

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**



**ESTUDIO PILOTO DE LA APLICACIÓN DE FENTON HETEROGENEO
PARA LA INACTIVACIÓN DE *Escherichia coli*
EN AGUAS RESIDUALES DE DOCENCIA EN LA FACULTAD DE
CIENCIAS**

JUANITA ABELLÓ ESPARZA

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para obtener el título de
Microbióloga Industrial**

**BOGOTÁ D.C
2014**

**ESTUDIO PILOTO DE LA APLICACIÓN DE FENTON HETEROGENEO
PARA LA INACTIVACIÓN DE *E. coli*
EN AGUAS RESIDUALES DE DOCENCIA EN LA FACULTAD DE
CIENCIAS**

JUANITA ABELLÓ ESPARZA

APROBADO

**CARLOS ENRIQUE DAZA
DIRECTOR**

**ANA KARINA CARRASCAL
DIRECTOR**

**AURA MARINA PEDROZA RODRIGUEZ
Asesor**

**ALEJANDRO RODRIGUEZ
Jurado**

**BOGOTÁ D.C
2014**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por ponerme en el camino personas, retos y metas que aunque parezcan imposibles en algunas ocasiones me dio la fuerza de seguir adelante para cumplir y superar todos los obstáculos que se presentaron en el camino.

A Aura Marina Pedroza por abrirme las puertas del laboratorio, por dejarme ser parte de este proyecto, por su conocimiento, su apoyo, colaboración infinita y la paciencia que me tuvo.

A Ana Karina Carrascal por ayudarme, apoyarme, su infinito conocimiento y por la gran paciencia que me tuvo.

A Carlos Enrique Daza por ayudarme y resolverme las dudas de último minuto y por su conocimiento y paciencia.

A mis compañeros de laboratorio por aguantar los ratos de mal genio, cuidarme las dormidas en el mesón y por ser el mejor grupo de apoyo del mundo.

A mis papás por su amor y apoyo en todo momento.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. MARCO TEORICO	13
3.1. Agua residual	13
3.1.1. Características del agua residual de los laboratorios de microbiología. 14	
3.1.2. Microorganismos	15
3.2. Procesos de oxidación avanzada	15
3.2.1. Fenton heterogéneo: catalizadores empleados	16
3.2.2. Factores que afectan el proceso Fenton	18
3.2.3. Mecanismo de inactivación.....	18
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGIA	21
6.1. Caracterización del agua residual	22
6.2. Obtención del carbón activado.....	23
6.3. Síntesis de los catalizadores de Fe-Ce	24
6.4. Caracterización del carbón activado y del catalizador Fe-Ce/Carbón activado.....	24
6.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) Espectroscopía Dispersiva de Rayos X (EDX).....	24
6.4.2. Difracción de rayos X (DRX).....	24
6.5. Curvas de inactivación.....	24
6.5.1. Recuperación y reinoculación de <i>E. coli</i>	24
6.5.2. Características del reactor	25
6.5.3. Características de los tratamientos evaluados y controles en función del tiempo	25
6.6. Reactivación secundaria	26
6.7. Reutilización agua residual	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1. Caracterización del agua residual y ajustes del agua residual	27
7.2. Caracterización del carbón activado y catalizador Fe-Ce/carbón activado	29
7.3. Curvas de inactivación.....	32

7.4.	Reactivación secundaria	36
7.5.	Reutilización del agua residual.....	38
7.6.	MEB Y EDS del catalizador después del tratamiento	40
8.	CONCLUSIONES	44
9.	RECOMENDACIONES	45
10.	BIBLIOGRAFIA	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Colorantes más utilizados en tinciones microbiológicas. Tomado y modificado de (Cardozo M 2012).	14
Tabla 2. Soportes catalíticos más utilizados en el proceso Fenton heterogéneo	17
Tabla 3. Caracterización de las propiedades físicas y químicas del carbón activado empleado como soporte catalítico en este trabajo. Tomado de (Cifuentes et. al 2013).	23
Tabla 4. Tratamientos al agua residual evaluados.....	26
Tabla 5. Parámetros medidos para la caracterización del agua residual.Lotes 1 y 2 utilizados en las curvas de inactivación.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de mineralización celular a causa de la acción de radicales oxidantes (Foster et. al 2011).....	20
Figura 2. Esquema de la metodología empleada.	22
Figura 3. Esquema del reactor Fenton utilizado en las curvas de inactivación. A la derecha se observa una fotografía del reactor. Fuente: Autor.	25
Figura 4. Imagen MEB del catalizador Fe-Ce/carbón activado antes del tratamiento Fenton.	30
Figura 5. Imagen MEB acompañada del mapeo químico realizado con la técnica EDX para el catalizador Fe-Ce/carbón activado	30
Figura 6. Espectro EDX y composición en peso y atómica para el catalizador Fe-Ce/carbón activado.	31
Figura 7. Difracción de rayos X del catalizador Fe-Ce/carbón activado.	31
Figura 8. a) Cinética de inactivación de E. coli con tratamiento Fenton heterogéneo utilizando el catalizador Fe-Ce/Carbón activado/ H ₂ O ₂ . a1) Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad b) Cinética de inactivación de E.colicon tratamiento con H ₂ O ₂ (control) b1) Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad.	34
Figura 9. a) Cinética de inactivación E. coli, curva control Fe-Ce/carbón activado. a1) Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad b) Cinética de inactivación de E. coli, Curva control con carbón activado. b1) Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad.	36
Figura 10. Porcentaje de Tinción para Staphylococcus aureus y Bacillus licheniformis.	39
Figura 11. Microscopia Óptica, agua destilada, tratamiento Fenton heterogéneo y controles de H ₂ O ₂ , Fe-Ce/carbón activado y carbón activado.	40
Figura 12. Imagen MEB de la cepa de E. coli, sin ningún tratamiento.	40
Figura 13. Imagen MEB de E. coli después del tratamiento Fenton Heterogéneo..	41
Figura 14. Imagen MEB de E. coli y el catalizador después del tratamiento control con el catalizador Fe-Ce/carbón activado.	41
Figura 15. Imagen MEB de E. coli y del carbón activado después del tratamiento control con carbón activado.....	42
Figura 16. Imagen MEB acompañada de mapeo químico por técnica EDX de E. coli antes del tratamiento.	43
Figura 17. Imagen MEB acompañada del mapeo químico realizado con la técnica EDX para E. coli después del tratamiento Fenton Heterogéneo.....	43
Figura 18. Espectro EDX y composición atómica y en peso de la E. coli antes y después del tratamiento Fenton. A. E. coli sin tratamiento, B. E. coli después del proceso Fenton Heterogéneo.....	44

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el proceso Fenton Heterogéneo utilizando un catalizador óxido de Fe y Ce soportado sobre carbón activado como alternativa para inactivar *Escherichia coli* en agua residual generada en las prácticas de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se empleó como agua residual dos lotes cuyas características iniciales fueron, Lote 1: pH 4,5; color 3260 unidades de color (UC); conductividad 0,804ms/cm y $3,0 \times 10^{12}$ UFC/mL de población bacteriana y, Lote 2: pH 4,98; color 7935 (UC); conductividad 0,83 ms/cm y $1,0 \times 10^{14}$ UFC/mL de población bacteriana.

El agua se inoculó artificialmente usando una cepa de *E. coli* del agua residual hasta una concentración inicial de 10^7 UFC/mL debido a la elevada concentración de microorganismos. El tratamiento Fenton Heterogéneo fue llevado a cabo con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 400 mL del agua residual, 160 mg/mL de catalizador, pH=3,7, temperatura igual a 20 °C y presión atmosférica. El suministro del reactor fue de 2 Lh^{-1} de aire y $0,3 \text{ mLh}^{-1}$ de H_2O_2 0,3M. Se realizó siembra en profundidad en agar VRB con el fin de hacer el recuento de colonias después de cada tratamiento.

De acuerdo con los resultados, el tratamiento Fenton Heterogéneo inactivó una concentración de 10^7 UFC/mL de *Escherichia coli* sin reactivación secundaria del agua pos tratada a las 12 y 24 h. Se observó que la adsorción de la bacteria en el catalizador y en el soporte es importante. El agua pos-tratada pudo reutilizarse para las tinciones de Gram en las prácticas de microbiología.

ABSTRACT

In the undergraduate thesis, the Fenton heterogeneous process was evaluated using a Fe and Ce oxide catalyst-type supported on activated carbon as an alternative to inactivate *Escherichia coli* contained in wastewater generated in the practices of microbiology at the Faculty of Sciences of the Pontificia Universidad Javeriana.

Two batches of wastewater were used. The characteristics of Lot 1 are: pH 4.5 ; Color 3260 (UC); conductivity 0.804 ms/cm and 3.0×10^{12} CFU mL⁻¹ of bacterial population, the characteristics of Lot 2 are: pH 4.98 ; Color 7935 (UC); conductivity 0.83 ms/ cm and 1.0×10^{14} CFUmL⁻¹ of bacterial population.

The water was artificially inoculated using a strain of *E. coli* extracted from the wastewater to an initial concentration of 10^7 CFUmL⁻¹ due to high concentrations of microorganisms. Heterogeneous Fenton treatment was carried out with an effective working volume of 400 mL, 160 mg/mL of catalyst , pH = 3.7 , temperature of 20 °C and atmospheric pressure. The reactor feed was 2 Lh⁻¹ air and 0.3 mLh⁻¹ 0.3 M H₂O₂. Culture was done in VRB agar depth in order to make the colony count after each treatment.

According to the results, treatment Heterogeneous Fenton quenched a concentration of 10^7 CFU mL⁻¹ of *Escherichia coli* without secondary recovery of treated water after 12 and 24 h. It was observed that the adsorption of the bacteria in the catalyst and the support is important. The post- treated water can be reused for Gram stains in microbiology practices.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua es uno de los mayores problemas ambientales a los que la población se enfrenta hoy en día y tiene implicaciones a nivel social, político, económico y de salud pública. Muchos procesos industriales, actividades agrícolas y domésticas vierten aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos recalcitrantes que deben ser eliminados de una manera apropiada. Asimismo, la concentración de los productos químicos en la corriente del efluente se debe mantener dentro de los valores permitidos por las legislaciones ambientales de cada país, las cuales cada vez son más estrictas ([Manisha V et. al. 2014](#)).

Los tipos y grados de contaminación varían en función de la actividad realizada, por ejemplo, en el caso de los desechos provenientes de laboratorios de investigación, docencia y ensayos de prueba, estos contienen residuos químicos y microbiológicos, donde pueden estar presentes compuestos orgánicos que pueden ser tóxicos tanto para su descarga al medio ambiente como para su almacenamiento ([Ghosh SK et. al. 2012](#)). Además, estas muestras de agua contienen microorganismos patógenos que requieren procesos de inactivación antes del vertimiento pues pueden generar problemas de salud pública.

Por esta razón, en los últimos años se ha incrementado la investigación en el tratamiento de aguas residuales ofreciendo alternativas a los métodos tradicionales. No obstante estos métodos no pueden ser utilizados para el tratamiento completo de las corrientes de aguas residuales recalcitrantes debido a la alta toxicidad y carcinogenicidad de los contaminantes. Las tecnologías más recientes buscan degradar moléculas recalcitrantes en moléculas más pequeñas, que puedan ser oxidadas por los métodos convencionales, de tal manera que las nuevas metodologías son complementarias a las ya existentes ([Manisha V et. al. 2014](#)).

Los procesos de oxidación avanzada (POA) son tecnologías alternativas que buscan mejorar la calidad de los efluentes y el reuso del agua dentro del proceso productivo, son capaces de degradar compuestos orgánicos recalcitrantes, así como la inactivación de bacterias y virus. Estos procesos habitualmente funcionan con menor requerimiento de energía que la oxidación directa y pueden aplicarse a la remediación y desintoxicación de aguas residuales ([Babuponnusami A 2013](#)).

Dentro de los POA uno de los métodos más promisorios para el propósito mencionado, es el proceso de oxidación avanzada conocido como reacción Fenton en el que se utilizan como reactivos peróxido de hidrógeno y sales de Fe^{2+} haciendo uso de un reactor simple aerobio y bajo condiciones de acidez. La descomposición del peróxido en presencia del ion Fe^{2+} genera especies reactivas de oxígeno (radicales hidroxilo: $\bullet\text{OH}$) que son capaces

de degradar la materia orgánica sin selectividad por lo que se podría mejorar las condiciones del agua residual tratada ([García J et. al. 2012](#)).

En el presente trabajo, se ha propuesto el uso de catalizadores de Fe_2O_3 promovidos con CeO_2 y soportados sobre carbón activado obtenido a partir de residuos de los tallos de rosas colombianas el cual ha sido caracterizado física y químicamente en estudios previos de nuestro grupo de investigación. Los soportes provenientes de materia orgánica como el carbón activado proporcionan una gran ventaja en el método dado que su uso para el tratamiento de aguas ha sido ampliamente reportado como un método promisorio y altamente eficiente para la eliminación de materia orgánica presente en desechos acuosos. Además, este material es de bajo costo, alta abundancia en nuestro país y se obtiene a partir de una materia prima de desecho que no presenta ninguna aplicabilidad o uso y que por sí sola, podría representar una fuente de contaminación importante.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo de grado tiene por objetivo evaluar el efecto del proceso Fenton heterogéneo como sistema de tratamiento del agua residual proveniente de los laboratorios de microbiología de la Pontificia universidad Javeriana, para la inactivación de *Escherichia coli* presente en esta agua residual, además de evaluar el re uso del agua residual tratada en coloraciones de Gram.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Pontificia Universidad Javeriana, como entidad de educación superior posee laboratorios de investigación y docencia, en los cuales por los procesos propios de cada laboratorio se generan aguas residuales. Estas aguas se clasifican como aguas residuales industriales, las cuales contienen sustancias que provienen de las actividades realizadas en estos laboratorios como coloraciones hematológicas, histológicas, parasitológicas, fúngicas y bacterianas. Es así que se producen mezclas de compuestos tóxicos y dañinos para el medio ambiente por lo que estas aguas residuales se manejan como residuos de alta peligrosidad.

A parte de los componentes químicos tóxicos que se puedan generar, estas aguas residuales pueden tener microorganismos, estudios previos realizados por [Cardozo 2012](#) y [Fernández 2013](#), demostraron que el agua residual tiene poblaciones de *E. coli* cercanas a $3,9 \times 10^6$ UFCmL⁻¹, concentración que es superior a lo exigido en la Resolución 3957 de 2009 de la SDA.

Debido a las características mencionadas anteriormente, la Universidad a partir del 2011 maneja al agua residual proveniente de los laboratorios como residuo peligroso, la cual se recolecta en contenedores plásticos y es dispuesta por la empresa contratada por la Universidad para el manejo de

residuos peligrosos. Este tratamiento le genera costos a la Universidad y por lo tanto es necesario crear, una alternativa de tratamiento que sea amigable con el medio y elimine los costos de recolección del residuo a la Universidad.

Por esto, se hace pertinente el estudio de un tratamiento para el agua residual proveniente de los laboratorios de docencia e investigación, como el proceso Fenton heterogéneo de tal forma que la aplicación de este proceso como tratamiento alternativo para el agua residual, pueda disminuir la carga contaminante de microorganismos presentes, en este caso *E. coli*, y así reducir los efectos contaminantes que se puedan causar al medio ambiente logrando un mejor manejo del recurso hídrico.

Además en el presente proyecto se utiliza un catalizador el cual es obtenido a partir de desechos de flores colombianas. Estos desechos son convertidos a través de un método térmico en un carbón activado que presenta interesantes propiedades como adsorbente y como soporte catalítico. El material adsorbente es de bajo costo y alto valor agregado, presenta alta área superficial y propiedades químicas que lo hacen idóneo para el tratamiento oxidativo de aguas residuales. En nuestro país, los desechos de flores, y en especial de rosas, se encuentran en grandes cantidades por ser la floricultura, una actividad de las más importantes en el territorio nacional. De esta manera, es muy innovador y relevante encontrar métodos que aprovechen estos residuos y hagan uso racional de estos para un propósito ambiental como el de este trabajo.

Adicionalmente en esta investigación se realizó un análisis del agua tratada para observar si cumple con las características necesarias para poder ser reutilizada en las tinciones realizadas en las prácticas de los laboratorios de docencia e investigación.

3. MARCO TEORICO

3.1. Agua residual

Las aguas residuales se caracterizan por tener altas concentraciones de materia orgánica, sólidos suspendidos, nutrientes y microorganismos. El agua residual es un producto inevitable de toda actividad humana tanto doméstica como industrial que al ser descargada sin un tratamiento previo en cuerpos o fuentes de aguas naturales representa una amenaza grave al ecosistema. Por lo tanto, el desarrollo y la aplicación de procesos de tratamiento de aguas residuales es indispensable para preservar el medio ambiente, cuidar el recurso hídrico y proteger así la salud pública (López J 2011).

Por lo tanto el agua de los laboratorios de docencia es un agua residual, debido a que se generan grandes volúmenes de residuos líquidos coloreados los cuales son el producto de tinciones celulares que emplean una amplia gama de colorantes de distintas familias (Fernández 2012).

3.1.1. Características del agua residual de los laboratorios de microbiología.

El agua residual de los laboratorios de microbiología se deriva del uso de colorantes usados en tinciones microbiológicas, los compuestos utilizados en las tinciones son capaces de generar trastornos tanto en humanos como animales, por ejemplo: mutaciones, citotoxicidad, carcinogenicidad y neurotoxicidad (Gao P et. al 2012). Dentro de ellos se destacan el cristal violeta y el verde de malaquita dado que pertenecen a la familia de los triarilmetanos y son potencialmente tóxicos y mutagénicos. Por otra parte, también se utilizan mordientes y solventes que hacen que la composición del agua sea muy compleja (Xiong Z et. al. 2011).

Los colorantes más utilizados en las tinciones microbiológicas se presentan en la Tabla1.

Las aguas residuales del laboratorio también contienen una gran carga de microorganismos ($\geq 10^6$ UFCmL⁻¹), que convierten a estos residuos en un riesgo biológico debido a la posible presencia de microorganismos patógenos como: *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* (Fernández 2012). Además contiene *Pseudomonas* spp.

Tabla 1. Colorantes más utilizados en tinciones microbiológicas. Tomado y modificado de (Cardozo M 2012).

COLORANTES	FAMILIA QUIMICA	INDICE NUMERO DE COLOR	SOLVENTES Y MORDIENTES
Tinta china comercial o nigrosina	Azo	50420	Agua
Negro sudán	Azo	26150	Cetona
Sudán III	Azo	26100	Alcohol etílico
Rojo congo	Azo	22120	Fenol
Verde malaquita	Triarilmetánico	42000	Suero de caballo
Fucsina sódica	Triarilmetánico	42685	Desoxicolato de amonio
Fucsina básica	Triarilmetánico	-	Oxalato de amonio
Cristal violeta	Triarilmetánico	42555	Ácido sulfúrico

Azul de cresil brimo	Oxacina	51010	-
Safranina O	Safranina	50240	Yoduro de bisublimato
Eosina y	Fluorona	45380	Yoduro de potasio
Azul de metileno	Tiazina	42780	Agua/Etanol

3.1.2. Microorganismos

Escherichia coli, es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteraceae*, es un bacilo Gram-negativo. Son anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos, capaces de crecer con metabolismo respiratorio y fermentativo. *E. coli* es considerado tradicionalmente como un coliforme fecal que además da positivo a la prueba del Indol. Aproximadamente el 0,1% de las bacterias intestinales del ser humano está representada por esta especie. Su nombre proviene de su descubridor “Theodore von Escherich”, quién lo aisló por primera vez en 1885 y lo nombro como *Bacterium coli*, y en 1920 fue nombrada *Escherich* por una revisión del trabajo de Theodore von Escherich.

A pesar de que *E. coli* ha sido muy estudiada a nivel fisiológico, genético y bioquímico, aún se desconoce bastante de su comportamiento en los diferentes hábitats donde puede encontrarse. Los hábitats de *E. coli* se dividen en primarios, que serían el hombre y los animales de sangre caliente, encontrándose, por lo tanto, en sus heces; y secundario serian aguas y suelos. Por su especificidad, esta bacteria está considerada como el mejor bio-indicador de contaminación fecal ([Howard C. Berg 2003](#)).

3.2. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POA), han sido propuestos en los últimos años como alternativas muy eficaces en la depuración de aguas contaminadas con resultados muy interesantes. Estos se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes, generando especies transitorias de gran poder oxidativo, estas especies se conocen como radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos o por otras formas de energía, y posee una alta efectividad para la oxidación de la materia orgánica. Los POA presentan interesantes características como por ejemplo ([García-Montaño 2007](#), [Parag et al. 2004](#), [Neyens et al. 2003](#)):

- I. Mineralización de los contaminantes, especialmente los compuestos orgánicos recalcitrante, hasta su completa transformación en dióxido de carbono y agua, evitando la formación de subproductos o residuos.
- II. Degradación de contaminantes orgánicos en compuestos más biodegradables y/o menos tóxicos.
- III. Eliminación de color y/o olor.
- IV. Desinfección pues puede provocar la inactivación de bacterias que representen peligro.

Uno de los procesos de oxidación avanzada más promisorios es el proceso Fenton, debido a que tiene un bajo costo debido a que los materiales y elementos utilizados son fáciles de encontrar y no son costosos, además de un gran poder de generar radicales $\bullet\text{OH}$, esto le da una gran eficacia al sistema, además de un valor agregado debido a que el peróxido de hidrógeno se descompone al final en CO_2 y H_2O , estos son compuestos que no generan contaminación al medio ambiente. Por otra parte, el hierro tampoco representa un contaminante (Blanco 2009).

La reacción Fenton puede ser de dos tipos homogénea y heterogénea, en la reacción homogénea, se da la generación de radicales hidroxilos mediante la utilización de sales disueltas de hierro (Fe^{+2}), sin embargo en esta reacción se producen lodos al final del proceso, los cuales necesitarían un tratamiento posterior. Por esta razón se propone la reacción de Fenton heterogénea la cual es una alternativa a la reacción de Fenton homogénea.

3.2.1. Fenton heterogéneo: catalizadores empleados

La reacción Fenton Heterogénea se basa en la generación de radicales hidroxilo se utilizando sales de Fe^{3+} en formas másicas o soportadas (García J et. al. 2012).

Los catalizadores heterogéneos están compuestos normalmente por una fase activa (óxido metálico) y un soporte para la dispersión del mismo, dentro de las propiedades que se tienen en cuenta para la elección de un soporte se encuentra, una elevada área superficial sobre la cual la fase activa o catalizador se deposita de manera homogénea.

En muchos casos existen otros compuestos superficiales, conocidos como promotores, que mejoran las características del catalizador ayudando a que se disperse mejor sobre la superficie o también aumentando la selectividad y/o actividad catalítica en el proceso (promotores químicos).

Entre los soportes para el proceso Fenton heterogéneo más usados destacan las alúminas, sílices, zeolitas y carbón activado; en general, deben

ser materiales inertes, química y térmicamente y que aporten una alta porosidad al catalizador resultante (Alcantara T et. al 2008). En la Tabla 2 se muestran algunos de los soportes más utilizados en Fenton heterogéneo.

Tabla 2. Soportes catalíticos más utilizados en el proceso Fenton heterogéneo

PROCESO	SOPORTE	METAL	REFERENCIA
Tratamiento de aguas residuales de la producción agroalimentaria	Bentonita comercial	Cu	Caudo et. al. 2008
Oxidación de fenol	Arcilla	Al-Fe	Barrault et al. 2000
Degradación Azul de metileno	Montmorillonita natural	Fe	De León et. al. 2008
Remoción nitratos	Carbón activado	Fe ₂ O ₃ , CuO, Cr ₂ O ₃ ,	Matatov-Meytal and Sheintuch 1997
Tratamiento Aguas	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ , TiO ₂	Cooper and Burch 1999
Mineralización ácido carboxílico	Zeolita mineral	Fe ⁺³ /Fe ⁺²	Centi et al. 2000
Tratamiento aguas con colorantes	MgO	Fe	Pak and Chang 1999

En el presente trabajo se empleó un catalizador tipo óxido de Fe y Ce soportado sobre carbón activado debido a que según Massa P et. al. 2009 resulta ser una opción prometedora para ser utilizado en el tratamiento de contaminantes orgánicos por oxidación con H₂O₂.

El cerio se utiliza debido a que promueve la actividad catalítica del Fe, esto se debe a las propiedades de reducción y oxidación que posee el CeO₂. El CeO₂ tiene la capacidad de sufrir ciclos rápidos redox, además, de aumentar la capacidad del catalizador para el almacenamiento de oxígeno (Carriazo J.G et. al. 2007).

A su vez, el uso de carbón activado presenta muchas ventajas sobre otros métodos de tratamiento convencionales (Kamal N 2008). Las ventajas de utilizar carbón activado son: menor sensibilidad a variaciones, no se ve afectado por productos químicos tóxicos, tiene una mayor flexibilidad en el diseño y ayuda a la eliminación de contaminantes orgánicos, además posee una elevada capacidad de adsorción y la posibilidad de ser reutilizado, sin embargo, las propiedades intrínsecas del carbón activado dependen de la materia prima utilizada (Barragán J et. al. 2011).

El carbón activado utilizado en este trabajo fue obtenido a partir de residuos de rosas y como soporte presenta unas características específicas como: una alta porosidad y gran área superficial que son de gran importancia en la

síntesis de un catalizador heterogéneo para llevar a cabo la reacción Fenton, la caracterización del carbón viene dada por [García J et. al. 2012](#).

3.2.2. Factores que afectan el proceso Fenton

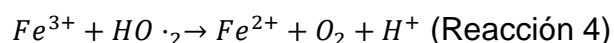
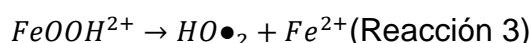
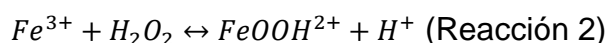
Hay varios factores que pueden afectar la reacción como: la concentración inicial de catalizador, concentración de peróxido, el tipo y concentración del contaminante orgánico y el pH.

El pH no solo afecta la degradación de los contaminantes sino la estabilidad del catalizador. A pH alcalino la estabilidad del peróxido cambia y se descompone rápidamente en moléculas de oxígeno evitando la formación de radicales hidroxilo. De igual forma, algunos autores reportan una mayor pérdida de hierro del soporte a valores de pH muy ácidos ([Ramírez J et. al. 2007](#)).

La concentración del catalizador es otro parámetro que puede determinar la eficiencia en la degradación y en la remoción de contaminantes. Entre mayor sea la concentración del catalizador, mayores son los sitios activos para la descomposición del peróxido y adsorción de componentes orgánicos. El catalizador debe presentar una actividad elevada que se mantenga a lo largo del tratamiento, durante el cual el catalizador debe presentar una estabilidad física, química y mecánica para las condiciones deseadas de operación. Por otro lado, el peróxido de hidrógeno favorece la producción de radicales hidroxilo, a medida que la concentración de este aumenta en el sistema, sin embargo, un exceso de peróxido puede producir disminución en la mineralización. Dado que el peróxido de hidrógeno puede convertir el radical hidroxilo a agua y a el radical hidroxiperoxilo $HO_2\cdot$, que posee un menor poder oxidante que el hidroxilo por lo que disminuye la eficiencia del sistema en la degradación de compuestos ([Ramírez J et. al. 2007](#)).

3.2.3. Mecanismo de inactivación

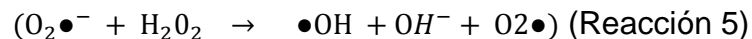
En el sistema Fenton heterogéneo, el H_2O_2 se descompone catalíticamente por Fe^{3+} para generar un poderoso oxidante, el radical hidroxilo ($HO\cdot$) (Reacción 1). El ión Fe^{3+} puede reducirse por reacción con H_2O_2 y formar de nuevo el ión Fe^{2+} , más radicales hidroxilo. El mecanismo global resulta de carácter catalítico (Reacción 2-4) ([Blanco J 2009](#)).



El daño celular producido por el radical hidroxilo, ocurre sobre diferentes macromoléculas como los lípidos de membrana, los radicales generados promueven la peroxidación de los componentes fosfolípidos poliinsaturados de la membrana lipídica, que conducen a la pérdida de la respiración y la muerte celular (Gao M et. al. 2012).

La formación de dímeros de coenzima A intracelular da como resultado la inhibición del mecanismo de respiración celular y por tanto conducen a la muerte celular, lo que sugiere la oxidación de la CoA reductasa, está implicada en el proceso de inactivación. Estos resultados indican que los radicales hidroxilos HO• inducen estrés oxidativo directo a componentes bacterianos. Los radicales hidroxilo HO• provocan la ruptura de la membrana celular y esto sugiere que el primer objetivo de los HO• para la inactivación de *E. coli* es la membrana celular (Gao M et. al. 2012).

Sin embargo, hay estudios que demuestran que el mecanismo de inactivación está relacionado con H₂O₂ y O₂•⁻ los cuales entran a la célula a través de un proceso de difusión y subsecuentemente generan radicales HO• por medio de la reacción de Harber-Weiss (Cho M et. al. 2004).



La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño celular que puede ser desencadenado por el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno (Cho M et. al. 2004).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- I. La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- II. Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- III. La tensión de oxígeno.
- IV. La presencia de hierro.
- V. La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados,

estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Gutiérrez V 2002).

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de las proteínas por daño en un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN.

El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis)(Gutiérrez V 2002).

En la Figura 1 se puede observar cómo se originan los daños a nivel de pared y membrana, ocasionando la pérdida de fluidez, estructura, permeabilidad, y cambios en el gradiente iónico transmembranales así como la alteración de funciones celulares. El daño en la membrana plasmática se mide por la pérdida de iones potasio, proteínas y RNA o concentraciones extracelulares de iones calcio. Adicionalmente, los ROS atacan, proteínas, lípidos y otros componentes con efectos citotóxicos y mutagénicos. La degradación de los componentes celulares termina en la mineralización celular a CO_2 y H_2O y este proceso irreversible (Foster et. al 2011).

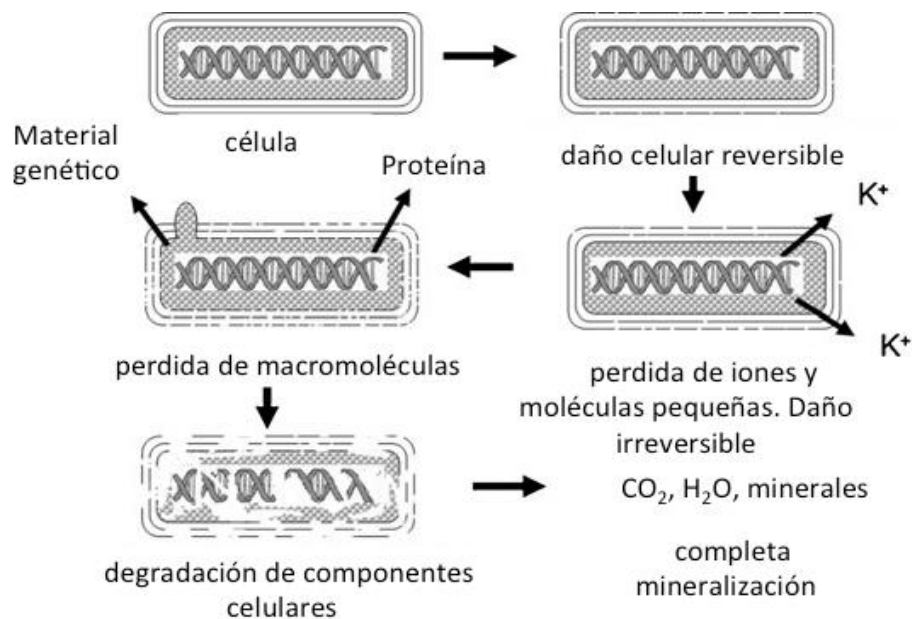


Figura 1. Esquema de mineralización celular a causa de la acción de radicales oxidantes (Foster et. al 2011).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El proceso de oxidación avanzada Fenton heterogéneo es capaz de inactivar una concentración de 10^7 UFCmL⁻¹ de *Escherichia coli* inoculada artificialmente en aguas residuales de los laboratorios de Microbiología de la facultad de ciencias?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el proceso Fenton heterogéneo sobre la inactivación de *E. coli*, presente en aguas residuales generadas en las prácticas de Microbiología y su reutilización en tinciones de Gram empleando catalizadores de Fe-Ce soportados en carbón activado a través de un estudio piloto.

5.2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar mediante las técnicas DRX, MEB y EDS el carbón activado y el catalizador utilizados en el proceso Fenton Heterogéneo y determinar el efecto de los mismos sobre el proceso
- II. Realizar curvas de inactivación de *E. coli* empleando el proceso de Fenton heterogéneo en función del tiempo a escala de laboratorio utilizando un proceso por lote.
- III. Observar y establecer si hay procesos de reactivación de *E. coli* en el efluente después del proceso
- IV. Determinar si el agua tratada después del proceso Fenton heterogéneo puede re utilizarse en las coloraciones de Gram

6. METODOLOGIA

En la Figura 2 se muestra un esquema simplificado de la metodología empleada en el presente trabajo.

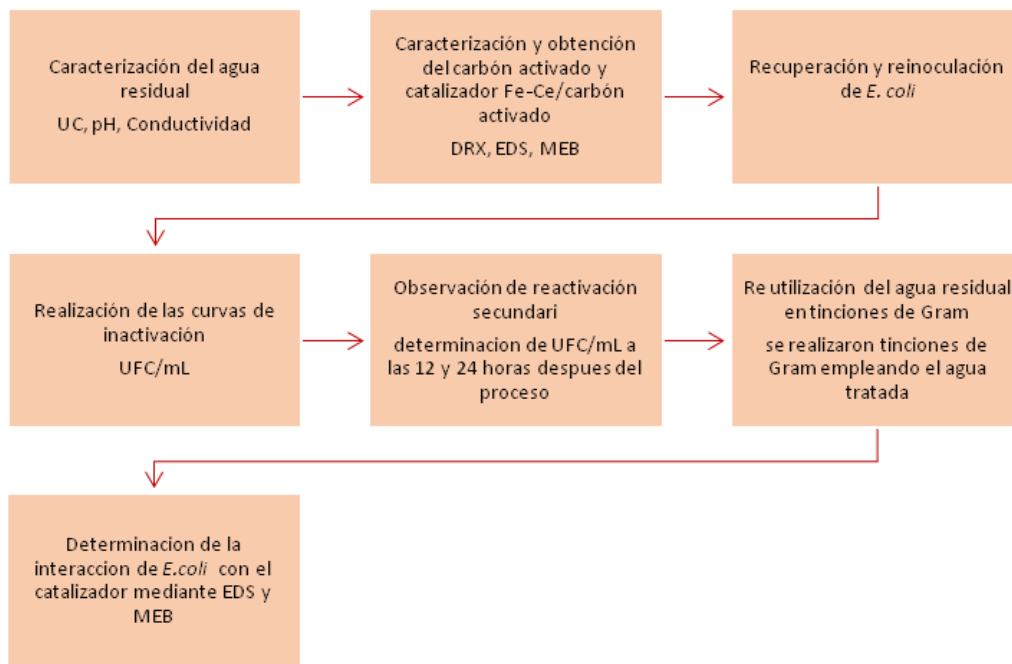


Figura 2. Esquema de la metodología empleada.

6.1. Caracterización del agua residual

El agua residual utilizada proviene de los laboratorios de docencia 233, 214 y 224 de los Edificios Ángel Valtierra S.J. (Ed. 51) y Félix Restrepo S.J. (Ed. 50) de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se tomaron 500 mL de cada uno de los recipientes que están ubicados en cada laboratorio y se mezclaron en un recipiente de 25 L debidamente marcado, cerrado y protegido contra la luz.

Al agua residual se le determinó la concentración inicial de la población de microorganismos, el pH, conductividad y unidades de color. Para la determinación de estos parámetros siguieron los siguientes procedimientos:

- I. Siembra en profundidad por triplicado y recuento para determinar la población inicial de microorganismos. Se realizaron diluciones seriadas y se utilizó un volumen de 1mL de la dilución 10^{14} y se mezcló con el medio de cultivo fundido VRB (*Scharlau*). Se incubó hasta la aparición de colonias contables (ICMSF, 2000).
- II. El pH se midió con un potenciómetro Schott calibrado según el método 4500-H⁺B de la *American Public Health Association* (APHA 2005).
- III. La conductividad eléctrica se midió con un conductímetro M.R.C.
- IV. Las unidades de color se midieron después de centrifugar 10 mL de las muestra durante 10 min a 5000 rpm, luego se transfirió el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio y estéril, se midió la

absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm, las unidades de color se calcularon a partir de la siguiente ecuación 1 propuesta por [Campbell WM et. al. 2004](#):

$$UC = \frac{(abs \times 500)}{0,132} \quad (\text{Ecuación 1})$$

6.2. Obtención del carbón activado

El carbón activado empleado como soporte catalítico se obtuvo a partir de residuos agroindustriales provenientes de la industria de flores. Se emplearon tallos de rosas rojas los cuales se secaron y se tamizaron a un tamaño de 250 μm . El proceso de transformación térmica de la biomasa se realizó a alta temperatura (700° C/1 h) en atmósfera inerte (N_2). La activación del carbonizado se llevó a cabo con NaOH en proporción 1:2 en peso durante 24 h seguida de un tratamiento con HNO_3 hasta pH neutro ([García J et. al. 2012](#)). La caracterización química y física del carbón activado fue desarrollada por [Cifuentes et. al 2013](#). En la tabla 3 se presentan las características más importantes que describen a este carbón activado.

Tabla 3. Caracterización de las propiedades físicas y químicas del carbón activado empleado como soporte catalítico en este trabajo. Tomado de ([Cifuentes et. al 2013](#)).

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Acidez	1,85± 0.11mol g ⁻¹
Basicidad	1,31± 0.09mol g ⁻¹
Análisis textural	S _{BET} = 594 m ² g ⁻¹ , S _L = 697 m ² g ⁻¹ , S _{microporos} =585 m ² g ⁻¹ (t-plot), V _{microporos} = 0,21 cm ³ g ⁻¹ (t-plot), Ancho de poro promedio= 0,18 (BJH).
Análisis próximo	Humedad (8,86 %), Materia volátil (15,63 %), Carbono fijo (64,86 %) y Cenizas (11,67 %)
Análisis elemental	C (61,08 %), H (2,10 %), O (32,53 %), N (3,81 %) y S (0,47 %)
Punto isoeléctrico (PZC)	6,8 ± 0.2

6.3. Síntesis de los catalizadores de Fe-Ce

Los catalizadores fueron sintetizados por la técnica de impregnación húmeda incipiente sobre el carbón activado empleando $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en contenidos nominales de 1% m/m de ambos metales. La calcinación fue llevada a cabo en atmósfera de N_2 a $400\text{ }^\circ\text{C}/2\text{ h}$ (García et. al. 2012). La concentración nominal de Fe y de Ce fue seleccionada con base en un estudio paramétrico que se incluye en una tesis de maestría que se desarrolló de manera paralela a este trabajo.

6.4. Caracterización del carbón activado y del catalizador Fe-Ce/Carbón activado

6.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) Espectroscopía Dispersiva de Rayos X (EDX)

Se tomaron imágenes MEB y se realizaron análisis de EDX a la matriz porosa compuesta por carbón activado óxido de cerio y hierro después de terminado cada tratamiento. Las muestras se depositaron sobre una superficie conductora y se recubrieron con una película de Au, y se observaron en un microscopio JEOL, modelo JSM 6490-LV.

6.4.2. Difracción de rayos X (DRX)

El catalizador fue caracterizado mediante Difracción de Rayos X empleando un equipo BRUKER D8 con un detector VANTEC que usa un electrodo de Cu - Ka.

6.5. Curvas de inactivación

6.5.1. Recuperación y reinoculación de *E. coli*

El recuento inicial de *E. coli* en el agua residual fue de 10^{14} UFCmL⁻¹ el cual es un valor muy alto según los protocolos de desinfección, la concentración que se requería era de 10^7 UFCmL⁻¹ y por tanto fue necesario reinocular el agua para ello, además de que el agua presentó concentraciones elevadas de *Pseudomonas* spp y esta población inhibe el crecimiento de *E. coli*.

Para la reinoculación del agua, esta se esterilizó previamente y se preparó un inóculo cuya concentración final fue de 10^7 UFCmL⁻¹ de *E. coli*. Se midió la absorbancia del inóculo a una longitud de onda de 540 nm y se ajustó a una absorbancia de 0,04 – 0,08, esto garantizó que la concentración inicial

del agua fuera alrededor de 10^7 UFCmL⁻¹. Se tomaron 4 mL del inoculo para inocular el agua. Se inoculó 1mL por cada 100mL de agua residual.

6.5.2. Características del reactor

Como reactor se utilizó uno tipo *Batch* de vidrio con un Volumen total (VT) de 2000 mL y un Volumen efectivo de trabajo (VET) de 400 mL (Figura 3). El sistema cuenta con 4 puertos para control de pH, adición de H₂O₂, flujo de aire y uno de muestreo. Cada proceso se realizó utilizando aireación constante, pH 3,73, H₂O₂ 0,3M, 160mg/L de catalizador. La selección de estas variables se hizo con base en un estudio paramétrico de una tesis de maestría que se desarrolló de manera paralela a este trabajo.

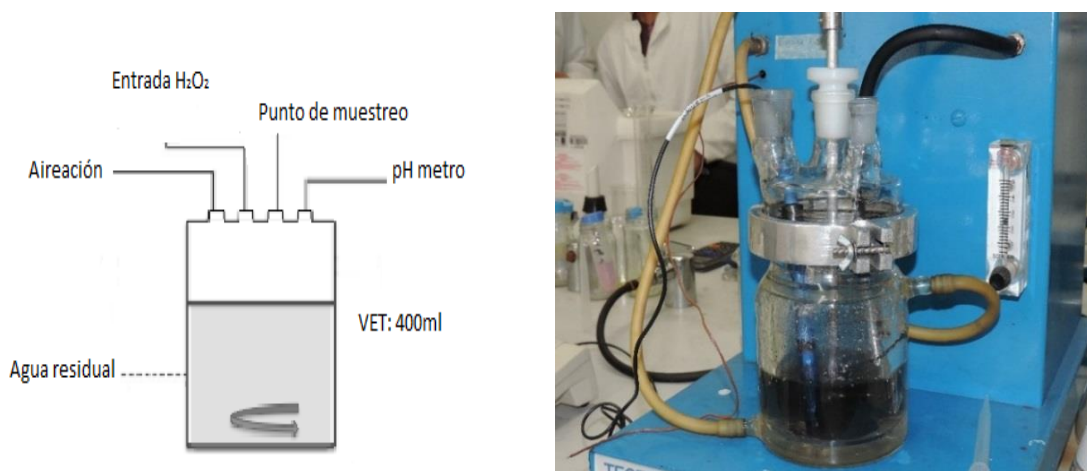


Figura 3. Esquema del reactor Fenton utilizado en las curvas de inactivación. A la derecha se observa una fotografía del reactor. Fuente: Autor.

6.5.3. Características de los tratamientos evaluados y controles en función del tiempo

Se llevaron a cabo curvas cinéticas de inactivación de *E. coli* bajo diferentes tratamientos. Se evaluó el tratamiento Fenton Heterogéneo usando el catalizador Fe-Ce/carbón activado y como controles se realizaron experimentos con H₂O₂, el catalizador sin H₂O₂ y el carbón activado sin H₂O₂. Para cada uno de los tratamientos se siguieron las condiciones descritas en el numeral anterior, en la Tabla 4 se dan los tratamientos.

Para cada una de las muestras tomadas durante el proceso, se incubó durante 24horas a 35 °C, se realizó recuento de las colonias después del periodo de incubación, los resultados se expresaron en log₁₀ de UFC/mL. Posterior a los tratamientos, se tomaron micrografías MEB con el fin de conocer la morfología del catalizador y la integridad celular de *E. coli*.

Tabla 4. Tratamientos al agua residual evaluados.

EXPERIMENTO	REPETICIONES	DURACIÓN (h)
Fenton*	2	14
H ₂ O ₂	2	14
Fe-Ce/carbón activado	2	14
Carbón activado	2	14

* Tratamiento con H₂O₂ y el catalizador Fe-Ce/carbón activado.

6.6. Reactivación secundaria

La reactivación secundaria se evaluó si el tratamiento y los controles eran capaces de inactivar totalmente o parcialmente *E. coli*. Para ello se tomaron muestras a las 12 y 24 horas después del tiempo de finalización cada curva y se sembraron en agar VRB.

Se incubaron durante 24 horas a 35 °C y se realizó recuento de las colonias características (lactosa positiva). Se determinó el porcentaje de reactivación teniendo en cuenta el número inicial y final de UFCmL⁻¹. La evaluación de la reactivación secundaria se realizó en todos los tratamientos por triplicado, se sacaron promedios y se compararon desviaciones estándar en cada tratamiento.

6.7. Reutilización agua residual

Se realizaron suspensiones de *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus aureus* que provienen del laboratorio de alimentos a partir de colonias aisladas se tomó una asada de cada microorganismo y se suspendió en 9mL de solución salina (NaCl 0,85% p/v), a partir de cada suspensión se realizaron tinciones de Gram empleando el agua residual pos tratamiento (Fenton heterogéneo y los controles H₂O₂, 1% Fe-Ce/carbón activado y carbón activado (CA)).

Se midió la calidad de tinción por observación de un campo microscópico y se contaron 100 células pero se revisaron varios campos para determinar homogeneidad en la tinción, en este conteo se incluyeron las células totalmente teñidas y las que no se teñieron en su totalidad, se sacó un porcentaje de células teñidas comparando la calidad de tinción con el control que se realizó con agua destilada, se hizo por triplicado y se sacó promedio, desviación estándar y un porcentaje de tinción, el porcentaje de tinción se

obtuvo aplicando una fórmula matemática donde el 100 % de tinción se estableció con las 100 células contadas en el control de agua destilada.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización del agua residual y ajustes del agua residual

A continuación se presentan los parámetros obtenidos para el agua residual del estudio (Tabla 5). Se utilizaron dos lotes de agua, debido a que el lote 1 presentó alteraciones físicas, químicas y microbiológicas.

Tabla 5. Parámetros medidos para la caracterización del agua residual. Lotes 1 y 2 utilizados en las curvas de inactivación.

PARÁMETRO	LOTE 1	LOTE 2	SDA RES. 3957 DEL 2004
pH (unidades)	4,25	4,98	5,0 – 9,0
Color(UPTC)	3260	7935	1000
Conductividad μS	0,804	0,83	No aplica
Población Inicial (UFCmL^{-1})	$3,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{14}$	20000

Como se puede observar en la Tabla 5 el pH tiene valores menores a los permitidos para el vertimiento al alcantarillado este valor de pH se debe al carácter ácido que poseen los colorantes, que generalmente, en solución, el pH que tienen es cercano a 4, los valores impuestos en la resolución 3957 del 2009 de la SDA son: pH 5-9 unidades, por lo tanto es el primer parámetro que no se cumple. La medida de pH de un cuerpo de agua es muy importante porque es un indicador de la calidad del agua, debido a la sensibilidad de los organismos acuáticos al pH de su ambiente. Cambios pequeños en el pH pueden poner en peligro a muchos tipos de plantas y animales; Si el pH de las aguas en que viven se encuentra fuera de este rango, podrían no sobrevivir o no ser capaces reproducirse, por esto es de vital importancia que el pH no sea menor ni mayor a lo que sugiere la normativa ([AIACiMa 2007](#)).

En segundo lugar las unidades de color permitidas son de 1000 unidades por lo que el lote 1 sobre pasa este valor por 2260 unidades y el lote 2 sobrepasa por 6935 unidades de color, así que este parámetro tampoco cumple con el valor solicitado por la SDA resolución 3957 de 2009. El color en el agua se debe a los colorantes utilizados en los laboratorios para tinciones, lo cuales están molecularmente constituidos por grupos

funcionales conocidos como como cromóforos, auxocromos y grupos solubilizadores. Los colorantes que se encuentran en esta agua residual pertenecen al grupo de trifenilmetánicos que son un amplio grupo de tintes de gran impacto mundial por su color y toxicidad comprobada en animales y humanos. Se ha encontrado que estos colorantes son mutagénicos, clastogénicos, carcinogénicos, teratógenos y cancerígenos, lo cual puede causar un gran impacto a nivel ambiental si esta agua fuera vertida al alcantarillado, además el color en el agua impide el paso de los rayos del sol los cuales son esenciales para procesos fotosintéticos dentro de los cuerpos de agua, impidiendo así la supervivencia de organismos y plantas acuáticas. (Saquib M et. al. 2003).

El agua potable utilizada en estas tinciones proviene del grifo, normalmente la conductividad para el agua de consumo humano está entre los valores de 0,050 y 0,100ms/cm a 25°C, la conductividad obtenida en los dos lotes de agua residual puede deberse a la alta concentración de iones debido a la composición de los colorantes, productos de metabolitos celulares como ácidos orgánicos y a la presencia de bacterias. En general estos pueden catalogarse como contaminantes orgánicos e inorgánicos y estos están asociados al aumento de la conductividad (American Publics Health Association 2005).

La población inicial de microorganismos de los dos lotes de agua es muy alta, esta población puede deberse a que los microorganismos no se quedan 100 % fijados a las láminas y terminan en el agua, sin embargo es difícil predecir que las poblaciones fueran tan altas debido a los compuestos químicos que tiene el agua, como ya se mencionó estos compuestos pueden llegar a ser muy tóxicos, por lo tanto lo que se puede deducir es que estos compuestos tuvieron un efecto bacteriostático sobre los microorganismos en el agua dejándolos en un estado de latencia hasta que encontraran condiciones favorables para su crecimiento.

Para esto autores han reportado que los microorganismos tienen un poder de adaptación y resistencia a distintos antisépticos entre ellos los colorantes. También afirman que bacterias como *E. coli* pueden adquirir resistencia a colorantes como el cristal violeta si se expone a concentraciones no letales de estos. Por esta razón es muy posible que *E. coli* encontrada en el agua residual se adaptó a las condiciones del medio debido a que los colorantes se encontraban diluidos, lo que pudo disminuir sus efectos bactericidas sobre *E. coli*, generando procesos de resistencia (Rusell AD 2004).

Según los parámetros medidos en los lotes 1 y 2 esta agua residual, producto de las actividades de docencia, no cumple con los parámetros de

vertimiento al alcantarillado de la SDA resolución 3957 del 2009 previos al tratamiento.

7.2. Caracterización del carbón activado y catalizador Fe-Ce/carbón activado

Para la caracterización del carbón activado y el catalizador Fe-Ce, se realizó microscopia electrónica de barrido y además un análisis elemental utilizando una microsonda EDX. En la Figura 4 se logra observar que el catalizador de 1% Fe-Ce/carbón activado tiene una morfología granular, una apariencia porosa e irregular, además de que está compuesto por capas agrupadas que son el resultado de estructuras laminares de grafeno, esta apariencia es debida al material de partida y a su composición ([Barragán J 2011](#)).

Según [Cazetta AL et. al. 2011](#), la porosidad del carbón aumenta debido a la activación alcalina con NaOH, esto promueve la ruptura de los enlaces en la superficie del carbonizado retirando especies químicas, especialmente de carácter ácido, que cuando son eliminadas generan rugosidad e irregularidad en el material.

Las imágenes del artículo de [Cifuentes et. al. 2013](#) indican que el carbón activado posee grandes cavidades con un alto grado de heterogeneidad y asperezas, provenientes de la estructura lignocelulósica presente en el material de partida. También se puede observar en las imágenes poros de mayor tamaño que se formaron durante el procedimiento de activación debido a la pérdida de materia volátil durante la pirólisis. Estas características le confieren al carbón activado, la capacidad para que sustancias químicas o microorganismos presentes en el agua residual se puedan adsorber. Morfológicamente, el catalizador no presenta grandes diferencias superficiales en comparación con el carbón activado antes descrito.

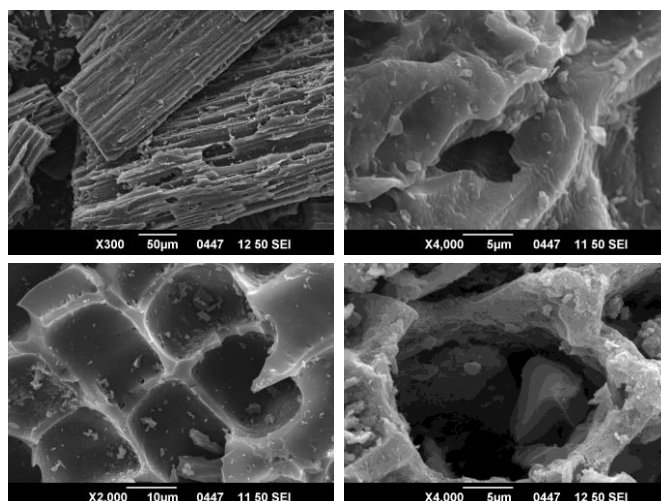


Figura 4. Imagen MEB del catalizador Fe-Ce/carbón activado antes del tratamiento Fenton.

En la Figura 5 se observa el MEB acompañado de un mapeo químico el cual nos indica la distribución de los elementos en la muestra. En este caso, los elementos que más nos interesan son el carbón, el hierro, el cerio y el oxígeno. La distribución de estos elementos es bastante homogénea sobre el material y en especial del Ce y del Fe, lo cual podría llegar a favorecer el proceso Fenton puesto que la actividad de un catalizador depende de la dispersión de fases activas en el soporte.

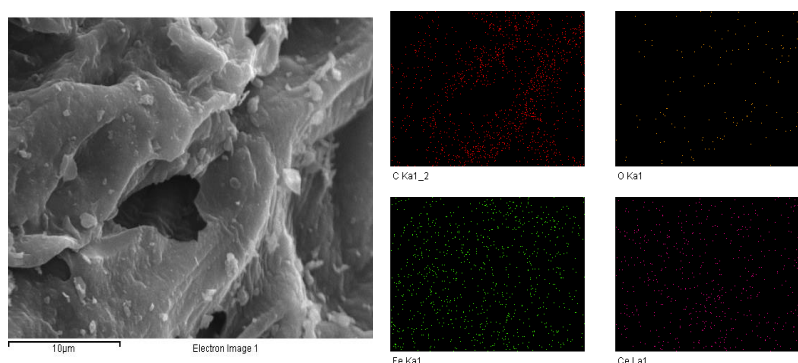
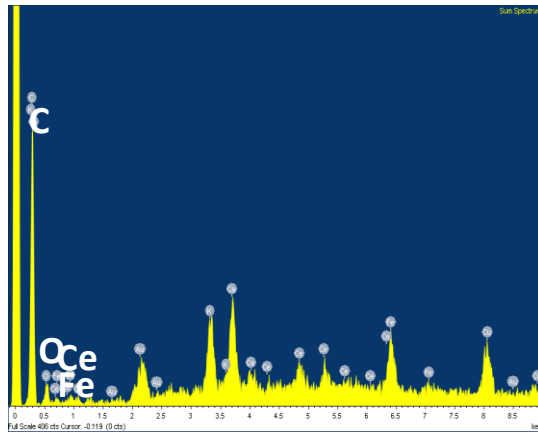


Figura 5. Imagen MEB acompañada del mapeo químico realizado con la técnica EDX para el catalizador Fe-Ce/carbón activado

En la Figura 6 se muestra la composición atómica y en peso de cada elemento, siendo el carbono el elemento más abundante. Por otra parte, se observa que los porcentajes de hierro y cerio están en menor proporción, pero la presencia de estos dos elementos nos permite deducir que la preparación del catalizador se realizó de manera efectiva. Los porcentajes bajos en comparación con la cantidad nominal (1 % en peso), se deben a que probablemente estos metales se incorporan en la porosidad interior del carbón activado.



Elemento	%Peso	% Atómico
C	96,37	97,34
O	3,46	2,62
Fe	0,03	0,01
Ce	0,03	N.D.

Figura 6. Espectro EDX y composición en peso y atómica para el catalizador Fe-Ce/carbón activado.

En la Figura 7 se muestra el patrón de DRX del catalizador. En este difractograma se observa una alta amorficidad por la amplitud de las señales y la deficiente línea base. Las señales que se observan son las típicas de carbones activados compuestos por láminas de grafito. Adicionalmente, se observan señales de baja intensidad de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Mi H et. al 2011) y CeO_2 (Kumar E.R et. al 2013), cuyos tamaños de partícula no se pudieron determinar, lo que sugiere que dichos tamaños de partícula son muy pequeños y probablemente inferiores a 10 nm. La importancia de determinar el tamaño de partícula se debe a que entre mayor sea el tamaño de partícula menor área superficial por lo tanto el proceso catalítico se ve afectado, en el caso contrario, cuando los tamaños de partículas son pequeños hay mayor disposición de fase activa y el proceso se ve beneficiado.

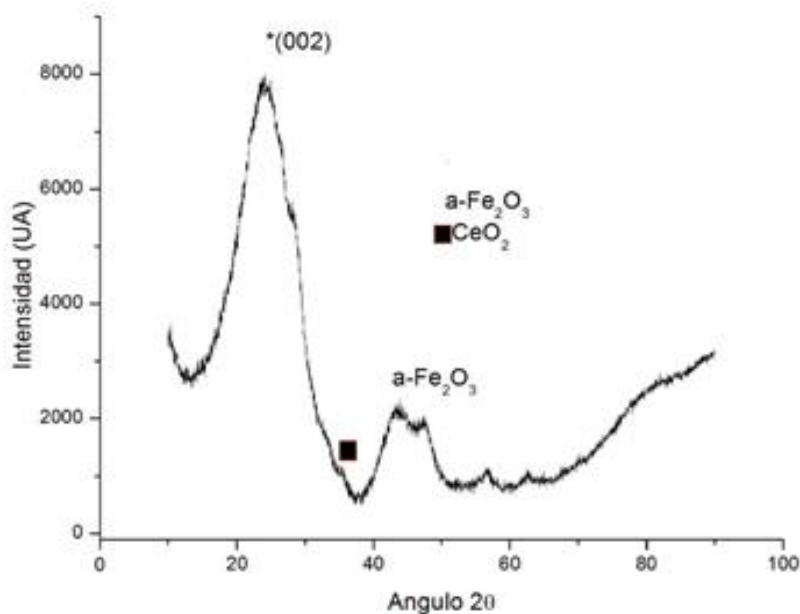


Figura 7. Difracción de rayos X del catalizador Fe-Ce/carbón activado.

7.3. Curvas de inactivación

Los microorganismos son capaces de sobrevivir en condiciones adversas en este caso el agua residual de los laboratorios, debido a sus mecanismos de protección y sobrevivencia que tienen, como la formación de biopelículas o la adherencia a los sólidos, esto sucede cuando el medio en el que se encuentran no hay fuentes fácilmente asimilables de carbono y nitrógeno.

En la figura 8 se muestra el tratamiento Fenton heterogéneo aplicado al agua residual y la curva control de peróxido de hidrogeno. En la inactivación de *E. coli* por el tratamiento de Fenton heterogéneo (a) se observa que hay una disminución de 6 unidades logarítmicas en 60 minutos, partiendo de una concentración inicial de 10^7 UFCmL⁻¹ y terminadas las 14 horas de tratamiento la concentración final fue de 10^1 UFCmL⁻¹, es decir que después de 60 minutos de tratamiento la población se mantuvo 10^1 UFCmL⁻¹ hasta finalizar las 14 h de tratamiento, además se observa que no hay reactivación pos tratamiento.

La inactivación de *E. coli* por el proceso de Fenton Heterogéneo puede deberse a diversos factores, según [Spuhler D et. al. 2010](#) el H₂O₂ puede generar especies oxidativas que pueden ser exógenas o endógenas, las especies oxidativas exógenas dañan la membrana celular y además se pueden difundir dentro de la célula. Mientras que las especies oxidativas endógenas dañan directamente las células debido a que generan dentro de la célula más especies oxidativas causando peroxidación lipídica, esto se debe a que los OH· generados reaccionan muy rápidamente con biomoléculas celulares y cuando entran en contacto con el DNA se rompen las hebras, hay modificaciones de las bases nucleótidos y es cuando ocurre un gran daño en la célula.

Sin embargo, no todo el daño celular es debido al peróxido por esta razón [Spuhler D et. al 2010](#) dice que hay que tener en cuenta la reacción que ocurre entre el hierro y el peróxido de hidrogeno. La concentración de estos dos compuestos es muy importante debido a que la alteración de la concentración intracelular de Fe³⁺ y H₂O₂ puede aumentar la formación intracelular de OH·, dando lugar al daño del ADN de la célula.

Por otra parte los •OH endógenos pueden reaccionar directamente con biomoléculas celulares (reacciones de tipo I), o más comúnmente, con O₂ del medio (Reacción tipo II) que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como O₂, O₂^{-•}, •OH y H₂O₂. Las reacciones de tipo I incluyen el ataque a proteínas y componentes de la membrana celular, especialmente los lípidos de membrana, que conduce a

cadenas de peroxidación de lípidos y la inactivación de las células por aumento de la permeabilidad y / o la interrupción de los gradientes iónicos transmembranales. Los ROS generados a través de las reacciones de tipo II también pueden controlar estos ataques. Además, el H_2O_2 puede reaccionar adicionalmente con Fe^{3+} intracelular libre para formar radicales $\bullet\text{OH}$ altamente reactivos y otras especies de oxígeno tóxicos a través de la reacción de Haber – Weiss (Spuhler D et. al 2010).

Adicionalmente, cualquier forma $\text{OH}\cdot$ reaccionará con lo que está presente en su sitio de formación y dañará directamente casi todas las moléculas biológicas, incluyendo el ADN. Hasta la fecha no existe ningún mecanismo de defensa celular contra el ataque de los $\text{OH}\cdot$ hacia el ADN, por lo tanto estos radicales, una vez generados dentro de las células, son extremadamente tóxicos (Spuhler D et. al 2010).

Cuando la concentración de especies activas de oxígeno (o ROS) aumenta a un nivel que excede la capacidad de defensa de la célula, a esto se llama estrés oxidativo.

El tratamiento de peróxido de hidrógeno (b) muestra una disminución de 3 unidades logarítmicas en un tiempo de 2 h, presenta variaciones debido a que el peróxido de hidrógeno puede dañar la célula pero este daño puede ser reversible, además de que el peróxido puede descomponerse. Por lo tanto a partir de la concentración inicial de 10^7 UFCmL⁻¹ e inactivando 3 unidades logarítmicas, su concentración final fue de 10^4 UFCmL⁻¹ terminadas las 14 horas de tratamiento, este control presentó reactivación secundaria.

El peróxido de hidrógeno presenta una acción bactericida que se debe a la producción de iones hidroxilo y radicales libres, que actúan oxidando componentes esenciales del microorganismo como por ejemplo lípidos, proteínas y ADN. Además la liberación de O_2 por las catalasas tisulares en su descomposición y en forma de burbujas favorece la eliminación de bacterias (Gutiérrez V 2002).

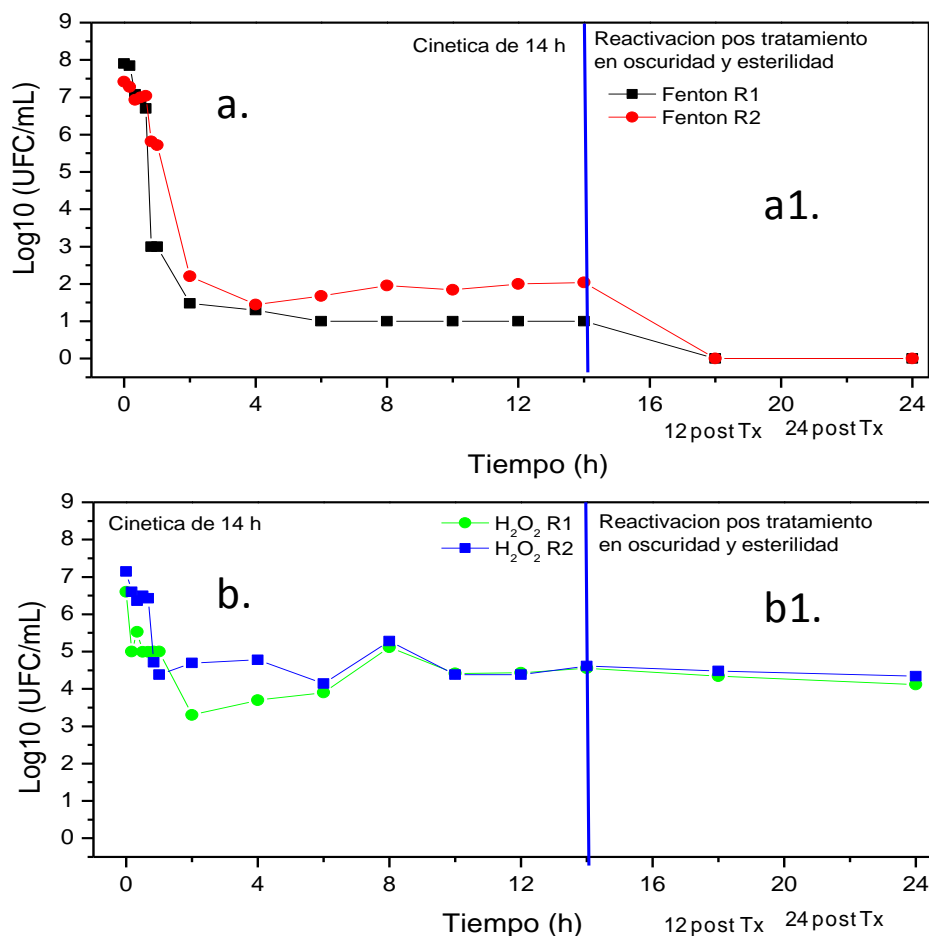


Figura 8. a) Cinética de inactivación de *E. coli* con tratamiento Fenton heterogéneo utilizando el catalizador Fe-Ce/Carbón activado/ H₂O₂. **a1)** Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad **b)** Cinética de inactivación de *E. coli* con tratamiento con H₂O₂ (control) **b1)** Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad.

El mecanismo de acción del peróxido consiste en la oxidación de los grupos sulfhidrilo y los dobles enlaces de las enzimas de las bacterias, provocando una modificación conformacional de las proteínas que forman dichas enzimas, esto le genera a la bacteria la pérdida de sus funciones, y la muerte celular. Por esta razón la acción desinfectante del peróxido de hidrogeno está basada en hacer vulnerables las estructuras de protección de las bacterias, además que al alterar la conformación de las paredes celulares permite el acceso al interior de la célula del peróxido y así puede oxidar estructuras internas como el ADN (Gutiérrez V 2002).

En la Figura 9 se observa la curva control de 1% Fe-Ce/Carbón activado (a), esta presenta una disminución de 5 unidades logarítmicas en un tiempo de 30 min, por lo que la concentración final terminadas las 14 horas de tratamiento fue de 10² UFCmL⁻¹, el tratamiento presento muchas variaciones en función del tiempo, debido a que en este tratamiento el catalizador sin ayuda del peróxido no puede inactivar por completo a *E. coli*, porque no hay

producción de radicales hidroxilo o especies libres oxidativas, sin embargo la disminución de la población puede deberse a dos factores, el primero es la utilización del CeO₂ dado que según [Thill et al. 2006](#) el CeO₂ es altamente tóxico para *E. coli* debido a una reacción oxidativa cuando las partículas de CeO₂ son adsorbidas por la superficie de la célula bacteriana.

El segundo factor puede deberse al mecanismo de adsorción por la porosidad que posee el carbón activado sin embargo las variaciones que se presentan se deben a mecanismos de desadsorción y esto se debe a que el carbón activado está impregnado de hierro y cerio por lo que las concentraciones de estos dos elementos pueden favorecer la formación de partículas del óxido activo de mayor tamaño las cuales pueden bloquear la porosidad del carbón activado y así no permitir que *E. coli* se adhiera a su superficie.

El carbón activado (9b) fue el mejor control de todos si se compara el tiempo y la disminución de unidades logarítmicas, este presentó a los 10 min una disminución de 7 unidades logarítmicas, pero en este caso, este tratamiento no es un tratamiento de inactivación, debido a que el carbón activado no presenta o no tiene capacidad para generar especies oxidativas o radicales que puedan inactivar a *E. coli*, por lo tanto en este tratamiento se da un proceso de adsorción pero a comparación del tratamiento de Fe-Ce/Carbón activado, el carbón activado está puro y no hay especies químicas que puedan llenar sus poros, así *E. coli* puede adherirse a la superficie del carbón, esto también se debe al tamaño de los poros del carbón que son menor a 125 µm ([García et. al 2012](#)).

El carbón activado es considerado un adsorbente muy versátil y eficiente para remover compuestos orgánicos en solución acuosa, su capacidad de adsorción se debe a su gran área específica y a su naturaleza. El carbón activado presenta un comportamiento anfotérico es decir que la carga de su superficie depende del pH de la solución en la que se encuentre, en este caso el pH del agua es de 3,73 por lo tanto la carga del carbón activado es positiva, esto es muy importante debido a que dependiendo del pH de la solución el carbón activado puede repeler o atraer los compuestos presentes en el agua. Por esta razón *E. coli* se adhiere al carbón activado, debido a que *E. coli* presenta una carga negativa en su superficie y el carbón activado la atrae ([Leyva R et. al 2002](#)).

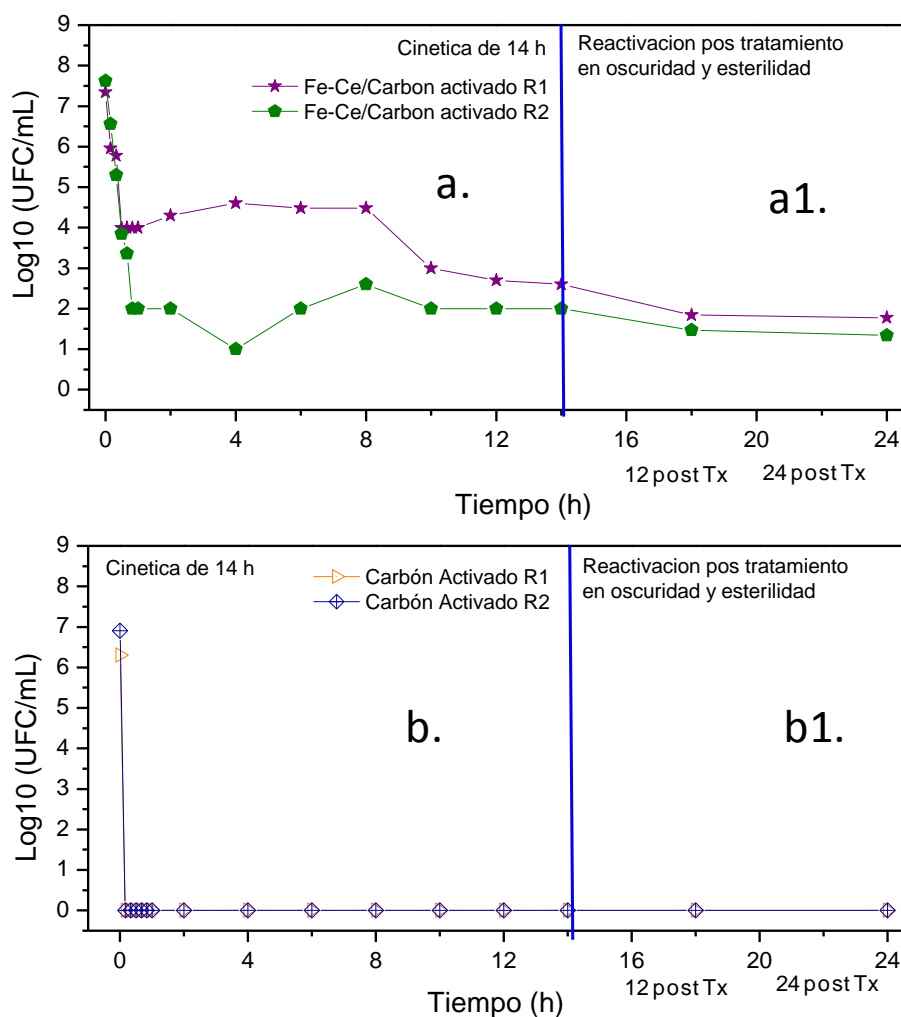


Figura 9. a) Cinética de inactivación *E. coli*, curva control Fe-Ce/carbón activado. **a1)** Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad **b)** Cinética de inactivación de *E. coli*, Curva control con carbón activado. **b1)** Reactivación pos-tratamiento en oscuridad y esterilidad.

7.4. Reactivación secundaria

Al tratamiento Fenton heterogéneo y a los controles de H₂O₂, Fe-Ce/carbón activado y carbón activado se les evaluó la reactivación que *E. coli* pudiera presentar terminadas las 14 horas de tratamiento. En los resultados que se presentan en la Figura 8: reactivación y pos tratamiento en oscuridad (a1) se observó que el tratamiento Fenton Heterogéneo no presentó reactivación de *E. coli* a pesar de que terminadas las 14 h de tratamiento quedaba una población de *E. coli* de 10¹ UFCmL⁻¹, esto puede deberse a que en el agua pos tratada hay un efecto residual de los radicales •OH que según lo observado dura 24 horas, permitiendo que no haya crecimiento de *E. coli* después de 12 y 24 h después de terminado el proceso por lo que se puede deducir que el tratamiento con Fenton Heterogéneo es tan fuerte para la célula que no puede presentar mecanismos de reparación, por lo tanto su inactivación es del 100%.

El tratamiento de peróxido de hidrógeno (b1) no presenta una reactivación como tal, debido a que la concentración de 10^4 UFCmL⁻¹ al final de las 14 h de tratamiento es igual a la concentración de las 12 y 24 horas que es de 10^4 UFC/mL.

Esto puede deberse a que *E. coli* puede presentar mecanismos de reparación, estos mecanismos se presentan en una fase denominada “Hombros”. Los “hombros” son descritos como fases muy suaves de inactivación seguidas usualmente por caídas exponenciales de la población que terminan por zonas de desaceleración llamadas colas (Zhou H et. al 2011).

En esta fase de “hombros” el daño de la pared celular es acumulativo y gradual con lo que le permite a los microorganismos activar mecanismos de reparación. Los mecanismos de reparación microbiana como respuesta al estrés oxido-reductivo incluyen la producción de enzimas como las catalasas y superóxido dismutasas, sumadas a la producción de otras enzimas relacionadas con la reparación de daños en el ADN como la exonucleasa III y la proteína Rec A (Zhou H et. al. 2011).

Sin embargo, en este control *E. coli* queda en un estado de supervivencia, debido a que presenta mecanismo de reparación porque no hay muerte total, este mecanismo no es suficiente para que la población de *E. coli* aumente superando la concentración final de las 14 horas. Pero este estado de supervivencia también puede deberse a que *E. coli* puede responder a entornos cambiantes, es decir que responde a cambios de temperatura, pH y osmolaridad, adaptándose a estos cambios bruscos en su entorno. La capacidad que tiene de adaptarse a estos cambios es esencial para su supervivencia, estas alteraciones desencadenan modificaciones en la expresión genética a través de una variedad de mecanismos que entre los más comunes se encuentran los factores alternativos sigma y los represores transcripcionales.

El factor sigma se disocia de la ARN polimerasa tras el inicio de la transcripción y es responsable de la expresión de los genes de reparación durante el crecimiento normal de la bacteria, sin embargo este factor se altera produciendo 5 factores sigma que se activan durante el estrés o los cambios en las condiciones normales de crecimiento haciendo rápidas modificaciones en la expresión de genes y así permitirle a *E. coli* sobrevivir (Shen S et. al 2011) por esta razón se podría decir que *E. coli* está presentando mecanismos de reparación para su supervivencia en el medio, sin embargo estos mecanismos no ayudan a recuperar la total viabilidad de la célula.

En el control de Fe-Ce/carbón activado Figura 9 (a1) no se puede afirmar que hay reactivación secundaria a las 12 y 24 h, debido a que este tratamiento no presenta un mecanismo de inactivación porque no hay producción de radicales libres ni especies oxidativas. En este control se presenta un mecanismo de adsorción por lo tanto *E. coli* no es inactivada si no que es adherida a la superficie del carbón activado, sin embargo el hierro y el cerio interfieren en este proceso porque llenan los poros del carbón impidiendo que *E. coli* se adhiera, por esta razón podemos ver crecimiento a las 12 y 24 horas, porque muy probablemente no todas quedaron adheridas al carbón y quedaron suspendidas en el agua, con lo que se observa crecimiento.

El control de carbón activado Figura 9 (b1) no presenta reactivación secundaria por dos razones primero el carbón activado no genera especies oxidativas las cuales dañan a *E. coli* por lo tanto esta no presenta mecanismos de reparación que le permitan crecer a las 12 y 24 horas, ahora bien la segunda razón es que el carbón tiene una gran porosidad la cual sirvió para la adherencia de *E. coli* a su superficie, y en este tratamiento no hubo procesos de desadsorción en el efluente pos tratado, por lo que todo quedo adherido a la superficie del carbón y no presento crecimiento a las 12 y 24 horas.

7.5. Reutilización del agua residual

Para la reutilización del agua residual se sacaron porcentajes de tinción para el tratamiento Fenton heterogeneto y los controles de H₂O₂, Fe-Ce/carbón activado y carbón activado. En la Figura 10 se observan los porcentajes de tinción para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus licheniformis*, este porcentaje de tinción de saco con regla de tres siendo el 100 % el control de agua destilada para cada microorganismo.

Los resultados para Fenton Heterogéneo presentan un porcentaje de tinción entre 96 y el 100 %, este tratamiento presenta el porcentaje de tinción más alto, el control de peróxido presenta porcentajes de tinción entre 87 y 100% siendo muy variables estos datos. El control de Fe-Ce/carbón activado, presenta el porcentaje más alto de tinción entre los 3 controles, estando en un rango de 95 y 100 % de tinción, mientras que el control de carbón activado presenta el porcentaje más bajo que esta entre el 65 y 72%.

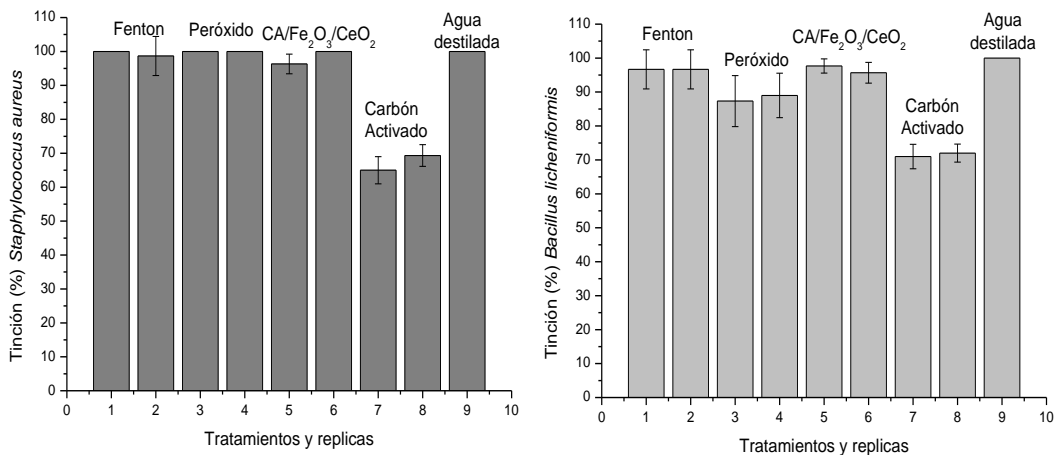


Figura 10. Porcentaje de Tinción para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus licheniformis*.

Se puede observar que los porcentajes de tinción son bastante buenos, siendo Fenton Heterogéneo el tratamiento que presenta mayor porcentaje de tinción, el que presenta menor porcentaje de tinción es el de carbón activado, estos porcentajes se ven reflejados en las tinciones realizadas Figura 11.

Con estos datos se puede decir que el agua residual después de pasar por el proceso de Fenton Heterogéneo puede reutilizarse en tinciones de Gram, debido a que el agua tratada no interviene con el proceso de tinción, esto se puede deber a que los iones que puede contener el agua después del tratamiento no interfieren con los colorantes dentro de la célula, por ejemplo el cristal violeta es básico y se une a componentes celulares de carga negativa, por lo que se puede decir que los colorantes se fijan a la pared celular según sus cargas, por tal motivo si el agua con el que se realizan las tinciones tiene una conductividad muy alta podría interferir con las cargas de los colorantes volviéndolos menos efectivos para adherirse a la pared celular (Santambrosio E et. al 2009). Debido a esto el porcentaje de carbón activado es el más bajo, porque posiblemente el carbón residual en el agua aumenta la conductividad del agua interfiriendo en el proceso de tinción de las células.

Por otra parte los porcentajes de tinción varían entre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus licheniformis*, esto puede deberse a que las bacterias en forma de cocos tienen una superficie/volumen alta mientras que los bacilos presentan una relación baja, por esta razón en relación al tamaño celular, las células pequeñas tienen mayor superficie relativa disponible que las células grandes. Este hecho se hace más visible en el caso de los cuerpos esféricos, debido a que las células con menor radio poseen una relación superficie/volumen más ventajosa, y de ahí que puedan llevar a cabo los intercambios con el medio en condiciones más ventajosas como en este caso *Staphylococcus aureus*. (UNLPam 2007).

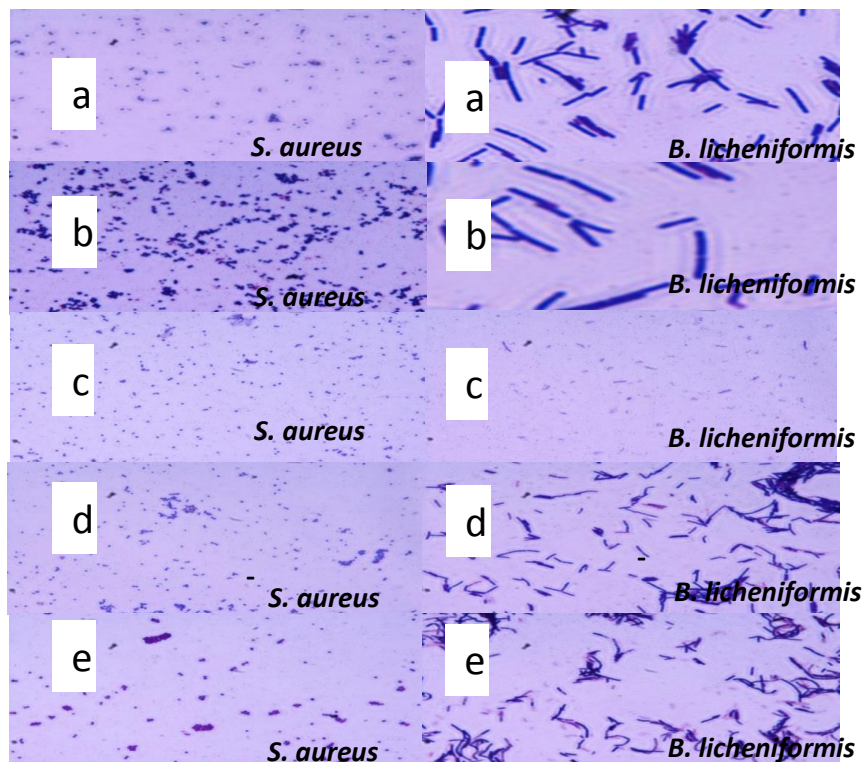


Figura 11. Microscopia Óptica, (a) agua destilada, (b) tratamiento Fenton heterogéneo y controles de (c) H_2O_2 , (d) Fe-Ce/carbón activado y (e) carbón activado.

7.6. MEB Y EDS del catalizador después del tratamiento

Se tomaron imágenes MEB y EDS al catalizador después del tratamiento y las curvas control, para observar que cambios podía tener el catalizador y a su vez observar los daños ocurridos a *E. coli*, a continuación se presentan las imágenes de la microscopía electrónica de barrido del catalizador utilizado en cada tratamiento después de terminado cada proceso.

En la Figura 12, se observa la cepa de *E. coli* aislada para reinocular el agua antes del proceso Fenton heterogéneo y se puede ver que tiene un tamaño de 1-2 μm .

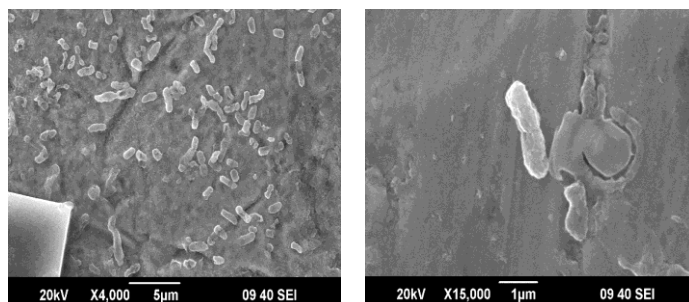


Figura 12. Imagen MEB de la cepa de *E. coli*, sin ningún tratamiento. En la Figura 13 se observan las células de *E. coli* después del tratamiento Fenton Heterogéneo, como se dijo anteriormente debido a los radicales

•OH, el Fe_2O_3 y el CeO_2 , *E. coli* pierde su integridad celular, en esta imagen se evidencian los daños microscópicos del proceso Fenton Heterogéneo, su morfología celular se altera hinchándose como pelotas, también se puede observar que tras el daño acumulativo ocasionado por los radicales •OH, donde ocurre lisis celular y por ende la liberación del contenido intracelular, ocasionando la muerte de *E. coli*.

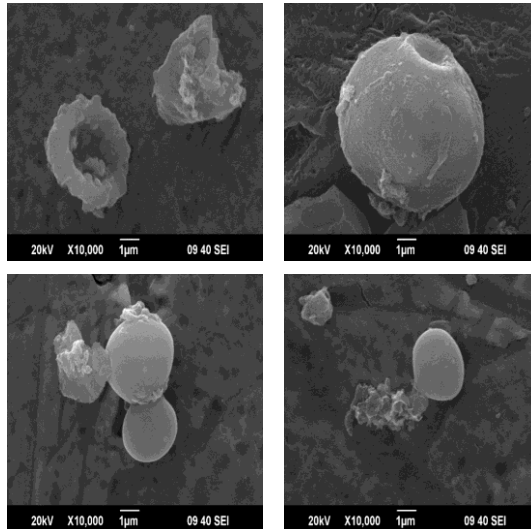


Figura 13. Imagen MEB de *E. coli* después del tratamiento Fenton Heterogéneo.

En la Figura 14 también se pueden observar la pérdida de la integridad celular de *E. coli* después del tratamiento con Fe-Ce/carbón activado, sin embargo en este tratamiento no se observa la lisis celular, si no la célula dañada. También se puede ver como se adhiere *E. coli* al carbón activado, esto es debido a su alta porosidad y a que los tamaños del poro permiten la adherencia de las células al carbón.

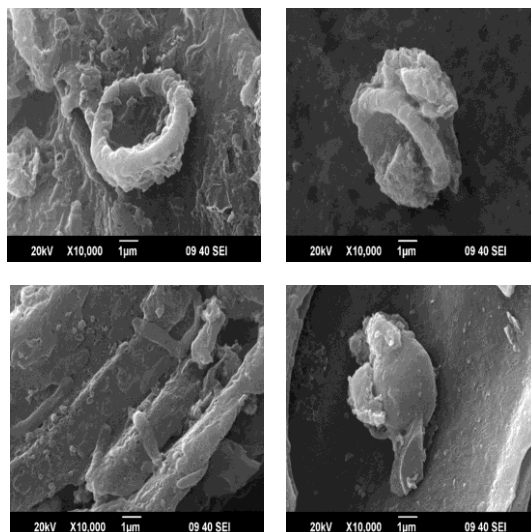


Figura 14. Imagen MEB de *E. coli* y el catalizador después del tratamiento control con el catalizador Fe-Ce/carbón activado.

En la Figura 15 se observa el control de carbón activado, en este tratamiento se ve que la integridad celular de *E. coli* está intacta, por lo que se puede asegurar que este tratamiento no inactiva *E. coli* si no que la elimina del agua residual mediante procesos de adsorción, dado que los poros del carbón tienen un tamaño de 125 μm y el tamaño de *E. coli* esta entre 1 y 2 μm , por lo tanto, esto le da la capacidad de poder adherirse o quedar atrapada en los poros del carbón activado, además de que el carbón puede comportarse como un anfótero, lo que quiere decir que se carga según el medio en el que se encuentre, en este caso el medio está cargado positivamente por el pH ácido de 3,73, de tal forma que el carbón activado también está cargado positivamente por lo que puede atraer y permitir la adherencia de *E. coli* a su superficie debido a que la bacteria presenta en su pared cargas negativas y estas se ven atraídas hacia las cargas del carbón.

También se puede observar que las características del carbón siguen intactas después del tratamiento, por lo que se puede decir que el carbón activado utilizado en todos los procesos es bastante estable y no cambia su porosidad ni su morfología.

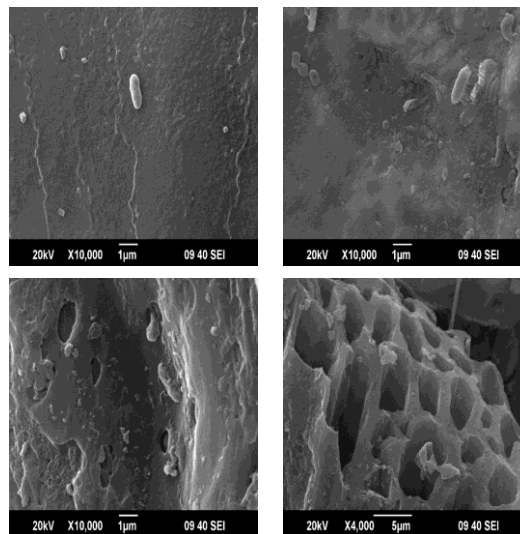


Figura 15. Imagen MEB de *E. coli* y del carbón activado después del tratamiento control con carbón activado.

En la Figura 16 se observa el mapeo químico de *E. coli* en donde se puede inferir que su composición está basada en C, N, O, P y S, adicionalmente, es posible observar que todos los elementos están distribuidos homogéneamente por toda la superficie de la célula.

Por su parte, en la Figura 17 se puede ver el análisis EDS y el mapeo químico del catalizador después del tratamiento Fenton Heterogéneo, se observa que la célula que aparece en la imagen tiene una composición basada en C, N, P, O y S, esto nos demuestra que es un microorganismo en este caso dada la morfología vista presumiblemente es *E. coli*.

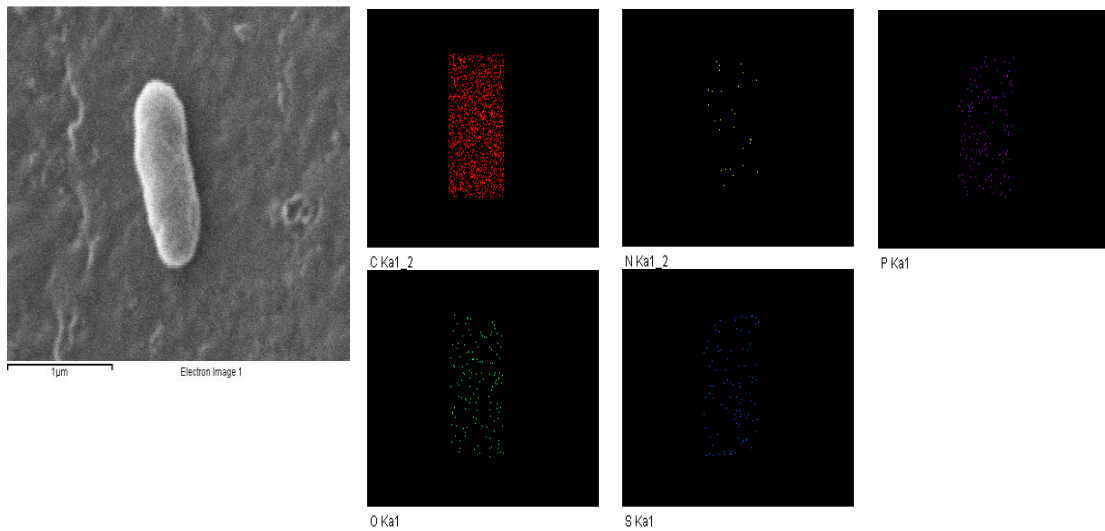


Figura 16. Imagen MEB acompañada de mapeo químico por técnica EDX de *E. coli* antes del tratamiento.

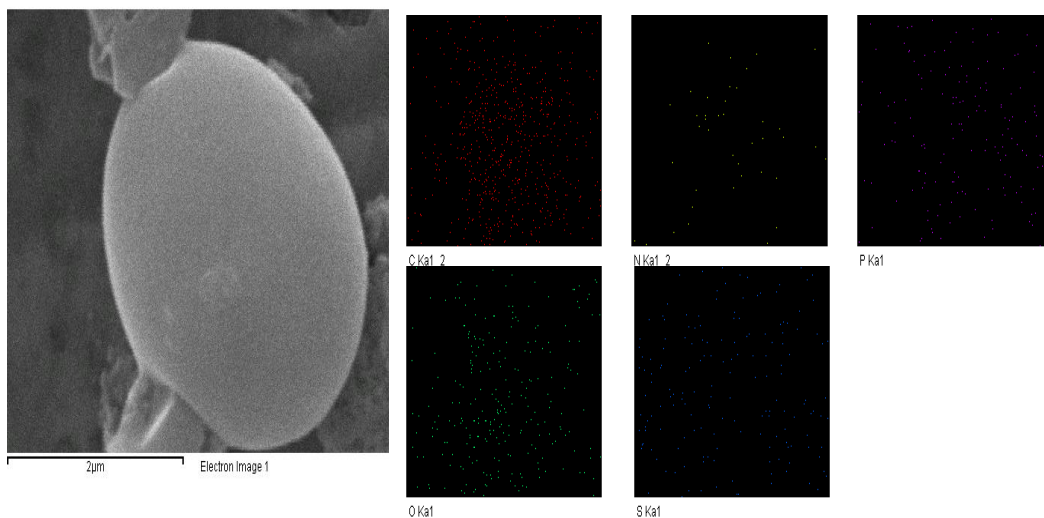
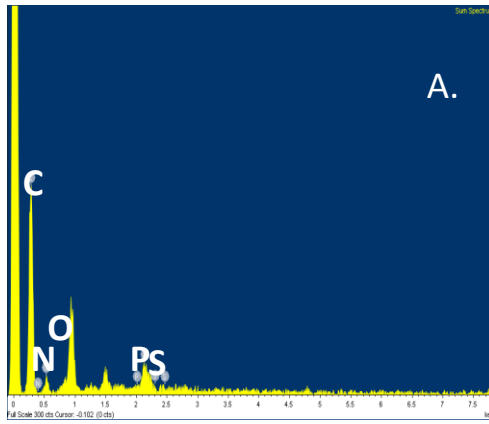
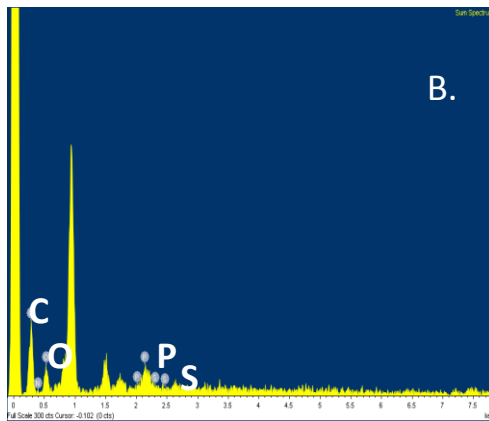


Figura 17. Imagen MEB acompañada del mapeo químico realizado con la técnica EDX para *E. coli* después del tratamiento Fenton Heterogéneo

En la Figura 18 se muestra el espectro EDS y la composición en peso y atómica de *E. coli* antes y después del tratamiento Fenton. En todos los resultados, con las microscopias y el mapeo químico realizado a la superficie de las células, se encontró una composición de C, N, O, P esto permitió verificar que fueran células de *E. coli* debido a que según [Caballero et. al 2007](#) y [Khan et al. 2006](#) estos compuestos son nutrientes esenciales requeridos por los microorganismos. El elemento que está en mayor porcentaje es el carbón esto se debe a que el EDS fue tomado en las muestras que contenían el carbón activado.



Elemento	% Peso	% Atómico
C	55.68	61.56
N	14.24	13.50
O	29.98	24.89
P	0.17	0.08
S	N.D.	N.D.



Elemento	% Peso	% Atómico
C	76.69	81.17
N	2.80	2.54
O	20.49	16.28
P	0.01	N. D
S	0.01	N. D

Figura 18. Espectro EDX y composición atómica y en peso de la *E. coli* antes y después del tratamiento Fenton. A. *E. coli* sin tratamiento, B. *E. coli* después del proceso Fenton Heterogéneo.

8. CONCLUSIONES

A partir del desarrollo del presente trabajo es posible concluir:

- I. El agua residual proveniente de los laboratorios de microbiología contiene sustancias químicas tóxicas, además de una población de 10^{14} UFCmL⁻¹ de microorganismos, por tanto debe efectuarse un tratamiento previo al agua para evitar incumplir con la norma de vertimientos y evitar el impacto al recurso hídrico y posibles sanciones.
- II. El catalizador de Fe-Ce presenta una morfología porosa, irregular y laminar compuesta por estructuras de grafeno en donde los óxidos de Fe y de Ce se ubican homogéneamente en su superficie con un tamaño de partícula nanométrico. Estas características son muy benéficas para el proceso Fenton Heterogéneo.
- III. Los experimentos control realizados señalan que la adsorción de *E. coli* en el carbón activado es alta, pero en este caso la inactivación no es por muerte celular como si lo es para el caso del proceso Fenton Heterogéneo.

- IV. El tratamiento de Fenton heterogéneo es un tratamiento efectivo para la inactivación de 7 unidades logarítmicas de *Escherichia coli* en aguas residuales provenientes de los laboratorios de docencia de la Pontificia Universidad Javeriana.
- V. Fenton heterogéneo tiene un efecto residual que no permite la reactivación de *E. coli* a las 12 y 24 horas después de terminado el proceso, constituyéndose en una alternativa para el tratamiento de aguas residuales.
- VI. El agua residual proveniente de los laboratorios, tratada con Fenton Heterogéneo puede volver a usarse en las tinciones de Gram, ya que los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos utilizando agua destilada.

9. RECOMENDACIONES

A partir del desarrollo del presente trabajo se proponen las siguientes recomendaciones para investigaciones posteriores:

- I. Para garantizar que el proceso Fenton heterogéneo sea efectivo en la inactivación de microorganismos, se podrían evaluar otras poblaciones diferentes de *E. coli*.
- II. Se podría evaluar otro volumen efectivo de trabajo para garantizar que esto no afecte con el proceso.
- III. Se podría estudiar más las propiedades físicas y químicas del catalizador usando métodos de caracterización avanzados buscando correlacionar más a fondo las propiedades del catalizador con su actividad.
- IV. Evaluar la toxicidad del agua tratada para asegurar que no se generen compuestos tóxicos por el proceso y así asegurar que el agua tratada puede descargarse en el efluente o en el sistema de alcantarillado.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1. American Publics Health Association. *Standar methods for the examination of water and wastewater*. 2005. 21 Edition. United States of America
- 2. Amin NK. Removal of reactive dye from aqueous solutions by adsorption onto activated carbons prepared from sugarcane bagasse pith. *Desalination* 2008; 223 (1–3): 152-161.
- 3. Babuponnusami A, Muthukumar K (2013) A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* xxx xxx–xxx

4. Barrault, J., Abdellaoui, M., Bouchoule, C., Majest_e, A., Tatibouet, J.M., Louloudi, A., Papayannakos, N., Gangas, N.H., 2000a. Catalytic wet peroxide oxidation overmixed (Al-Fe) pillared clays. *Appl. Catal. B* 27 (4), L225-L230.
5. Bassemir, RW, Bean A. (2004) Inks. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* Berg. Howard C (2003) *E. coli* in motion, Biological and medical physics biomedical engineering. Department of molecular and cell biology.
6. Berg. Howard C (2003) *E. coli* in motion, Biological and medical physics biomedical engineering. Department of molecular and cell biology.
7. Blanco J (2009) Degradación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto-Fenton. Tesis de maestría Universidad politécnica de Cataluña.
8. Bonivento J, Molina A, Maestre R, García A (2011) *E. coli* 0157: H7 En las canales de bovinos en plantas de beneficio: Un peligro biológico con gran impacto para la salud pública. *Biociencias* Vol 6 Número 2 53 - 61 Universidad Libre Seccional Barranquilla
9. Campbell WM, Burrell AK, Officer DL, Jolley KW. Porphyrins as light harvesters in the dye-sensitised TiO₂ solar cell. *Coordination Chemistry Reviews*. 2004;248(13-14):1363-79.
10. Cardozo Miño M (2012) Evaluación de la fotocatalisis heterogénea UV/TiO₂ y fenton heterogéneo H₂O₂/Fe/Carbón activado en el tratamiento del agua residual de laboratorios de microbiología. Proyecto trabajo de grado.
11. Carriazo J.G, Centeno M.A, Odriozola J.A, Moreno S, Molina R (2007) Effect of Fe and Ce on Al-pillared bontonite an their performance in catalytic oxidation reactions. *Estado sólido y catálisis ambiental*, departamento de química, Universidad Nacional de Colombia. General vol 317 120-128
12. Cazetta AL, Vargas AMM, Nogami EM, Kunita MH, Guilherme MR, Martins AC, Silva TL, Moraes JCG, Almeida VC (2011). NaOH-activated carbon of high surface area produced from coconut shell: Kinetics and equilibrium studies from the methylene blue adsorption. *Chemical Engineering Journal*; 174 (1): 117-125.
13. Centi, G., Perathoner, S., Torre, T., Verduna, M.G., 2000. Catalytic wet oxidation with H₂O₂ of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneous Fenton-type catalysts. *Catal. Today* 55 (1/2), 61-69

14. Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J (2004) Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research* 38 1069–1077
15. Cooper C, Burch R (1999). An investigation of catalytic ozonation for the oxidation of halocarbons in drinking water preparation. *Water Res.* 33 (18), 3695–3700.
16. Domènech, X., Jardim, W. F., & Litter, M. I. (2001). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*. Editor: Miguel Blesa, Red CYTED VIII-G, 3, 26.
17. Foster H, Ditta I, Varghese S, Steele A (2011) Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology Biotechnology*; 90, 1847-1868.
18. Gao M, An T, Li G, Nie X, Yip H, Zhao H, Wong P (2012) Genetic studies of the role of fatty acid and coenzyme A in photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. *Water research* vol 46 3951-3957
19. Gao P, Liu J, Zhang T, Sun DD, Ng W. Hierarchical TiO₂/CdS “spindle-like” composite with high photodegradation and antibacterial capability under visible light irradiation. *Journal of Hazardous Materials.*;229–230(0):209-16.
20. García J, Castellanos M , Uscátegui A 1, Fernández J, Pedroza A , Daza C (2012) Remoción de colorantes sintéticos mediante el proceso Fenton heterogéneo usando Fe₂O₃ soportado en carbón activado obtenido a partir de residuos de rosas. *Universitas Scientiarum* Vol. 17 (3): 303-314
21. Ghosh SK, Doctor PB, Kulkarni PK. Toxicity screening of dye-contaminated river water using the Microtox system and its impact on microbial population. *Science of The Total Environment* 1993; 134 Supplement 2: 1211-1216.
22. Gutierrez V (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. *Rev Cubana Med Milit* 2002;31(2):126-33
23. Kumar E.R, Jayaprakash R, Patel R, Kumar S (2013) Preparation and magnetic properties of the nanosized Mn–Ce–Fe–O system *Materials Science in Semiconductor Processing* 16, 1701–1705.

24. Leyva R, Velázquez L, Mendoza J, Guerrero R (2002) Adsorción de salicilato de sodio en solución acuosa sobre carbón activado. Centro de investigación y estudios de Posgrado. FCQ, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Vol 46 num 2
25. López J (2011) Evaluación de la eficiencia de un reactor anaeróbico de flujo ascendente y manto de lodos UASB para el tratamiento de aguas residuales – escala laboratorio. Proyecto trabajo de grado.
26. Manisha V. Bagal, Parag R. Gogate (2014) Wastewater treatment using hybrid treatment schemes based on cavitation and Fenton chemistry: A review. ScienceDirect Ultrasonics Sonochemistry 21 1–14
27. Massa P, Dafinov A, Fenoglio R, Medina Cabello F (2009) Degradación catalítica de fenol con peróxido de hidrogeno: Sistemas “fenton heterogéneo”. *Rev Soc Quim Peru.* 75 (2)
28. Massa P, Dafinov A, Medina F, Fenoglio R (2008) Catalytic wet peroxide oxidation of phenolic solutions over Fe₂O₃/CeO₂ and WO₃/CeO₂ catalyst systems Catalysis. Communications Vol 9 1533–1538
29. Matatov-Meytal, Y.I., Sheintuch, M., 1997. Abatement of pollutants by adsorption and oxidative catalytic regeneration. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36 (10), 4374–4380.
30. Mi H, Xu Y, Shi W, Yoo H, Chae O, Oh S (2012) Flocculant-assisted synthesis of Fe₂O₃/carbon composites for superior lithium rechargeable batteries; *Materials Research Bulletin* 47 (2012) 152–155.
31. Pak, D.W., Chang, W.S., 1999. Decolorizing dye wastewater with low temperature catalytic oxidation. *Water Sci. Technol.* 40 (4/5), 115–121.
32. Patel D, Patel K. (2010) Synthesis, characterization and application of quinazolinone based reactive dyes for various fibers. *Fibers and Polymers*; 11 (4): 537-544.
33. Pouran S, Raman A, Daud W (2014) Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions. *Journal of Cleaner Production* 64 24e35
34. Ramirez J, Maldonado F, Pérez A, Moreno C, Costa C, Madeira L. Azo-dye Orange II degradation by heterogeneous Fenton-like reaction using carbon-Fe catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental* 2007; 75 (3-4): 312-323.

35. Rodríguez-Angeles G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica Mex vol. 44:464-475.
36. Russell AD (2004) Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. Journal of Hospital Infection;57(2):97-104.
37. Santambrosio E, Ortega M, Garibaldi P (2009) Tinción y observación de microorganismos, Facultad Regional Rosario Dept de Ingeniería Química, cátedra de biotecnología.
38. Shun S, Fang F (2011) Integrated stress responses in salmonella. International journal of food microbiology. Xxx
39. Spuhler D, J Rengifo JA, Pulgarin C (2010) The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing Escherichia coli K12. Applied Catalysis B: Environmental 96 126–141
40. Thill, A., O. Zeyons, O. Spalla, F. Chauvat, J. Rose, M. Auffan, and A. M. Flank. 2006. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for Escherichia coli. physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. Environ. Sci. Technol. 40:6151-6156.
41. Valenzuela E, Godoy R, Almonacid L, Barrientos M (2012) Calidad microbiológica del agua de un área agrícola-ganadera del centro sur de Chile y su posible implicancia en la salud humana *Rev. chil. infectol.*[online]. vol.29, n.6, pp. 628-634. ISSN 0716-1018
42. Watts R, Kong S, Orr M, Miller G, Henry B (1995) Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent, Water Research, Volume 29, Issue 1, 1995, Pages 95-100, ISSN 0043-1354.
43. Xiong Z, Ma J, Ng WJ, Waite TD, Zhao XS (2011) Silver-modified mesoporous TiO₂ photocatalyst for water purification. Water Research. 45(5):2095-103.
44. Watts R, Kong S, Orr M, Miller G, Henry B (1995) Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent, Water Research, Volume 29, Issue 1, 1995, Pages 95-100, ISSN 0043-1354.
45. Mi H, Xu Y, Shi W, Yoo H, Chae O, Oh S (2012) Flocculant-assisted synthesis of Fe₂O₃/carbon composites for superior lithium

rechargeable batteries; *Materials Research Bulletin* 47 (2012) 152–155.

46. Kumar E.R, Jayaprakash R, Patel R, Kumar S (2013) Preparation and magnetic properties of the nanosized Mn–Ce–Fe–O system *Materials Science in Semiconductor Processing* 16, 1701–1705.

ANEXO 3
BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
ESTUDIO PILOTO DE LA APLICACIÓN DE FENTON HETEROGENEO PARA LA INACTIVACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> EN AGUAS RESIDUALES DE DOCENCIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Abelló Esparza			Juanita			
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Carrascal			Ana Karina			
Daza			Carlos Enrique			
FACULTAD						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
x						
Nombre del programa académico						
Microbiología Industrial						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Janeth del Carmen Arias						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Microbióloga Industrial						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá		2014			50	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		x				
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
<p>Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.</p>						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo			x		
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS					
Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co , donde se les orientará).					
ESPAÑOL			INGLÉS		
Fenton heterogéneo			Fenton heterogeneous		
Carbón activado			Activated carbon		
Inactivación <i>Escherichia coli</i>			Quenched of <i>Escherichia coli</i>		
Reactivación secundaria			Secondary recovery		
Catalizador Fe/Ce			Catalyst- type Fe/Ce		
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					
RESUMEN					
<p>En el presente estudio se evaluó el proceso Fenton Heterogéneo utilizando un catalizador óxido de Fe y Ce soportado sobre carbón activado como alternativa para inactivar <i>Escherichia coli</i> en agua residual generada en las prácticas de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.</p> <p>Se empleó como agua residual dos lotes cuyas características iniciales fueron, Lote 1: pH 4,5; color 3260 unidades de color (UC); conductividad 0,804ms/cm y 3,0x10¹² UFC/mL de población bacteriana y, Lote 2: pH 4,98; color 7935 (UC); conductividad 0,83 ms/cm y 1,0x10¹⁴ UFC/mL de población bacteriana.</p> <p>El agua se inoculó artificialmente usando una cepa de <i>E. coli</i> del agua residual hasta una concentración inicial de 107 UFC/mL debido a la elevada concentración de microorganismos. El tratamiento Fenton Heterogéneo fue llevado a cabo con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 400 mL del agua residual, 160 mg/mL de catalizador, pH=3,7, temperatura igual a 20 °C y presión atmosférica. El suministro del reactor fue de 2 Lh⁻¹ de aire y 0,3 mLh⁻¹ de H₂O₂ 0,3M. Se realizó siembra en profundidad en agar VRB con el fin de hacer el recuento de colonias después de cada tratamiento.</p> <p>De acuerdo con los resultados, el tratamiento Fenton Heterogéneo inactivó una concentración de 107 UFC/mL de <i>Escherichia coli</i> sin reactivación secundaria del agua pos tratada a las 12 y 24 h. Se observó que la adsorción de la bacteria en el catalizador y en el soporte es importante. El agua pos-tratada pudo reutilizarse para las tinciones de Gram en las prácticas de microbiología.</p>					
ABSTRACT					
<p>In the undergraduate thesis, the Fenton heterogeneous process was evaluated using a Fe and Ce oxide catalyst-type supported on activated carbon as an alternative to inactivate <i>Escherichia coli</i> contained in wastewater generated in the practices of microbiology at the Faculty of Sciences of the Pontificia Universidad Javeriana.</p> <p>Two batches of wastewater were used. The characteristics of Lot 1 are: pH 4.5 ; Color 3260 (UC); conductivity 0.804 ms/cm and 3.0x10¹² CFU mLh⁻¹ of bacterial population, the characteristics of Lot 2 are: pH 4.98 ; Color</p>					

7935 (UC); conductivity 0.83 ms/ cm and 1.0×10^{14} CFU mL^{-1} of bacterial population.

The water was artificially inoculated using a strain of *E. coli* extracted from the wastewater to an initial concentration of 107 CFU mL^{-1} due to high concentrations of microorganisms. Heterogeneous Fenton treatment was carried out with an effective working volume of 400 mL, 160 mg/mL of catalyst, pH = 3.7, temperature of 20 °C and atmospheric pressure. The reactor feed was 2 Lh $^{-1}$ air and 0.3 mLh $^{-1}$ 0.3 M H₂O₂. Culture was done in VRB agar depth in order to make the colony count after each treatment.

According to the results, treatment Heterogeneous Fenton quenched a concentration of 107 CFU mL $^{-1}$ of *Escherichia coli* without secondary recovery of treated water after 12 and 24 h. It was observed that the adsorption of the bacteria in the catalyst and the support is important. The post- treated water can be reused for Gram stains in microbiology practices.