

¿Pueden inducirse procesos fotoquímicos abióticos para la desinfección y detoxificación en aguas subterráneas naturales?

Julían Andrés Rengifo Herrera¹, Héctor Mario Gutiérrez Zapata², Janeth Sanabria²

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. J.J. Ronco” (CINDECA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata, CONICET, 47 No. 257, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2. Grupo de Investigación en Procesos Avanzados de Oxidación para Tratamientos Químicos y Biológicos-GAOX, Escuela de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Facultad de Ingenierías, Universidad del Valle, A.A. 25360, Cali, Colombia

E-mail: julianregifo@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN: En este trabajo se usaron efluentes subterráneos reales provenientes de un área rural en Colombia. Posteriormente a estos efluentes se les adicionó separadamente una cepa bacteriana de *Escherichia coli* K12 en una concentración cercana a los 10^7 – 10^6 UFC mL⁻¹ y una concentración de 24.3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conocido como 2,4-D, uno de los herbicidas más utilizados y con una alta solubilidad en agua a fin de simular una contaminación microbiológica y química respectivamente. Cabe destacar que estas aguas ya contienen naturalmente hierro en una concentración cercana a 0.3 mg L⁻¹. Posteriormente se adicionó 10 mg L⁻¹ de H₂O₂ y se irradió (300 W m⁻²) con un simulador solar. Los microorganismos fueron cuantificados a través de dos procedimientos, cultivabilidad, usando técnicas convencionales de conteo en placa (CP) y viabilidad usando recuento directo de células viables-Hibridación Fluorescente in situ (DVC-FISH). El 2,4-D fue cuantificado usando cromatografía líquida de HPLC.

Los resultados obtenidos revelaron que fueron necesarios 60 min de irradiación solar simulada para reducir completamente la cultivabilidad de las células de *E. coli* K-12 mientras que para reducir totalmente su viabilidad, fueron requeridos 360 min. Esta disminución tanto en viabilidad como en cultivabilidad puede ser el resultado de procesos fotoquímicos entre los que podemos encontrar los procesos foto-Fenton, inducidos en el medio natural por la adición de peróxido de hidrógeno y la irradiación solar simulada, los cuales generan radicales hidroxilo altamente oxidantes, capaces de atacar a los microorganismos. Por otro lado, el 75.2% del 2,4-D adicionado fue degradada luego 180 minutos de irradiación solar simulada. Se detectó por HPLC, en los primeros minutos de la reacción, la formación de su principal subproducto de degradación, el 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), el cual también fue posteriormente degradado. Esto demuestra que la utilización de luz solar y de hierro naturalmente presente puede ser una alternativa promisoriosa para detoxificar y desinfectar aguas subterráneas.

INTRODUCCIÓN

En Latinoamérica y especialmente en comunidades rurales, el 31% de las personas utiliza aguas subterráneas como su principal Fuente de agua potable (UNEP-GEO, 2010), sin embargo, muchas de estas comunidades pueden adolecer de sistemas de saneamiento básico además de hacer uso de cantidades importantes de agroquímicos para llevar a cabo sus actividades económicas principales, haciendo que estas fuentes subterráneas sean muy proclives a contaminación microbiológica y química. De esta manera, la

investigación en nuevas tecnologías para la remoción efectiva de contaminación microbiológica y química en estos efluentes se ha convertido en un muy importante punto a desarrollar en los últimos años.

Las aguas naturales, especialmente las superficiales, tienen la habilidad de degradar por sí mismas concentraciones bajas de contaminantes orgánicos a través de vías bióticas (microorganismos) y abióticas (hidrólisis y procesos fotoquímicos) (De Laurentiis et al. 2014; Gligorovski et al. 2015). Se sabe que la presencia de nitritos/nitratos y materia orgánica disuelta en estos efluentes puede estimular diferentes procesos fotoquímicos abióticos inducidos por luz solar, los cuales pueden producir formas reactivas de oxígeno (FRO) como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), todos ellos capaces de degradar contaminantes orgánicos e inactivar microorganismos. Un caso muy particular, es la presencia de especies naturales de hierro (disuelto o coloidal) el cual junto con cantidades naturales de H_2O_2 (10^{-7} - 10^{-11} M (Nakatani et al. 2007; Burns et al. 2012) podrían inducir procesos Fenton, foto-Fenton o fotocatalíticos, también responsables de la degradación de orgánicos y la inactivación de bacterias. Sin embargo, estos procesos fotoquímicos naturales no producen concentraciones muy elevadas de FROs en aguas naturales (en general oscilan entre 10^{-10} to 10^{-12} M (Burns et al. 2012)), lo cual podría reducir la capacidad de estos efluentes de reducir por sí mismos la contaminación química y microbiológica presente.

Recientemente, Gutiérrez-Zapata et al. (2016) reportaron que la simple adición de 10 mg L^{-1} de peróxido de hidrógeno sobre un efluente natural de aguas subterráneas irradiado con luz solar simulada, el cual ya contenía naturalmente hierro (0.3 mg L^{-1}), fue suficiente para remover el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conocido como 2,4-D. Por otro lado, diversos estudios ya han reportado también que la adición de bajas concentraciones de H_2O_2 en aguas naturales superficiales conteniendo bajas concentraciones de hierro natural (0.1 - 0.3 mg L^{-1}) e irradiadas con luz solar simulada o natural inactivaron completamente diversas cepas bacterianas (Sciacca et al. 2010; Ndounla et al. 2013). Todos estos hallazgos, permiten sugerir que sería posible mejorar procesos foto-inducidos naturales responsables de la formación de FROs a través de la simple adición de peróxido de hidrógeno, incrementando así la habilidad de estos efluentes naturales para remover ya sea contaminación química o microbiológica.

En la literatura, la inactivación de bacterias en aguas naturales superficiales o subterráneas a través de procesos foto-Fenton ha sido frecuentemente seguida por técnicas de cultivabilidad, principalmente a través del conteo en placa (CP) (Sciacca et al. 2010; Sciacca et al. 2011; Ndounla et al. 2013; Ndounla et al. 2014), sin embargo, una de las grandes limitaciones de estas técnicas de cultivabilidad es su incapacidad de detectar células en estados de viabilidad no cultivabilidad (VBNC) (Bjergbæk and Roslev, 2005); dichos microorganismos podrían mantener su virulencia, convirtiéndose en un serio problema de salud. En 2004, Garcia-Armisen y Servais (2004) usaron una metodología basada en el conteo directo de células viables o DVC, por sus siglas en inglés, acoplada a hibridación fluorescente in situ (FISH) para enumerar células de *E. coli* viables en aguas superficiales. Posteriormente en 2009, Servais y colaboradores (2009) compararon un

método de cultivabilidad (número más probable, NMP) con DVC-FISH en aguas superficiales, encontrando un alto número de células de *E. coli* en estados de VBNC no detectadas por NMP.

Este estudio muestra por primera vez la posibilidad de eliminar tanto contaminación química como microbiológica en aguas subterráneas naturales conteniendo hierro natural a través de la simple adición de peróxido de hidrogeno (10 mg L^{-1}) e irradiación solar simulada.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

El estudio se centró en el tratamiento de 60 mL de agua subterránea real (ver caracterización fisicoquímica en la tabla 1) proveniente de una zona rural ubicada en el suroccidente de Colombia, la cual ya contenía hierro naturalmente. A estos efluentes se les agregó en muestras diferentes 24.3 mg L^{-1} de 2,4-D y 10^6 - 10^7 UFC mL^{-1} (10^6 - 10^7 Células mL^{-1}) de la cepa *Escherichia coli* K-12. Posteriormente a cada muestra conteniendo ya sea 2,4-D o células de *Escherichia coli* K-12, se le agregó 10 mg L^{-1} de peróxido de hidrogeno. La irradiación solar simulada fue efectuada utilizando un simulador solar Hanau Suntest con una potencia constante de irradiación de 300 W m^{-2} (Figura 1). Se realizaron también experimentos de control con el agua subterránea sin presencia de peróxido de hidrogeno e irradiada con luz solar simulada y con presencia de H_2O_2 bajo condiciones de oscuridad. La temperatura en los experimentos no fue superior a los $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

La evolución temporal del 2,4-D y su producto de degradación principal, el 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), fue determinada por HPLC utilizando un cromatógrafo LC20AT- Shimadzu y como fase móvil acetonitrilo (55%) y una solución acuosa de ácido acético a pH 3.0 (30%) y agua Milli-Q (15%). Se utilizó también una columna C-18 Nucleosil 100-5, un flujo isocrático de 0.8 mL min^{-1} y un detector UV a 280 nm. La técnica de DVC-FISH fue realizada teniendo en cuenta el trabajo reportado por Rengifo-Herrera y colaboradores (Rengifo-Herrera et al. 2013).

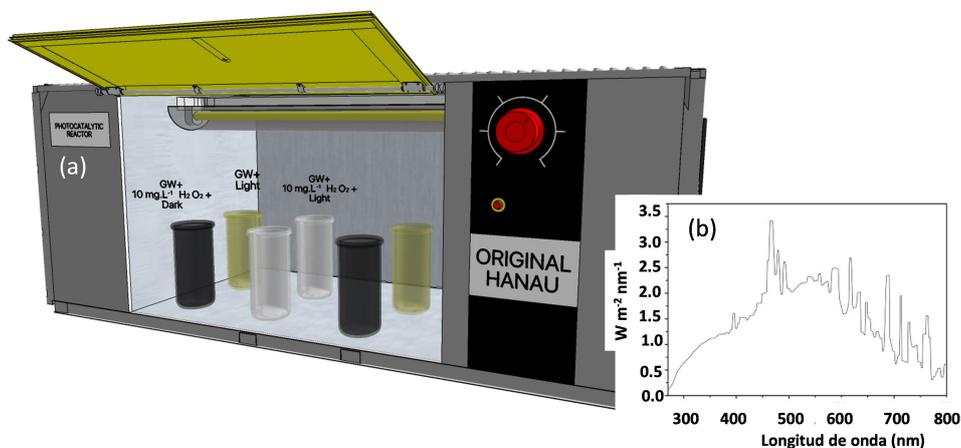


Figura 1. (a) Simulador solar Hanau Suntest y (b) su espectro de emisión característico.

Tabla 1. Valores de la caracterización de las aguas subterráneas utilizadas.

Parámetros (unidades)	Valores
pH	6.98
Hierro total (mg L ⁻¹)	0.295
Oxígeno disuelto (mg O ₂ L ⁻¹)	0,76
Carbono orgánico disuelto (mg L ⁻¹)	3.90
Color (UPC)	0.5
Turbiedad (NTU)	0.5
Nitritos (mg L ⁻¹)	0.017
Nitratos (mg L ⁻¹)	0.88
Nitrogeno como amoniac (N-NH ₃ mg L ⁻¹)	0.026
Fluoruro(mg L ⁻¹)	1.0
Fosfatos (mg L ⁻¹)	0.14
Carbonatos (mg L ⁻¹)	366
Sulfatos (mg L ⁻¹)	44.1
Dureza total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	230

RESULTADOS OBTENIDOS

Degradación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en aguas subterráneas reales irradiadas con luz solar simulada

La figura 2 muestra que el 75.2% del 2,4-D presente al inicio del experimento fue degradado luego de 180 minutos de irradiación a pH natural (pH 7.0). Además su principal producto de degradación, el 2,4-DCP (figura insertada) sufrió también una fuerte degradación luego del mismo tiempo de irradiación. Como era de esperarse, al reducir el pH del efluente a 2.8 unidades, prácticamente todo el 2,4-D fue degradado a través de un proceso foto-Fenton clásico (Pignatello et al. 2006). Por otro lado, ni los experimentos de fotólisis (agua

subterránea en ausencia de H_2O_2 y bajo irradiación solar simulada) ni aquellos realizados en la oscuridad a pH 7.0 presentaron disminución en la concentración de 2,4-D; de esta manera, puede evidenciarse que, ni los procesos fotoquímicos inducidos por luz solar simulada, ni los procesos Fenton en la oscuridad tuvieron un papel relevante en la degradación del herbicida a pH natural del agua. Bajo irradiación solar simulada, la presencia de hierro natural y peróxido de hidrogeno (10 mg L^{-1}) a pH natural (7.0), podrían estimular procesos fotoquímicos como el foto-Fenton y la fotocatalisis heterogénea, llevados a cabo por hierro disuelto en forma de complejos como por ejemplo complejos con ácidos húmicos y oxi-hidroxidos de hierro respectivamente (Pignatello et al. 2006). Además, el H_2O_2 puede sufrir fotólisis con luz UV-A+B (Gligorovski et al. 2015). De esta manera, estos procesos foto-inducidos por la presencia simultánea de H_2O_2 y luz solar simulada pueden generar altas tasas de producción de radicales $\bullet OH$, los cuales poseen un fuerte potencial oxidativo capaz de degradar el 2,4-D y su principal producto de degradación, el 2,4-DCP.

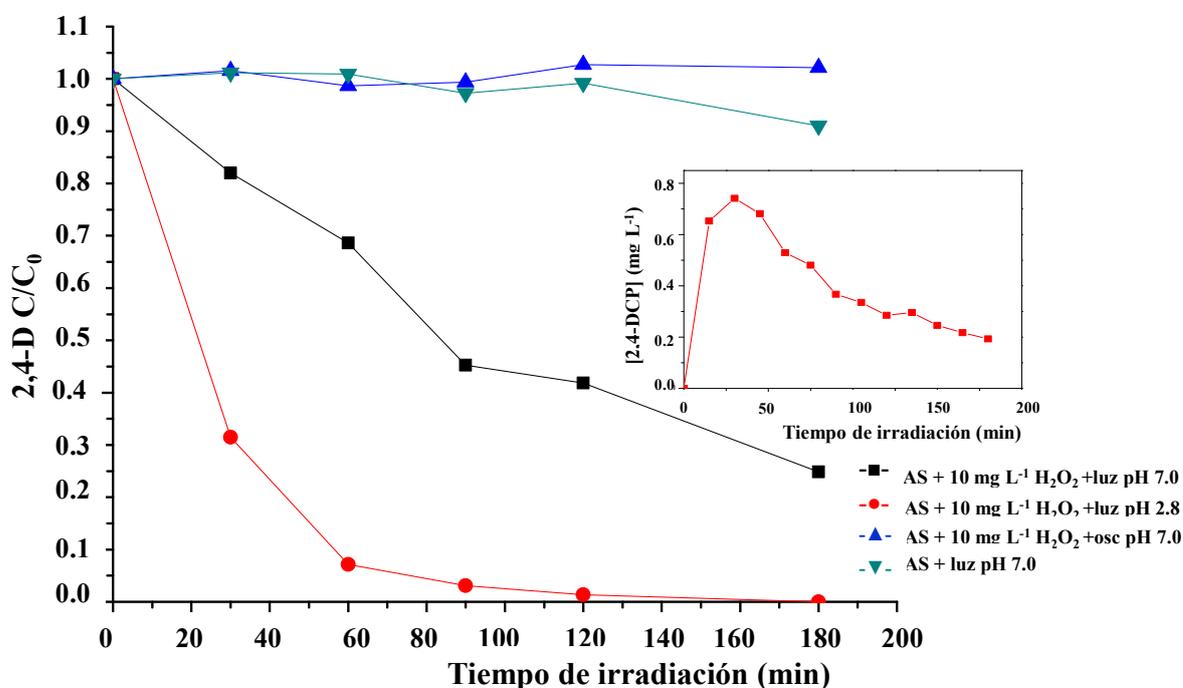


Figura 2. Degradación de 2,4-D en agua subterránea (AS) bajo diferentes condiciones experimentales. Figura insertada muestra la degradación de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). Potencia de irradiación: 300 W m^{-2} . Temperatura máxima alcanzada $36.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Seguimiento simultaneo de la cultivabilidad y viabilidad de células de Escherichia coli K-12 en aguas subterráneas reales y bajo irradiación solar simulada

La figura 3 muestra el seguimiento de la cultivabilidad a través de conteo en placa (CP) y viabilidad utilizando la técnica DVC-FISH de células de *Escherichia coli* K-12 bajo diferentes condiciones experimentales y realizados todos a pH natural del efluente (7.0). La cultivabilidad se redujo drásticamente (casi 4.5 unidades logarítmicas) después de 120 minutos, cuando las células de *E. coli* estuvieron expuestas a

la luz solar simulada (fotólisis) y en presencia de peróxido de hidrógeno 10 mg L^{-1} en la oscuridad. Es bien conocido que la luz solar, principalmente sus componentes UV-A+B pueden debilitar algunas enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), además de degradar parcialmente algunas proteínas intracelulares que contienen iones ferrosos (Kapuscinski y Mitchell, 1981; Imlay, 2008). Este fenómeno puede llevar a los microorganismos a sufrir un estrés oxidativo, el cual podría ser responsable de la pérdida de cultivabilidad observada. Por otro lado, procesos Fenton o like-Fenton producidos por los oxi-hidroxidos de hierro o complejos solubles de hierro, los cuales generan radicales $\bullet\text{OH}$ serían los responsables de la pérdida de cultivabilidad observada en los experimentos realizados en la oscuridad. Sin embargo, al estar presente simultáneamente, el peróxido de hidrógeno y la luz solar simulada, se observó una rápida (70 min de irradiación) y total pérdida de cultivabilidad, probablemente causada por fenómenos foto-inducidos como el foto-Fenton y la fotocatalisis heterogénea llevada a cabo por oxi-hidroxidos de hierro y complejos solubles de hierro. Además, debe también tenerse en cuenta que la fotólisis del peróxido de hidrógeno a través de la absorción de luz UVA+B podría también participar en la inactivación de los microorganismos. En este caso en particular, existe una serie de procesos oscuros y foto-inducidos que causan la generación de radicales $\bullet\text{OH}$ (Pignatello et al. 2006). Además, las células bacterianas son debilitadas por la presencia de luz UV.

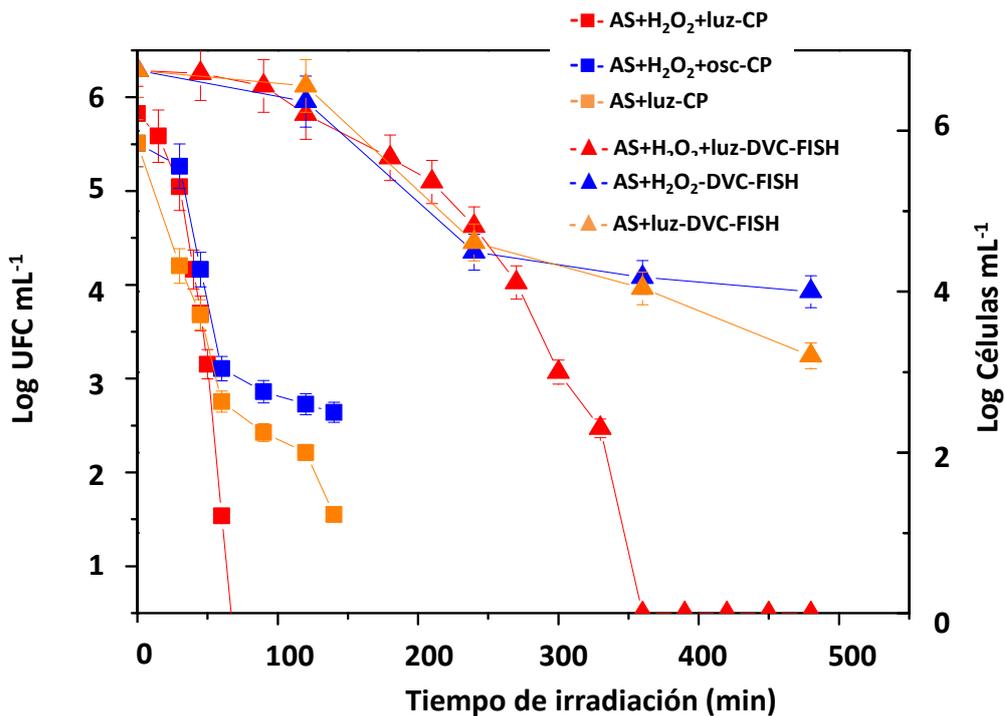


Figura 3. Seguimiento de la cultivabilidad y viabilidad de células de *Escherichia coli* K-12 en agua subterránea (AS) bajo diferentes condiciones experimentales. Potencia de irradiación: 300 W m^{-2} . Temperatura máxima alcanzada $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Valor de pH: 7.0.

Sin embargo, los datos de viabilidad arrojaron otras conclusiones. Como puede observarse en la figura 3, la viabilidad no se redujo fuertemente en los experimentos de fotólisis y aquellos realizados en la oscuridad

(2.5 unidades logarítmicas) luego de 480 minutos. La viabilidad fue totalmente reducida solo cuando el H₂O₂ y la luz solar simulada estuvieron presentes luego de 360 minutos de irradiación. Estos resultados podrían demostrar que el seguimiento exclusivo de cultivabilidad podría llevar a falsos positivos, ya que probablemente los microorganismos estarían entrando en estados de viabilidad no cultivabilidad (VBNC) lo que significa que no están siendo inactivados a bajos tiempos de irradiación. Son necesarios tiempos largos de tratamiento para asegurar la completa inactivación de las células bacterianas.

CONCLUSIONES

La principal conclusión de este trabajo es que la adición de peróxido de hidrogeno en bajas concentraciones en aguas subterráneas irradiadas por luz solar puede activar diversos procesos naturales foto-inducidos, especialmente foto-Fenton y fotólisis de peróxido de hidrogeno, los cuales pueden generar altas tasas de radicales hidroxilo altamente oxidantes. Estos radicales pueden aprovecharse para degradar contaminantes orgánicos e inactivar microorganismos patógenos en esta clase de efluentes, convirtiendo este proceso en un posible mecanismo efectivo para remover contaminación química y microbiológica sin la adición de grandes cantidades de sustancias químicas. Por otro lado, el seguimiento exclusivo de los microorganismos en esta clase de procesos foto-inducidos a través de técnicas de cultivabilidad, podría llevar a la detección de falsos positivos, en donde las células microbianas podrían entrar en estados de viabilidad no cultivabilidad (VBNC) indetectables para este tipo de procedimientos. El uso de técnicas de viabilidad demuestra claramente que proporcionan datos más precisos acerca de la inactivación de microorganismos a través de procesos tales como foto-Fenton.

Agradecimientos. Los autores agradecen al CONICET y a la Universidad Nacional de La Plata en Argentina y a la Universidad del Valle en Colombia por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Bjergbæk, L.A., Roslev, P., 2005. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 99, pp. 1090-1098.
- Burns, J.M., Cooper, W.J., Ferry, J.L., King, D.W., Dimento, B.P., McNeill, K., Miller, C.J., Miller, W.L., Peake, B.M., Rusak, S.A., Rose, A.L., Waite, T.D., 2012. Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments. *Aquatic Sciences*, 74, pp. 683-734.
- De Laurentiis, E., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2014. Effects of climate change on surface-water photochemistry: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, pp. 11770–11780.
- García-Armisen, T., Servais, P., 2004. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 58, pp. 269-279.
- Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S., Vione, D., 2015. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals (•OH), *Chemical Reviews*, 115, pp. 13051-13092.
- Gutierrez-Zapata, H.M., Rojas, K., Sanabria, J., Rengifo-Herrera, J.A., 2016. 2,4-D abatement from groundwater samples by photo-Fenton processes at circumneutral pH using naturally iron present. Effect of inorganic ions, *Environmental Science and Pollution Research*, In press.
- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annual Reviews Biochemistry*, 77, pp. 755–776.
- Kapuscinski, R., Mitchell, R., 1981. Solar Irradiation Induces Sublethal Injury in *Escherichia coli* in Seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, 41, pp. 670-674.

- Nakatani, N., Ueda, M., Shindo, H., Takeda, K., Sakugawa, H., 2007. Contribution of the photo-Fenton reaction to hydroxyl radical formation rates in river and rain water samples. *Analytical Sciences*, 23, pp. 1137-1142.
- Ndounla, J., Spuhler, D., Kenfack, S., Wéthé, J., Pulgarin, C., 2013. Inactivation by solar photo-Fenton in pet bottles of wild enteric bacteria of natural well water: Absence of re-growth after one week of subsequent storage. *Applied Catalysis B: Environmental* 129, pp. 309–317.
- Ndounla, J., Pulgarin, C., 2014. Evaluation of the efficiency of the photo Fenton disinfection of natural drinking water source during the rainy season in the Sahelian region. *Science of The Total Environment*, 493, pp. 229–238.
- Pignatello, J.J., Oliveros, E., MacKay, A., 2006. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, pp. 1–84.
- Rengifo-Herrera, J.A., Castaño, O.L., Sanabria, I.J., 2013a. Culturability and Viability of Salmonella Typhimurium during Photo-Fenton Process at pH 5.5 under Solar Simulated Irradiation. *Journal of Water Resource and Protection*, 5, pp. 21–27.
- Sciacca, F., Rengifo-Herrera, J.A., Wéthé, J., Pulgarin, C., 2010. Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild Salmonella sp. in PET bottles by H₂O₂ addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron. *Chemosphere*, 78, pp. 1186–1191.
- Sciacca, F., Rengifo-Herrera, J.A., Wéthé, J., Pulgarin, C., 2011. Solar disinfection of wild Salmonella sp. in natural water with a 18L CPC photoreactor: Detrimental effect of non-sterile storage of treated water. *Solar Energy*, 85, pp. 1399–1408.
- Servais, P., Prats, J., Passerat, J., García-Armisen, T., 2009. Abundance of culturable versus viable Escherichia coli in freshwater. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, pp. 905-909.
- UNEP-GEO, 2010. Perspectivas del Medio Ambiente: AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE. UNEP, San José.