

DESINFECCIÓN DE VIRUS MEDIANTE PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN

DISINFECTION OF VIRUSES USING ADVANCED OXIDATION PROCESSES

NIETO J., J. I.

RESUMEN

La desinfección del virus se investigó mediante los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO). El PAO utilizado es el proceso Fenton ($\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$). La influencia de la concentración del Metal (1-10 μM) y H_2O_2 (3-50 μM), la producción de los radicales hidroxilos (HO^\bullet) y la luz solar sobre la inactivación del virus es investigada. El bacteriófago MS2, un sustituto frecuentemente usado para virus entérico humano, es utilizado como organismo modelo. Los resultados han mostrado que la constante de velocidad de inactivación (k_{obs}) en el sistema $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ es de primer orden cinético. La inactivación del MS2 en el sistema $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ está gobernada por el Fe coloidal. La irradiación por la luz solar afecta drásticamente en la velocidad de inactivación y producción de los oxidantes (HO^\bullet) en el sistema $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$, aumentando de 5.5 veces en la k_{obs} (hasta 3.1 min^{-1}). La producción de radicales HO^\bullet , medida por resonancia de spin electrónico (ESR), podría no ser responsable de la inactivación observada en el proceso Fenton sin luz solar. Otros oxidantes, tales como las especies ferryl (FeO_2^+), debe jugar un rol sobre la inactivación. Los experimentos usando scavengers de oxidantes en el seno de la solución revelaron que la inactivación ocurrió mediante un mecanismo que implica la producción de oxidantes por el metal situados en estrecha proximidad con el virus. En conclusión, estos resultados mostraron que el proceso de Fenton y foto-Fenton puede servir como una tecnología eficiente para la desinfección del virus.

Palabras clave: Desinfección de virus, proceso Fenton, proceso avanzado de oxidación, mecanismo de inactivación.

ABSTRACT

Disinfection of virus is investigated by advanced oxidation processes (AOPs). The AOP applied is the process Fenton ($\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$). The influence of concentration of metal (1-10 mM) and H_2O_2 (3-50 μM), production of hydroxyl radicals (HO^\bullet) and sunlight on inactivation is investigated. MS2 coliphage, a commonly used surrogate for human enteric viruses, is used as the model organism. The results have shown that the inactivation rate constant (k_{obs}) in the $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ system was of first order kinetic. The inactivation in the $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ system is governed by colloidal iron. Irradiation by sunlight drastically affect the rate of inactivation and HO^\bullet production in the $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ system, leading to a 5.5-fold increase in k_{obs} (up to 3.1 min^{-1}). HO^\bullet production, measured by electron spin resonance, could not account for the observed inactivation in the $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ system. Other oxidants, such as ferryl species, must therefore play a role. Experiments using bulk oxidant scavengers revealed that inactivation occurred by a caged mechanism involving oxidant production by metals located in close proximity to the virus. In conclusion, these results show that the Fenton/photo-Fenton process may serve as an efficient technology for virus disinfection.

Keywords: virus disinfection, Fenton process, advanced oxidation process, inactivation mechanism.

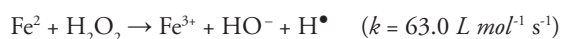
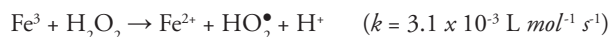
Introducción

La propagación de los virus entéricos humanos en los diferentes ambientes acuáticos representa una amenaza a la salud pública en los países industrializados y en vías de desarrollo (Wyn-Jones y Sellwood, 2001; Werber et al., 2009; Ashbolt, 2004). Ellos pueden causar diversos tipos de enfermedades, incluyendo gastroenteritis, hepatitis, encefalitis y meningitis. Además, los virus son con frecuencia más resistentes a los métodos convencionales de desinfección en comparación con otros patógenos (Abbaszadegan, Monteiro, Nwachuku, Alum, y Ryu, 2008; LeChevallier y Au, 2004). La presencia de virus en las fuentes de agua es debido a las aguas residuales sin previo tratamiento y aquellas tratadas insuficientemente (Xagorarakis, Kuo, Wong, Wong y Rose, 2007; Lee, y Kim, 2002; Rutjes, Lodder, Docters van Leeuwen y Roda Husman, 2009; Lodder, van den Berg, Rutjes, y de Roda Husman, 2010; Sinclair, Jones, y Gerba, 2009). Este problema es más significativo en los países en vías de desarrollo, debido a la falta de acceso a servicios de saneamiento básicos en zonas rurales y semiurbanas, así como también a los métodos de desinfección ineficientes que todavía es un problema en zonas urbanas (Ashbolt, 2004). Además, los métodos tradicionales, tales como cloración, pueden generar subproductos de desinfección mucho más tóxicos que los iniciales, con riesgos potenciales carcinogénicos y mutagénicos (Krasner *et al.*, 2006; Hu, Wang, Ng y Ong, 1999). Por lo tanto, métodos de desinfección más seguros y eficientes son necesarios, para garantizar la calidad microbiológica del agua y la seguridad de la salud pública.

Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO), tales como la fotocatalisis heterogénea usando TiO_2 (Cho, Chung, Choi y Yoon, 2005; Gerrity, Ryu, Crittenden y Abbaszadegan, 2008), el tratamiento de desinfección con UV solo (Simonet y Gantzer, 2006) o UV en combinación con sustancias químicas oxidantes (Mamane, Shemer y Linden, 2007; Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005) han surgido como alternativas para inactivar patógenos. Uno de los más prometedores PAO consiste en el proceso Fenton. Este proceso se basa en la formación de especies altamente reactivas (como radicales hidroxilos, HO^\bullet), generados a través de la descomposición del H_2O_2 y catalizado por iones metálicos de transición, como Fe. Además, la producción de oxidantes a través del proceso Fenton también puede ocurrir naturalmente en los cuerpos de agua y sistemas ingenieriles. Se ha estimado que el proceso Fenton contribuye hasta un 50% de radicales HO^\bullet en aguas superficiales iluminadas por el sol (Vaughan y Blough, 1998).

La primera etapa y la limitante de la reacción en la descomposición del H_2O_2 por Fe es la reducción del metal de transición por H_2O_2 (ecuación 1.1). Posteriormente, el metal es reoxidado por H_2O_2 , y se forma

el radical hidróxilo (HO^\bullet) altamente reactivo (ecuación 1.2). La ecuación 1.2 se conoce como la reacción de Fenton.



Sin embargo, a pH neutro, el Fe (III) es poco soluble y se precipita como (hidr)óxido de Fe amorfo. El (hidr)óxido de Fe puede todavía participar en la reacción de Fenton, aunque a un ritmo más lento que el Fe disuelto (Pignatello, Oliveros y MacKay, 2006; Lin y Gurlol, 1998; Teel, Warberg, Atkinson y Watts, 2001). Además se ha propuesto que el oxidante principal a pH neutro no es el radical hidróxilo (HO^\bullet), sino uno menos reactivo, especie de Fe está presente, tal como el ion ferril (FeO_2^+) (Hug y Leupin, 2003; Keenan y Sedlak, 2008; Reinke, Rau y McCay, 1994).

El efecto del proceso Fenton sobre la inactivación de virus fue investigado por Sangripanti, Routson y Lytle (1993), quienes estudiaron la inactivación de diversos fagos y virus mediante Fe (30 mg/L) o Cu (1 mg/L) solo, y en presencia de H_2O_2 . Ellos mostraron que la adición de H_2O_2 (100 mg/L) produjo un aumento en la inactivación para un subgrupo de virus por Fe. A pesar de la eficacia demostrada de la inactivación de virus por Fe/ H_2O_2 , hay pocos estudios sobre la desinfección de virus mediante este proceso Fenton a pH neutro. Además, se sabe que la luz en el UV cercano y luz visible mejora la reacción de Fenton (Pignatello *et al.*, 2006), sin embargo, el efecto de la luz solar sobre la inactivación por el proceso Fenton nunca se ha abordado. El objetivo de este trabajo es estudiar los factores que controlan la inactivación del virus mediante el proceso Fenton a pH neutro, con el fin de evaluar la importancia de este proceso para los PAO y los sistemas naturales. El bacteriófago MS2 es usado como un organismo modelo para virus entéricos humanos debido a las propiedades y características que este comparte con los virus patogénicos. El efecto de la concentración del ion metálico de Fe (1-10 μM) y H_2O_2 (1-50 μM), la producción del radical hidroxilo (HO^\bullet) y el efecto de la luz solar sobre la inactivación es investigado. La solubilidad del Fe es calculada mediante programa PHREEQC-2 con base de datos minteq.v4. La formación del radical hidróxilo es medida por la técnica de resonancia de spin electrónica (ESR, por sus siglas en inglés) y experimentos de scavenger (consumidores de oxidantes). Con base en los resultados, se propone un esquema del mecanismo de inactivación del virus mediante el proceso Fenton y foto-Fenton.

Materiales y métodos

Los experimentos fueron llevados a cabo en reactores batch que contienen bacteriófago MS2 en solución buffer de carbonato salino (CBS) a pH neutro. Las constantes de velocidad de inactivación y la producción de formación de los radicales hidroxilos (HO^\bullet) se obtuvieron para diferentes concentraciones de Fe(III) y H_2O_2 en presencia y ausencia de luz solar simulada.

ORGANISMOS: El bacteriófago MS2 (DSMZ 13767) y su huésped bacteriano *E. coli* (DSMZ 5695) se obtienen de la colección alemana de microorganismos y culturas celulares, Braunschweig, Alemania. La propagación del fago MS2 se realiza en 1 L de medio LB (10 g de Bactotripton, 1 g de extracto de levadura, 8 g de NaCl, 1 g de D-glucosa, 0.3 g de CaCl_2 y 2 mg de sulfato de estreptomycin) que contiene *E. coli*. Cuando la densidad óptica de este cultivo alcanza 0.04, medido a 600 nm, la fase midlog *E. coli* se inocula con MS2 a una multiplicidad de infección (relación entre fagos y bacterias) de 0.1. Luego de cinco horas de incubación a 37°C, las células bacterianas se lisaron con cloroformo (5 ml) e inmediatamente se purificaron como se describe en Pecson, Martin y Kohn (2009). La solución stock MS2 obtenida tiene una concentración de 10^{14} PFU/ml y se almacena en solución salina buffer de carbonato (CBS; 5 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, pH 7.4) a 4°C.

CUANTIFICACIÓN DEL FAGO: se realiza por la técnica de doble capa de agar como se describe anteriormente (Pecson *et al.*, 2009). Las concentraciones del fago MS2 infeccioso se midieron en unidades formadoras de placas por mililitros (PFU/ml).

Montaje experimental: Los experimentos se realizaron en reactores de vidrio (100 ml) que contiene 50 ml de CBS a pH 6.8, con una concentración inicial de fago MS2 infeccioso de 10^7 PFU/ml. La solución se agita continuamente con una barra de agitación magnética a 250 rpm, y la temperatura se mantiene a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Para los experimentos sin luz solar, los reactores se cubrieron con papel aluminio, para proteger las muestras de la luz. Los experimentos con luz solar se llevaron a cabo utilizando un simulador solar (Tecnología de ABET, Sun 2000) de 1000 W de lámpara de Xe, con filtro AM 1.5 y corte de filtro UVB, este último para evitar la influencia de inactivación a través del daño directo por la luz UVB.

EXPERIMENTOS DE INACTIVACIÓN: En reactores que contienen MS2 y CBS se les agregaron Fe(III) a partir de una solución stock recién preparada de FeCl_3 (1mM) para obtener una concentración final de metal que varía de 1 a 10 μM . El H_2O_2 se agrega como último componente, a partir de una solución madre (25mM) para obtener concentraciones finales entre 3 y 50 μM . Los

experimentos control de MS2, MS2+Fe y MS2+ H_2O_2 se realizaron también. En los experimentos control libre de metal (MS2+ H_2O_2), 0.1 μM de EDTA se añade al buffer para acomplejar las trazas de metales presentes en la solución que pueden conducir a reacciones de Fenton. Esta concentración de EDTA no causa inactivación del virus. Durante la inactivación 100 μl de alícuota de muestra se recolectaron periódicamente e inmediatamente se diluyeron en 100 μl de buffer CBS modificado con catalasa (500 unidades/ml), para eliminar el H_2O_2 presente. Todos los experimentos de inactivación se llevaron a cabo por duplicado con buena reproducibilidad.

MEDICIONES DE RESONANCIA DE SPIN ELECTRÓNICA (ESR): La producción de formación de los radicales hidroxilos (HO^\bullet), para un subconjunto de soluciones utilizadas en los experimentos de inactivación ($\text{Fe(III)}/\text{H}_2\text{O}_2$), en ausencia de virus, es medida mediante la técnica instrumental ESR (Resonancia de Spin Electrónica) utilizando el método de trampas de spin, tales como DMPO (5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido; un estándar comercial para atrapar radicales libres).

CÁLCULOS DE SOLUBILIDAD DE METAL: El cálculo de solubilidad del metal en solución buffer CBS se realizó utilizando el programa PHREEQC-2, con la base de datos mnteq v.4.

ANÁLISIS DE DATOS: Las constantes de velocidad de inactivación de primer orden cinético se determinaron a partir de la pendiente de la regresión lineal de $\ln([\text{virus}]/[\text{virus}]_0)$ en función del tiempo, y se reportaron como k_{obs} (min^{-1}). La producción de formación de radicales hidroxilos, r_{OH} (M/s) se determinó a partir de la evolución en el tiempo de la señal de ESR doblemente integrada del aducto de spin paramagnético, DMPO-OH. Para mejorar la precisión de los cálculos, antes de la doble integración, las huellas de ESR experimentales se ajustaron al modelo técnico de la ESR de DMPO-OH utilizando el software Mathcad. Las incertidumbres se reportaron a un intervalo de confianza del 95% de los ajustes a k_{obs} y r_{OH} .

Resultados

Inactivación del bacteriófago MS2 mediante el proceso tipo Fenton

Para entender el comportamiento de la inactivación del fago MS2 mediante el método de tratamiento, proceso Fenton ($\text{Fe(III)}/\text{H}_2\text{O}_2$), se investiga la influencia de la concentración del Fe(III) y H_2O_2 , y la producción de los radicales sobre la inactivación del MS2. La solubilidad del metal se determina para saber cuál es la especie presente en el sistema a un pH de 6.8.

Los experimentos de inactivación se realizaron a una concentración inicial del bacteriófago MS2 de 10^7

PFU/ml en solución buffer de carbonato salino (CBS; 0.1 mM NaHCO₃+15 mM NaCl) a pH 6.8.

El efecto de la concentración de H₂O₂ sobre la sobrevivencia del bacteriófago MS2 se estudia (Figura mostrado en Nieto, Pierzchla, Sienkiewicz y Kohn (2010)). La constante de velocidad de inactivación observada (k_{obs}) en el proceso Fe(III)/H₂O₂ exhibe una dependencia lineal sobre la concentración de H₂O₂ entre 0 y 50 μM, indicando que la inactivación del MS2 es de primer orden cinético con respecto al H₂O₂. Por el contrario, la dependencia de la concentración de Fe(III) con respecto a la k_{obs} , es mucho más compleja (Figura 1a). La k_{obs} aumenta lentamente conforme aumenta la concentración de Fe agregado, no de una manera lineal a altas concentraciones de Fe (mayor de 2 μM). Para entender este comportamiento, se estudia la solubilidad del Fe(III) y la producción de los radicales hidroxilos. Los cálculos de solubilidad muestran que la concentración de Fe disuelto permanece constante en todo el experimento, y el Fe precipitado va aumentando de una manera lineal conforme aumenta el Fe agregado de 1 y 10 μM (Figura 1b). La formación de los radicales hidroxilos (HO•) en la presencia de 50 μM H₂O₂ y a diferentes concentraciones de Fe(III) muestra que la velocidad de producción del radical HO• (r_{OH}) incrementa conforme aumenta la concentración de Fe hasta 4 μM y a más altas concentraciones de Fe, la r_{OH} disminuye (Figura 1c).

Efecto de la luz solar sobre la inactivación de MS2 en el proceso Fe(III)/H₂O₂

La irradiación con luz solar en el proceso Fe(III)/H₂O₂ tiene un efecto drástico sobre la inactivación (Figura 2a) y la producción de los radicales hidroxilos (Figura 2b). Cuando los experimentos se llevaron a cabo en presencia de diferentes concentraciones de Fe(III) y 50 μM de H₂O₂, la k_{obs} alcanza valores de hasta 3.1 min⁻¹ (Figura 2a) y la producción de radicales HO• aumenta considerablemente (Figura 2b) en comparación del proceso Fenton sin luz.

Discusión

Inactivación del bacteriófago MS2 mediante el proceso tipo Fenton

En base a los resultados obtenidos, la k_{obs} por Fe (III) agregado entre 1 y 10 μM presenta una tendencia que estadísticamente no es diferente entre sí. Esta tendencia no se puede atribuir a la agregación de altas concentraciones de Fe (determinado en experimentos de control sin H₂O₂), debido a la contribución relativa de la reacción de Fenton a la k_{obs} que también incrementa con un incremento de las concentraciones de Fe (Figura 1a). Los cálculos de solubilidad mostraron que la solución

ya está saturada a bajas concentraciones de Fe(III) añadido de 1 μM, indicando que el Fe(III) está precipitando y va aumentando conforme se incrementa la concentración de Fe añadido (Figura 1b), y la concentración de Fe disuelto se mantuvo constante durante todo el experimento. Basándose en estas observaciones, se propone que la inactivación del bacteriófago MS2 fue mediada por coloides de Fe, en lugar de Fe disuelto. Sin embargo, como resultado del gran error asociado a la k_{obs} en este sistema, no se puede descartar de manera concluyente la participación de Fe disuelto. El principal rol del Fe(III) en el proceso Fenton (Fe/H₂O₂) es actuar como un catalizador para la producción de los oxidantes, como el radical hidroxilo (HO•), los cuales seguidamente inactivan los virus. Para el proceso Fe/H₂O₂, la adición de 1 μM Fe condujo a una disminución en la producción de los radicales hidroxilos (r_{OH}) comparado a la r_{OH} en la muestra control libre de Fe (DMPO bajo las mismas condiciones experimentales, Figura 1c). Esta disminución en la r_{OH} indica que el Fe puede actuar como atenuador de los radicales HO• para los niveles de referencia del DMPO oxidado. Cabe señalar que el DMPO-OH, producto de la trampa del spin implicado en la producción de los radicales HO• puede surgir también de la transformación espontánea del producto de la trampa del spin con el superóxido (Bacic, Spasojevic, Secerov y Mojovic, 2008). El superóxido producido puede dar lugar a una sobreestimación de los radicales hidroxilos. Sin embargo, como la constante de velocidad de reacción de HO• con DMPO a pH neutro es principalmente superior a la de superóxido, O₂^{•-}, (4.3x10⁹ M⁻¹ s⁻¹ y 30 M⁻¹ s⁻¹, respectivamente (Mason, Hanna, Burkitt y Kadiiska, 1994)), la contribución de superóxido en la r_{OH} es insignificante en el experimento. Asimismo los resultados basados en la r_{OH} (Figura 1c) y la k_{obs} (Figura 1a) indica que otra especie oxidante está presente en la inactivación del virus, probablemente el ion ferril (FeO₂⁺). El método de trampa del spin por DMPO no proporciona información sobre la presencia de estas especies (Yamazaki y Piette, 1991), por lo tanto, su presencia no es evidente a partir de los datos de ESR. Una contribución a la inactivación por parte de los radicales carbonatos, formados a través de la reacción de HO• con el buffer, puede ser excluido, debido a que la señal del aducto DMPO característico para los radicales carbonatos no se detectó.

Para elucidar el mecanismo de inactivación se realiza el experimento de scavenger (Figura mostrado en Nieto *et al.* (2010)). Etanol es utilizado como el compuesto que consume rápidamente los oxidantes en la solución, tales como ion ferril (FeO₂⁺) y radicales hidroxilos (HO•) (Keenan y Sedlak, 2008). Esto respalda la idea que los oxidantes producidos a través del metal catalizador (Fe) adsorbido sobre o localizado en las cercanías del virus contribuye a la inactivación. Este resultado corresponde a resultados previos por Kohn,

Grandbois, McNeil y Nelson (2007), quienes muestran que la inactivación de MS2 mediada por otro oxidante, oxígeno singlete, es regida por las interacciones de la fuente del oxidante con el virus, mientras que la contribución del oxígeno singlete en el seno de la solución es secundaria.

Efecto de la luz solar sobre la inactivación de MS2 en el proceso Fe(III)/H₂O₂

Como puede observarse, el incremento en r_{OH} tras la irradiación solar es significativamente más pronunciada que el correspondiente efecto de la luz solar en k_{obs} (Figura 2). La producción de los radicales HO• en el seno de la solución, por lo tanto, de nuevo, no puede ser responsable de la tendencia de inactivación observada. Como en el proceso Fenton sin luz, tanto el ion ferril y los radicales HO• pueden estar presentes en el proceso foto-Fenton (Pignatello *et al.*, 2006). Sin embargo, la contribución del radical HO•, el más fuerte de los dos oxidantes, sobre la inactivación es probablemente mucho más significativo en el proceso foto-Fenton que en el proceso Fenton, donde la producción HO• es mínima. Esto explica porque en el proceso foto-Fenton, la k_{obs} y la r_{OH} exhibe dependencias similares en la concentración de Fe añadido (Figura 2a y 2b) mientras que esto no era el caso del proceso Fenton, donde la inactivación se rige por el ion ferril (Figura 1a y 1c).

Por lo tanto, basados en estos datos, se puede proponer un esquema sobre el mecanismo de inactivación del MS2 en el proceso Fenton (Figura 3), que consiste en: 1) adsorción de los coloides de Fe (III) en el virus; 2) producción del ion ferril (FeO²⁺) y pequeñas cantidades de radicales HO• en los coloides de Fe asociados a los virus. Estos oxidantes reaccionan con los componentes del virus y causarían la inactivación. En el proceso foto-Fenton, el paso 2) se desplaza a una mayor contribución de inactivación mediada por los radicales HO• comparado al ion ferril, como resultado de una mayor producción HO• tras la irradiación por luz solar.

Relevancia del resultado y su aporte a la realidad nacional, regional o local

Los resultados obtenidos demostraron que los PAO basado en el proceso Fenton (Fe/H₂O₂) podrían servir como un método de tratamiento eficiente para la desinfección del virus en el agua. Interesantemente, sin embargo, la luz solar en el proceso Fenton mejora considerablemente la inactivación y se podría esperar una muy rápida inactivación del virus a bajas concentraciones de Fe y H₂O₂. Además, cabe destacar que el Fe y H₂O₂ están presentes en aguas naturales y en sistemas ingenieriles, lo que lo hace ideal, porque los procesos oxidativos que implican esta reacción de Fenton estaría ocurriendo naturalmente y favorecería la inactivación

del virus. Por ejemplo, en países desarrollados (como España, Holanda, Alemania, entre otros), los PAOs, tales como UV/H₂O₂, proceso Fenton, entre otros, han emergido como una alternativa de método de tratamiento terciario para la purificación de aguas, principalmente de compuestos no biodegradables, como agroquímicos y compuestos farmacéuticos, que las plantas de tratamiento de agua potable e industrial no lo pueden remover fácilmente. En los países vías en desarrollo, como Colombia, se está utilizando este proceso Fenton/foto-Fenton, como una alternativa para la depuración de aguas residuales provenientes de la Agricultura, esto todavía como una planta piloto. Para la desinfección de patógenos, los PAO no han sido todavía aplicados debido a la falta de investigación a nivel ingenieril para su uso en las plantas de tratamiento, así como también no se ha evaluado un estudio socio-económico para su aplicación.

Por lo tanto, en vista del poder desinfectante de este método de tratamiento, esta investigación es relevante, como un primer aporte y de futuras investigaciones para mejorar y asegurar la calidad microbiología del agua. Su aplicación podría ser significativa en zonas rurales o semi-urbanas, donde la irradiación solar predomina. Sin embargo, previos estudios tienen que tomarse en cuenta antes de su aplicación. Igualmente, se espera que esta investigación pueda contribuir como una propuesta de métodos de tratamiento del agua, dentro del eje de Gestión Ambiental, en la componente de calidad del agua de la Agenda de Investigación Ambiental del MINAM.

Conclusiones

Es conocido que los PAO, a concentraciones más elevadas de Fe y H₂O₂ que los estudiados en la presente investigación han sido aplicados (Pignatello *et al.*, 2006). En combinación con la exposición de luz solar, el PAO basado en el proceso foto-Fenton, según los resultados obtenidos, inactiva virus muy rápidamente con las estructuras morfológicas similares a la del fago MS2. Debido a que la inactivación ocurre de manera muy eficaz incluso a concentraciones muy bajas de Fe y a pH neutro, podría ser posible evitar las dos limitaciones más comunes de los PAO basados en el proceso Fenton, que son la generación de lodos y el control de pH (Pignatello *et al.*, 2006). En comparación a otros PAO basados con luz, tales como UV/H₂O₂ o TiO₂/UV, el proceso foto-Fenton tiene además la ventaja de que no requiere una fuente de luz de alto consumo energético. Mientras que la fotocatalisis heterogénea utilizando TiO₂ también puede modificarse para funcionar con luz solar, Gerrity *et al.* (2008) encontró que la inactivación de virus puede ser inhibida por interacciones insuficientes entre el catalizador y el virus a valores de pH

que se encuentran en el tratamiento del agua. A diferencia del TiO_2 utilizados en ese estudio (punto isoeléctrico de 5.2 a 5.7), muchos (hidr)óxidos de Fe llevan una carga positiva a pH neutro (Cornell, M. y Schwertmann, 2003), que facilita la interacción entre los coloides de Fe con los virus, que normalmente poseen una carga negativa. Por lo tanto, se cree que los PAO basado en el proceso foto-Fenton tiene un gran potencial para ser utilizado como una alternativa eficiente en los métodos de desinfección de virus en el agua. Su aplicación a otros patógenos, sin embargo, aún no se ha probado completamente.

En aguas naturales, las concentraciones de H_2O_2 y metales son generalmente más bajos que los utilizados en este estudio. Además, la formación de complejos de metales traza con la materia orgánica puede conducir a un proceso reducido de Fenton. Por lo tanto, para estudiar este comportamiento se compara la actividad viral de una muestra que contiene $1\ \mu\text{M}$ de Fe y $50\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 en solución buffer de carbonato salino (CBS) con una muestra de lago, bajo las mismas condiciones experimentales. Los componentes del agua en el lago influyeron en el sistema Fe/ H_2O_2 disminuyendo hasta un tercio del valor obtenido (dato no mostrado). Tomando en cuenta esta pérdida de reactividad en el sistema Fe/ H_2O_2 y suponiendo una dependencia lineal de k_{obs} a concentraciones ambientalmente relevantes ($500\ \text{nM}$ H_2O_2 , $1\ \mu\text{M}$ Fe), se puede estimar la k_{obs} en el proceso foto-Fenton de $3 \times 10^{-3}\ \text{min}^{-1}$. Esto implica que en el transcurso del día con 12 horas de luz solar, la concentración del virus se reduciría en aproximadamente un orden de magnitud debido a la inactivación por el proceso foto-Fenton. Esta estimación, sin embargo, es muy aproximada y se necesitan más investigaciones para evaluar de manera más realista la importancia de la reacción de foto-Fenton para inactivación de virus en aguas superficiales.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Fundación Nacional de Ciencia de Suiza (Proyecto N.º 200021_118077 y N.º 205320-112164), como una parte de mi tesis doctoral.

Referencias

- ABBASZADEGAN, M., MONTEIRO, P., NWACHUKU, N., ALUM, A., y RYU, H. (2008). Removal of adenovirus, calicivirus, and bacteriophages by conventional drinking water treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part a: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(2):171–177.
- ASHBOLT, N. J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198(1-3), 229–238.
- BACIC, G., Spasojevic, I., Secerov, B., y Mojovic, M. (2008). Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities. *Spectrochimica Acta Part a: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(5):1354–1366.
- CHO, M., CHUNG, H. M., CHOI, W. Y., y YOON, J. Y. (2005). Different inactivation behaviors of MS2 phage and escherichia coli in TiO_2 photocatalytic disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1):270–275.
- CORNELL, M., y SCHWERTMANN, U. (2003). *The Iron oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Wiley-VCH, Weiheim, 2nd edition.
- GERRITY, D., RYU, H., CRITTENDEN, J., y ABBASZADEGAN, M. (2008). Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light. *Journal of Environmental Science and Health Part a: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(11):1261–1270.
- HU, J. Y., WANG, Z. S., NG, W. J., y ONG, S. L. (1999). Disinfection by-products in water produced by ozonation and chlorination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 59 (1), 81-93.
- HUG, S. J., y LEUPIN, O. (2003). Iron-catalyzed oxidation of arsenic(III) by oxygen and by hydrogen peroxide: pH-dependent formation of oxidants in the Fenton reaction. *Environmental Science and Technology*, 37(12):2734–2742.
- KEENAN, C. R., y SEDLAK, D. L. (2008). Factors affecting the yield of oxidants from the reaction of manoparticulate zero-valent iron and oxygen. *Environmental Science and Technology*, 42(4),1262–1267.
- KOHN, T., GRANDBOIS, M., MCNEIL, K., y NELSON, K. L. (2007). Association with natural organic matter enhances the sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage by singlet oxygen. *Environmental Science and Technology*, 41(13):4626–4632.

- KOIVUNEN, J., y HEINONEN-TANSKI, H. (2005). Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research*, 39(8):1519-1526.
- KRASNER, S. W., WEINBERG, H. S., RICHARDSON, S. D., PAS-TOR, S. J., CHINN, R., *et al.* (2006). Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7175-7185.
- LECHEVALLIER, M. W. y AU, K.-K. (2004). *Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. WHO, IWA, London, UK. Recuperado de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/watreatpath.pdf
- LEE, S. H., y KIM, S. J. (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research*, 36(1):248-256.
- LIN, S. S., y GUROL, M. D. (1998). Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on iron oxide: Kinetics, mechanism, and implications. *Environmental Science and Technology*, 32(10):1417-1423.
- LODDER, W. J., VAN DEN BERG, H. H. J. L., RUTJES, S.A., y de RODA HUSMAN, A. M. (2010). Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17):5965-5971.
- MAMANE, H., SHEMER, H., y LINDEN, K. G. (2007). Inactivation of E-coli, B-subtilis spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H2O2 advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 146(3):479-486.
- MASON, R. P., HANNA, P. M., BURKITT, M. J., y KADIISKA, M. B. (1994). Detection of oxygen-derived radicals in biological-systems using electron-spin-resonance. *Environmental Health Perspectives*, 102:33-36.
- NIETO-JUAREZ, J. I., PIERZCHLA, K., SIENKIEWICZ, A., y KOHN, T. (2010). Inactivation of MS2 coliphage in Fenton and Fenton-like systems: role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight. *Environmental Science and Technology*, 44,:3351-3356.
- PECSON, B. M., MARTIN, L. V., y KOHN, T. (2009). Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17):5544-5554.
- PIGNATELLO, J.J., Oliveros, E., y MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1):1-84.
- REINKE, L. A., RAU, J. M., y McCAY, P. B. (1994). Characteristics of an oxidant formed during iron(II) autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(4):485-492.
- RUTJES, S. A., LODDER, W. J., DOCTERS VAN LEEUWEN, A., and DE RODA HUSMAN, A. M. (2009). Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1):97-105.
- SAGRIPANTI, J. L., ROUNTON, L. B. y LYTLE, C. D. (1993). Virus inactivation by copper or iron ions alone and in the presence of peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12):4374-4376.
- SIMONET, J. y GANTZER, C. (2006). Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12):7671-7677.
- SINCLAIR, R. G., JONES, E. L., y GERBA, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6):1769-1780.
- TEEL, A. L., WARBERG, C. R., ATKINSON, D. A., y WATTS, R. J. (2001). Comparison of mineral and soluble iron Fenton's catalysts for the treatment of trichloroethylene. *Water Research*, 35(4):977-984.
- VAUGHAN, P. P., y BLOUGH, N. V. (1998). Photochemical formation of hydroxyl radical by constituents of natural waters. *Environmental Science and Technology*, 32(19):2947-2953.
- WERBER, D., LAUSEVIC, D., MUGOSA, B., VRATNICA, Z., IVANOVIC-NIKOLIC, L., ZIZIC, L., ALEXANDRE-BIRD, A., FIORE, L., RUGGERI, F.M., DI BARTOLO, I., BATTISTONE, A., GASSILOU, B., PERELLE, S., KALUSKI, D. N., KIVI, M., ANDRAGHETTI, R., y POLLOCK, K. G. J. (2009). Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. *Epidemiology and Infection*, 137(12):1713-1720.
- WYN-JONES, A.P., y SELLWOOD, J. (2001). Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6):945-962.
- XAGORARAKI, I., KUO, D. H. W., WONG, K., WONG, M., y ROSE, J. B. (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24):7874-7881.
- YAMAZAKI, I., y PIETTE, L. H. (1991). EPR spin-trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen-peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 113(20):7588-7593.

Anexos

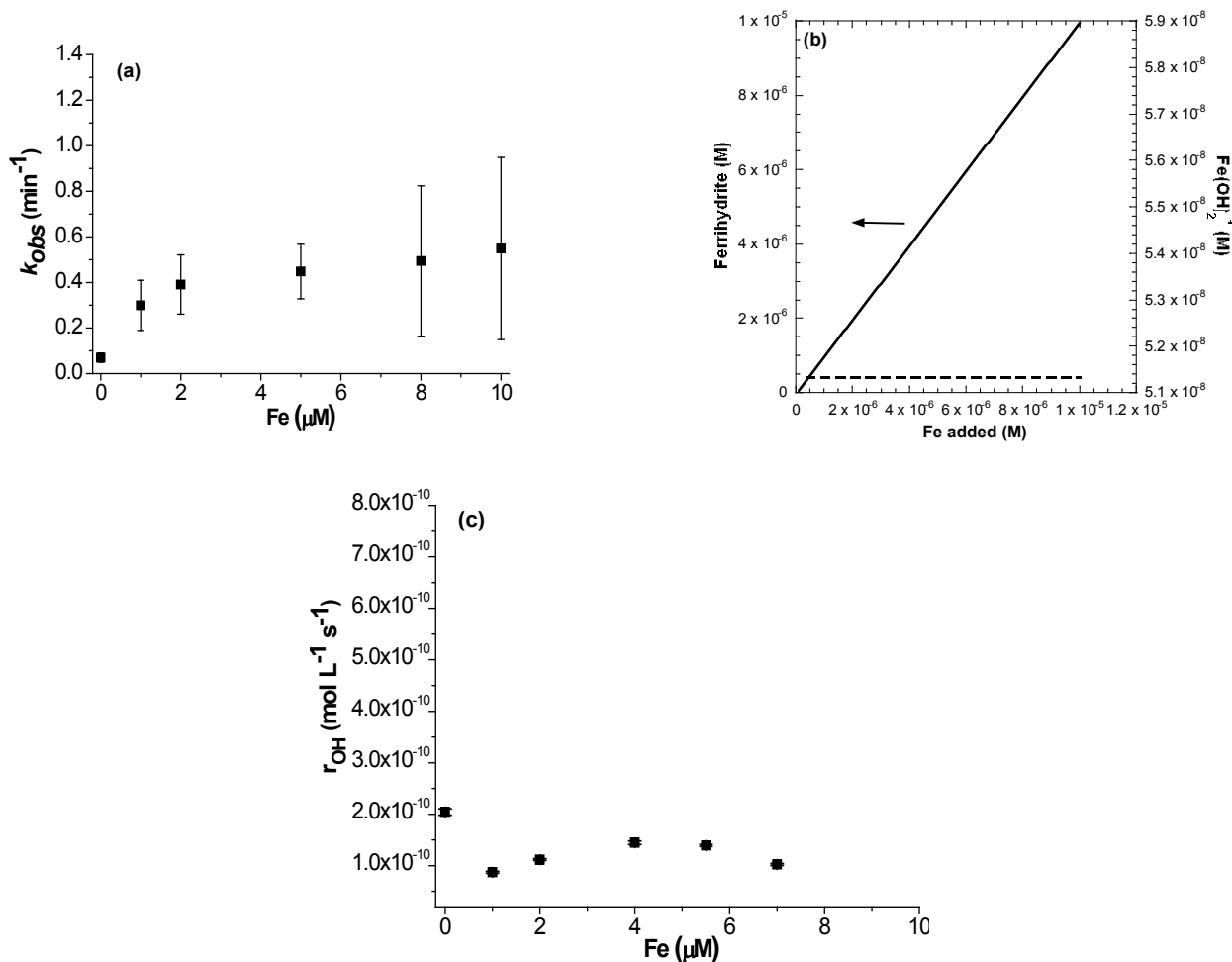


Figura 1. Efecto de la (a) concentración del Fe(III) con respecto a la inactivación de bacteriófago MS2, (b) efecto de la solubilidad de Fe(III) y (c) formación de los radicales hidroxilos (medido por ESR, siglas en inglés) a diferentes concentraciones de Fe (III) adicionado, en el sistema Fe(III)/H₂O₂. MS2=10⁷ PFU ml⁻¹ en CBS, H₂O₂=50 μ M, EDTA=0.1 μ M, pH=6.8.

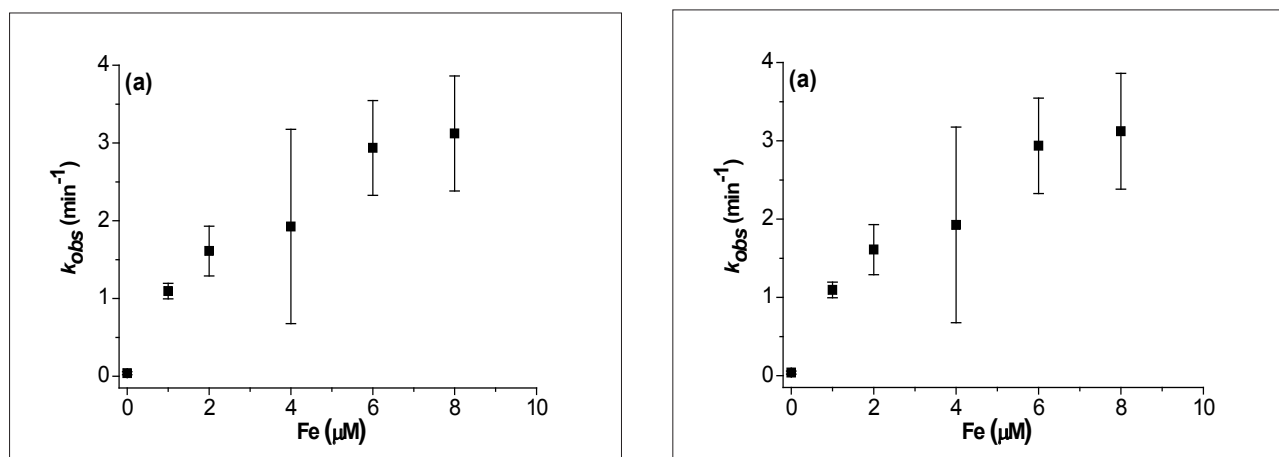


Figura 2. Efecto de la (a) concentración del Fe(III) con respecto a la inactivación de bacteriófago MS2, (b) formación de los radicales hidroxilos (medido por ESR, siglas en inglés) a diferentes concentraciones de Fe (III) adicionado en el sistema Fe(III)/H₂O₂/luz solar. MS2=10⁷ PFU ml⁻¹ in CBS, pH=6.8, H₂O₂=50 μ M, EDTA=0.1 μ M, I=300 W m⁻² para la inactivación de MS2, I=10 mW cm⁻² (UVA) para la formación de HO[•].

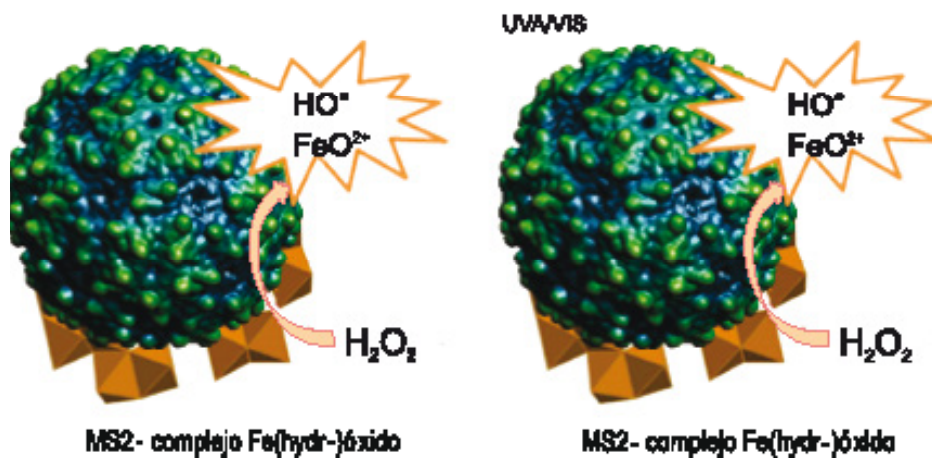


Figura 3. Esquema ilustrativo del mecanismo de inactivación del bacteriófago MS2 mediante el proceso Fenton ($Fe(III)/H_2O_2$) (a) y el proceso foto-Fenton ($Fe(III)/H_2O_2$ /luz solar) (b).