactivación de *E. coli*, se observaron después de la radiación UV/O₃ a concentraciones de O₃ tan bajas como 0.05 mg/L en agua ultra pura, la exposición con 0.02 mg/L de O₃ no mejoró la inactivación, pero reprimió la foto-reactivación de *E. coli*, mientras en MS2 la inactivación fue menos significativa después de UV/O₃, y más significativo después de las exposiciones al O₃-UV y UV-O₃ que fue de 0.2 log para el primero y 0.8 log para los dos últimos proceso a dosis de O₃ de 0.1 mg/L y dosis UV de 8.55 mJ/cm² en agua ultra pura (Fang et al., 2013).

Evaluación de la inactivación de *E. coli*, Bacteriografo MS2 y esporas de *B. subtilis* en la ozonización de aguas residuales, se difundió ozono gaseoso (11%) en el agua enfriada, los

experimentos se realizaron agregando H_2O_2 a cada efluente secundario inmediatamente antes de la adición de O_3 . Los valores de CT (Concentración de ozono disuelto integrada en el tiempo) mayores de 9 mg-min/L fueron necesarios para medir la inactivación de esporas de *B. subtilis* y valores de CT de 1 y 2 mg-min/L se lograron mayores que 6- y 5- log en la inactivación de *MS2* y *E. coli* respectivamente (Gamage et al., 2013).

Los investigadores evaluaron el efecto en la resistencia de las esporas de *B. subtilis* mediante la inactivación foto catalítica, todos los experimentos se realizaron en agua destilada, la radiación UV se llevó a cabo en un reactor semi- discontinuo a una longitud de onda de 365nm, se probaron tres concentraciones diferentes de Fe(II)(0.0, 1.0 y 5 mM) usando la misma concentración de H_2O_2 (100 mM), y un pH de 3.0 usando 0.1 M H_2SO_4 . En condiciones acidas producen mejores resultados en la mortalidad para las esporas, las esporas de *B. subtilis* fueron inactivadas por la mezcla de Fe (II) 5 mM, radiación UV (365 nm) y H_2O_2 100 mM para generar 1 log (90%) de inactivación en 60 minutos (Huesca et al.,2017).

Mecanismo de inactivación del ozono en *E. coli* y *Enterococcus faecalis*, para los experimentos se utilizó 1mg/L de agua ozonizada con tiempos de contacto de 30 s, 1, 5, 10 y 20 min. Se inactivo *E. faecalis* en 30 s después del tratamiento con 1 mg/ L de O_3 , mientras que *E. coli* se inactivaron lentamente contra el tiempo, se necesitaron 20 min de tiempo de contacto con O_3 para una desinfección casi total (Barisci et al., 2018).z

Se demostró la eficacia de inactivación de *E. coli* y bacterias autóctonas durante la ozonización, la inactivación de *E. coli* alcanzo los límites de detección del método para FCM y ATP(1.7) en dosis de ozono de 0.5 g O_3 / g Doc, las bacterias autóctonas estaban compuestas por comunidades con alta y baja reactividad al ozono, los niveles de inactivación medidos con ATP intracelular se correlacionaron razonablemente con ICC(0.8). La dosis de 0,25 g O_3 / gDOC fue insuficiente para dañar todas las células bacterianas, sin embargo, una dosis de ozono de aproximadamente 0,4 g O_3 /g DOC reduco drásticamente el ICC (Czekalski et al., 2016).

Marco Teórico

1.1 Agua

Agua en el mundo y su problemática.

El agua es la fuente de toda la vida en la tierra. Su distribución es muy variable: en algunas regiones es muy abundante, mientras que en otras escasea.

El 97.5% del agua en la tierra se encuentra en los océanos y mares de agua salada, únicamente el restante 2.5% es agua dulce. Del total de agua dulce en el mundo, 69% se encuentra en los polos y en las cumbres de las montañas más altas y se encuentra en un estado sólido.

El 30% del agua dulce del mundial, se encuentra en la humedad del suelo y en los acuíferos profundos.

Solo el 1% del agua dulce en el mundo, escurre por las cuencas hidrográficas en forma de arroyos y ríos y se depositan en lagos, lagunas y en otros cuerpos superficiales de agua y en acuíferos.

Esta es agua que se repone regularmente a través del ciclo hidrológico.

Las aguas dulces constituyen un recurso escaso, amenazado y en peligro. De acuerdo con los estudios sobre los balances hídricos del planeta solamente el 0.007% de las aguas dulces se encuentran realmente disponibles a todos los usos humanos directos. De esta pequeñísima porción dependen procesos sociales vitales. Las más recientes evaluaciones de los especialistas y organizaciones internacionales conectadas con los problemas del agua, sugieren que para el año 2025 más de las dos terceras partes de la humanidad sufrirá algún estrés por la falta de este líquido (L'vovich et al. 1995, Simonovic 1999).

La supervivencia de la humanidad depende de la disposición de agua potable. Los ecosistemas acuáticos están mucho más degradados en comparación con los terrestres o marinos, afectando proporcionalmente a gran cantidad de especies y hábitats. El uso de aguas insalubres, saneamientos no efectivos y problemas de higiene suponen un 3,1 % de las muertes en el mundo. Siendo los niños de menos de cinco años los más afectados, llegando a representar un 90% del número total. Se estima que 2.500 millones de personas no tienen acceso a saneamientos avanzados.

Los cambios sobre la superficie terrestre, las modificaciones topográficas y la compresión de las capas de suelo, incluyendo la construcción de ciudades y el cultivo de distintas especies de plantas, tienen importantes repercusiones sobre los ciclos del agua. El uso de los recursos acuáticos para riego y los usos municipales e industriales del agua modifican sustancialmente el ciclo del agua, tanto cuantitativamente como cualitativamente. El impacto que tienen sobre el ciclo del agua el aumento de la población y de las actividades económicas en las sociedades de consumo, apareciendo lo que se denomina “Estrés hídrico”.

El cierre total o parcial del ciclo del agua representaría una parte esencial para un desarrollo sostenible. El aumento en la escasez de fuentes de aguas limpias para beber y el aumento del consumo de agua para industrias y agricultura deberían traducirse en un uso de los recursos acuáticos más eficiente y racional.

La calidad de las aguas se ve afectada por la contaminación ocasionada por microorganismos, trazas de metales, compuestos químicos tóxicos, introducción de especies no endémicas, cambios en la acidez, temperatura o salinidad.

En los últimos años se ha podido observar un aumento en la preocupación por la contaminación de las aguas en el mundo. Su control ha llegado a ser de prioritaria importancia en los países desarrollados y muchos de los que están en vías de desarrollo. Los elementos claves para la prevención, control y reducción de la descarga de sustancias peligrosas, nutrientes y otros contaminantes en los ecosistemas acuáticos, residen en el control de la contaminación desde la fuente y en la legislación sobre emisiones de aguas residuales por parte de las autoridades competentes.

1.2 Fuentes de Agua

La calidad del Agua depende de la geografía, clima y actividades antropogénicas, por lo que la correcta selección de la fuente de agua para abastecimiento público es fundamental en un proceso de tratamientos de potabilización, el cual puede abarcar desde el abastecimiento directo hasta el empleo de complejos y costosos sistemas de depuración.

Existen dos tipos de abastecimiento de agua, las convencionales y las no convencionales.

1.2.1 Fuentes Convencionales

Son aquellas que se han empleado tradicionalmente para el uso y consumo humano, debido a su fácil accesibilidad y bajo costo de extracción, dentro de este tipo de fuentes encontramos las aguas subterráneas y superficiales.

Aguas subterráneas

Son aquellas que se han filtrado desde la superficie de la tierra hacia abajo por los poros del suelo. Las formaciones del suelo y roca que se han saturado del líquido se conocen como depósitos de aguas subterránea o acuíferos (Henry & Heinke, 1999).

Las aguas subterráneas presentan grandes ventajas respecto a las superficiales, debido a que no son tan susceptibles a la contaminación, por lo que representan, en su mayoría una buena calidad de agua, debido a que la carga bacteriológica es mucho menor y carece de turbiedad.

Aguas Superficiales

El abastecimiento de agua superficial se puede efectuar a partir de arroyos, ríos, lagos, manantiales y presas. La localización y elevación de la fuente de agua puede ofrecer la ventaja de aprovechar la fuerza de gravedad y facilitar la distribución (Jiménez Cisneros, 2001). La utilización de las aguas superficiales como fuente de abastecimiento de agua, tiene la ventaja de soportar un alto grado de explotación.

Agua de lluvia

El uso directo de agua de lluvia es una fuente limitada de agua, aunque importante en algunas áreas que están lejos de las fuentes de agua dulce, pero que reciben precipitación pluvial con regularidad (Henry & Heinke, 1999). La recolección y el almacenaje del escurrimiento directo de los techos puede ser una fuente segura de agua, con una lluvia irregular, aunque los tanques deben de estar protegidos contra la contaminación y la entrada de mosquitos, pueden surgir problemas de salud (Tebbutt, 1990).

1.2.2 Fuentes no convencionales

Este tipo de fuentes son utilizadas cuando existe escases de agua, derivada de la sobre explotación de las aguas superficiales y subterráneas; la calidad de estas fuentes es poco

aceptable, por lo que son tomadas como última opción para abastecer a una población, estas fuentes pueden ser agua de mar, agua residual tratada e incluso icebergs.

Agua de mar

Esta contiene grandes cantidades de sal, cuya eliminación resulta altamente costosa, existen diferentes técnicas, para la eliminación de sal; una es la destilación, la cual consiste en la evaporación y condensación del agua; otra técnica es la congelación donde se reduce la temperatura del agua hasta su punto de fusión, separando la salmuera de los cristales de hielo; la electrodiálisis es otro método, que consiste en un movimiento forzado de iones cargados a través de membranas permeables a los cationes o aniones; sin embargo, uno de los métodos más conocidos es la osmosis inversa, donde se emplean membranas permeables y para este caso la fuerza impulsora es la presión que suministran las bombas.

Agua Residual Reciclada

Son aquellas que han recibido el tratamiento suficiente para volver a ser utilizadas directamente en la industria y en la agricultura, y para ciertas aplicaciones municipales limitadas. La reutilización del agua se clasifica, según su uso, en: municipal, industrial, agrícola, de recreo y para recarga de acuíferos (Jimenez Cisneros, 2001).

1.3 Aguas residuales

Las aguas residuales urbanas abarcan comúnmente aguas domésticas, industriales y de escorrentías. Las aguas domesticas tienen distintas procedencias, incluyendo zonas residenciales, comerciales, institucionales y recreativas.

En los hogares, el agua corriente es empleada para diversos propósitos: lavado, baño, cocina y transporte de desechos. En cuanto a las aguas de desecho producidas, son de dos tipos: las aguas “negras”, procedentes de los váteres, y las “grises”, de la cocina y baños. Estas pueden ser canalizadas de forma combinada o por separado. Generalmente, cuanto más rica es una comunidad, más tendencia hay a separar las aguas negras.

En el sector industrial, la demanda de agua y la producción asociada de agua residual, dependen de cada proceso específico. Algunas industrias requieren grandes volúmenes de agua para refrigeración, procesos, limpieza, transporte de productos o eliminación de desechos. Según la industria, la composición de los efluentes de desechos varia

significativamente. Además, las aguas residuales industriales pueden contener una amplia variedad de microcontaminantes que añaden dificultades a los tratamientos urbanos de las aguas residuales.

1.3.1 Composición del agua residual, contaminantes.

El agua residual puede ser caracterizada por sus principales contaminantes:

Tabla 1 Contaminantes del agua residual

Contaminante	Importancia	Origen
Sólidos sedimentables	Pueden generar depósitos de fangos o condiciones anaerobias en los sistemas de alcantarillado, instalaciones de tratamiento o entornos acuáticos.	Doméstico, escurrientías
Materia orgánica (DBO)	Consumen oxígeno y pueden distorsionar el equilibrio en aguas superficiales; cuando el oxígeno se agota, aparecen condiciones anaerobias, malos olores, mueren los peces, y se produce desajuste ecológico.	Doméstico, industrial
Microorganismos patógenos	Riesgos severos para la salud de las poblaciones a través de enfermedades transportadas por medio del agua como por ejemplo el cólera.	Doméstico
Nutrientes (N y P)	Excesivas cantidades de nitrógeno y fósforo en aguas superficiales provocan el crecimiento desmesurado de algas (eutrofización). La muerte de estas algas además contribuye al aumento de materia orgánica.	Doméstico, rural, escurrientías, industrial.
Microcontaminantes (metales pesados y compuestos orgánicos)	Los compuestos orgánicos no biodegradables pueden ser tóxicos, carcinógenos o mutágenos a muy bajas concentraciones. Algunos pueden bioacumularse en las cadenas tróficas	Industrial, rural, escurrientías (pesticidas)
Sólidos totales disueltos (sales)	A altos niveles pueden restringirse las aguas para uso en agricultura, irrigación o acuicultura	Industrial (intrusiones de agua salada)

1.4 Microbiología del agua

Todo microorganismo debe tener en su medio las unidades estructurales y las fuentes de energía (nutrientes) necesarias para formar y mantener su estructura y organización; casi todos los organismos vivos requieren fuente de carbono, energía, nitrógeno, agua y minerales (Romero, 1999).

Los organismos se dividen en autótrofos y heterótrofos. Los organismos autótrofos son capaces de sintetizar sus requerimientos orgánicos a partir de la materia inorgánica y pueden crecer independientemente de las sustancias orgánicas externas, empleando dos métodos, la fotosíntesis y la quimio síntesis. Los organismos heterótrofos requieren una fuente externa de materia orgánica.

La variedad microbiológica de las aguas naturales abarca numerosos microorganismos e incluye células eucariotas (algas, protozoarios y hongos), células procariotas (bacterias) y virus (microorganismos con capacidad de síntesis nula).

1.4.1 Tipos de microorganismos

La microbiología estudia células pertenecientes a dos grandes grupos, las eucariotas y las procariotas. Las primeras son aquellos organismos unicelulares o multicelulares que poseen un núcleo, además de poseer mitocondrias y cloroplastos presentes solo en células capaces de realizar la fotosíntesis. Las células procariotas son aquellas cuya estructura es sencilla y no poseen un núcleo verdadero, es decir las bacterias. (Apella & Araujo, 2005)

1.4.1.1 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que se encuentran en diferentes medios por ejemplo en el aire, suelo, agua natural y aguas residuales, su forma de reproducción es mediante fisión binaria. Su tamaño es diverso en función de la especie variando desde 0.1-0.2 μm de ancho a 5-10 μm de largo, aunque hay bacterias grandes que alcanzan 0,5 mm de largo (Madigan et al., 2003). Sus formas también son variadas, lo que permite su identificación y clasificación; algunas bacterias tienen la capacidad de formar esporas. El esporo es un elemento de protección frente a radiaciones, desecación, temperatura, altas presiones y frente a la entrada de sustancias químicas.

Debido al gran número y diversidad de especies bacterianas, en 1884 el bacteriólogo danés Christian Gram, ideó una técnica de tinción diferencial como primer paso en la diferenciación bacteriana. De esta manera, se establecen dos grandes grupos bacteriológicos: las bacterias Gram positivas, que se visualizan de color azul-violeta y las bacterias Gram negativas, cuyo color es rojo-rosáceo. Los fundamentos de esta técnica se basan en la diferencia estructural existente entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas; la pared celular de las Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano o mureína, principal componente de la pared, formado por finas láminas de dos derivados de azúcares, N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico y un pequeño grupo de aminoácidos. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las Gram negativas es delgada y se encuentra unida a una membrana plasmática externa. Este peptidoglicano es la clave de la tinción de Gram. (Gamazo et al., 2005)

1.4.2 Bacterias indicadoras de contaminación de agua

La gran mayoría de los cuerpos de agua en el mundo están contaminados, esto se debe a los diferentes arrastres, lixiviaciones, erosiones y procesos de intemperie por los que pasa toda agua natural, como consecuencia los cuerpos receptores tendrán gran florecimiento bacteriano, así como gran cantidad de nutrientes como nitratos y fosfatos, material orgánico como hojas y ramas, y de igual forma se encontrarán contaminantes inorgánicos producto de las actividades humanas. Los contaminantes no representan problema alguno para los cuerpos receptores de agua, siempre y cuando estos no rebasen su capacidad de carga y auto purificación. Aquellos que provocan problemas comprenden organismos causantes de enfermedades conocidos como patógenos, materia orgánica, sólidos, nutrientes, sustancias tóxicas, color, espuma, calor y materiales radiactivos.

- **Patógenos:** son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped. Los agentes patógenos tienen diversas propiedades que los distinguen de otros contaminantes del agua de consumo, aspectos que se deben de tomar en cuenta al aplicar los tratamientos de desinfección:
 - Son componentes que no están disueltos en el agua.

- Con frecuencia forman agregados o se adhieren a sólidos en suspensión presentes en el agua, lo que puede influir en la disminución de la efectividad de los tratamientos aplicados.
- La probabilidad de que el ataque de un patógeno tenga éxito, derivando en infección, depende de su carácter invasivo y de la virulencia del patógeno, así como de la inmunidad de la persona expuesta.
- Si la infección se asienta, los agentes patógenos se multiplican en el hospedador. Algunas bacterias también son capaces de proliferar en alimentos o bebidas, lo cual aumenta las posibilidades de infección.
- **Materia orgánica (MO):** cuando mayor es la demanda biológica de oxígeno (DBO), esto es, cuanta más materia orgánica está presente, mayor es el problema que crean la descomposición de la misma. La actividad metabólica de las bacterias que necesitan oxígeno puede reducir el contenido normal de oxígeno disuelto (OD) en una corriente o lago hasta menos de 1 mg/L, abajo del cual la mayor parte de los peces son incapaces de sobrevivir.
 - **Sólidos:** los particulados orgánicos e inorgánicos en las aguas residuales son sólidos sedimentables, flotantes y en suspensión capaces de reducir la penetración de la luz solar en el agua.
 - **Nutrientes:** los nitratos y fosfatos favorecen el crecimiento de plantas y algas que pueden ocasionar la eutrofización del cuerpo de agua, además de representar un problema en la obstrucción de los filtros y el tratamiento químico del agua se vuelve costoso.
 - **Sustancias tóxicas y peligrosas:** concentraciones bajas de ácidos, cáusticos, cianuro, arsénico, muchos metales pesados y numerosas sustancias químicas son tóxicas para los organismos vivos, incluso para los humanos.
 - **Otros contaminantes:** el color, la espuma y el calor son otros contaminantes que causan problemas, no son objetables solo por razones estéticas; también limitan la penetración de la luz y pueden reducir los

niveles de OD, lo cual altera el equilibrio ecológico natural del agua (Henry & Heinke, 1999).

1.4.2.1 Indicadores microbiológicos de contaminación fecal

La rutina de los análisis microbiológicos en el agua está basada en la detección de microorganismos asociados que comparten los mismos hábitats, pero cuya detección y aislamiento es más viable desde un punto de vista técnico y económico. Estos microorganismos se conocen como indicadores de contaminación fecal y se rigen de acuerdo a los siguientes criterios:

- Ser fáciles de aislar y cultivar en el laboratorio
- Estar presentes siempre que existan agentes patógenos entéricos
- Ser relativamente inocuos para el hombre
- Ser integrantes de la micro biota intestinal
- No multiplicarse en aguas naturales generando un valor superior al real.
- Mantener un grado de eliminación durante el tratamiento similar al de los patógenos.

Según el destino final al cual se dirige un tipo de agua, los indicadores bacterianos objeto de análisis van a ser diferentes, a continuación, se describen los indicadores más comúnmente analizados en el marco del control de la calidad del agua.

El grupo de los coliformes lo constituyen bacterias gram negativas habituales de la región intestinal de mamíferos y aves. Se caracterizan por su capacidad de fermentación de lactosa a 35-37°C. Géneros que forman parte de este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Pueden existir como saprofitos independientes o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* que solo puede ser fecal. Por tanto, se pueden diferenciar los coliformes totales que comprenden todos los coliformes de cualquier origen y los coliformes fecales, que designan solo a los coliformes de origen exclusivamente intestinal, con la capacidad adicional de fermentar la lactosa también a 44,5 °C.

1.5 *Escherichia coli*

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su honor (Donnenberg, 2002)

La *E. coli* es la bacteria más encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies de animales, su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa e intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño, por el contrario, muchas cepas de *E. coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas que tienen efecto inhibitorio sobre todas las cepas potencialmente patógenas, por tanto, la colonización del intestino es benéfica para el hospedero (Romero Cabello, 2001)

1.5.1 Características

Son bacterias Gram negativas cilíndricas con 1.1-1.5 µm de diámetro por 2.0-6.0 µm de largo, se disponen aisladas o en parejas. Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenece, son bacterias quimio heterótrofas, anaerobias facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato o nitrito (Faleiro Naves, 2010).

Las principales pruebas fisiológicas que distinguen *E. coli* de las demás especies son la producción de indol, la reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa y la fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz & Strockbine, 2005).

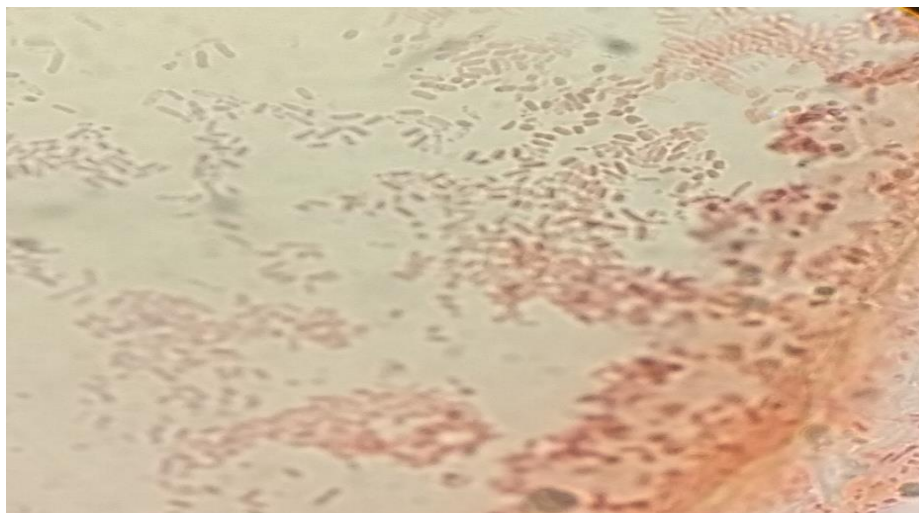


Fig. 1 Tinción de Gram *E. coli*

1.5.2 Medio y reproducción

Medio

E. coli es la especie predominante de la micro biota 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. 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 señalada como indicador de contaminación fecal. Se m puede encontrar en el medio ambiente, ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y en los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal (Blanco, y otros, 2002; Todar, 2008).

El intestino humano es colonizado por *E. coli* en las primeras 40 horas tras el nacimiento, se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida una misma cepa puede permanecer indefinidamente (Prescott, Harley, & Klein, 2002).

Reproducción

La *E. coli* de tipo silvestre es protótrofa y puede crecer en un medio mínimo que solo contenga glucosa y algunas sales orgánicas. En la mayoría de las condiciones se divide una vez por hora, aunque en un medio enriquecido que contenga más azúcares y aminoácidos, se dividirá cada 20 minutos. Por lo general se reproduce por fisión binaria simple, en la cual el

cromosoma único de la bacteria se multiplica y migra a los extremos opuestos de la célula, seguido por la división celular, por lo que da lugar a dos células hijas idénticas (Pierce, 2009)

Enfermedades y clasificación

La *E. coli* como patógeno es capaz de causar casos aislados o brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC), cuyas características principales se describirán brevemente.

E.coli enterotoxigénica

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).

Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y auto limitada pero también puede ser grave.

1.6 *B. subtilis*

El género *Bacillus* pertenece a un grupo de bacterias bastante conocida, diferentes tipos de especies muy utilizadas en la actualidad especialmente en la industria de la fermentación (Zukowski, 1992). La mayoría de las cepas de *Bacillus* son microorganismos mesófilos que crecen rápidamente, produciendo colonias de buen tamaño hasta en 24 horas a una temperatura específica.

B. subtilis se clasifica dentro del grupo dos de seis, el cual esta formado por bacterias que comparten la característica de catalizar un amplio rango de carbohidratos por las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) y de pentosas fosfato (Priest, 1993).

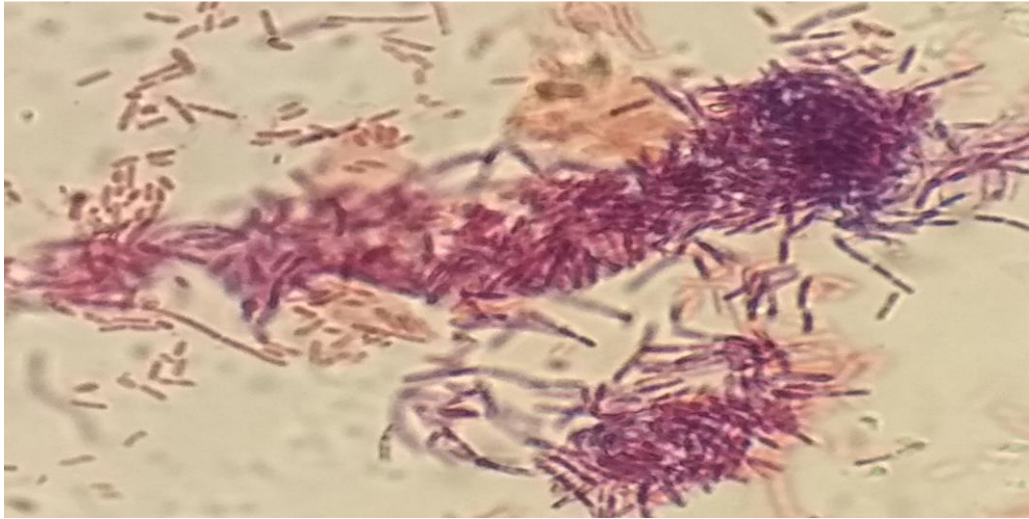


Fig. 2 Tinción Gram *B. subtilis*

1.6.1 Características

El género *Bacillus* son bacilos aerobios y anaerobios facultativos Gram positivos, producen endoesporas con morfología oval o cilíndrica que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5-8.5 (Snay et al., 1989)

1.6.2 Medio y reproducción

Medio

B. subtilis se encuentra ampliamente distribuido en los suelos agrícolas, raíces de las plantas y en el tracto gastrointestinal de los animales, así también, en agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y en la Antártida. Igualmente *B. subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especies de cacao, legumbres, semillas y pan. (Slepecky, 1992)

Reproducción

Al terminar el crecimiento exponencial de un cultivo de *B. subtilis* se llevan a cabo una serie de cambios en las células tanto estructurales como metabólicos, los cuales culminan con la

formación de esporas. Los principales estímulos para el inicio de la esporulación, es una densidad celular alta y la limitación por algún nutriente. El proceso de esporulación comprende varios estadios. El estadio cero se inicia con una respuesta al agotamiento de nutrientes y a la producción de péptidos que detecta y responden a una alta concentración celular. El inicio de la esporulación es regulado por la proteína de unión a DNA Spo0a, la cual actúa como regulador maestro del proceso y tiene influencia directa o indirectamente, sobre la expresión de más de 500 genes durante los estados tempranos de desarrollo de *B. subtilis* (Molle et al., 2003) En el estadio II se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y el estadio termina con la formación de un septo en un polo de la célula. En el estadio III ocurre el engullimiento de la pre espora. Del estadio IV al VII, hay la formación de la corteza y de la cubierta, la maduración de la espora y la lisis celular. La duración de cada etapa es de aproximadamente 1 hora (Errington.1993).

Durante esta serie de eventos de la esporulación se forman dentro de un mismo cuerpo dos células; la célula madre y la pre espora, las cuales mantienen una comunicación para poder, en conjunto y de una forma metabólica ordenada, formar la espora.

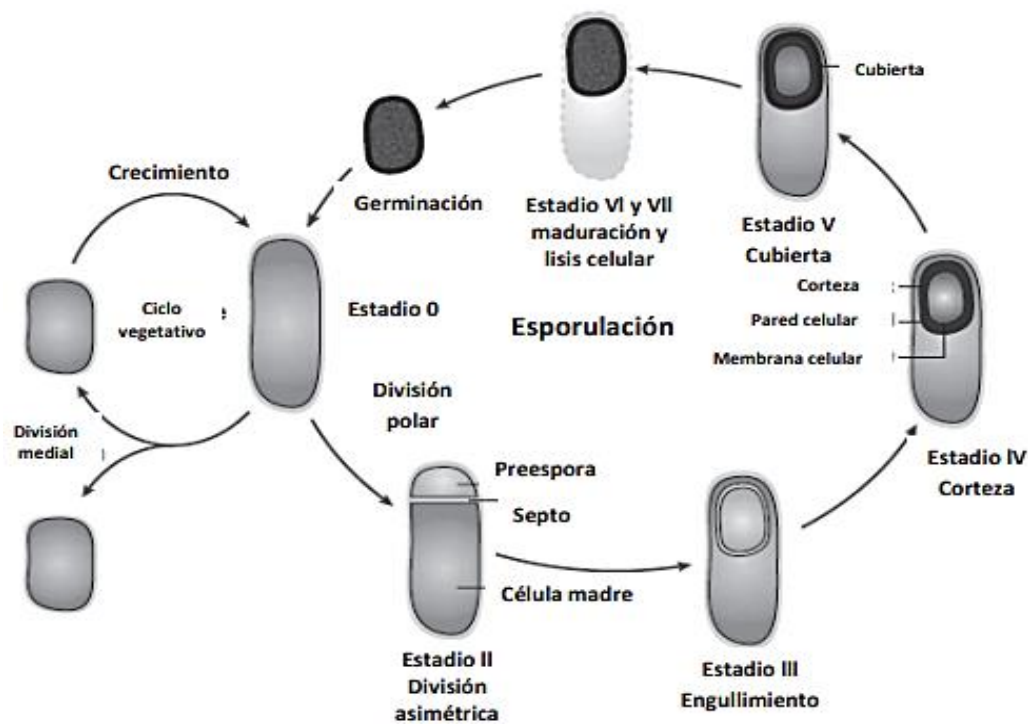


Fig. 3 Ciclo de esporulación de *B. subtilis* (Errington, 2003)

Esporulación

La esporulación en *B. subtilis* es inducida por inanición, el programa de desarrollo de esporulación no se inicia inmediatamente cuando el crecimiento se ralentiza debido a la limitación de nutrientes. Unas variedades de respuestas alternativas pueden ocurrir:

- La activación de la motilidad flagelar para buscar nuevas fuentes de alimento por quimiotaxis
- La producción de antibióticos para destruir los microbios del suelo competidores
- La secreción de enzimas hidrolíticas para eliminar proteínas extracelulares y polisacáridos, o la inducción de 'competencia' para la captación de ADN exógeno para el consumo, con el efecto secundario ocasional de que la nueva información genética se integra de manera estable.

La esporulación es una última respuesta a la inanición, y se suprime hasta que las respuestas alternativas resultan inadecuadas. Incluso entonces, se deben cumplir ciertas condiciones, como la integridad cromosómica, el estado de replicación cromosómica y el funcionamiento del ciclo de Krebs. La esporulación requiere mucho tiempo y energía, y es esencialmente irreversible, por lo que es crucial que una célula monitoree su entorno de manera eficiente y garantice que la esporulación se embarca solo en los momentos más apropiados. La decisión equivocada puede ser catastrófica: una célula vegetativa morirá si las condiciones son demasiado duras, mientras que las esporas formadoras de bacterias en un ambiente propicio para el crecimiento vegetativo serán superadas. En resumen, el inicio de la esporulación es una red muy estrechamente regulada con numerosos puntos de control para un control eficiente. Dos reguladores transcripcionales, σ^H y Spo0A, juegan un papel clave en el inicio de la esporulación. Participan varias proteínas adicionales, principalmente mediante el control de la concentración acumulada de Spo0A~P. Spo0A se encuentra al final de una serie de reacciones de fosfotransferencia interproteica, Kin-Spo0F-Spo0B-Spo0A, denominadas "fosforelay".

1.7 Procesos de Oxidación Avanzada

Los procesos de oxidación avanzada o POA se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes que involucran la generación y uso de especies poderosas transitorias, principalmente el radical hidroxilo (OH).

La generación de estos radicales se realiza a partir de oxígeno, agua oxigenada y catalizadores soportados, por lo que los subproductos de reacción son únicamente agua y dióxido de carbono (Monge, Silva, A. y Bengoa, 2018)

La mayoría de estos pueden aplicarse a la remediación y destoxificación de aguas especiales, generalmente en pequeña o mediana escala. Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos o con métodos convencionales, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos

Los POA se pueden clasificar de diversas formas, entre ellas se encuentran los procesos no fotoquímicos y procesos fotoquímicos en función de la participación de la luz en el proceso (Monge et al., 2018).

1.7.1 Ventajas y desventajas

Se presentan algunas ventajas con las que cuentan los procesos de oxidación avanzada y a su vez, las desventajas que pueden presentar al aplicarlos.

Ventajas

- Consiguen la mineralización completa del contaminante
- No solo cambian la fase del contaminante, sino que lo transforman químicamente
- No generan barros, por lo cual no se requiere de un proceso de tratamiento y/o disposición
- Eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes, medicamentos y oxidantes residuales.

Estas técnicas, deben su eficiencia a los procesos involucrados que poseen una mayor factibilidad termodinámica y una velocidad de oxidación muy incrementada por la participación de radicales, principalmente el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), esta especie posee propiedades que lo hace capaz de atacar virtualmente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar de 106 a 1012 veces más rápido que oxidantes alternativos como el O_3 . En la siguiente tabla, se presentan los potenciales de oxidación de distintas especies (Doménech et al., 2002).

Tabla 2 Potenciales de Oxidación

Especie	Potencial en volts (E°) a 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
Acido hipocloroso	1.49
Cloro	1.36
Bromo	1.09
Yodo	0.54

Desventaja

- Es necesario la mano de obra especializada
- Elevado costo, especialmente cuando se habla de ozono y luz ultravioleta.
- En algunos casos, necesitan tiempos de reacción elevados.
- Pueden formar subproductos de reacciones indeseables en algunos casos.

1.7.2 Radical OH·

Los radicales OH· pueden ser generados por medios fotoquímicos usando como fuente la luz solar o fuentes artificiales de luz ultravioleta, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica. Si la degradación ocurre por excitación directa de la luz, es llamada fotólisis, mientras que, si usa sensibilizadores, estos son compuestos inorgánicos u orgánicos que absorben la radiación ultravioleta y producen los radicales hidroxilos (OH·), anión radical super-óxido (O₂⁻).

Muchas degradaciones de los contaminantes orgánicos con los foto-sensibilizadores producen mineralización, formándose una variedad de compuestos inorgánicos, tales como

CO₂, H₂O, NO₃⁻, haluros, fosfatos. Los radicales hidroxilos (OH·) se pueden formar a partir del oxígeno, del peróxido de hidrógeno e incluso sólo a partir del agua. Una vez formado el radical hidroxilo, cuando reacciona se reduce a agua.

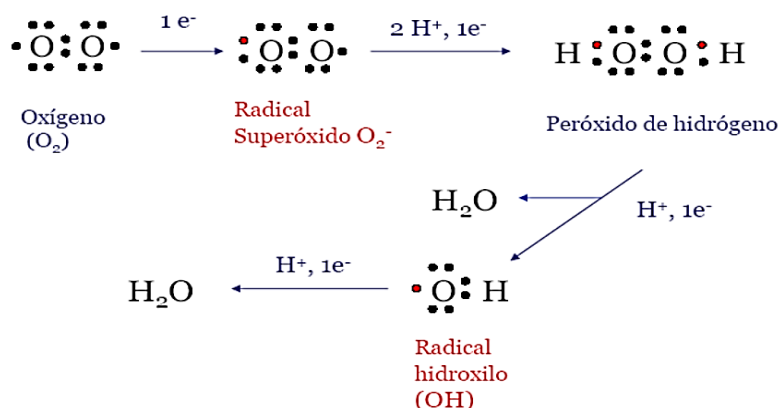
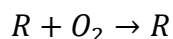
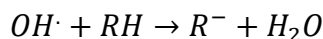


Fig. 4 Proceso de formación del radical hidroxilo (Terán, 2016)

Los radicales OH· generados en disolución son los responsables de la oxidación de los compuestos orgánicos por captura de hidrógeno y formación de un radical orgánico (Ec. 1), que puede reaccionar con el oxígeno atmosférico formando peroxirradicales (Ec. 2) que dan lugar a una serie de reacciones de degradación oxidativa, alcanzando en algunos casos la mineralización completa de la materia orgánica.



1.7.3 Procesos fotoquímicos

Los procesos fotoquímicos consisten en el uso de luz, generalmente luz solar para crear una tecnología ecológica. Esta radiación puede actuar directamente en el sistema o funcionar como una fuerza impulsora detrás de la activación de un fotocatalizador. La degradación de los contaminantes es posible con una radiación con una longitud de onda adecuada. Una de las principales ventajas de estas tecnologías es que cuentan con una degradación directa, en otras palabras, no es necesario el uso de un reactivo químico o de reactivos oxidantes por consiguiente se reduce el costo, el riesgo para la salud y daños al ambiente.

En estos procesos fotoquímicos se pueden encontrar:

- **Ultravioleta al vacío:** En este proceso se aprovecha la irradiación de las longitudes de onda. Es una técnica que aún se encuentra en una etapa de desarrollo, sin embargo, se usa para la degradación de contaminantes en aguas y en las corrientes de aire con alta humedad.
- **Fotocatálisis:** Se emplea radiación UV y/o visible como fuerza motriz de tratamiento. Este proceso causa la aceleración de una reacción fotoquímica mediante la presencia de un catalizador, que da lugar a la eliminación de materia orgánica y metales pesados disueltos en el agua residual. La fotocátalisis se aplica cuando el contaminante por sí mismo no es capaz de capturar fotones, y por lo tanto se requiere el uso de un catalizador que absorbe la energía radiante y acelera la oxidación (Monge et al., 2018).
- **Foto-fenton:** Es un método eficiente, pero tiene la desventaja de requerir el agregado continuo de H_2O_2 y el mantenimiento de condiciones ácidas. Los usos más frecuentes de esta tecnología han sido usados en el tratamiento de aguas industriales, suelos y lixiviados

1.7.4 Procesos no fotoquímicos

Los procesos de oxidación no fotoquímicos originan especies muy reactivas, principalmente el radical hidroxilo, este proceso es a través de la transformación de especies químicas o mediante la utilización de distintas formas de energía, a excepción de la irradiación luminosa.

A continuación, se mencionan algunos de estos tipos de procesos que se pueden encontrar:

- **Ozonización:** Este proceso es mayormente usado en la mineralización de materia orgánica, mediante reacciones lentas y selectivas. El ozono es usado en la purificación de agua y puede ser aplicado en diferentes etapas, unas de ellas son en el pretratamiento o en la finalización de la purificación. La eficacia del ozono dependerá de la contaminación que tiene el agua tratar.
- **Oxidación electroquímica:** Son los procesos más sencillos, podemos encontrar la electro-oxidación u oxidación anódica (oA). Las aplicaciones de corriente eléctrica entre dos electrodos adecuados en agua producen reacciones químicas primarias que se dedican a la destrucción de los compuestos orgánicos y se basan

en la acción de los ánodos de una celda electrolítica. Este proceso genera H_2O_2 y se alimenta con O_2 o aire.

- **Proceso de fenton:** Es un método clásico para la producción de radicales $\text{OH}^\cdot$; el cual se basa en la interacción de sales de hierro ferroso (Fe^{2+}) con una presencia de H_2O_2 añadidos en un medio ácido. Y es que, el hierro es un catalizador que no se consume durante el proceso, al contrario, se regenera.

1.8 Ozonización

El ozono es utilizado para la mineralización de moléculas orgánicas, aunque implica el uso de dosis altas de ozono y el encarecimiento del proceso.

En la potabilización del agua el ozono se puede aplicar en diferentes fases o etapas del proceso:

- Pre-ozonización: se realiza al principio del tratamiento incorporando el ozono al agua bruta, a la vez que se realiza una primera desinfección, se puede eliminar el hierro y manganeso, como también, ayudar al proceso de coagulación, especialmente en aguas con elevada dureza.
- Ozonización intermedia: se puede aplicar antes de la filtración, además de oxidar la materia orgánica natural, favorece su eliminación biológica en los filtros de arena.
- Post-ozonización: se emplea en la fase final, a la salida de la planta.

Como su costo es caro, una buena estrategia es la utilización de la ozonización como pre-tratamiento, ya que los productos de la oxidación parcial con ozono son generalmente más fácilmente biodegradables que sus precursores.

Proceso de Ozonización

La eficacia de la ozonización depende de la contaminación química y biológica del agua a ser tratada, del tiempo de contacto y de la concentración de ozono. Los componentes de un sistema de ozonización son los siguientes:

1. Preparación del gas de alimentación
2. Generación del ozono
3. Contacto del ozono que suele realizarse por difusores de burbuja o mediante inyectores del tipo venturi.

4. Destrucción del ozono que se realiza por destrucción térmica o bien por destrucción catalítica con catalizadores de paladio, óxido de níquel o manganeso

Aplicaciones

La ozonización es una técnica de oxidación química con una gran variedad de aplicaciones, que incluye: desinfección, oxidación de micro contaminantes orgánicos recalcitrantes, oxidación de contaminantes inorgánicos, eliminación de color y sabor, potabilización de aguas y depuración de aguas residuales (Bablon, 2005).

La acción del ozono es conveniente para el tratamiento de especies químicas que contienen sitios nucleofílicos caracterizados por la presencia del O, N, S o P. Debido a la acción del ozono, sustancias como aminas, pesticidas y especies aromáticas pueden ser transformadas y llevadas a un estado en el cual su biodegradabilidad puede realizarse fácilmente.

En muchos casos y dependiendo del tipo de efluente, la eliminación de la materia orgánica implica el uso de altas dosis de ozono, incrementando el coste del tratamiento. La dosis de ozono a utilizar disminuye considerablemente cuando el objetivo es aumentar la biodegradabilidad del efluente, en vez de buscar la mineralización de la materia orgánica.

1.9 Peróxido de Hidrógeno

Es un compuesto químico representado con la fórmula empírica H_2O_2 . Aunque es considerado un compuesto inodoro, el peróxido de hidrógeno presenta un olor dulce a altas concentraciones de vapor.

Este compuesto es comercialmente presentado en solución acuosa en concentraciones -98% por peso de H_2O_2 . La solución acuosa se caracteriza por ser más densa, ligeramente más viscosa y por contar con un punto de ebullición elevado, así como un punto de congelamiento bajo con respecto al agua.

Las soluciones de H_2O_2 reaccionan en presencia de materiales oxidantes, sin embargo, debido a su punto de inflamabilidad no muestran reactividad ante golpes e impactos, como también tienen la capacidad de descomponerse en agua y oxígeno, dando como resultado una reacción exotérmica. Su velocidad de reacción se incrementa drásticamente en presencia de temperaturas altas o contaminantes.

Actualmente el peróxido de hidrógeno se está empleando de manera innovadora y versátil en el tratamiento de aguas residuales presentándose como un efectivo oxidante de materia orgánica.

Formas de activación y descomposición

El peróxido de hidrógeno es considerado como un oxidante intermedio con base en el rango de potenciales de oxidación, y puede lograr algunas oxidaciones por sí mismo, pero en la mayoría de las aplicaciones, requiere activación de alguna u otra manera, se activa en presencia de una gran variedad de entidades químicas orgánicas e inorgánicas.

La baja reactividad intrínseca del compuesto representa una ventaja importante que permite ser activado selectivamente para realizar una oxidación determinada.

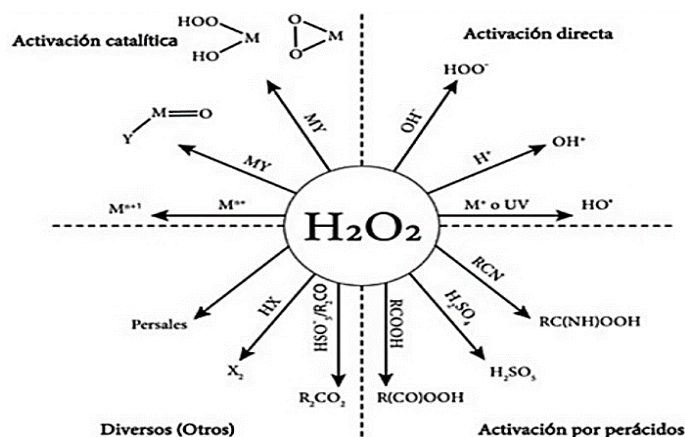


Fig. 5 Formas de activación del Peróxido de Hidrógeno (Jones, 1999)

Generalmente, la activación del peróxido de hidrógeno por iones metálicos de transición es un método elegido, aunque en gran número de casos, el metal de transición puede dar problemas ambientales y de disposición, mientras tanto, las reacciones con compuestos orgánicos pueden proporcionar una alternativa en la activación de iones metálicos.

En soluciones alcalinas, se disocia; mientras que en condiciones altamente ácidas, puede ser protonado o convertirse en un equivalente del catión hidroxil.

En la descomposición, a pesar de sus características de oxidación, el H_2O_2 es un metabolito natural de diversos organismos y al descomponerse, produce oxígeno y agua. Al formarse por la acción de los rayos del sol en el agua, mediante un sistema de purificación natural para

nuestro ambiente, no muestra problemas de liberación de gas o residuos químicos asociados como ocurre con otros oxidantes.



El peróxido de hidrógeno es una fuente efectiva de radicales hidroxilos ($E^\circ = 2.8V$), produce 2 ($OH^\cdot$) por cada molécula de H_2O_2 (Song et al., 2008). Tiene la capacidad de producir radical hidroxilo vía catálisis, bien sea en presencia o ausencia de radiación (Felis & Miksch, 2015).

Dentro de sus principales ventajas, destaca el no ser un oxidante selectivo, ya que reacciona con toda la materia orgánica presente en el agua contaminada o efluente a tratar, logrando una degradación parcial (conversión de contaminantes a productos de oxidación intermedios) o mineralización completa (conversión CO_2 , agua e iones inorgánicos) (Comninellis, 1994).

Usos y aplicaciones

Ha sido utilizado en la industria textil, petroquímica y minera en el blanqueamiento de pulpa de papel, síntesis de derivados químicos, manufactura del plástico, oxidación de colorantes y tratamiento de superficies metálicas, como agente antimicrobiano, antiséptico.

Principalmente en la industria aeroespacial se usa como combustible en motores de cohetes monopropelentes o como aportación de oxígeno en motores bipropelentes. Se usa por lo general a una concentración $>90\%$, y es extremadamente explosivo.

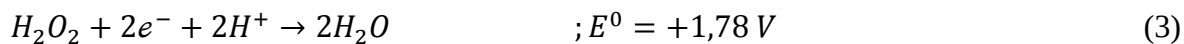
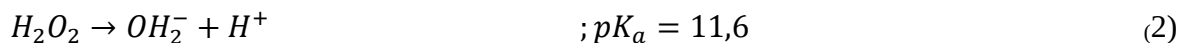
Diversas especies de peróxidos, por su activo contenido de oxígeno, son poderosos agentes oxidantes capaces de destruir los contaminantes sólidos, acuosos y residuos gaseosos más comunes, para dar productos inocuos o fácilmente biodegradables.

El oxígeno activo del peróxido también puede ser utilizado para la degradación microbiana de especies contaminantes; además puede ser usado en remediación de suelo contaminado, en el tratamiento biológico, en descargas de agua pluvial.

Cuando la actividad microbiana es moderada, el peróxido de hidrogeno es aplicado para el control de algas y en la resolución de lodos en lagos y reservorios.

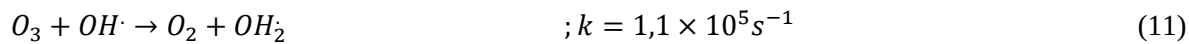
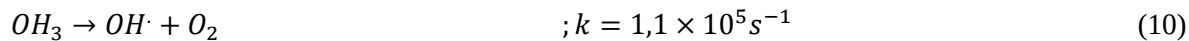
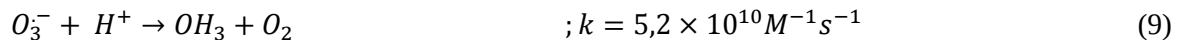
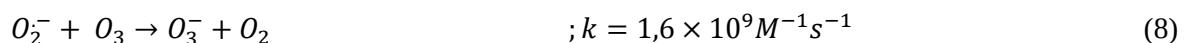
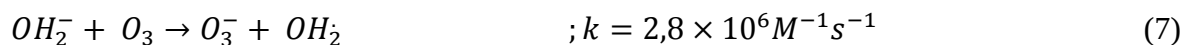
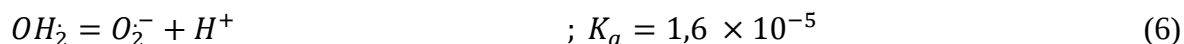
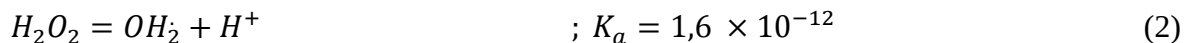
1.10 Combinación O₃/ H₂O₂

La ozonización transforma los contaminantes en compuestos más simples, pero se logra una mejoría agregando peróxido de hidrogeno. El peróxido de hidrogeno dismuta con una velocidad máxima al pH de su pK_a:



El uso de dos o más oxidantes combinados permite aprovechar los posibles efectos sinérgicos, lo que produce una destrucción adicional de la materia orgánica. El proceso pretende combinar la oxidación directa del ozono con la reacción rápida y poco selectiva de los radicales OH[·] con los compuestos orgánicos.

El H₂O₂ puede iniciar la descomposición de O₃ por transferencia de electrones. La reacción genera OH[·] consumiendo H₂O₂ y O₃, ecuación (5), a través de un mecanismo en cadena mostrado en las ecuaciones (2) y (6) a (12):



CAPÍTULO 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Preparación de medios

Se realizó la preparación del medio sólido pesando 5 g de NaCl, 2.5 g de levadura, 5 g de peptona, 7 g de agar bacteriológico en 500 ml de agua, al disolverlo se metió al auto clave por 20 minutos a 121°C para esterilizarlo, al transcurrir ese tiempo se vertió en cada caja Petri esterilizada y se dejaron solidificar, cuando estas solidificaron completamente se metieron a la estufa de cultivo 10 minutos para secarlas (Fig. 6). Para el medio líquido se realizó la preparación de Luria Bertani líquido pesando 2.5 g de NaCl, 1.25 g de levadura, 2.5 g de peptona en 250 ml de agua se esteriliza, después se dejó enfriar y se metió al refrigerador tapado para que no se contamine para sembrar posteriormente.

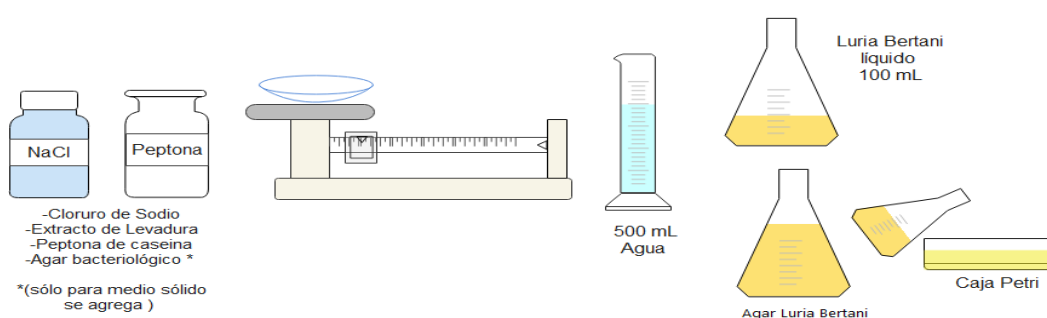


Fig. 6 Preparación medios de Cultivo

Preparación de cultivos de microorganismo

Para la preparación de las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* se tomarán 12 ml del medio Luria Bertani líquido para cada bacteria con ayuda de la micropipeta se depositarán en vasos de precipitado de 50 ml y con ayuda de un asa bacteriológica se tomarán las muestras de cada bacteria cultivando en cada vaso de precipitado, se taparán los vasos y se agitarán con ayuda del vortex y se colocarán cada bacteria en la incubadora por 24 horas a $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7).

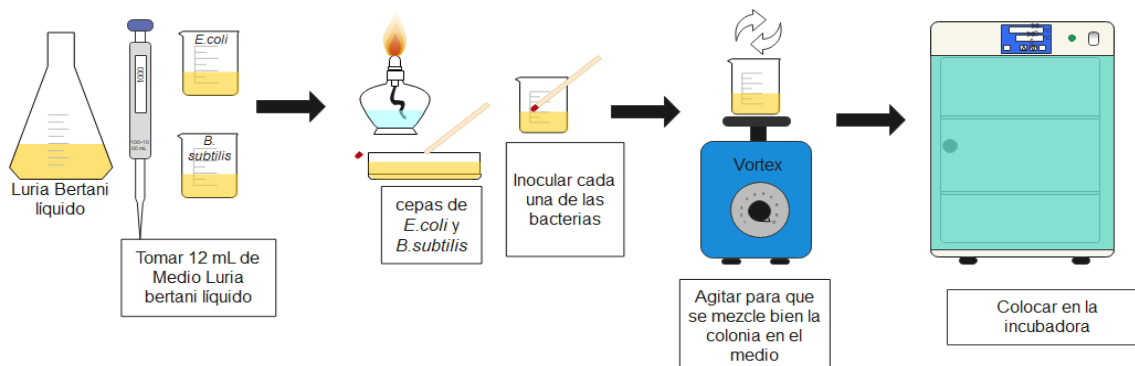


Fig. 7 Preparación de cultivos de microorganismos

Al transcurrir el tiempo requerido se observó el crecimiento de ambas bacterias en el medio líquido (se observó una nata en la superficie del cada vaso), con ayuda del vortex se agito los vasos que contienen el medio líquido con las bacterias y con ayuda de una micropipeta se tomaron 5 mL de inóculo de *B. subtilis* y 2 mL de *E. coli* se colocan las bacterias en tubos de 2 ml, se vuelven agitar en el vortex y se centrifugan durante 10 min a 10,000 rpm; el lavado de medio consiste en quitar el medio y colocar agua esterilizada, se vuelven agitar en el vortex y se centrifugan por otros 10 min, el lavado se realiza 2 veces (Fig. 8).

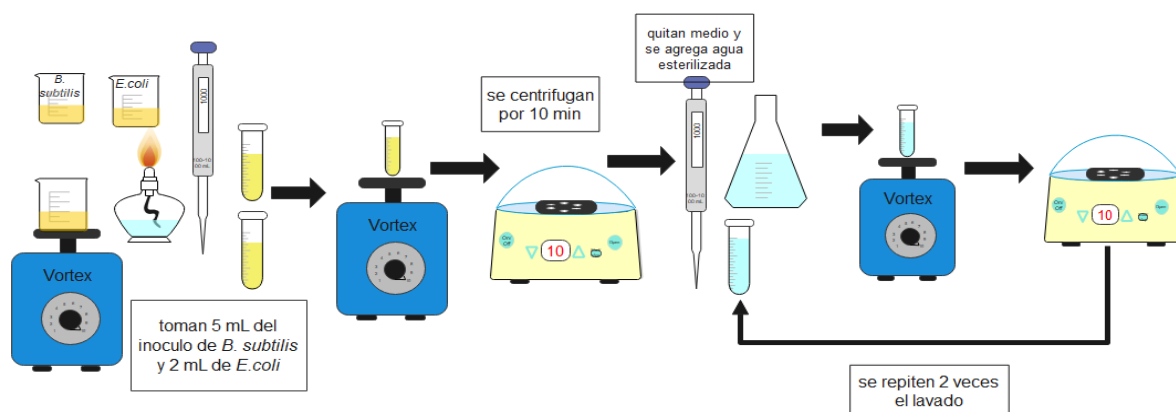


Fig. 8 Lavado de medios

Se realizaron diluciones sucesivas para los dos tipos de bacterias en el caso de *E. coli* se realizaron diluciones sucesivas de 10^9 hasta 10^3 bacterias/ ml y para *B. subtilis* se realizaron las diluciones de 10^7 hasta 10^3 bacterias/ml. Se etiquetaron los tubos de ensayo y las cajas Petri, para poder realizar las diluciones sucesivas de cada bacteria se tomaron 100 μ l de la bacteria patrón se colocaron en el siguiente tubo y se agregaron 900 μ l de agua esterilizada, hasta llegar a una dilución de cada bacteria de 10^3 bacterias/ml. Se tomaron 100 μ l de cada dilución y se colocaron en cada caja Petri, para poder inocular, se utilizó un una espátula Drigalski o rastrillo bacteriológico para realizar la difusión por toda la caja, además, el rastrillo deberá estar previamente colocado en alcohol y después pasarlo por la flama de la lámpara de alcohol para esterilizarlo constantemente repitiendo esta acción cada vez que se siembre una dilución diferente en cada caja Petri, las muestras patrones al terminar de inocular en ellas se colocaron en la incubadora durante 16-20 h a $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Acondicionamiento del reactor de tratamiento

En un volumen de 500 ml donde se van a acondicionar los métodos a utilizar desde la inyección del peróxido de hidrógeno y ozono.

Tratamiento de las bacterias por Procesos de Oxidación Avanzada

Se inocularán las bacterias en la cantidad requerida se trabajarán ambas bacterias con una concentración de 10^5 UFC, mezcladas cada una completamente en un volumen de 500 ml, el cual se introducirá en el reactor BATCH, el O_3 será inyectado en el tiempo 0 ya que requiere tiempo de contacto para que se inicie el proceso que se necesita, se agregará el H_2O_2 al inicio del tratamiento.

El tiempo de tratamiento para el estudio de *E. coli* fueron de 3 minutos con un intervalo de 30 segundos para la toma de muestras, mientras *B. subtilis* fueron de 12 min con un intervalo de 2 minutos para la toma de muestras.

Cada muestra se sembrará en cajas Petri por triplicado con ayuda de una espátula Drigalski o rastrillo bacteriológico, posteriormente se colocarán en la incubadora durante 16-20 h a $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

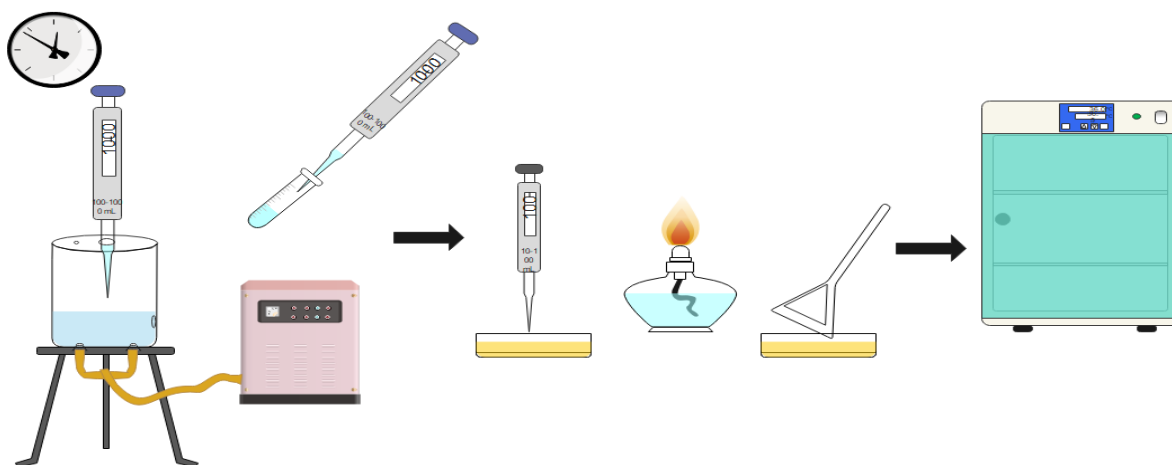


Fig. 9 Tratamiento y toma de muestras

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del volumen del reactor

Para el reactor que se construirá, se escogió un volumen de 1000 mL, debido a que es un reactor a nivel laboratorio en ciertos casos debido a que, si el volumen es muy extenso, podría ser un inconveniente ya que se desperdiciará una significativa cantidad de reactivos.

La altura del recipiente se calculó utilizando la siguiente formula:

$$Lc = \frac{4 \times Vc}{\pi \times D_i^2}$$

Lc= longitud del cilindro

Vc= volumen del cilindro (1000mL)

Di= Diámetro del cilindro

El diámetro del cilindro es de 8 centímetros, con lo cual la altura o longitud del cilindro será de la siguiente forma remplazando en la ecuación

$$Lc = \frac{4 \times 1000cm^3}{\pi \times (8 cm)^2}$$
$$Lc = 19.89 cm \approx 20 cm$$

A este volumen se le debe incrementar un volumen extra de seguridad, el cual es un factor de seguridad por nivel de llenado. Este factor de seguridad significa que el reactor debe trabajar a un volumen menor al volumen máximo del recipiente por ejemplo al 80% de su capacidad máxima. Según la norma API 2350 “Overfill Protection for Storage Tanks in Petroleum Facilities” se debe aumentar un 20% al volumen total, para obtener un volumen de seguridad. (API, 2005)

$$volumen\ de\ seguridad = 1000 \times 0.2$$

$$volumen\ de\ seguridad = 200\ mL$$

Por lo cual se debe aumentar la altura del recipiente usando la formula anterior:

$$Lc = \frac{4 \times 200 cm^3}{\pi \times (8 cm)^2}$$
$$Lc = 3.97 cm \approx 4 cm$$

La altura del recipiente será de 26 centímetros de altura, debido a que se debe agregar un espacio para que entre la tapa del reactor la cual aparte de otras funciones evita cualquier posible derrame del líquido.

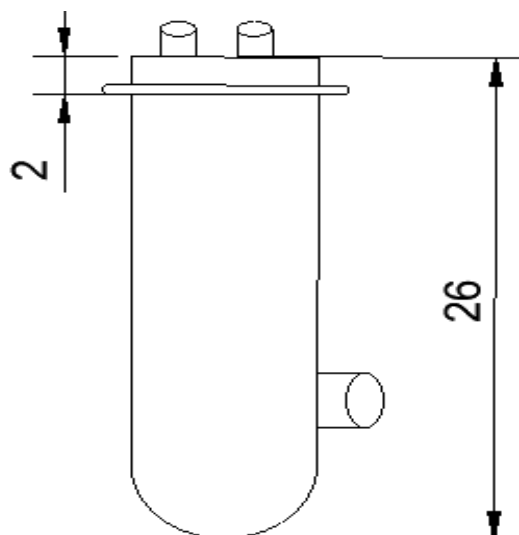


Fig. 10 Diseño de Reactor Batch

Se realizó el acondicionamiento del reactor de acuerdo a la Fig. 10 en donde se trató el agua con los procesos de oxidación avanzada (UV/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$), primero se realizaron varias pruebas preliminares en donde se evaluaron los procesos de oxidación avanzada, como la dosis óptima de H_2O_2 , los medios de cultivos óptimos para evaluar el tratamiento de las dos bacterias juntas, por medio de esas pruebas preliminares se realizó el tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ y se quitó la radiación UV (Ver anexos).



Fig. 11 Tratamiento UV/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ (izquierda), tratamiento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ (derecha)

Se realizaron varias repeticiones del tratamiento de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ en donde se realizó un tiempo de 150 segundos de tratamiento con tomas de muestras cada 30 segundos en la Fig. 12 UFC de *E. coli* se observa la disminución de la concentración de bacterias de *E. coli* conforme pasa el tiempo

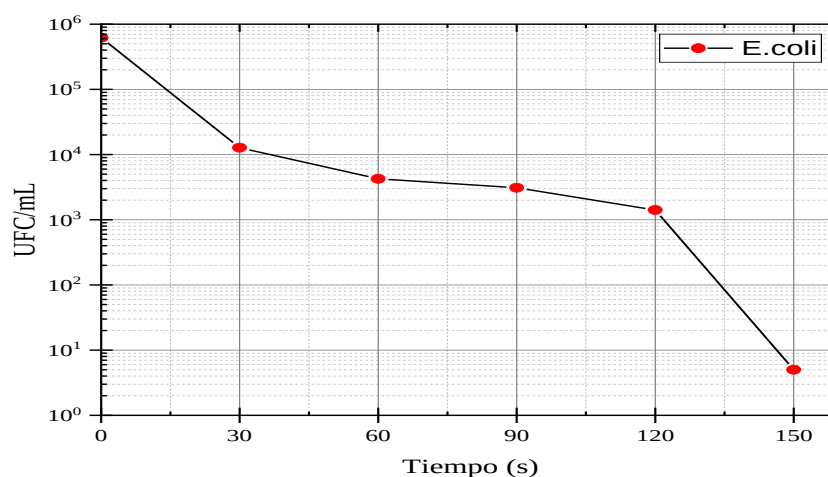


Fig. 12 UFC de *E. coli*

En la fig. 13 se observa el porcentaje de supervivencia de *E. coli* frente a los procesos de oxidación avanzada, es notorio a los 30 segundos de tratamiento como reduce más del 90 % la bacteria *E. coli*

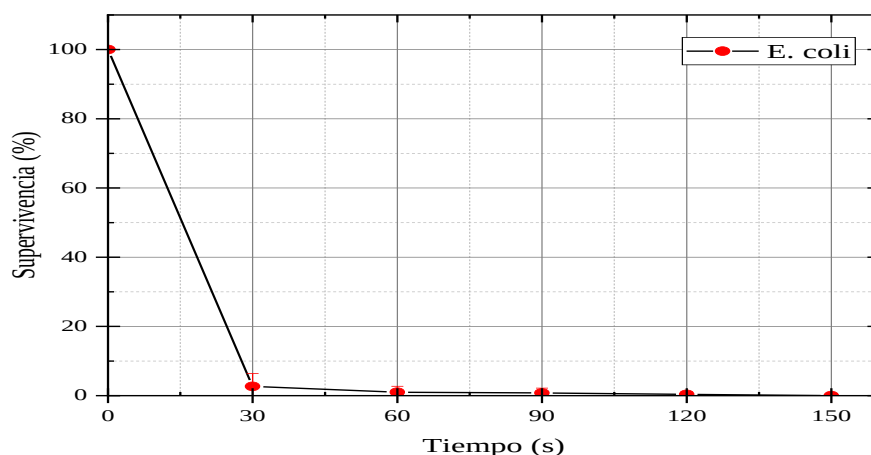


Fig. 13 Porcentaje de Supervivencia de *E. coli*

En la Fig 14 se muestra el porcentaje de inactivación de *E. coli* el cual alcanza un 99.98% de eficacia del tratamiento de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$

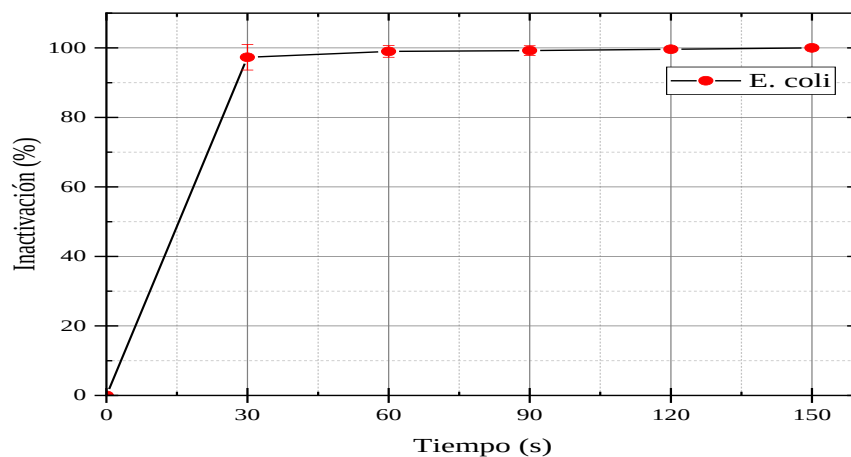


Fig. 14 Porcentaje de inactivación de *E. coli*

En la Fig. 15 UFC de *B. subtilis* se observa la disminución de la concentración de bacterias de *B. subtilis* conforme pasa el tiempo.

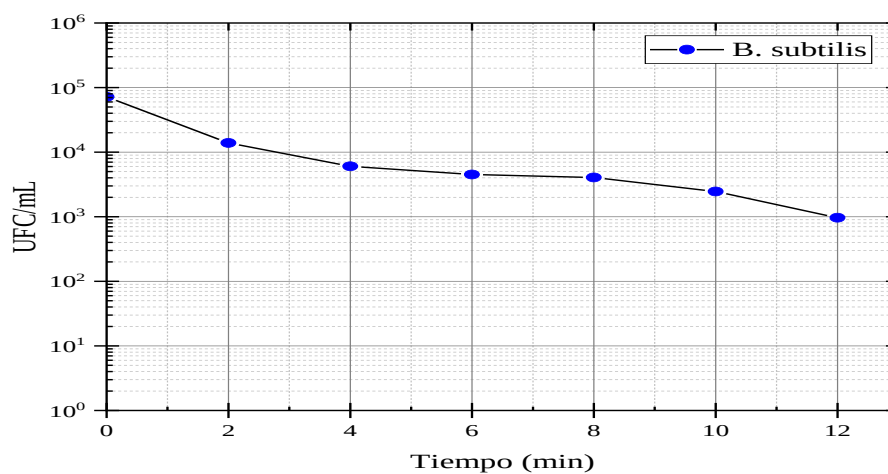


Fig. 15 UFC de *B. subtilis*

Se realizó el tratamiento de *B. subtilis* tomando muestras cada 2 min hasta el tiempo 12min, se observó una disminución mayor del porcentaje de supervivencia a los 2 minutos de tratamiento, de ahí el porcentaje se fue reduciendo poco a poco hasta el tiempo 12 que alcanzo un porcentaje del 1.33% de supervivencia (muestra Fig. 16)

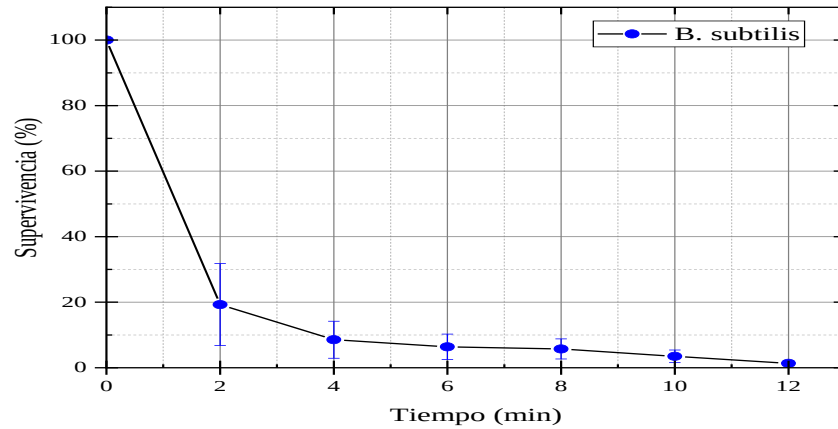


Fig. 16 Porcentaje de supervivencia de *B. subtilis*

En la fig. 17 se observa el porcentaje de supervivencia de *B. subtilis* frente a los procesos de oxidación avanzada, es notorio a los 2 min de tratamiento como reduce el 80 % de inactivación de la bacteria *B. subtilis* obteniendo un 98.67% de eficacia ya que en comparación con la bacteria *E. coli*, *B. subtilis* crea más resistencia por la creación de esporas.

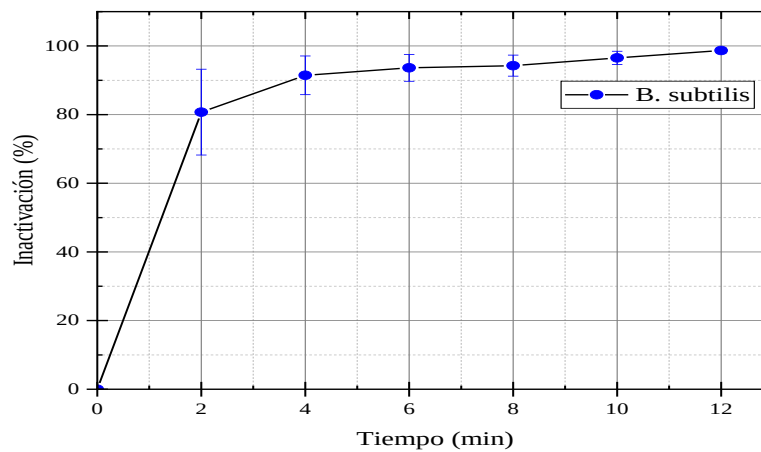


Fig. 17 Porcentaje de inactivación de *B. subtilis*

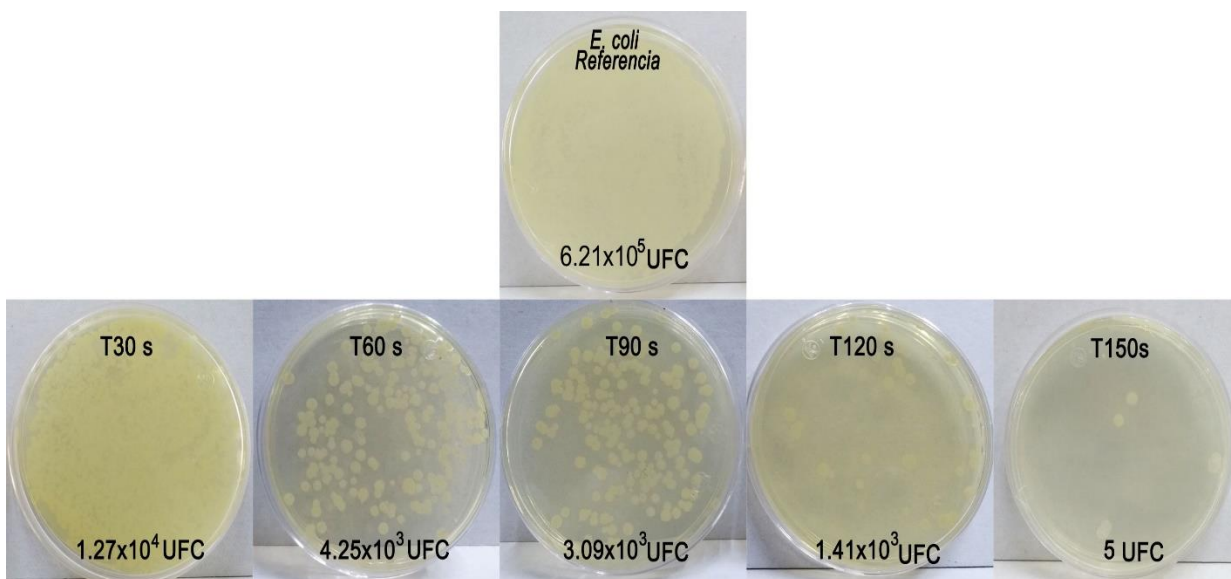


Fig. 18 Tratamiento de *E. coli* mediante el proceso H_2O_2/O_3

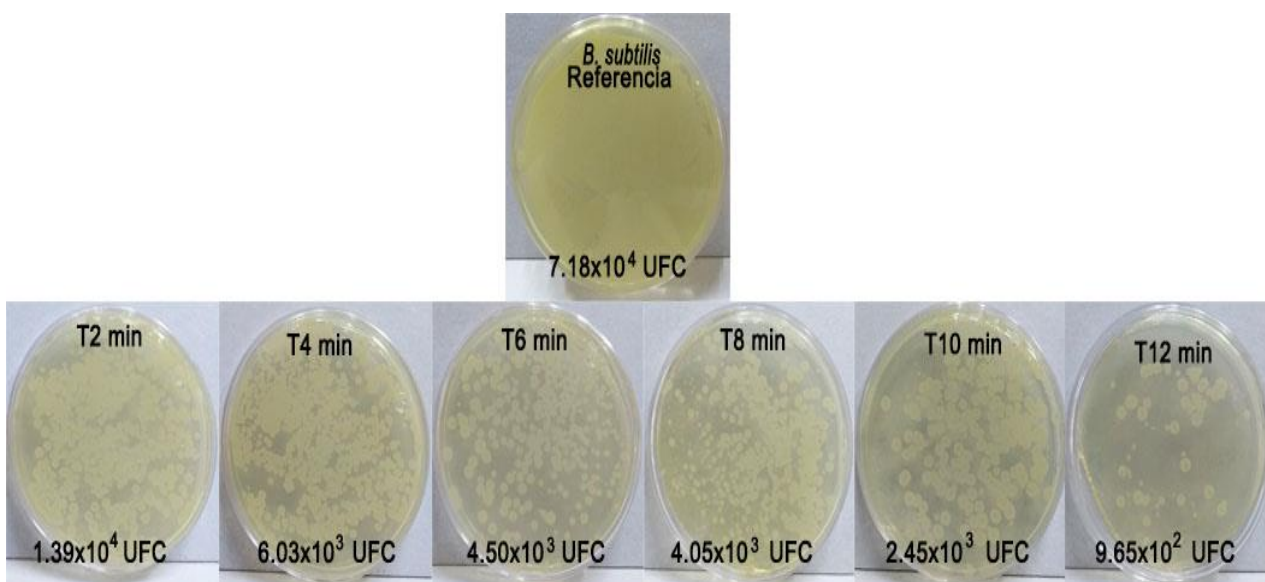


Fig. 19 Tratamiento de *B. subtilis* mediante el proceso H_2O_2/O_3

De acuerdo a los resultados obtenidos (Fig. 18 y 19) en el proceso experimental se obtuvo un porcentaje de inactividad de la bacteria *E. coli* empleando el proceso de oxidación avanzada (O_3/H_2O_2) es del 99.99% de eliminación bacteriana (Fig. 14), la dosis ideal de H_2O_2 es de 50 μ L con un tiempo de exposición de 150 segundos.

Mientras tanto el porcentaje de inactivación de la bacteria *B. subtilis* es del 98.67% de eliminación bacteriana (Fig. 17), la dosis ideal de H_2O_2 es de 200 μL con un tiempo de exposición de 12 min.

Además, se muestran en las cajas Petri (Fig. 18 y 19) la disminución de la concentración de cada bacteria de acuerdo a los tiempos de tratamiento, obteniendo de ahí los resultados graficados demostrando una eficacia del tratamiento $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que el volumen adecuado del reactor fue de 1000ml para realizar las pruebas con las bacterias sin desperdiciar una cantidad significativa de reactivos. El diseño del reactor Batch se realizó para que todos los reactivos oxidantes actúen conjuntamente y se forme una cantidad adecuada de radicales hidroxilos se puedan eliminar las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*, de acuerdo a las referencias bibliografías consultada para el O_3 y el H_2O_2 al y mantener el mayor área y tiempo de contacto entre las bacterias y los radicales hidroxilos.

El tratamiento aplicado se adecuo de acuerdo a los microorganismos estudiados, en este caso *B. subtilis* es más resistente en comparación a *E. coli*, por la formación de esporas, esta última bacteria es un parámetro evaluado bajo norma. También se realizaron las pruebas preliminares correspondientes para obtener la dosis adecuada de H_2O_2 para *E. coli*, se trabajó con dosis de 50 μ L y *B. subtilis* 200 μ L, se alcanzó una inactivación del 99.99% en *E. coli* y 98.67% en *B. subtilis* utilizando la combinación de H_2O_2/O_3 en un tiempo de 12 minutos.

Es recomendable hacer varias pruebas adicionales para la *Bacteria. subtilis* porque encontrarse en condiciones extremas o medios sin nutrientes, se activa para modo spora y se reactiva cuando el medio ambiente el fructífero para volverá reproducirse

REFERENCIAS

- Apella, M.c, & Araujo, P. Z. (2005). Microbiología del Agua. Conceptos Básicos. *En C.I Europea, Solar Safe Water*, 33-50.
- Aydogan, A., y Gurol, M. (2006). Application of Gaseous Ozone for Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores. *Air & Waste Management Association (2012)* 179-185. doi: <https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464443>
- Blanco, J., Blanco, M. Blanco, J.E, Mora, A., Alonso, M P., González, E. A., y otros. (2002). Enterobacterias: Características Generales. Género *Escherichia*. *Manual de Microbiología Veterinaria, McGraw-Hill Interamericana*, 301-325.
- Comninellis, C. (1994). Electrocatálisis en la conversión / combustión electroquímica de contaminantes orgánicos para el tratamiento de aguas residuales. *Electrochimica Acta*, 39 (11-12), 1857-1862. doi: 10.1016 / 0013-4686 (94) 85175-1
- Coronel, J. C. (2014) *Diseño y construcción de un reactor tipo batch para el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Internacional SEK*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Internacional SEK
- Czekalski, N., Imminger, S., Hammes, F., Lee, Y., von Gunten, U. (2016). Inactivation efficiency of *Escherichia coli* and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine triphosphate analyses. *Water Research*, 101, 617–627. doi:10.1016/j.watres.2016.05.089
- Donnenberg, M. (2002). *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. Elsevier Science Inc.*
- Dular M., Kosel, J., Oder M., Šarc, A., Stopar D. (2018) Removal of bacteria *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* by (super)cavitation, *Ultrasonics - Sonochemistry* 42, 228–236
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *B. subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117–126. doi:10.1038/nrmicro750

- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *B. subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269–275. doi:10.1016/j.tim.2008.03.004
- Faleiro Naves, P.L. (2010). Formación de Biopelículas por “*Escherichia coli*” y su Correlación con Factores de Virulencia: Prevención y Actividad de Antimicrobianos Frente a Organismos Planctónicos y Asociados a Biopelículas. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II, Madrid.
- Fang, J., Liu, H., Liu W., Ni, M., Shang C. (2013). *E. coli* and bacteriophage MS2 disinfection by UV, ozone and the combined UV and ozone processes. *Front. Environ. Sci. Eng.* Doi: 10.1007/s11783-013-0620-2
- Fan, X., Gurtler, J., Sokorai, K. (2020). Advanced oxidation process for the inactivation of *Salmonella typhimurium* on tomatoes by combination of gaseous ozone and aerosolized hydrogen peroxide. *International Journal of Food Microbiology* 312 (2020) 108387, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108387>
- Game, S., Gerrity, D., Pisarenko, AN., Wert, EC., Snyder, SA. (2013). Evaluation of process control alternatives for the inactivation of *Escherichia coli*, MS2 bacteriophage, and *Bacillus subtilis* spores during wastewater ozonation, *Ozone Sci Eng.*, 35, 501-513.
- Girgin Ersoy, Z., Barisci, S., Turkey, O.(2018). Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone, *LWT - Food Science and Technology*,1, 1-27.
- Henry, J. G., & Heinke, G. W. (1999). *Ingeniería Ambiental*. Prentice Hall,2, México.
- Hunt, N., y Mariñas, B. (1997). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Water Research*, 31(6), 1355–1362. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)003946](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)003946)
- Li, Y, Lu G.,Wu, D.,Yang, Z., Zhang R. (2016) Disinfection characteristics of the combined ultraviolet radiation and ozone process using *Escherichia coli* as a probe. *Water Science &Technology: Water Supply* 16(1), 163-170
- Hu, H.-Y., Huo, Z.-Y., Li, G.-Q., Lu, Y., Wu, Q.-Y. (2018). Synergistic effect of combined UV-LED and chlorine treatment on *Bacillus subtilis* spore inactivation. *Science of The Total Environment*, 639, 1233–1240. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.240

- Matin, A.R., Yousefzadeh, S., Ahmadi, E., Mahvi, A., Alimohammadi, M., Aslani, H., Nabizadeh, R., (2018) A comparative study of the disinfection efficacy of H₂O₂/ferrate and UV/ H₂O₂/ ferrate processes on inactivation of *Bacillus subtilis* spores by response surface methodology for modeling and optimization, Food and Chemical Toxicology, doi: 10.1016/j.fct.2018.04.002.
- Monge, S., Silva, A. y Bengoa, C. (2018). Manual técnico sobre procesos de oxidación avanzada aplicados al tratamiento de aguas residuales industriales. España: CYTED.
- Monroy C. L. (2019) *Evaluación de la eficiencia del hipoclorito de Sodio en Endoesporas de una cepa certificada de Bacillus subtilis*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Prescott, L.M., JP., & Klein, D. A. (2002). Microbiology (5th edition ed.). Mc- Graw-Hill, USA.
- Realpe, M.E.; Hernández, C. A.; Agudelo, C. I. (2002) Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica, Biomédica, 22 (2), 106-109
- Regalado García, A. G., Valenzuela García, L. I., & Pedraza Reyes, M. (2018). la germinación de las esporas de *Bacillus subtilis* activa la respuesta celular de daño al material genético. jóvenes en la ciencia, 4, 289–293. Recuperado a partir de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2282>
- Romero Cabello, R. (2001). Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas, Medica Panamericana S.A de C.V., México.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology,, 56 (4), 845–857. doi: 10.1111 / j.1365-2958.2005.04587.x
- Terán M.C. (2016) *Estudio de la aplicación de procesos de oxidación avanzada a aguas contaminadas*. Tesis de licenciatura no publicada, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona
- Xu, L., Zhang, C., Xu, P., Wang, XC. (2018). Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. *Journal of Environmental Sciences*, 65, 356-366.

Xu, L., Zhang, C., Xu, P., Wang, X.C. (2018). Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. *Journal of Environmental Sciences*, 65, 356-366.

Zhang, C., Li, B., Jadeja, R., Fang, J., & Hung, Y.-C. (2016). Effects of bacterial concentrations and centrifugations on susceptibility of *Bacillus subtilis* vegetative cells and *Escherichia coli* O157:H7 to various electrolyzed oxidizing water treatments. *Food Control*, 60, 440-446.

Recuperado:[https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Sin_l%C3%ADmites\)/7%3A_Gen%C3%A9tica_Microbiana/7.20%3A_Regulaci%C3%B3n_del_Desarrollo/7.20A%3A_Esporulaci%C3%B3n_en_Bacillus](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_l%C3%ADmites)/7%3A_Gen%C3%A9tica_Microbiana/7.20%3A_Regulaci%C3%B3n_del_Desarrollo/7.20A%3A_Esporulaci%C3%B3n_en_Bacillus)
7.20A: Esporulación en Bacillus - LibreTexts Español

ANEXOS

Pruebas preliminares

Preliminar 1 Tratamiento de *E. coli* + *B. subtilis* mediante UV/ H₂O₂/O₃

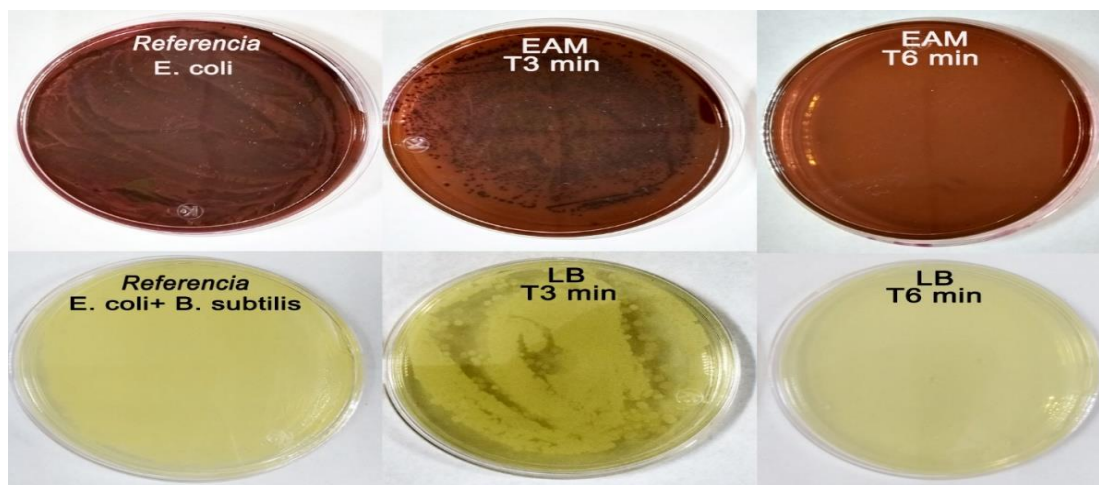


Fig. 20 Tratamiento de *E. coli* y *B. subtilis* UV/H₂O₂/O₃

Se realizó un tratamiento mediante UV/H₂O₂/O₃ con las dos bacterias juntas (Fig. 20), se utilizó agar Luria Bertani para las dos bacterias juntas y un agar selectivo Eosina y Azul de Metileno (EAM) para el crecimiento de *E. coli* y se observó que no hubo disminución en la concentración de bacterias de *E. coli*, por lo cual se realizó una prueba de crecimiento de las dos bacterias por separado en cuatro agares diferentes (Fig 21).

Preliminar 2 Prueba de crecimiento de *B. subtilis* en diferentes agares

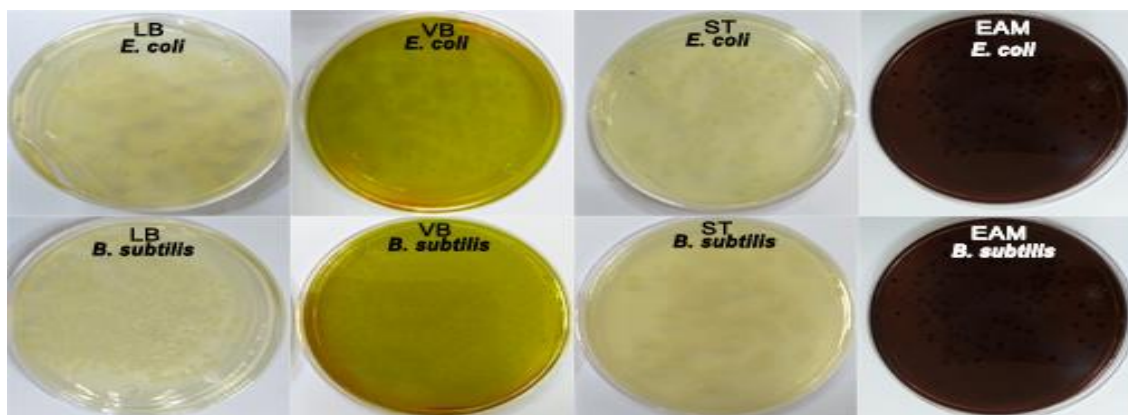


Fig. 21 Prueba de Agares para *E. coli* y *B. subtilis* a) Agar Luria Bertani, b) Agar Verde brillante, c) Agar Soya de Tripticaseina, d) Agar Eosina y Azul de Metileno

En la prueba de agares (Fig. 21) se observó y comprobó que las dos bacterias tanto *E. coli* como *B. subtilis* crecieron en los cuatro agares diferentes, Agar Luria ertani (LB), Agar Verde brillante (VB), Agar Soya de Tripticaseina (ST), Agar Eosina y Azul de Metileno (EAM), por lo que se tomó la decisión de tratar las dos bacterias por separado y comprobar su porcentaje de inactivación.

Preliminar 3 Tratamiento de *E. coli* y *B. subtilis* mediante UV/ H₂O₂/O₃

Se realizaron pruebas con las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* con los procesos de oxidación avanzada UV/ H₂O₂/O₃ se observó que la bacteria *E. coli* a los 30 segundos de tratamiento se vio un gran avance de inactivación y a los 60 segundos había un 100% de inactivación, mientras tanto la bacteria *B. subtilis* a los 120 segundos se inactivaron y a los 150 segundos se reactivaron las bacterias de acuerdo a artículos “Debido a su falta de acción enzimática y metabolismo, las esporas latentes no pueden reparar el daño a macromoléculas como el ADN o las proteínas. Si bien puede haber reparación del daño del ADN cuando la espora vuelve a la vida en el proceso de germinación y crecimiento de la espora y se reanuda la actividad metabólica” (Setlow 2003), “si se ha acumulado demasiado daño durante la latencia de la espora, este daño puede superar la capacidad de reparación. sistemas y conducen a la muerte de la espora germinada” (Setlow 1992, 1995; Setlow y Setlow 1996; Tennen et al. 2000).

Muchos microbios 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 foto reactivación

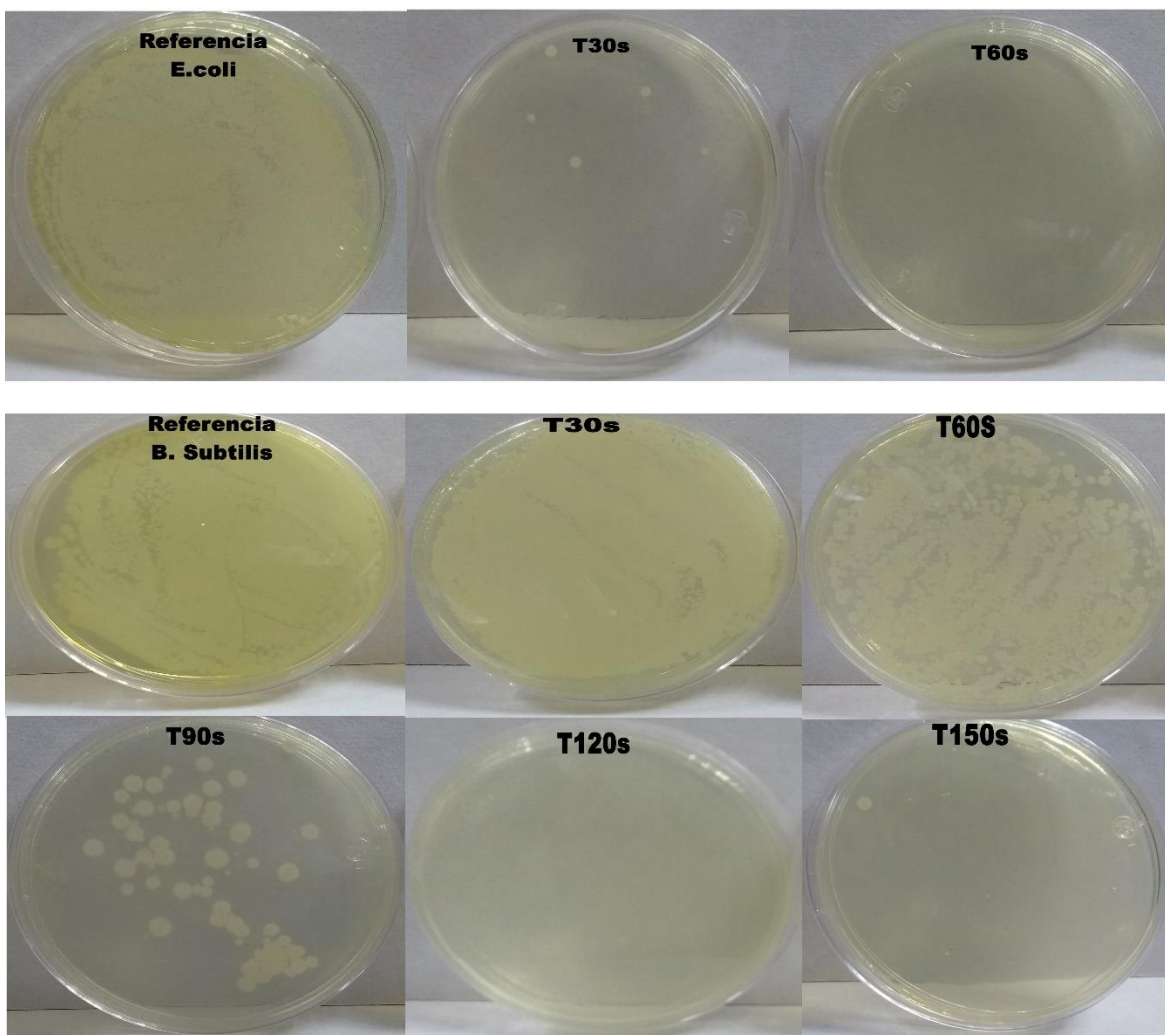


Fig. 22 Tratamiento de *E. coli* y *B. subtilis* mediante UV/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$

Preliminar 4 Tratamiento de *B. subtilis* mediante $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ obtención de dosis optima de H_2O_2

Se realizaron tratamientos con distintas dosis H_2O_2 para obtener la dosis adecuada para la eliminación de *B. subtilis*, ya que esta bacteria es más resistente por la formación de endoesporas, se puede observar en Fig. 23 los tratamientos con dosis de H_2O_2 de 50, 100, 150 y 200 μL , se tomó la dosis de 200 μL de H_2O_2 para el tratamiento, ya que el tiempo de tratamiento fue menor y se obtuvo una mejor inactivación de endoesporas de *B. subtilis*.

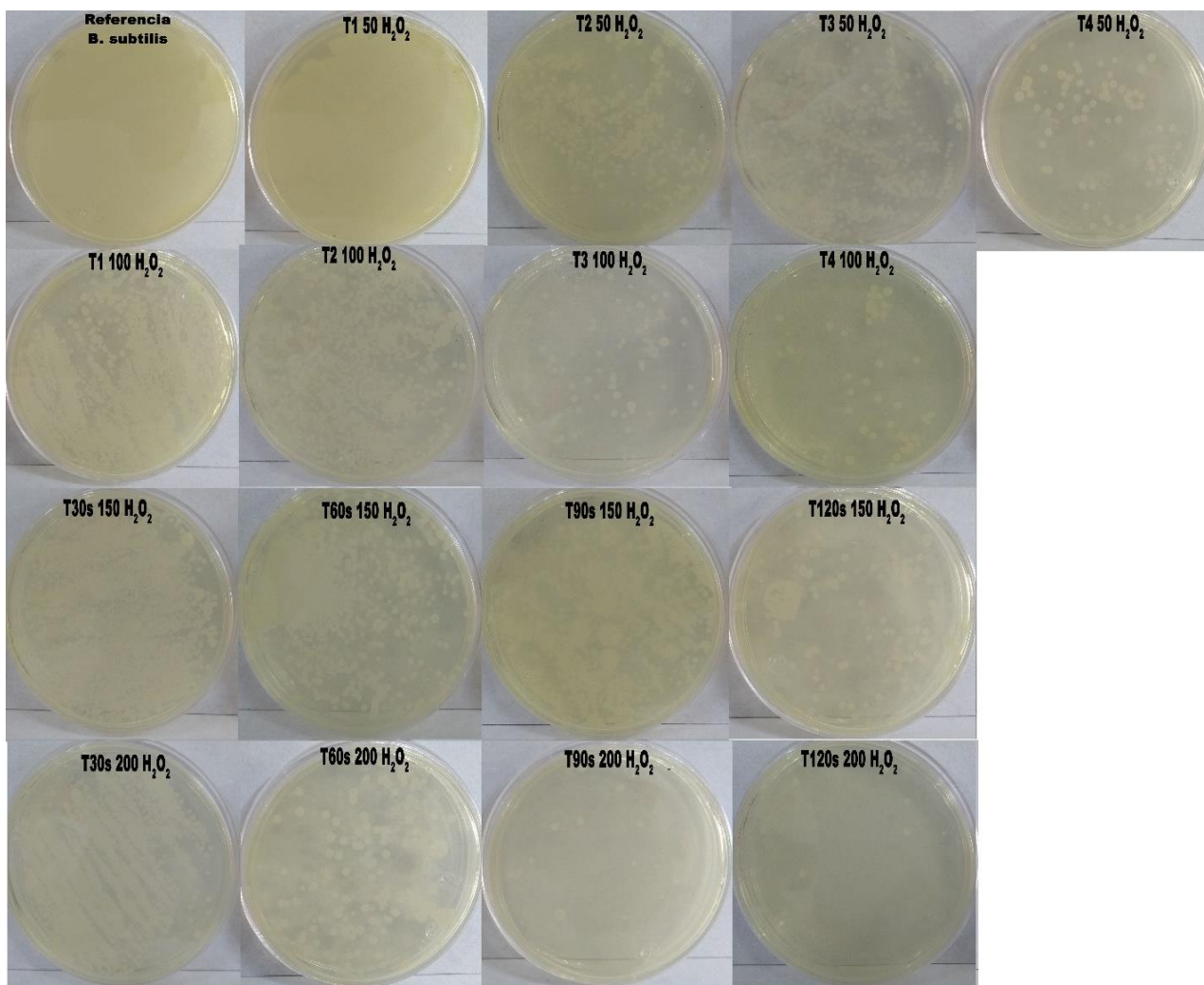


Fig. 23 Tratamiento de *B. subtilis* mediante H_2O_2/O_3 con distintas dosis de H_2O_2