



Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

Aplicación de tratamientos electroquímicos para la
eliminación de bacterias patógenas en aguas

Application of electrochemical treatments for the elimination
of pathogenic bacteria in water

Autora

Paula Arnedo Pasamar

Directora

Natividad Miguel Salcedo

Escuela Politécnica Superior (Huesca)

2025

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos de la universidad, que han hecho que estos años hayan sido más amenos, motivadores y divertidos, gracias por su compañía. Asimismo, al entorno académico en el que me he formado, cada experiencia perteneciendo a la E.P.S. de Huesca ha contribuido a que finalice esta etapa con ilusión y muchas ganas de mirar hacia el futuro.

Al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA) del Campus Río Ebro de Zaragoza; y a todas las personas que trabajan en los laboratorios donde realicé mi investigación, por su paciencia, atención, conocimientos, y por estar siempre dispuestos a escuchar y ayudar.

Al Gobierno de Aragón, en concreto a través del Grupo de Investigación de Referencia Agua y Salud Ambiental (B43_23R) y al proyecto TED2021-129267B-I00, financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por “European Union NextGenerationEU/PRTR”, por el soporte recibido para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Resumen y palabras clave | 8 |
| 2. Abstract and keywords..... | 9 |
| 3. Introducción y objetivos..... | 10 |
| 4. Antecedentes | 12 |
| 4.1. Aguas residuales urbanas..... | 12 |
| 4.1.1. Composición y características..... | 12 |
| 4.1.2. Desinfección en la línea de tratamiento de EDARs..... | 14 |
| 4.1.3. Presencia de microorganismos patógenos..... | 16 |
| 4.2. Marco legal de la reutilización del agua en España..... | 17 |
| 4.3. Bacterias indicadoras de contaminación | 21 |
| 4.3.1. <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 4.3.2. <i>Enterococcus faecalis</i> | 24 |
| 4.4. Tratamientos de desinfección | 25 |
| 4.4.1. Tratamientos convencionales | 25 |
| 4.4.1.1. Ozonización | 26 |
| 4.4.1.2. Cloración | 27 |
| 4.4.1.3. Irradiación ultravioleta..... | 28 |
| 4.4.2. Procesos de oxidación avanzada | 28 |
| 4.4.2.1. Oxidación anódica | 30 |
| 4.4.2.2. Electro-Fenton | 32 |
| 4.4.2.3. Fotoelectro-Fenton..... | 32 |
| 5. Materiales y métodos | 33 |
| 5.1. Metodología experimental | 33 |
| 5.1.1. Configuración del sistema electroquímico | 33 |
| 5.1.2. Matrices | 34 |
| 5.1.3. Catalizadores..... | 36 |
| 5.1.4. Fuente de radiación ultravioleta..... | 38 |
| 5.1.5. Muestras bacterianas fortificadas | 38 |
| 5.1.6. Procedimiento experimental | 39 |
| 5.2. Metodología analítica | 41 |
| 5.2.1. Determinación de la concentración bacteriana y expresión de resultados.. | 41 |

| | |
|---|----|
| 5.2.1.1. Disoluciones decimales seriadas | 41 |
| 5.2.1.2. Método de siembra en placa | 42 |
| 5.2.1.3. Método Quanti-Tray 2000 | 42 |
| 5.2.2. Determinación de la concentración de H ₂ O ₂ | 44 |
| 6. Resultados y discusión | 45 |
| 6.1. Ensayos preliminares en Na ₂ SO ₄ | 45 |
| 6.2. Inactivación de <i>Escherichia coli</i> en agua residual depurada sintética..... | 47 |
| 6.2.1. Aplicación de oxidación anódica | 47 |
| 6.2.2. Aplicación de electro-Fenton..... | 49 |
| 6.2.3. Aplicación de fotoelectro-Fenton | 52 |
| 6.3. Inactivación de <i>Enterococcus faecalis</i> en agua residual depurada sintética | 55 |
| 6.3.1. Aplicación de electro-Fenton..... | 55 |
| 6.3.2. Aplicación de fotoelectro-Fenton | 57 |
| 6.4. Inactivación bacteriana en agua residual depurada real con el tratamiento fotoelectro-Fenton y ferrita de bismuto | 59 |
| 7. Conclusiones | 62 |
| 8. Referencias bibliográficas..... | 65 |
| 9. Anexos | 70 |
| 9.1. Anexo I: Concentraciones de <i>Escherichia coli</i> durante los tratamientos electroquímicos..... | 70 |
| 9.2. Anexo II: Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos durante los tratamientos electroquímicos para la desinfección de <i>Escherichia coli</i> | 72 |
| 9.3. Anexo III: Concentraciones de <i>Enterococcus faecalis</i> durante los tratamientos electroquímicos..... | 75 |
| 9.4. Anexo IV: Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos durante los tratamientos electroquímicos para la desinfección de <i>Enterococcus faecalis</i> | 76 |
| 9.5. Anexo V: Concentraciones de <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto | 77 |
| 9.6. Anexo VI: Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> | 78 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Composición típica de aguas residuales urbanas según su nivel de concentración..... | 13 |
| Tabla 2. Microorganismos presentes y sus concentraciones habituales en aguas residuales domésticas brutas | 16 |
| Tabla 3. Usos más comunes y concentraciones de <i>E.coli</i> en aguas regeneradas permitidas según RDL 1085/2024 | 19 |
| Tabla 4. Volúmenes de aguas residuales tratadas y reutilizadas y los usos del agua regenerada en España y Aragón en 2022 | 20 |
| Tabla 5. Características epidemiológicas y patológicas de las principales cepas diarrogénicas de <i>E.coli</i> | 23 |
| Tabla 6. Composición de la muestra de agua residual depurada sintética | 35 |
| Tabla 7. Caracterización físico-química de agua residual depurada sintética | 35 |
| Tabla 8. Caracterización físico-química de agua residual depurada real | 35 |
| Tabla 9. Características estructurales y físico-químicas de la hematita, magnetita y ferrita de bismuto..... | 36 |
| Tabla 10. Concentraciones de <i>E.coli</i> en Na ₂ SO ₄ durante el tratamiento de oxidación anódica | 70 |
| Tabla 11. Concentraciones de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica | 71 |
| Tabla 12. Concentraciones de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 71 |
| Tabla 13. Concentraciones de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 72 |
| Tabla 14. Concentraciones de <i>E.coli</i> en ARDS durante el control de luz para el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 72 |
| Tabla 15. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de <i>E.coli</i> en Na ₂ SO ₄ | 73 |
| Tabla 16. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de <i>E.coli</i> | 73 |
| Tabla 17. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con hematita para la desinfección de <i>E.coli</i> | 73 |
| Tabla 18. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con magnetita para la desinfección de <i>E.coli</i> | 74 |
| Tabla 19. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.coli</i> .. | 74 |
| Tabla 20. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con hematita para la desinfección de <i>E.coli</i> | 74 |
| Tabla 21. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con magnetita para la desinfección de <i>E.coli</i> | 74 |

| | |
|--|----|
| Tabla 22. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.coli</i> | 75 |
| Tabla 23. Concentraciones de <i>E.faecalis</i> en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 75 |
| Tabla 24. Concentraciones de <i>E.faecalis</i> en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. | 76 |
| Tabla 25. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con magnetita para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 76 |
| Tabla 26. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 76 |
| Tabla 27. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con magnetita para la desinfección de <i>E.faecalis</i> . | 77 |
| Tabla 28. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 77 |
| Tabla 29. Concentraciones de <i>E.coli</i> y <i>E.faecalis</i> en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto..... | 78 |
| Tabla 30. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.coli</i> | 78 |
| Tabla 31. Concentraciones de H ₂ O ₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 79 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Escherichia coli observada con microscopio electrónico de barrido (MEB) | 22 |
| Figura 2. Enteroccus faecalis observado con MEB | 24 |
| Figura 3. Clasificación de tecnologías de oxidación avanzadas..... | 29 |
| Figura 4. Sistema electroquímico utilizado en los tratamientos de desinfección..... | 34 |
| Figura 5. Imágenes MEB de ferrita de bismuto (A), magnetita (B) y hematita (C y D)... | 37 |
| Figura 6. Absorción del espectro UV-Vis de hematita, magnetita y ferrita de bismuto | 37 |
| Figura 7. Cámara solar Atlas Suntest CPS+ utilizada en los tratamientos de desinfección | 38 |
| Figura 8. Suspensión bacteriana homogénea con concentración de 106 - 107 UFC/100 mL en tubo de ensayo..... | 39 |
| Figura 9. Gradilla con eppendorfs con disoluciones decimales seriadas de bacterias durante la experimentación | 41 |
| Figura 10. Placas de Petri con agares nutritivos sembrados con <i>E.coli</i> (izda.) y <i>E.faecalis</i> (dcha.)..... | 42 |
| Figura 11. Máquina selladora Quanti-Tray Sealer PLUS | 43 |
| Figura 12. Evolución de la concentración de <i>E.coli</i> en Na ₂ SO ₄ durante el tratamiento de oxidación anódica | 45 |
| Figura 13. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en Na ₂ SO ₄ durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de <i>E.coli</i> | 47 |
| Figura 14. Evolución de la concentración de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica | 48 |
| Figura 15. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de <i>E.coli</i> | 48 |
| Figura 16. Evolución de la concentración de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 50 |
| Figura 17. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 51 |
| Figura 18. Evolución de la concentración de <i>E.coli</i> en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro..... | 52 |
| Figura 19. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de <i>E.coli</i> | 54 |
| Figura 20. Evolución de la concentración de <i>E.faecalis</i> en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro | 55 |
| Figura 21. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 57 |
| Figura 22. Evolución de la concentración de <i>E.faecalis</i> en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro..... | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de <i>E.faecalis</i> | 59 |
| Figura 24. Evolución de las concentraciones de <i>E.coli</i> y <i>E.faecalis</i> en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto..... | 60 |
| Figura 25. Evolución de la concentración de H ₂ O ₂ en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de <i>E.coli</i> y <i>E.faecalis</i> | 62 |

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El presente Trabajo de Fin de Grado evalúa la eficacia de distintos tratamientos electroquímicos de oxidación avanzada (PEOA): oxidación anódica, electro-Fenton y fotoelectro-Fenton. Los procesos fueron aplicados para la eliminación de bacterias patógenas en aguas residuales depuradas, en el marco de su regeneración para reutilización, conforme al Real Decreto 1085/2024. Se analizaron dos bacterias indicadoras de contaminación fecal: *Escherichia coli* (Gram-negativa) y *Enterococcus faecalis* (Gram-positiva), elegidas por su relevancia normativa y diferente resistencia frente a agentes oxidantes.

Los tratamientos se realizaron en matrices de complejidad creciente: una disolución de sulfato de sodio (Na_2SO_4); agua residual depurada sintética (ARDS) y agua residual depurada real, procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Tudela, en Navarra. Se utilizaron como catalizadores tres óxidos de hierro: hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4) y ferrita de bismuto (BiFeO_3). Durante el tratamiento electro-Fenton, BiFeO_3 resultó ser el más eficaz frente a *Escherichia coli*, gracias a su estructura cristalina de perovskita, que favorece la reacción-Fenton y la separación de cargas, mientras que la magnetita fue más efectiva frente a *Enterococcus faecalis*, debido a su mayor capacidad para liberar Fe^{2+} de forma sostenida. No obstante, la combinación del tratamiento electroquímico y luz ultravioleta y visible (UV-Vis), mostró un efecto sinérgico con BiFeO_3 , aumentando la producción de especies oxidantes y el rendimiento del proceso, gracias a su alta actividad photocatalítica.

Los resultados de estos procesos, y en particular el fotoelectro-Fenton con la ferrita de bismuto, indican que son altamente eficaces para la desinfección de aguas, con aplicación realista y sostenible en la regeneración de aguas residuales.

Palabras clave: oxidación avanzada, oxidación anódica, electro-Fenton, fotoelectro-Fenton, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, catalizadores de hierro, reutilización.

2. ABSTRACT AND KEYWORDS

This Final Degree Project evaluates the effectiveness of various electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs): anodic oxidation, electro-Fenton, and photoelectro-Fenton. These processes were applied for the elimination of pathogenic bacteria in wastewater, within the framework of its regeneration for reuse in accordance with Royal Decree 1085/2024. Two fecal contamination indicator bacteria were analyzed: *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Enterococcus faecalis* (Gram-positive), selected for their regulatory relevance and differing resistance to oxidizing agents.

The treatments were carried out in matrices of increasing complexity: sodium sulphate (Na_2SO_4), synthetic treated wastewater (STWW), and real treated wastewater from the Tudela Wastewater Treatment Plant (WWTP), in Navarra. Three iron-based catalysts were used: hematite (Fe_2O_3), magnetite (Fe_3O_4), and bismuth ferrite (BiFeO_3). During the electro-Fenton treatment, BiFeO_3 proved to be the most effective against *Escherichia coli*, due to its perovskite crystal structure, which favors the Fenton reaction and charge separation. In contrast, magnetite was more effective against *Enterococcus faecalis*, owing to its higher capacity to release Fe^{2+} in a sustained manner. However, the combination of electrochemical treatment with ultraviolet and visible light (UV-Vis) showed a synergistic effect with BiFeO_3 , enhancing the production of oxidizing species due to its high photocatalytic activity.

The results of these processes, particularly the photoelectro-Fenton treatment using bismuth ferrite, demonstrate high efficacy for water disinfection, with realistic and sustainable application in wastewater regeneration.

Keywords: advanced oxidation, anodic oxidation, electro-Fenton, photoelectro-Fenton, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, iron-based catalysts, water reuse.

3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El acceso a agua limpia y segura constituye uno de los pilares fundamentales para el desarrollo sostenible, la salud pública y la protección del medio ambiente. Sin embargo, la creciente presión sobre los recursos hídricos, debido al cambio climático y al aumento de la población y demanda, están haciendo cada vez más evidente la necesidad de buscar fuentes alternativas de abastecimiento y mejoras en la eficiencia del uso del agua. En este contexto surge la reutilización del agua como una solución prioritaria en muchos países, entre ellos España, donde las aguas residuales depuradas son regeneradas mediante tratamientos adecuados para que puedan ser aprovechadas para diferentes usos no potables, como riego agrícola, industrial, recreativo o ambiental.

A pesar de los avances en los tratamientos aplicados en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), se ha demostrado que los procesos convencionales, incluso en su fase terciaria, no siempre consiguen la eliminación completa de microorganismos patógenos en aguas (López et al., 2016). Esto es debido a que las operaciones no están diseñadas para deshacerse de este tipo de carga microbiológica, sino que están orientadas a la eliminación de contaminantes regulados por la ley vigente, como sólidos en suspensión, materia orgánica o nutrientes.

Entre los principales indicadores de contaminación fecal se encuentran *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, ya que sus características fisiológicas y capacidad de persistencia en condiciones adversas, convierten a estas dos bacterias en referentes claves para evaluar la seguridad del agua regenerada (Delgado et al., 2008). La eliminación de este tipo de microorganismos en aguas depuradas adquiere una especial relevancia cuando se contempla su reutilización. En estos casos, la normativa actual en materia de reutilización de aguas a nivel nacional, el Real Decreto 1085/2024, establece límites específicos para determinados patógenos, lo que obliga a incorporar procesos de desinfección eficaces tras el tratamiento convencional.

Debido a que su presencia no solo representa un riesgo sanitario, sino también una barrera normativa, resulta fundamental investigar en tecnologías avanzadas de desinfección que se alineen con los principios de sostenibilidad ambiental. Los Procesos de Oxidación Avanzada (POA) han demostrado ser altamente eficientes en la eliminación de contaminantes orgánicos recalcitrantes y microorganismos patógenos, gracias a la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), capaces de mineralizar la materia orgánica y atacar las estructuras celulares de las bacterias (Poyatos et al., 2010). A partir de los POA han emergido los Procesos Electroquímicos de Oxidación Avanzada (PEOA), como la oxidación anódica, el proceso electro-Fenton o el fotoelectro-Fenton, la variente fotoassistida del electro-Fenton. Al combinar eficiencia, versatilidad y bajo impacto ambiental, se presentan como unas alternativas muy prometedoras de desinfección, en comparación con otros métodos convencionales generadores de subproductos tóxicos (Sanz et al., 2013).

En este marco, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es estudiar distintos tratamientos electroquímicos para la eliminación de bacterias patógenas en aguas residuales, en el contexto de su regeneración y posible reutilización. Para ello se han planteado varios objetivos específicos:

- Estudiar la eliminación de bacterias patógenas mediante 3 tratamientos electroquímicos de oxidación avanzada: oxidación anódica, electro-Fenton y fotoelectro-Fenton.
- Comparar la eficacia de 3 catalizadores de óxido de hierro diferentes utilizados en los procesos electro-Fenton y fotoelectro-Fenton.
- Evaluar la eliminación de las bacterias patógenas en función del tiempo de tratamiento.
- Determinar la efectividad de los tratamientos aplicados en aguas residuales depuradas.

Este trabajo contribuye activamente a la consecución de varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la Agenda 2030 de la ONU:

- ODS 3 de Salud y bienestar: con la desinfección de aguas residuales para su reutilización, se reducen riesgos asociados a enfermedades de origen hídrico.
- ODS 6 de Agua limpia y saneamiento: se promueven tecnologías de vanguardia que permiten la reutilización segura del agua.
- ODS 12 de Producción y consumo responsables: el uso eficiente de los recursos naturales es fomentado con el desarrollo y evaluación de métodos sostenibles de tratamiento y regeneración de aguas.
- ODS 14 de Vida submarina: la mejora en la calidad del agua residual vertida al medio natural ayuda a proteger los sistemas acuáticos.

La investigación se enmarca en los esfuerzos por mejorar la calidad de las aguas regeneradas, contribuyendo a garantizar su seguridad sanitaria y a cumplir con los requisitos establecidos en el Real Decreto 1085/2024, que asienta las bases del papel estratégico de la reutilización en la gestión hídrica nacional. Además, se busca proporcionar una base experimental para la implementación de tecnologías limpias y eficientes en el ámbito del tratamiento de aguas, con el objetivo último de avanzar hacia una economía circular del agua y mitigar los efectos de la crisis hídrica global.

4. ANTECEDENTES

4.1. Aguas residuales urbanas

4.1.1. Composición y características

Las aguas residuales son aquellas que se obtienen después de darle uso al agua natural. Sus orígenes son variados, pero hay cuatro fuentes fundamentales: aguas domésticas o urbanas, industriales, agrícolas y o ganaderas y pluviales.

La composición de las aguas residuales urbanas es muy variable por los muchos factores que las afectan; empezando por el consumo promedio de agua por habitante, que hace variar las concentraciones de las sustancias disueltas en ella, además de los hábitos alimenticios de cada población, que también influye en la composición química y calidad del agua (Rojas, 2002). Otros factores que afectan, son los tipos y tamaños de las actividades económicas que se den en las aglomeraciones urbanas y la presencia de una red de saneamiento unitaria o separativa, cuya diferencia es la recogida del agua de lluvia. Si ambas son recolectadas en el mismo sistema de red, este será de tipo unitario, en cambio, si se realiza en sistemas distintos, se trata de una red separativa (Ramis, 2019). En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de los constituyentes de las aguas residuales urbanas en función de si la carga se considera alta, media o baja.

Tabla 1. Composición típica de aguas residuales urbanas según su nivel de concentración. Fuente: Rojas, 2002.

| Constituyente | Concentración (mg/L) | | |
|--|----------------------|-------|------|
| | Alta | Media | Baja |
| Sólidos totales | 1200 | 700 | 350 |
| Disuelto | 850 | 500 | 250 |
| Fijos | 525 | 300 | 145 |
| Volátiles | 325 | 200 | 105 |
| En suspensión | 350 | 200 | 100 |
| Fijos | 75 | 50 | 30 |
| Volátiles | 275 | 150 | 70 |
| Sólidos sedimentables mL/l-h | 20 | 10 | 5 |
| DBO (5 días, 20°C) | 300 | 200 | 100 |
| DQO | 570 | 380 | 190 |
| Nitrógeno (N) total | 85 | 40 | 20 |
| Orgánico | 35 | 15 | 8 |
| Amoniacal | 50 | 25 | 12 |
| Fósforo (P) total | 20 | 10 | 6 |
| Cloruros (Cl) | 100 | 50 | 30 |
| Alcalinidad (como CaCO₃) | 200 | 100 | 50 |
| Grasas | 150 | 100 | 50 |
| Calcio (Ca) | 110 | 50 | 10 |
| Magnesio (Mg) | 10 | 9 | 8 |
| Sodio (Na) | 100 | 50 | 23 |

Entre las características físicas y químicas de estas aguas podemos encontrar los sólidos, además de la temperatura, la turbidez, el color y el olor. La temperatura suele oscilar entre 10°C y 21°C. Los valores más altos son perjudiciales para la supervivencia de especies, tanto de flora como de fauna, en las aguas receptoras del medio e incluso promueve el crecimiento de hongos y algas indeseadas. Esto se debe a que la solubilidad del oxígeno (O₂) disuelto disminuye con el aumento de la temperatura (Rojas, 2002).

Existen otros componentes de las aguas residuales que afectan a la concentración de oxígeno disuelto: la materia orgánica biodegradable supone un sustrato perfecto para la actividad microbiológica, por lo que, una alta cantidad de la misma, junto con la presencia de microorganismos, podrían provocar el agotamiento del oxígeno. Por otro lado, una gran cantidad de sólidos en suspensión (SS) y una turbidez alta, harán que la productividad primaria disminuya al bloquear la luz que llega a las plantas subacuáticas del lecho del medio hídrico, esto inhibirá los procesos fotosintéticos de la vegetación de la zona bentónica debido a la menor recepción de luz solar. Como consecuencia, puede aumentar la mortalidad o migración de especies de peces, artrópodos, invertebrados, etc., además de la generación de olores y gases debido al ambiente séptico y a la formación de sulfatos, sulfitos y sulfuros por la actividad microbiana anaerobia (Ramis, 2019).

Los nutrientes son otra parte muy importante de estas aguas, principalmente el nitrógeno y el fósforo. La eutrofización se genera con el enriquecimiento de estos elementos. La materia vegetal o biomasa fitoplanctónica se multiplica descontroladamente y al descomponerse provoca el desequilibrio ecológico. Uno de los problemas que surgen durante la eutrofización es, el agotamiento del oxígeno disuelto (Ramis, 2019).

4.1.2. Desinfección en la línea de tratamiento de las EDARs

En una EDAR, la línea de tratamiento principal se divide en tres etapas: pretratamiento, tratamiento primario y tratamiento secundario. El pretratamiento elimina los residuos más gruesos y materiales floculantes. Por otra parte, el tratamiento primario se basa en procesos físicos que retiran los sólidos en suspensión y parte de la materia orgánica sedimentable y, por último, el tratamiento secundario emplea procesos biológicos para eliminar la mayoría de la carga de materia orgánica biodegradable disuelta y en suspensión (Ramis, 2019).

Existen varios estudios en EDARs en las que se han caracterizado distintas bacterias patógenas en el efluente de las primeras decantaciones de la línea de tratamiento, como parte de sus tratamientos primarios, y demuestran que la concentración de estos microorganismos no disminuye en esta etapa. En cambio, sí se ha demostrado que después de tratamientos secundarios y terciarios se han encontrado reducciones de concentraciones de patógenos, como *Escherichia coli* (López et al., 2016 y 2018).

Los tratamientos secundarios estudiados son: los fangos activos, que reducen la concentración de *E.coli* alrededor de dos unidades logarítmicas; los filtros percoladores, que consiguen disminuir, aproximadamente, una unidad logarítmica; y por último, el lagunaje, siendo el más eficaz, reduce la concentración de *E.coli* entre tres y cuatro unidades logarítmicas (López et al., 2016 y 2018).

En el tratamiento de fangos activos se lleva a cabo una depuración biológica del agua residual en un reactor biológico o tranque de aireación. El objetivo del proceso es reducir la cantidad de carga orgánica del agua. Microorganismos aerobios forman flóculos en suspensión al consumir la materia orgánica, necesitando agitación para evitar su sedimentación e inocular su activación. El tiempo de retención debe ser un parámetro estudiado previamente para asegurar la efectividad del tratamiento. Posteriormente, el agua pasa a un decantador secundario donde los flóculos, que forman los fangos o lodos, sedimentan; parte de estos lodos llenos de microorganismos, se redirigen al reactor para mantener la población microbiana y el resto se trata específicamente en otra línea de la EDAR (Vasco et al., 2009).

Los filtros percoladores son un sistema de reactor biológico de crecimiento asistido, donde los microorganismos, cuya función es la misma que en el proceso de fangos activos, se adhieren a un material de relleno formando una biopelícula. El agua residual llega a la parte superior del reactor y percola a través de un medio filtrante en el que se encuentran los microorganismos y es ahí donde se degrada la materia orgánica y coloidal, incluida una parte de los patógenos que se quieren eliminar. A diferencia del tratamiento de fangos activos, los filtros percoladores no necesitan un sistema adicional de aireación, sin embargo, está demostrado que los primeros ofrecen mayor eficiencia en la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), alcanzando hasta un 90% en comparación con los filtros que alcanzan hasta un 60% al final del tratamiento; cabe destacar que los filtros percoladores están diseñados para instalaciones EDAR pequeñas, por ello, a su vez, son más económicos que los procesos de fangos activos (George et al., 2002; Orruño et al., 2014).

El tratamiento por lagunaje es un método biológico y natural de depuración de aguas residuales que consiste en el almacenamiento del agua en balsas o lagunas artificiales con exposición a luz solar por un tiempo de retención determinado; cuanto mayor sea el tiempo de retención, mayor será la eficacia de desinfección (López et al., 2018). Las bacterias heterótrofas se encargan de degradar la materia orgánica simulando el proceso de autodepuración natural de los ríos y lagos, más efectivo en zonas cálidas donde la actividad biológica es mayor. Es una tecnología, no solo eficiente para reducir materia orgánica, si no, para eliminar parcialmente gérmenes patógenos. Es especialmente efectiva en poblaciones pequeñas en climas favorables, aunque puede verse comprometida si el agua residual contiene residuos industriales con posibles sustancias tóxicas (La Iglesia, 2016).

Existen tres tipos de lagunas de estabilización: anaerobias, facultativas y aerobias o de maduración. Las lagunas anaerobias actúan en ausencia total de oxígeno, reduciendo sólidos en suspensión y carga orgánica, en las que las bacterias anaerobias transforman esa carga en ácidos volátiles, metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2). Las lagunas facultativas combinan descomposición aerobia y anaerobia; en la superficie se diferencia la capa aerobia donde los organismos encargados de la degradación son las algas y donde existe una aireación que aporta oxígeno, por otra parte, en la capa más profunda ocurren los procesos anaerobios. Se trata de lagunas versátiles en las que, dependiendo de la carga de materia orgánica y las condiciones climáticas, pueden variar las condiciones de tratamiento, además de ser más eficaces que las lagunas anaerobias (La Iglesia, 2016). Por último, las lagunas de maduración actúan bajo la presencia de oxígeno y se diferencian de las facultativas en que, en estas, no hay aireación de O_2 , si no que el aporte del mismo depende de la fotosíntesis de las algas encargadas de degradar la baja carga orgánica que soportan estas lagunas. Son estas últimas las que normalmente se utilizan como tratamiento terciario para mejorar la calidad de los efluentes de las EDARs. Es así porque favorecen la eliminación de patógenos por dos motivos: al ser las lagunas de menor profundidad, son más efectivamente expuestas al sol y, por tanto, a la radiación solar o ultravioleta (UV); por otra parte, con la actividad

del fitoplancton, el pH aumenta de forma natural, reduciendo así la carga contaminante de patógenos (Andrade, 2021).

4.1.3. Presencia de microorganismos patógenos

Los microorganismos que se pueden encontrar en las aguas residuales urbanas son, principalmente, de origen fecal, de excrementos animales y humanos recogidos en las redes de saneamiento, aunque también su presencia se debe a los excrementos arrastrados del medio por las aguas. Entre los microorganismos más presentes y comunes están: las bacterias, virus, algas, protozoos, hongos y levaduras y parásitos, además de rotíferos, crustáceos, etc., es decir, animales microscópicos. En la Tabla 2 aparecen recogidas las especies de microorganismos más habituales en aguas residuales urbanas, junto a las concentraciones en las que se suelen hallar (Metcalf y Eddy, 2002).

Tabla 2. Microorganismos presentes y sus concentraciones habituales en aguas residuales domésticas brutas. Fuente: Metcalf y Eddy, 2002.

| Microorganismo | Concentración (NMP/mL) |
|--------------------------------|------------------------|
| Coliformes totales | 10^5 - 10^6 |
| Coliformes fecales | 10^4 - 10^5 |
| Estreptococos fecales | 10^3 - 10^4 |
| <i>Enterococcus</i> sp. | 10^2 - 10^3 |
| <i>Shigella</i> sp. | Presente |
| <i>Salmonella</i> sp. | 10^0 - 10^2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10^1 - 10^2 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 10^1 - 10^3 |

La problemática relacionada con el agua y las bacterias viene dada porque el agua es un vehículo de transmisión de enfermedades muy utilizado por los microorganismos patógenos. El origen de las enfermedades puede ser tanto la ingesta de alimentos regados con agua contaminada como la ingesta directa de ese agua (Torres et al., 2016).

Aunque en las EDARs se reduzca en parte la carga microbiológica, los microorganismos no son completamente eliminados durante los procesos de tratamiento, ya que no están diseñados para ello. Una fracción significativa logra sobrevivir, lo que implica que ciertos patógenos pueden acabar saliendo, junto con el agua depurada, hacia los medios receptores. Esto tiene consecuencias ambientales graves, además de la transmisión de enfermedades infecciosas a humanos y animales, estos microorganismos pueden provocar fenómenos como la ya comentada eutrofización, la alteración de ecosistemas acuáticos, la contaminación de aguas subterráneas o la generación de resistencia

antimicrobiana, ya que la liberación de bacterias resistentes a antibióticos favorece la transferencia horizontal de genes de resistencia, un problema emergente de salud pública (Rodríguez et al., 2023).

Este aspecto es especialmente crítico cuando el agua depurada se destina a reutilización, para lo cual ha de someterse a un proceso de regeneración. En estos casos, la legislación exige un control estricto de los parámetros microbiológicos, de acuerdo con normativas como el Reglamento (EU) 2020/741 sobre la reutilización del agua, que establece valores máximos permitidos de *Escherichia coli* y otros indicadores. Por tanto, garantizar una desinfección final adecuada de las aguas residuales es fundamental para evitar riesgos para la salud pública y cumplir con los estándares de calidad exigidos para la reutilización segura del agua.

4.2. Marco legal de la reutilización del agua en España

Las aguas depuradas regeneradas deben integrarse en la planificación global del agua y presentarse como una alternativa estratégica dentro de la gestión sostenible de los recursos hídricos. La reutilización del agua amplía su disponibilidad y hace que los recursos de mejor calidad puedan ser destinados a usos que realmente lo requieran. En las Estaciones Regeneradoras de Aguas Residuales (ERARs), gracias a tratamientos específicos adecuados, las aguas salidas de las EDARs son procesadas y pueden usarse para riego, industria, recreación, etc. Desde el punto de vista económico, las aguas regeneradas compiten con procesos como los trasvases y la desalinización o desalación, ya que estas presentan ventajas como el menor consumo energético y de transporte, además, son una fuente predecible, ya que su disponibilidad está directamente relacionada con el volumen de agua residual generada (Melgarejo-Moreno y López-Ortiz, 2016).

La reutilización planificada de aguas residuales en España ha tenido un desarrollo progresivo y desigual durante décadas, debido a la evolución normativa del país y a las necesidades hídricas de cada territorio. En la década de los setenta se llevó a cabo en Gran Canaria la primera reutilización de aguas residuales planificada y fue para riego agrícola, a través de la EDAR de Barranco Seco I. Esta solución se extendió por el país, en primer lugar, en las costas y con el tiempo, lugares como Murcia o la Comunidad Valenciana fueron de los primeros en actualizar sus instalaciones de tratamiento de aguas y convertirlas en las EDARs de hoy en día, dotadas de tratamientos terciarios (Melgarejo-Moreno y López-Ortiz, 2016).

El punto de partida normativo fue la Ley de Aguas de 1985, cuyo artículo 101 ya contemplaba la necesidad de definir los criterios de reutilización, teniendo en cuenta la depuración previa y los usos posteriores. En 2001, se aprobó la Ley 10/2001 del Plan Hidrológico Nacional, que reconocía la escasez estructural del recurso hídrico en muchas zonas del país y abogaba por una planificación justa. Siguientes reformas de esta ley

como la Ley 11/2005, cuando España ya contaba con 322 sistemas de reutilización de aguas, pretendieron siempre aumentar el volumen de agua regenerada en el país con nuevas restricciones, propuestas, etc. (Yagüe, 2005).

El marco jurídico fundamental de la reutilización de aguas en España estaba, hasta 2024, esencialmente regulado por el Real Decreto 1620/2007, que debía cumplir las exigencias de la Directiva Marco del Agua (2000/60/CE). En 2007, esta normativa ayudó a que la reutilización se asentara verdaderamente como estrategia clave para una gestión sostenible del agua, especialmente en zonas españolas con fuerte estrés hídrico. La norma establecía que correspondía al Gobierno la determinación de las condiciones básicas de reutilización y requisitos de calidad de las aguas regeneradas, en función de los usos previstos; algo que se sentía necesario especificar debido a la fragmentación institucional que había en España, en cuanto al sistema de gestión del ciclo urbano del agua (Delacámarra et al., 2017).

En 2020, se publicó el Reglamento (EU) 2020/741, relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua en los estados europeos. Fue impulsado por la Unión Europea como parte del Pacto Verde Europeo con el objetivo de aplicar los principios de la economía circular a la gestión del agua de los Estados Miembro. El reglamento está centrado en reutilizar el agua para el riego agrícola y son los gobiernos de los países los responsables de aplicar la reutilización para otros usos. Por otra parte, define cuatro clases de agua regenerada determinadas por: el tipo de tratamiento y si es secundario, filtración o desinfección; el uso agrícola al que va destinado; y los valores máximos asequibles de parámetros microbiológicos y físico-químicos. El Reglamento (EU) 2020/741 reconoce que el principal obstáculo para conseguir su objetivo es el alto coste de inversión de las EDARs y ERARs, por ello, fomenta incentivos económicos y presenta de una forma muy clara los beneficios sociales, económicos y medioambientales que tiene la regeneración del recurso (Navarro, 2024).

La Ley de Aguas ha sufrido varias modificaciones, en 1999 y en 2001 y, hasta 2023, el Real Decreto Legislativo 1/2001 era la norma principal que se debía seguir en materia de agua en España. Tras la publicación en el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) del Reglamento (EU) 2020/741, se hizo necesario que la legislación española se actualizara. El Real Decreto-ley 4/2023 reforma el último Texto Refundido de Ley de Aguas (TRLA) de 2001 y da, una vez más, importancia a la reutilización del agua como herramienta clave para alcanzar una economía circular y la adaptación al cambio climático. A continuación, las administraciones, impulsaron la reutilización mediante mejoras en los tratamientos de aguas residuales, ayudas económicas y lo más interesante, planes de fomento, los cuales son obligatorios para todas las aglomeraciones urbanas españolas de más de 50.000 habitantes y deben presentarse antes de que acabe el año 2028. Esta ley, además de tratar la reutilización del agua, se elaboró para adoptar medidas urgentes en materia agraria debido a la sequía y empeoramiento del sector primario tras el conflicto bélico en Ucrania desde 2022 (Navarro, 2024).

Como consecuencia de la última modificación de la Ley de Aguas y el Reglamento (EU) 2020/741, cuyos requisitos son de obligado cumplimiento, se llevó a cabo una reforma

integral y moderna del régimen de la reutilización del agua en el país, aprobando así el Real Decreto 1085/2024 que deroga el de 2007. Este nuevo Real Decreto ofrece varios cambios; se describen las autorizaciones y concesiones necesarias para producir, suministrar y usar el agua regenerada; también, se excluye completamente el consumo humano y el agua de baño recreativa como usos del agua regenerada y, se da prioridad, por primera vez, a hacer usos ambientales como la recarga de acuíferos o el mantenimiento de humedales. Los incentivos son una parte importante de esta nueva norma; además del canon de vertido habitual y las subvenciones para aquellas empresas que quieran utilizar estas aguas en vez de las convencionales, también se permite cobrar por el servicio de producción y suministro de las mismas, lo que fomenta la participación del sector privado. Por otra parte, introducen un nuevo sello de gestión de transparencia del agua con el objetivo de dar reconocimiento ambiental a las organizaciones más responsables. En el Real Decreto 1085/2024 se detallan los requisitos técnicos y sanitarios del agua regenerada según su uso posterior y los protocolos de análisis y suspensión de suministro si no se cumplen (Lozano y Orteu, 2024). La Tabla 3 muestra las concentraciones de *E.coli* permitidas en aguas regeneradas en función de sus usos, cabe destacar que estos nuevos valores son más restrictivos que los descritos en el Real Decreto de 2007. La elección de *E.coli* como patógeno legislado responde a su valor como indicador microbiológico universal de contaminación fecal, dado que es un organismo ampliamente estudiado, fácil de detectar en laboratorio y muy representativo de la posible presencia de otros patógenos.

Tabla 3. Ejemplos de usos más comunes y concentraciones de *E.coli* en aguas regeneradas permitidas según RDL 1085/2024. Elaboración propia.

| Uso | Descripción | <i>E.coli</i> (UFC/100mL) |
|-------------------|--|----------------------------------|
| Urbano | Riego de jardines privados | 0 |
| | Riego de zonas verdes urbanas | 100 |
| Agrícola | Riego de cultivos de alimentos que se consumen crudos cuando la parte comestible se produce por encima del nivel del suelo y no está en contacto directo con las aguas regeneradas | 100 |
| | Riego de cultivos de alimentos que se consumen crudos en los que la parte comestible de la planta está en contacto directo con las aguas regeneradas | 10 |
| Industrial | Aguas de proceso y limpieza excepto en la industria alimentaria | 1.000 |
| | Torres de refrigeración y condensadores evaporativos | 0 |
| Recreativo | Riego de campos de golf | 100 |
| Ambiental | Recarga de acuíferos por percolación localizada a través de terreno | 1.000 |
| | Recarga de acuíferos por inyección directa | 0 |

En la siguiente tabla, la Tabla 4, se puede observar un resumen comparativo del volumen de aguas residuales tratadas y reutilizadas en España y en la comunidad autónoma de Aragón, así como los principales usos que se le da al agua regenerada. En toda España se tratan más de 15 millones de m³/día de agua, de los cuales se reutiliza, aproximadamente, el 8%. Por otro lado, en Aragón se reutiliza el 0,3% del total de aguas residuales depuradas, lo cual es una proporción muy baja comparada con la media nacional. Además, el 100% del agua regenerada en Aragón, se usó en jardines y zonas deportivas de ocio; esto pone de manifiesto la dependencia exclusiva del sector municipal y recreativo para la aplicación de agua regenerada en esta comunidad.

Tabla 4. Volúmenes de aguas residuales tratadas y reutilizadas y los usos del agua regenerada en España y Aragón en 2022. Fuente: INE, Serie 2000-2022. Elaboración propia.

| | España | Aragón |
|--|---------------|---------------|
| Aguas residuales tratadas (m³/día) | 15.428.404 | 586.480 |
| Agua reutilizada (m³/día) | 1.238.912 | 1.807 |
| Uso del agua reutilizada: Agricultura (%) | 38 | 0 |
| Uso del agua reutilizada: Industria (%) | 9 | 0 |
| Uso del agua reutilizada: Jardines y zonas deportivas de ocio (%) | 14 | 100 |
| Uso del agua reutilizada: Limpieza de alcantarillado y baldeo de calles (%) | 1 | 0 |
| Uso del agua reutilizada: Otros usos (%) | 39 | 0 |

El aprovechamiento de aguas regeneradas optimiza los procesos de depuración y representa un punto clave en la gestión inteligente de los recursos hídricos, en un contexto global de cambio climático y donde su demanda crece exponencialmente. Según los últimos datos registrados en el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2022 el consumo medio de agua en los hogares españoles fue de 128 litros por habitante y por día. Esta información cobra mayor relevancia al compararse con el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de 2023, que proyecta que para 2050 alrededor de 5.000 millones de personas enfrentarán escasez de agua y dificultades en el acceso a agua potable. Esto evidencia que el ritmo de consumo actual representa un riesgo inminente. Se estima además que para 2025, el 60% de la población mundial experimentará dificultades en el acceso al agua. Una de las

principales causas de esta crisis es la contaminación del medio hídrico debido a vertidos sin tratar, los cuales alcanzan las 2 millones de toneladas diarias de residuos de origen humano. Estos vertidos no solo generan graves impactos en la salud humana y el medio ambiente, sino que también afectan a la economía de los países.

Ante este panorama, nos enfrentamos al desafío de mitigar dichos efectos negativos mediante la investigación y el desarrollo de tecnologías innovadoras y eficientes para el tratamiento y reutilización del agua. Implementar soluciones sostenibles es fundamental para garantizar la preservación del recurso hídrico y su disponibilidad para las generaciones futuras.

4.3. Bacterias indicadoras de contaminación

Como se ha mencionado anteriormente, *Escherichia coli* es consideraba la bacteria indicadora de contaminación fecal por excelencia. Su uso está ampliamente aceptado y respaldado por la legislación vigente en materia de calidad de aguas residuales, de baño, regeneradas..., debido a su presencia constante en heces humanas y su fácil detección en laboratorio (Ingerson-Mahar y Reid, 2011). Esto convierte a esta bacteria en el principal parámetro microbiológico de referencia para evaluar la eficacia de los tratamientos de desinfección.

Sin embargo, en las aguas residuales pueden encontrarse muchos otros microorganismos patógenos, por ello, en este estudio se ha considerado relevante incluir el análisis de *Enterococcus faecalis*, como bacteria indicadora de contaminación fecal complementaria. Esta elección se justifica por su mayor resistencia frente a condiciones ambientales, así como por su reconocimiento como indicador adicional en distintas normativas y estudios científicos (Tortora et al, 2007).

4.3.1. *Escherichia coli*

E.coli es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Tiene forma de bacilo y puede crecer más exitosamente a 37º, en ambientes aerobios y anaerobios; puede ser móvil e inmóvil y presenta flagelos perítricos. La estructura biológica de este organismo anaerobio facultativo incluye una pared celular con una membrana externa rica en lipopolisacáridos, típica de las bacterias Gram-negativas, que proporciona resistencia ante condiciones ambientales adversas y agentes antimicrobianos. En cuanto a su ciclo de vida, la *Escherichia coli* se reproduce mediante

un proceso de división celular asexual llamado fisión binaria. En condiciones óptimas pueden llegar a dividirse cada 20-30 minutos, lo que denota una capacidad de proliferación muy rápida y eficiente. Se trata de un tipo de bacteria que no necesita un huésped para sobrevivir, lo que facilita su transmisión a través del agua y los alimentos (Fratamico et al. 2016). En la Figura 1 se puede observar una imagen de la bacteria *E.coli* capturada con un microscopio electrónico de barrido (MEB).

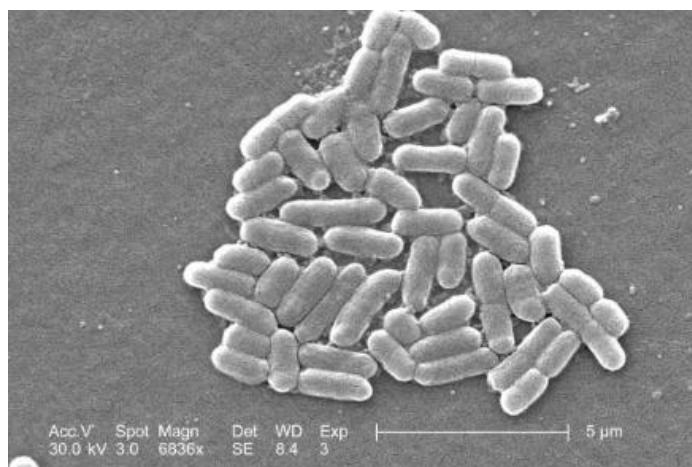


Figura 1. *Escherichia coli* observada con MEB. Fuente: Janice Haney Carr, National *Escherichia, Shigella, Vibrio* Reference Unit at Centers for Disease Control (CDC).

En su mayoría, *E.coli* no es dañina para los humanos, al contrario, se podría clasificar como beneficiosa e inofensiva. Es una bacteria que forma parte de la microbiota del intestino grueso humano y de otros mamíferos; su función consiste en digerir compuestos que nuestro organismo no puede por sí solo, además de producir vitaminas esenciales como la K o la B12. *Escherichia coli* presenta competitividad en el tracto intestinal humano frente a otros microorganismos patógenos de los que nos protegen, por eso, los humanos hemos desarrollado una relación simbiótica con la bacteria, a la vez que hemos descubierto los beneficios de los probióticos para la salud intestinal (Ingerson-Mahar y Reid, 2011).

E.coli sí es, en cualquier caso, un patógeno y según su mecanismo de patogenicidad y el tipo de enfermedad que causan al ser humano en el sistema digestivo, Kauffmann desarrolló la serotipificación de *Escherichia coli*. Consiste en la clasificación de sus cepas diarrogénicas según la combinación de los antígenos O y H de su superficie. Se diferencian 6 grupos principales: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Ángeles, 2002). En la Tabla 5 se recogen dos características de estas cepas: el modo de transmisión, pudiendo ser por agua contaminada, alimentos contaminados, etc. y la enfermedad diarreica o infección intestinal que producen.

Tabla 5. Características epidemiológicas y patológicas de las principales cepas diarrogénicas de *E.coli*.
 Fuente: Rodríguez-Ángeles, 2002. Elaboración propia.

| Cepa | Modo de transmisión | Enfermedad |
|-------------|---|--|
| ETEC | Agua y alimentos contaminados | Diarrea del viajero, diarrea acuosa en niños |
| EHEC | Agua contaminada, ingesta de carne cruda | Colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico |
| EIEC | Agua y alimentos contaminados, transmisión entre personas | Disentería similar a <i>Shigella sp.</i> |
| EPEC | Transmisión fecal-oral, contacto con superficies contaminadas | Diarrea acuosa en niños |
| EAEC | Agua y alimentos contaminados | Diarrea persistente |
| DAEC | Transmisión fecal-oral, contacto con superficies contaminadas | Diarrea acuosa en niños |

Los alimentos pueden estar contaminados de *Escherichia coli* debido a la exposición a material fecal en diferentes etapas de la cadena alimentaria. Uno de los principales focos de contaminación es el uso de estiércol mal compostado como fertilizante en la agricultura; los productos agrícolas que no sean debidamente lavados o procesados pueden llegar contaminados a los consumidores. Otros procesos de transmisión son: la fauna silvestre, como roedores o aves, que pueden depositar sus heces en los cultivos; la leche cruda, pudiendo contaminarse de las bacterias durante el ordeño; el consumo de carne picada, donde los microorganismos pueden distribuirse por todo el producto al ser molida y aumentar el riesgo de infección si no es cocinada debidamente y, por último, la inadecuada manipulación de los alimentos por parte de las personas (Ingerson-Mahar y Reid, 2011).

Además del estiércol, el agua contaminada usada para regar cultivos y lavar y enfriar productos agrícolas es otra fuente importante de transmisión. Es posible que *E.coli* penetre en las células vegetales de las paredes de las plantas, dificultando su eliminación con un simple lavado (Torres et al., 2016). Por otro lado, las aguas recreativas pueden ser un foco de infección si, por ejemplo, las piscinas no han sido correctamente cloradas. Es una realidad que a pesar de nuestros intentos por eliminar patógenos de las aguas del mundo, *E.coli* está presente en ellas y su presencia es un gran indicador de contaminación de aguas por residuos fecales. Esta bacteria, al igual que los microorganismos coliformes (familia *Enterobacteriaceae*), se utilizan como indicadores por su abundante presencia en el tracto gastrointestinal de humanos y animales homotermos, como ya se ha comentado. Al ser parte de la microbiota normal de estos organismos, su detección sugiere con facilidad la posible contaminación por materia

fecal. Aquellos residuos fecales pueden llegar al agua de diversas maneras: durante la lluvia, debido al derretimiento de nieve, escorrentías superficiales, actividades recreativas, fosas sépticas, animales silvestres, etc. (Delgado et al., 2008).

4.3.2. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram-positiva perteneciente a la familia *Enterococcaceae*, que forma parte de la microbiota intestinal de los animales de sangre caliente. Se trata de una bacteria anaerobia facultativa, inmóvil y con capacidad de fermentar glucosa sin generar gas (homofermentativa) produciendo ácido láctico como sustancia final. Se reproducen de forma más óptima a una temperatura de 35 °C, aunque se ha observado crecimiento entre los 10 y 45°C. Su patrón de crecimiento es en parejas o en cadenas cortas cuando se encuentra en suspensión en medios líquidos. Morfológicamente, se caracterizan por ser células en forma de esfera o ligeramente ovaladas, que no poseen cápsulas ni forman esporas. Presentan una pared celular rica en peptidoglucanos y ácido teicoico con antígenos del grupo D (Tortora, 2007). La Figura 2 muestra una imagen de *E.faecalis* hecha con un MEB.

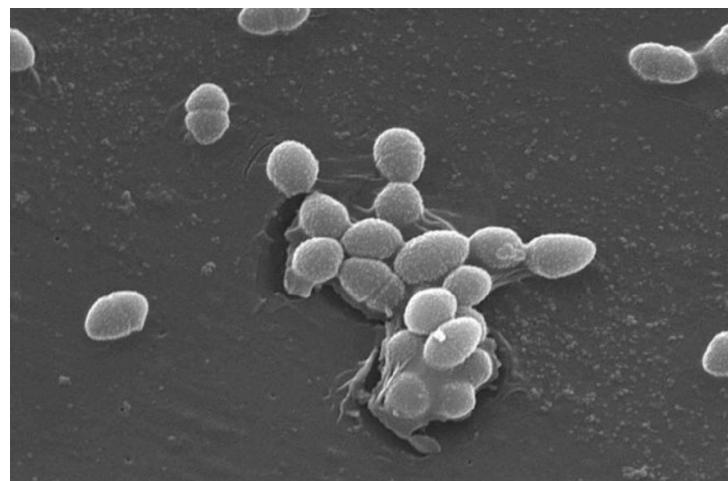


Figura 2. *Enteroccus faecalis* observado con MEB. Fuente: Janice Haney Carr, CDC.

Dentro del género *Enterococcus* existe una variedad de bacterias de gran interés para la investigación, sin embargo, *E.faecalis* posee una alta resistencia a condiciones ambientales extremas, por lo que es uno de los indicadores de contaminación fecal más utilizados, que nos proporciona información sobre la antigüedad de la contaminación. A diferencia de otros coliformes indicadores como *E.coli*, que nos indica una contaminación reciente, *E.aecalis* permite caracterizar, por su presencia, contaminación

fecal más antigua; esto se debe a que es capaz de sobrevivir por más tiempo en condiciones adversas, como son los pH alcalinos de hasta 9,6 y concentraciones salinas elevadas de hasta el 6,5% (Tortora et al, 2007).

Esta bacteria es útil en la industria de los alimentos, en cultivos de probióticos o en campos como la fermentación de alimentos. No obstante, es un patógeno oportunista no seguro para los humanos. *Enterococcus faecalis* causa infecciones nosocomiales, que incluyen infecciones en el tracto urinario, intrabdominales y endocarditis infecciosa persistente. Se han realizado investigaciones de las cepas más preocupantes a día de hoy, que son las que provocan endocarditis y afirman que su patogenicidad viene dada por su capacidad de formar biopelículas y así sobrevivir en condiciones pobres en nutrientes y antimicrobianas (George et al., 2005).

El origen de *E.faecalis* en aguas es igual al de *E.coli*: heces humanas; y por tanto, su transmisión al medio ambiente, también es la misma. Estos enterococos se pueden encontrar en el suelo, en alimentos, en plantas y animales, etc. y uno de los factores que más contribuyen a esta contaminación es el vertido de aguas residuales sin tratar, que actúan como vehículo de transmisión para estas bacterias (Ingerson-Mahar y Reid, 2011).

4.4. Tratamientos de desinfección

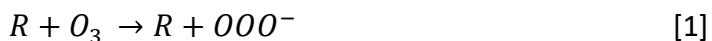
4.4.1. Tratamientos convencionales

Los tratamientos terciarios en las EDARs tienen como objetivo la eliminación de contaminantes persistentes como nutrientes, normalmente en forma de N y P, metales pesados, microcontaminantes y también microorganismos patógenos, mejorando así la calidad del agua y consiguiendo que su vertido o reutilización sea adecuada y legal, según los límites de concentraciones impuestos. Dentro de estos tratamientos, la desinfección se centra específicamente en la eliminación de microorganismos patógenos. Los procesos de desinfección más utilizados incluyen la ozonización, la cloración y la aplicación de UV.

4.4.1.1. Ozonización

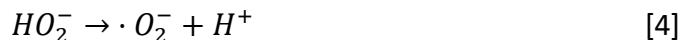
La ozonización es un proceso de oxidación que puede emplearse en el tratamiento de aguas residuales para transformar microcontaminantes y materia orgánica en compuestos intermedios menos tóxicos o mineralizarlos totalmente en CO₂, agua e iones inorgánicos. Existen dos mecanismos principales de actuación: la ozonización directa, en la que el ozono reacciona directamente con los contaminantes, y la ozonización avanzada, en la que, en medio alcalino, se generan radicales hidroxilo con mayor potencial oxidante (Lee y Von Gunten, 2012 y Sanz et al., 2013).

En la ozonización directa, el ozono molecular (O₃), al ser un oxidante selectivo, actúa de la siguiente forma: reacciona con enlaces como C≡C, C=N, C=C o N=N y genera compuestos inestables que se fragmentan en moléculas más pequeñas. Además, la degradación de los contaminantes aumenta cuando O₃ reacciona por adición electrofílica [1] o por inserción en la cadena molecular [2] (Lee y Von Gunten, 2012).



La inactivación de *E.coli* ha sido estudiada en efluentes de aguas residuales durante la ozonización directa, observándose una disminución progresiva de sus concentraciones a medida que aumenta la dosis de ozono, hasta alcanzar su eliminación completa con una relación de 0,5 g O₃/g DQO (Demanda Química de Oxígeno) (Lee et al., 2016).

Por otro lado, la ozonización se considera un proceso de oxidación avanzada (POA) cuando el ozono reacciona con iones OH⁻ [3] del medio. Consiste en un proceso radicalario en cadena, en el que se forman, finalmente, radicales ·OH que provocarán la inactivación bacteriana por ser especies altamente oxidantes [4,5 y 6].



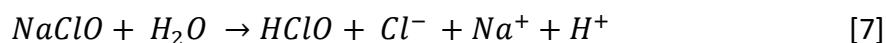
Además, resulta más eficaz frente a compuestos resistentes que la ozonización directa. La ozonización ocurre en condiciones de pH elevados y superiores a 8, o cuando a su vez actúan otros agentes como el peróxido de hidrógeno o la radicación UV (Sanz et al., 2013).

Una de las desventajas del tratamiento es la formación de subproductos no deseados como nitrosaminas, bromatos o formaldehído que aumentan la toxicidad del agua (Lee y Von Gunten, 2012).

4.4.1.2. Cloración

El desinfectante más usado es el cloro (Cl) y sus derivados por su bajo coste y fácil manejo. Los compuestos que más se utilizan en los tratamientos de desinfección son el hipoclorito de sodio (NaClO), el dióxido de cloro (ClO_2), las cloraminas (NH_2Cl , NHCl_2 y NCl_3) y el cloro gas (Cl_2) (Dang et al., 2016).

Dependiendo de la sustancia que se haya inoculado en el agua residual, los microorganismos sufrirán unas consecuencias u otras. El NaClO , el más utilizado de todos, se disocia en agua formando ácido hipocloroso (HClO) [7] y este, a su vez, se disocia en iones hipoclorito (ClO^-) [8] que son los responsables de la eliminación de microorganismos (Dang et al., 2016).



El HClO también oxida grupos sulfídricos, lo que provoca la degradación de las proteínas y la destrucción de las enzimas encargadas del metabolismo de los carbohidratos de los microorganismos. En presencia de cloro libre, las membranas de los gérmenes se dañarán, siendo interrumpida así la funcionalidad de sus células y afectando al ADN de las mismas. Por otra parte, el ClO_2 degrada el sistema enzimático de los microorganismos y su permeabilidad celular al ser un oxidante selectivo. (Collivignarelli et al., 2018).

Las condiciones iniciales que hay que tener en cuenta al utilizar este método de desinfección son principalmente la dosis de cloro, el pH y la temperatura; en un pH de 4 a 6, abundará HClO y en un pH más básico entre 8,5 y 10, habrá más ClO^- . Por otro lado, la eficacia del cloro como desinfectante disminuye a la vez que lo hace la temperatura, reduciendo su concentración en un 50% a 24ºC (Dang et al., 2016).

En cuanto a *Escherichia coli*, se puede lograr reducir su concentración entre 7 y 8 unidades logarítmicas a los 30 segundos de tratamiento al añadir una dosis de 30 mg Cl_2/L en agua residual (Mendiara, 2013). La efectividad del tratamiento es indiscutible, aunque los resultados variarán dependiendo de las características de los efluentes, concentración inicial de bacterias, especie bacteriana, etc. Existe, sin embargo, una desventaja en la cloración como proceso de desinfección y es la formación de

subproductos perjudiciales para la salud y el medio ambiente, como trihalometanos y ácidos haloacéticos, que son mutagénicos y cancerígenos y se forman cuando el Cl reacciona con la materia orgánica que contiene el agua (Collivignarelli et al., 2018).

4.4.1.3. Irradiación ultravioleta

La luz solar es una fuente natural de radiación electromagnética que abarca desde el infrarrojo (IR) hasta el ultravioleta (UV). Las mejores propiedades de desinfección corresponden a la radiación UV, cuya longitud de onda se extiende desde los 200 nm a los 400 nm.

La radiación UV se clasifica en: UVA, UVB y UVC. La radiación UVC tiene una longitud de onda de entre 200 y 280 nm y es absorbida, prácticamente en su totalidad, por la capa de ozono de la atmósfera, por lo que solo una pequeña parte llega a la superficie terrestre. Sin embargo, tiene la mayor capacidad de los tres tipos de radiaciones para eliminar microorganismos, ya que es capaz de dañar su ADN. La radiación UVB tiene una longitud de onda de entre 280 y 315 nm y, al igual que la UVC, es absorbida en parte por la atmósfera y consigue un efecto desinfectante en las aguas por su ataque a los ácidos nucleicos de los microorganismos, aunque con menor eficacia que la UVC. La radiación UVA tiene una longitud de onda de entre 315 y 400 nm, esta no daña los ácidos nucleicos de los patógenos, si no que afecta a la cadena de transporte celular y genera especies reactivas de oxígeno, nocivas para las bacterias, al activar sustancias fotosensibles (Blanco, 2009).

Al ser el tratamiento terciario más utilizado para la desinfección de aguas en las EDARs y ERARs, existen numerosos estudios que confirman su efectividad. En la EDAR de Jerez de la Frontera se aplicó una radiación ultravioleta de 254 nm y a 1.265 J/m² durante 30 minutos al agua residual del efluente saliente del tratamiento secundario y se concluyó con que el proceso conseguía reducciones del contenido microbiológico de coliformes y estreptococos fecales, de más de 3 unidades logarítmicas (Salcedo et al., 2002).

4.4.2. Procesos de oxidación avanzada

Es evidente la necesidad de aplicar tratamientos avanzados y eficaces en la eliminación de contaminantes; se ha observado que las tecnologías convencionales de desinfección no resultan del todo efectivas, sobre todo en efluentes con alta carga de material orgánico, microbiológico y tóxico. Los procesos de oxidación avanzada (POA), ya

nombrados en el apartado anterior, han ganado gran protagonismo en las últimas décadas por su alta capacidad de degradación de compuestos tóxicos, sustancias orgánicas e inorgánicas, metales y patógenos. Es una tecnología aplicada principalmente en aguas con baja biodegradabilidad o alta estabilidad química. Los POA se basan en la generación de especies oxidantes capaces de degradar contaminantes y se dividen, habitualmente, en homogéneos y heterogéneos, dependiendo del medio en el que se formen los radicales oxidantes (Sanz et al., 2013). En la Figura 3 se pueden observar las distintas tecnologías dentro de los POA.

La principal ventaja de estos procesos es que no generan subproductos de desinfección perjudiciales, como ocurre en otros tratamientos convencionales. No obstante, es una tecnología de alto coste operativo, pero es justificable por el uso que se le puede dar como pretratamiento. Además de utilizarse normalmente como tratamiento terciario, la aplicación de estos procesos en una etapa de pretratamiento aumenta la biodegradabilidad de aguas residuales con compuestos recalcitrantes y si los productos intermedios son fácilmente degradados en etapas biológicas posteriores de la línea de tratamiento, se consigue una mejora significativa de la calidad del agua (López et al., 2021).

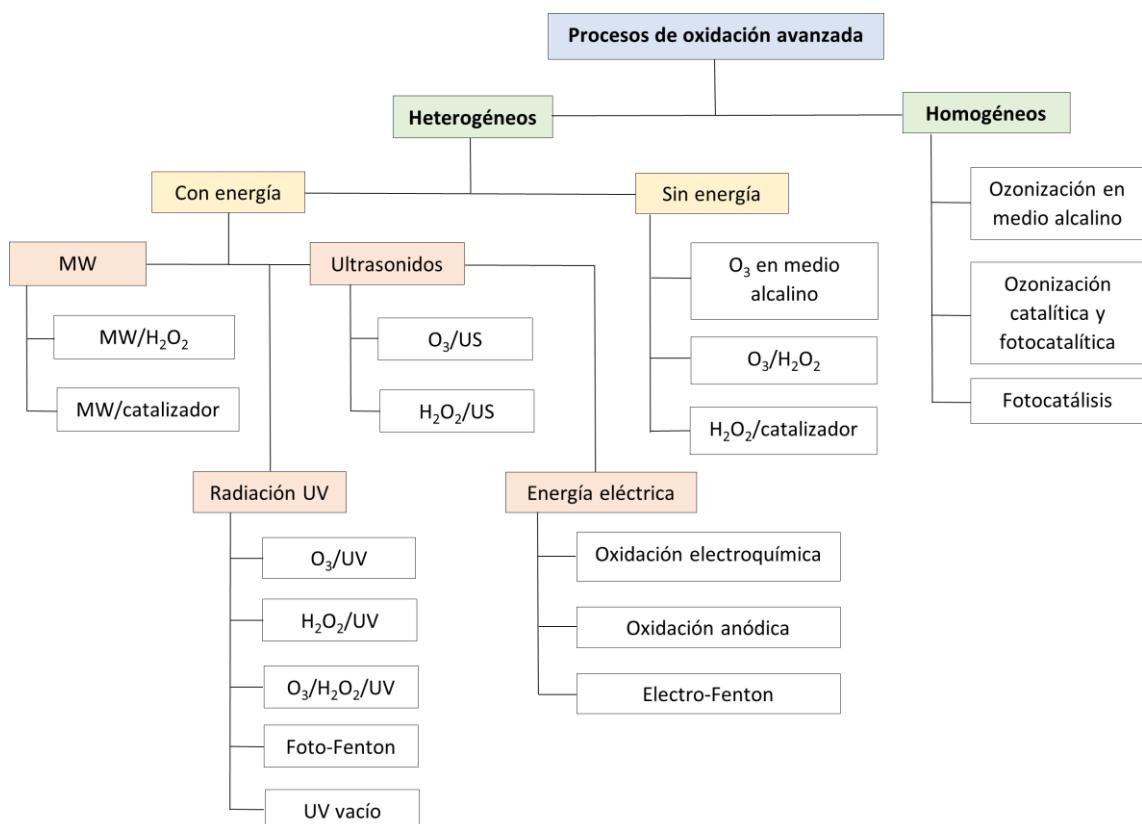
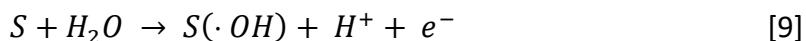


Figura 3. Clasificación de tecnologías de oxidación avanzadas. Fuente: Sanz et al., 2013. Elaboración propia

4.4.2.1. Oxidación anódica

La oxidación anódica forma parte de los procesos electroquímicos de oxidación avanzada (PEOA). Estos se han consolidado como una herramienta eficaz en la eliminación de contaminantes emergentes, microbiológicos y compuestos refractarios orgánicos e inorgánicos presentes en las aguas residuales. Su aplicación se basa en la interacción entre un cátodo y un ánodo, gracias a una corriente eléctrica entre ellos; se producen entonces reacciones de oxidación en el ánodo, donde ocurre la transformación o degradación de sustancias indeseables (Sanz et al., 2013).

La oxidación anódica puede ser directa o indirecta. La directa ocurre cuando los contaminantes se adhieren al ánodo y se oxidan, por transferencia de electrones, directamente sobre su superficie (S). En cambio, en la indirecta, la eliminación de los contaminantes se lleva a cabo mediante especies altamente oxidantes generadas en el ánodo. La especie oxidante más utilizada y que es capaz de mineralizar las membranas celulares de las bacterias de las aguas hasta degradarlas en CO_2 y H_2O , es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que se forma junto a H^+ [9].



Una de las ventajas de la oxidación anódica indirecta en la que se forman $\cdot\text{OH}$, es que, debido a su corta vida, no quedan presentes en el agua tratada, sin embargo, con este método pueden darse reacciones que consuman los radicales hidroxilo, que ralentizarán la degradación de los contaminantes por su menor disponibilidad y porque favorecen la formación de oxígeno [10 y 11]

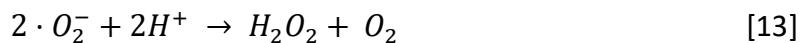


Esto dependerá del material utilizado como ánodo, pudiendo ser de platino (Pt), dióxido de plomo (PbO_2), dióxido de titanio (TiO_2), dióxido de estaño (SbO_2) o de diamante dopado de boro (BDD). Algunas otras especies altamente oxidantes pueden ser iones persulfatos, percarbonatos y percloratos, si en la superficie anódica se oxidan sales inorgánicas disueltas. Concretamente, en cuanto a especies reactivas de oxígeno (ERO), en los sistemas electroquímicos también pueden generarse radicales superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) que contribuyen de forma secundaria a la desinfección de microorganismos (Ganiyu et al., 2021).

El radical $\cdot\text{O}_2^-$ se forma principalmente en el cátodo a pH neutro por la reducción parcial de oxígeno disuelto en presencia de un suministro de aire [12].



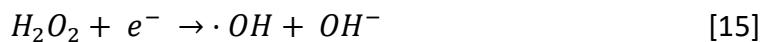
Este radical puede participar en reacciones redox que favorecen la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [13], además de provocar estrés oxidativo a las bacterias y alterar su membrana celular o reaccionar con otras especies para producir nuevos radicales (Ganiyu et al., 2021).



El H_2O_2 es una sustancia química que se genera, además, de otra forma en este proceso, gracias a la reducción electroquímica del oxígeno molecular en el cátodo, al conectarle un suministro de aire [14].



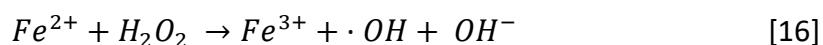
El peróxido de hidrógeno se descompone en radicales $\cdot OH$ [15] al eliminar contaminantes y es uno de los oxidantes más sostenibles que existen, ya que presenta baja ecotoxicidad y una menor huella de carbono que otros agentes, también muy utilizados, como el persulfato. La concentración de $\cdot OH$ dependerá del potencial aplicado y la densidad de corriente (Ganiyu et al., 2021).



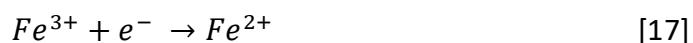
Estos radicales y especies oxidantes, son capaces de inactivar microorganismos a través de diferentes mecanismos: atacan los lípidos de sus membranas mediante la peroxidación lipídica y desestabilizan su estructura celular; pueden dañar su ADN provocando rupturas en la doble hélice y también, pueden oxidar las proteínas esenciales del metabolismo de los gérmenes reduciendo su actividad enzimática (Martínez-Huitile et al., 2015).

4.4.2.2. Electro-Fenton

El proceso electro-Fenton se basa, al igual que la oxidación anódica, principalmente en la generación de radicales hidroxilo, con la diferencia de que, en este, también interviene el ion ferroso (Fe^{2+}), proveniente de un catalizador de óxido de hierro. La reacción entre H_2O_2 y Fe^{2+} , la reacción Fenton, muestra una gran efectividad en la degradación de contaminantes orgánicos debido al alto poder oxidante del radical $\cdot OH$ que se forma y que ocurre junto a la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} [16]. Las mejores condiciones se dan en pH ácidos de alrededor de 3, sin embargo, en un pH neutro, la eficiencia de esta reacción es también evidente (Kuleyin et al., 2021).



La acumulación de Fe^{3+} en la solución puede ser un problema que ralentice el proceso de desinfección, además, pueden darse reacciones secundarias que favorezcan la detención de la oxidación, como la formación de hidróxido de hierro (II) $[Fe(OH)]^{2+}$ o, en presencia de ácidos carboxílicos de cadena corta, compuestos Fe^{3+} -carboxilato. Es por eso que el proceso electroquímico, sólo, es muy interesante; se contrarresta la limitación comentada regenerando Fe^{2+} en el cátodo mediante la reducción de Fe^{3+} [17]. Así, se optimiza el tratamiento al formar más $\cdot OH$ por la mayor disponibilidad del ion ferroso y evitando la acumulación de Fe^{3+} al generar pares electrón/hueco (Kuleyin et al., 2021).

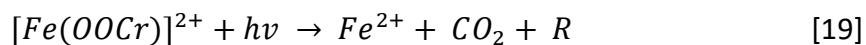
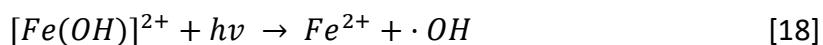


En cuanto a la acción desinfectante o de eliminación de contaminantes, el mecanismo principal que interviene en el proceso electro-Fenton es, respectivamente, la peroxidación lipídica y la hidroxilación de compuestos, al igual que en la oxidación anódica, ya que la principal sustancia desinfectante sigue siendo el radical $\cdot OH$, aunque formado en mayores cantidades (Martínez-Huitl et al., 2015).

4.4.2.3. Fotoelectro-Fenton

El proceso fotoelectro-Fenton consiste en la mejora del proceso electro-Fenton al incorporar luz ultravioleta, tanto UVA como UVC, luz visible o ambas (UV-Vis), que provocan la mineralización de la materia orgánica. La mayor efectividad de este método radica en la fotólisis y descarboxilación de complejos de Fe^{3+} secundarios formados en

el proceso, comentados en el apartado anterior. Se resuelve así la problemática de retardo de reacción que ocurría en el tratamiento electro-Fenton, sin aplicación de luz, provocada por la acumulación de estas sustancias. En presencia de radiación solar, $[Fe(OH)]^{2+}$ sufre fotólisis y se genera el radical $\cdot OH$ libre y Fe^{2+} [18]; lo mismo ocurre cuando la luz incide en Fe^{3+} -carboxilato, que además de dar Fe^{2+} se produce CO_2 [19]. La radiación también descompone el peróxido de hidrógeno en $\cdot OH$, proporcionando mayor cantidad de estas especies oxidantes clave para que los tratamientos funcionen [20]. Por otro lado, la disponibilidad de Fe^{2+} para la reacción Fenton [16] se ve aumentada por la presencia de luz a través de la reducción de Fe^{3+} [21] (Ganiyu et al., 2018).



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Metodología experimental

5.1.1. Configuración del sistema electroquímico

Se utiliza una celda electrolítica compuesta por un reactor de cristal en forma de cilindro de 350 ml de volumen aproximadamente; un imán esterilizado para generar agitación constante sobre una placa agitadora; un cátodo y un ánodo.

El cátodo es un electrodo de difusión de gas (GDE) formado por 3 membranas circulares separadas entre sí por mallas de fibra de carbono. Estas membranas actúan a modo de capas carbonosas (Activated plain cloth) de $\sim 3,2\text{ cm}^2$, a través de las que se suministra una corriente de aire constante proveniente de una bomba de aire conectada a la parte superior del cátodo. El objetivo de la bomba es proporcionar de forma continua oxígeno al reactor, para que se puedan dar reacciones como la reducción electroquímica del O_2 [14].

El ánodo es un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) y se caracteriza por una alta reactividad frente a moléculas orgánicas de todo tipo. Durante la oxidación anódica,

se generan ·OH en la superficie del ánodo, los cuales prácticamente no son reabsorbidos por la misma. Esta característica es la que confiere al electrodo BDD su alta eficacia oxidativa. Se trata de un ánodo no activo con un alto sobrepotencial de evolución de oxígeno; con este tipo de ánodos, la oxidación electroquímica puede ser tanto directa en su superficie, como indirecta mediante especies electrogeneradas con alto poder oxidante (Regalado et al., 2024).

Ambos electrodos están conectados a una fuente de corriente eléctrica constante durante los ensayos de tratamientos electroquímicos avanzados. El voltaje (V) es ajustado a lo largo de los procesos para mantener una corriente estable en torno a 10 mA. En la Figura 4 se pueden observar las partes del sistema electroquímico utilizado durante la experimentación.

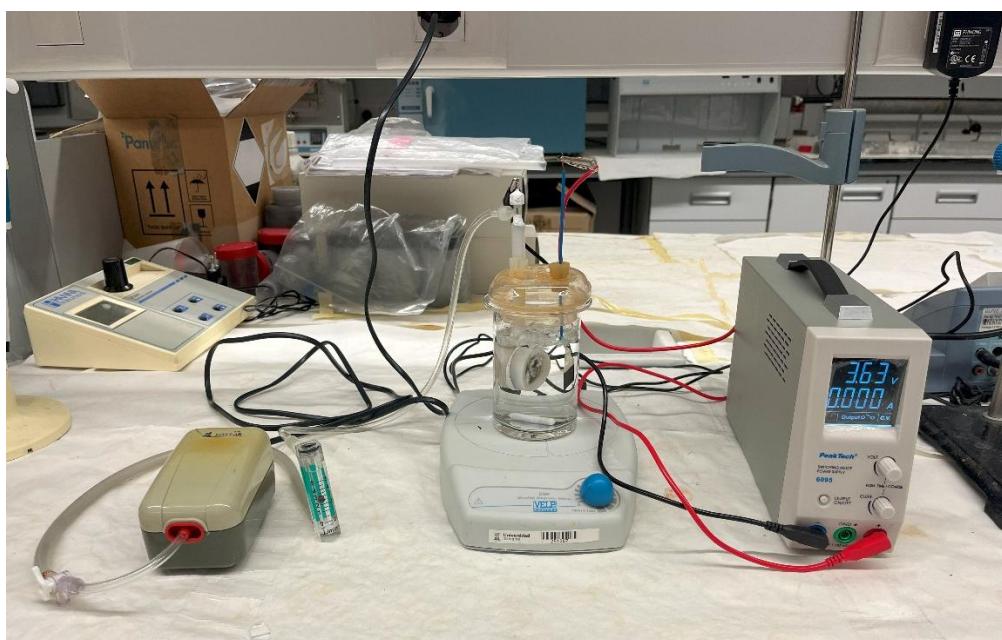


Figura 4. Sistema electroquímico utilizado en los tratamientos de desinfección.

5.1.2. Matrices

En el transcurso del trabajo fueron utilizadas 3 matrices: una disolución de sulfato de sodio (Na_2SO_4) 0,05M; agua residual depurada sintética (ARDS) y agua residual depurada real procedente de la EDAR de Tudela, en la Comunidad Foral de Navarra. En las Tablas 6 y 7 se puede observar la composición y las características físico-químicas del ARDS, respectivamente. Por otro lado, en la Tabla 8 quedan recogidas las características físico-químicas del agua real de salida de la EDAR.

Tabla 6. Composición de la muestra de agua residual depurada sintética. Fuente: Valero, 2017.

| Compuesto | Concentración (mg/L) |
|---|----------------------|
| Peptona de carne | 32 |
| Extracto de carne | 22 |
| Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) | 6 |
| Hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3) | 96 |
| Cloruro de sodio (NaCl) | 7 |
| Cloruro de potasio (KCl) | 4 |
| Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 4 |
| Sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 60 |
| Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 2 |
| Sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) | 60 |
| Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) | 0,28 |

Tabla 7 .Caracterización físico-química de agua residual depurada sintética. Elaboración propia.

| Parámetro | Valor promedio |
|-------------------------------|------------------------------|
| pH | 7,26 |
| Conductividad eléctrica | 0,54 $\mu\text{S}/\text{cm}$ |
| Turbidez | 3,27 UNT |
| DQO | 49 mg/L de O_2 |
| Sólidos en suspensión totales | <1 mg/L |

Tabla 8. Caracterización físico-química de agua residual depurada real. Elaboración propia.

| Parámetro | Valor promedio |
|-----------------------------|------------------------------|
| pH | 7,82 |
| Conductividad eléctrica | 1893 $\mu\text{S}/\text{cm}$ |
| Turbidez | 4,18 UNT |
| DQO | 88 mg/L de O_2 |
| SST | 4 mg/L |
| Carbón orgánico total (COT) | 22 mg/L |
| N total | 10 mg/L |
| Amoniacal | 1,62 mg/L |
| Nitratos | 8,7 mg/L |

5.1.3. Catalizadores

La catálisis heterogénea es actualmente una tecnología muy utilizada por su eficiencia y sostenibilidad. Es ampliamente usada en la industria, la refinación de petróleo, la síntesis de productos farmacéuticos y en diversas reacciones orgánicas, ya que reduce el impacto ambiental al no necesitar reactivos tóxicos para llevar el proceso a cabo. Además, con los catalizadores heterogéneos, las condiciones de operación no tienen por qué ser ni especiales ni severas, lo que facilita los procesos. Otra de las ventajas es que la recuperación de los catalizadores del medio es sencilla y permite su reutilización (Gupta et al., 2019).

Los catalizadores de hierro son actualmente unos de los más utilizados, debido a la abundancia del elemento en la corteza terrestre. En los experimentos se han empleado 3 óxidos de hierro mixtos: hematita, magnetita y ferrita de bismuto. Se usaron 50 mg/L de catalizador durante los tratamientos y algunas de sus características pueden ser consultadas en la Tabla 9. Por otro lado, la Figura 5 muestra imágenes de los 3 catalizadores hechas con un microscopio electrónico de barrido y la Figura 6 muestra la absorción del espectro UV-Vis de los mismos.

Tabla 9. Características estructurales y físico-químicas de la hematita, magnetita y ferrita de bismuto.

Fuente: Berardi et al., 2022; Cornell y Schwertmann, 2003; Gupta et al., 2019; Mosteo et al., 2024.
Elaboración propia.

| Propiedad | Hematita | Magnetita | Ferrita de bismuto |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Fórmula molecular | $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ | Fe_3O_4 | BiFeO_3 |
| Estado de oxidación del hierro | Fe^{3+} | Fe^{2+} y Fe^{3+} | Fe^{3+} |
| Sistema cristalográfico | Romboédrico | Cúbico | Romboédrico |
| Tipo estructural | Corindón | Espinela inversa | Perovskita |
| Área superficial específica (SE) | $10 \text{ m}^2/\text{g}$ | $80 \text{ m}^2/\text{g}$ | $<1 \text{ m}^2/\text{g}$ |
| Band gap | ~2,2 eV | ~0,1-0,2 eV | ~2,1-2,7 eV |

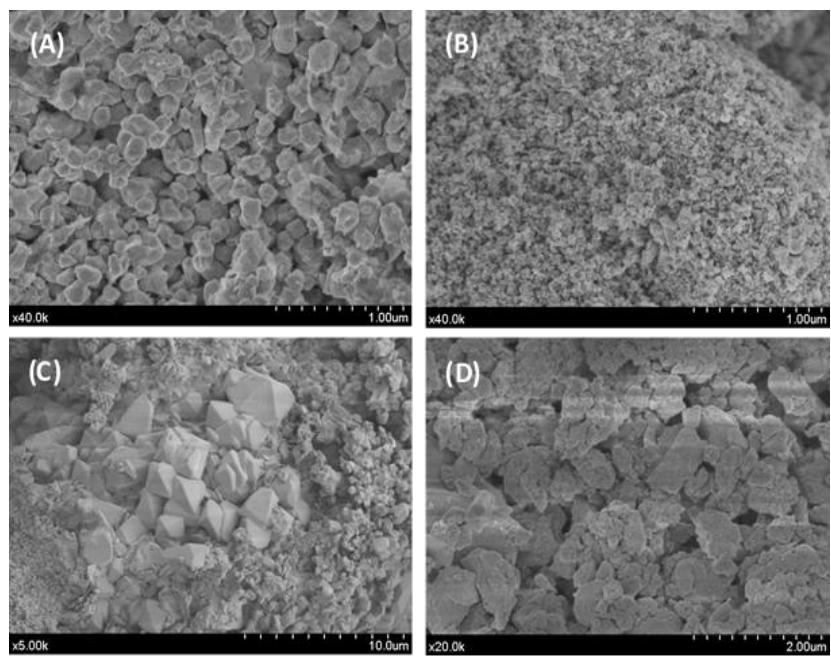


Figura 5. Imágenes MEB de ferrita de bismuto (A), magnetita (B) y hematita (C y D). Fuente: Mosteo, 2024.

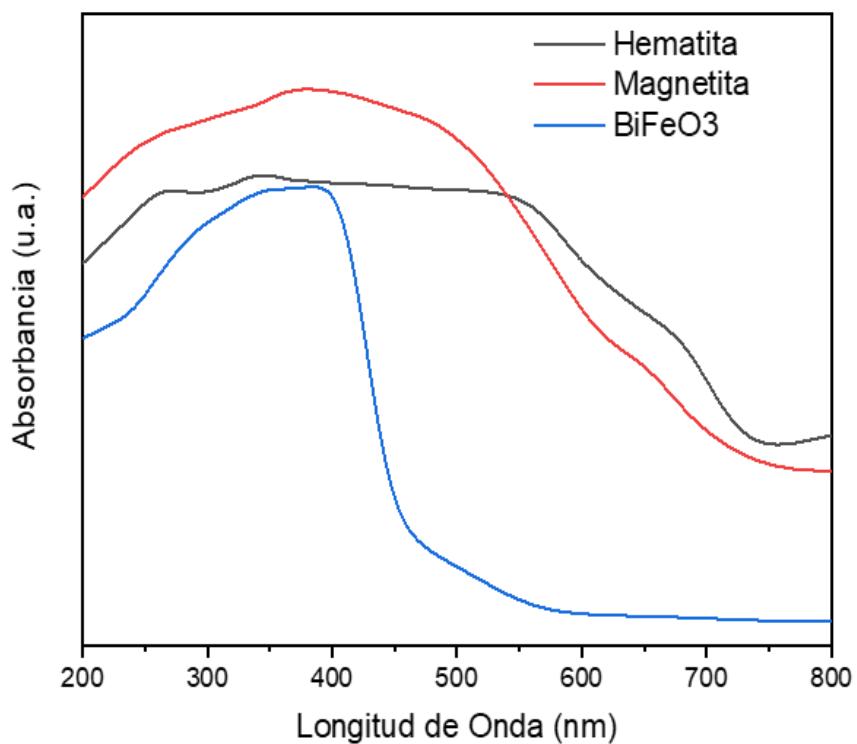


Figura 6. Absorción del espectro UV-Vis de hematita, magnetita y ferrita de bismuto. Fuente: Mosteo, 2024.

5.1.4. Fuente de radiación ultravioleta

Para el tratamiento fotoelectro-Fenton se utilizó como fuente de radiación una cámara solar (Atlas Suntest CPS+), equipada con una lámpara de xenón que emite una intensidad de 500 W/m^2 . Esta lámpara cubría el rango de longitudes de onda del ultravioleta y el espectro visible; la fracción correspondiente al UV fue medida con un radiómetro a 400 nm. Mientras, la temperatura fue constante durante todos los ensayos.



Figura 7. Cámara solar Atlas Suntest CPS+ utilizada en los tratamientos de desinfección.

5.1.5. Muestras bacterianas fortificadas

En primer lugar, se necesita una muestra fortificada de las bacterias con una concentración inicial conocida, para poder analizar más adelante la reducción de la misma tras los tratamientos. Para ello, siguiendo la norma ISO 6887-1:2017, se preparan suspensiones bacterianas a partir de cultivos puros de *E.coli* (ATCC 25922) y de *E.faecalis* (ATCC 29812). Con un asa de siembra estéril se selecciona una colonia aislada de *E.coli* o un conjunto de colonias de *E.faecalis*, ya que son de menor tamaño, y se transfieren asépticamente a un tubo de ensayo. En él, se añade una pequeña cantidad de suero fisiológico (SF) o solución salina estéril para desprender la colonia de la pared del tubo y, posteriormente, se completa el volumen con más suero hasta alcanzar los mL deseados de suspensión homogénea de bacterias.

La concentración buscada para ambas especies es de $10^6 - 10^7 \text{ UFC/100 mL}$, por lo que, a continuación, se lleva a cabo un ajuste de la concentración bacteriana mediante espectrofotometría. Una alícuota de la suspensión se transfiere del tubo de ensayo a una cubeta de cuarzo y se mide su absorbancia (ABS) en un espectrofotómetro a 625

nm. Si la absorbancia de la alícuota de *E.coli* no es de aproximadamente 0,15 y la de *E.faecalis* de 0,1, se ajusta añadiendo más suspensión bacteriana para aumentar la densidad o más SF para diluirla, repitiendo el proceso hasta alcanzar la absorbancia objetivo.



Figura 8. Suspensión bacteriana homogénea con concentración de $10^6 - 10^7$ UFC/100 mL en tubo de ensayo.

5.1.6. Procedimiento experimental

En primer lugar, se usaron 250 mL de disolución de Na_2SO_4 0,05 M como matriz en un ensayo preliminar con muestras de la bacteria más susceptible, *E.coli*, en una concentración de $10^6 - 10^7$ UFC/100 mL. Se aplicó el proceso de oxidación anódica durante 30 minutos con el objetivo de decidir el tiempo de tratamiento del resto de experimentos, el cual sería mayor debido a que se realizarían en una matriz más compleja, agua residual depurada sintética (ARDS). La inactivación bacteriana varía dependiendo del medio acuoso en el que se encuentren los microorganismos; en el ARDS, la eliminación microbiológica es un proceso más lento, ya que, la disponibilidad de electrolitos generadores de especies oxidantes es menor que en la disolución de sulfato y su composición puede interferir en las reacciones electroquímicas (Ganiyu et al., 2021).

Posteriormente, comenzó la experimentación con el tratamiento de oxidación anódica en ARDS y la primera bacteria estudiada fue *Escherichia coli*. Es necesario conectar el sistema electroquímico con el cátodo, el ánodo y la fuente de corriente y preparar los

materiales que intervendrán en los tratamientos: se debe inocular la muestra fortificada de la bacteria a la celda electrolítica, en la que ya se han debido añadir 250 mL de ARDS esterilizada; 3,081g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 M que actuará como electrolito y un imán esterilizado. La cantidad de muestra bacteriana agregada es de 250 μL , para que la proporción de medio líquido y muestra sea 1:1. De los 90 minutos de duración del ensayo, se extrajeron alícuotas en los minutos 0, 15, 30, 60 y 90.

Una vez completada la experimentación con este tratamiento, comenzaron los ensayos del proceso electro-Fenton. La preparación del sistema es la misma que anteriormente, no obstante, al querer estudiar la reacción Fenton [16], es necesario añadir 12,5 mg del catalizador de óxido de hierro seleccionado en cada ensayo, siendo estudiados la hematita, magnetita y ferrita de bismuto.

Al finalizar los ensayos del tratamiento electro-Fenton, se llevaron a cabo los del fotoelectro-Fenton, que necesitan igual preparación de sistema que la oxidación anódica y el electro-Fenton. La única diferencia es que, en esta parte de la experimentación, la celda quedará dentro de una cámara solar que actuará como fuente de luz UV-Vis.

Ya obtenidos y analizados los resultados de las concentraciones de *E.coli* durante los tratamientos, dieron comienzo los experimentos con *Enterococcus faecalis*. Antes de empezar los ensayos, se descartó un tratamiento y un catalizador, que mostraron menor eficacia que los otros procesos y óxidos de hierro. Esto debido a que funcionarían peor en la desinfección de una bacteria Gram-positiva, más resistente que *E.coli*.

A continuación, los ensayos que se llevaron a cabo con la especie de enterococos, necesitaron la preparación del sistema y la aplicación de las condiciones operativas descritas anteriormente en este apartado, de igual modo que los ensayos realizados con *E.coli*.

Se dieron por terminados los experimentos en ARDS y se eligió el mejor tratamiento y el mejor catalizador con los datos de reducción de concentraciones obtenidos de ambas bacterias. Por último, se llevó a cabo la desinfección de, en primer lugar, *E.coli*, y después de *E.faecalis*, en agua de salida de una EDAR real. Todos los experimentos hechos en agua depurada real, fueron realizados en las mismas condiciones que los anteriormente descritos.

Durante toda la experimentación, se tomaron muestras para medir la concentración de peróxido de hidrógeno, a la vez que se hacía para medir la concentración bacteriana en los minutos 15, 30, 60 y 90, de los ensayos de los tratamientos electroquímicos. Sabiendo esta información se puede evaluar si los procesos están funcionando correcta y eficazmente, ya que H_2O_2 es un compuesto clave en la producción de los radicales hidroxilos, que son los responsables de la desinfección. Por otro lado, en los tratamientos electro-Fenton y fotoelectro-Fenton, al utilizarse catalizadores heterogéneos, fue necesario filtrar las alícuotas recogidas para medir el peróxido antes de analizarlas, con filtros jeringa de nailon de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro.

5.2. Metodología analítica

5.2.1. Determinación de la concentración bacteriana y expresión de resultados

5.2.1.1. Disoluciones decimales seriadas

La concentración microbiológica de las alícuotas no es conocida de antemano, por lo que se realizaron disoluciones decimales seriadas, según la norma ISO 6887-1:2017, de la muestra inicial para asegurar que el conteo de colonias bacterianas es factible. Para realizar estas diluciones se toman 100 µL de la muestra de agua con patógenos y se transfiere a un eppendorf con 900 µL de SF; se consigue así una dilución -1 o 1:10. Para hacer las diluciones siguientes, se llevará a cabo el mismo procedimiento: se tomarán 100 µL de la dilución -1 y se pasarán a un eppendorf con 900 µL de SF, consiguiendo la dilución -2 o 1:100. El proceso se repetirá sucesivamente hasta alcanzar la dilución deseada y conveniente para el análisis correcto de los ensayos. En la Figura 9 se puede observar una de las gradillas utilizadas durante la experimentación, que soporta eppendorfs que contienen disoluciones decimales seriadas de bacterias.

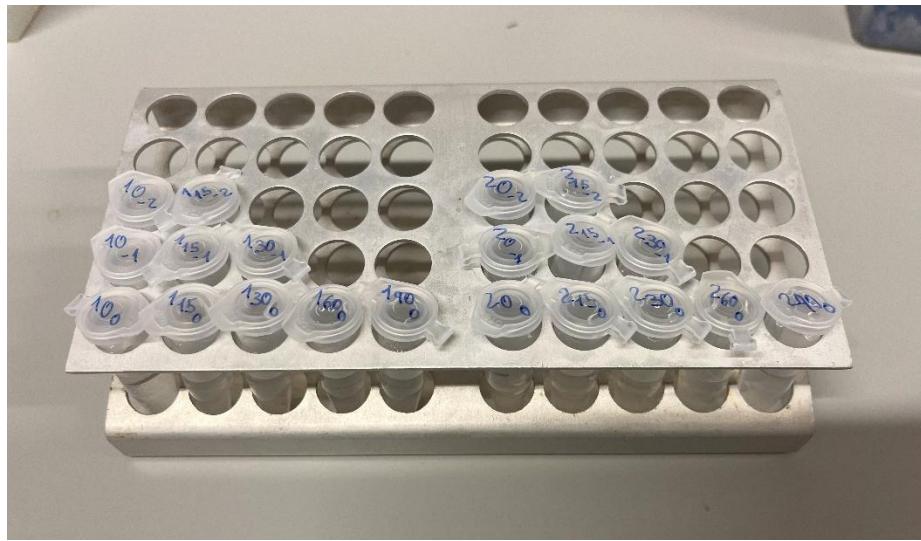


Figura 9. Gradilla con eppendorfs con disoluciones decimales seriadas de bacterias durante la experimentación.

5.2.1.2. Método de siembra en placa

Para analizar las concentraciones bacterianas como UFC/100 mL, se utiliza el método de siembra en superficie siguiendo la norma ISO 4833-2:2013. Con una pipeta automática, se coge un volumen de 100 µL de muestra en eppendorf y se vierte en una placa de Petri con medio sólido que dependerá de la bacteria analizada: *E.coli* crece en agar MacConkey (MC) y *E.faecalis* en agar Slanetz & Bartley (SB); cada uno es específicamente nutritivo para la bacteria que crece en ellos. El líquido añadido se extiende por la superficie uniformemente con ayuda de una varilla de vidrio estéril o asa de Drigalski. Lo siguiente, es dejar las placas incubando en la estufa, las de *E.coli* a 44°C por 24h y las de *E.faecalis* a 37°C por 48h. Al pasar este tiempo, las unidades formadoras de colonias se pueden contar y calcular la concentración de bacterias [22] hasta el límite de detección del método, que son 1000 UFC/100mL. La Figura 10 muestra dos placas de Petri sembradas con ambas bacterias estudiadas, cada una en el agar nutritivo en el que crece.

$$\frac{UFC}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Volumen de muestra (mL)} \cdot \text{Factor de dilución}} \quad [22]$$

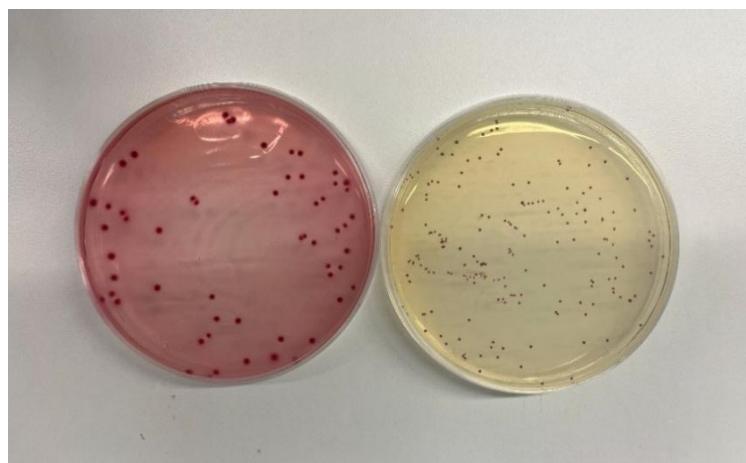


Figura 10. Placas de Petri con agares nutritivos sembrados con *E.coli* (izda.) y *E.faecalis* (dcha.).

5.2.1.3. Método Quanti-Tray 2000

Otro método utilizado cuando se espera una reducción en la concentración de bacterias a partir de los 30 minutos, es el Quanti-Tray 2000 de IDEXX. Está recogido en la norma ISO 9308-2:2012, ya que proporciona una cuantificación semiautomatizada basada en el modelo Número Más Probable (NMP). El Quanti-Tray 2000 utiliza el mismo modelo

estadístico que la dilución en serie tradicional de 15 tubos, pero, al automatizar el sistema, el proceso se simplifica.

Se toman 10 mL de muestra de la celda electrolítica y se mezclan con 90 mL de SF en un bote antiespumante; después, se añaden unos reactivos en polvo, correspondientes a *E.coli* o a enterococos, según la metodología de IDEXX “Tecnología del Sustrato Definido”. A continuación, se vierten los 100 mL totales en una bandeja con 49 pocillos grandes y 48 pocillos pequeños y se lleva a la máquina selladora Quanti-Tray Sealer PLUS, que se puede observar en la Figura 11; en ella, la muestra se divide automáticamente en porciones precisas en los 97 pocillos de la bandeja. Esto permite obtener un rango de recuento de 1 a 2419 NMP/100 mL con un 95% de intervalo de confianza, lo que ofrece un significativo aumento de la precisión en la detección de bacterias, en comparación con el método de dilución en serie tradicional. Al pasar 24h en la estufa se pueden contar los pocillos en los que hay bacterias presentes: si los experimentos se llevaron a cabo con *E.coli*, la temperatura de la estufa debió ser de 37°C y los pocillos positivos serán amarillos y fluorescentes; por otro lado, si los experimentos se hicieron con *E.faecalis*, la estufa debió estar a una temperatura de 41°C y se contarán los pocillos verdes positivos. Por último, se introducen los datos en el programa IDEXX y se obtienen los resultados de NMP/100 mL de las bacterias.



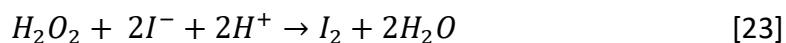
Figura 11. Máquina selladora Quanti-Tray Sealer PLUS.

5.2.2. Determinación de la concentración de H₂O₂

La medición de la concentración de peróxido de hidrógeno durante los tratamientos electroquímicos proporciona información clave sobre el funcionamiento y eficacia del proceso oxidativo. H₂O₂ es un intermediario esencial en los procesos para generar radicales hidroxilo, el agente oxidante responsable de la inactivación bacteriana. Por tanto, conocer la concentración de este compuesto permite verificar que el sistema lo está generando correctamente y permite evaluar si se está alcanzando una concentración suficiente para una oxidación y desinfección eficaz.

Se empleó el método yodométrico espectrofotométrico para determinar las concentraciones de H₂O₂, conforme a la norma ISO 3960:2017. Se utilizan: 1350 µl de yoduro de potasio (KI) al 0,01 M; 50 µl de molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) al 0,1 M y 600 µl de muestra con peróxido de hidrógeno.

Este procedimiento se basa en la capacidad del H₂O₂ de oxidar yoduro (I⁻) en yoduro molecular (I₂), una reacción en la que el molibdato actúa como catalizador [23].



I₂ reacciona con más I⁻ para formar aniones triyoduro (I₃⁻), que se cuantifican por espectrofotometría a 352 nm [24]. Su absorbancia permite determinar la concentración de H₂O₂ mediante una curva de calibrado.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio se recogen en los Anexos I, II, III, IV, V y VI. Los ensayos de inactivación bacteriana se realizaron por duplicado y los valores mostrados corresponden a las medias de dichos ensayos, acompañadas de sus respectivas desviaciones estándar, con el fin de reflejar la variabilidad de los datos obtenidos.

6.1. Ensayos preliminares en disolución de Na_2SO_4

Los resultados obtenidos en este primer experimento sobre inactivación bacteriana y producción de peróxido de hidrógeno se pueden consultar en los Anexos I y II, respectivamente.

Como se ha explicado en el procedimiento experimental del presente trabajo, los primeros ensayos se realizaron con la bacteria *Escherichia coli* y utilizando como matriz una disolución de sulfato sódico, con el objetivo de evaluar la eficacia del proceso de oxidación anódica en condiciones simples y controladas, donde el Na_2SO_4 actúa como electrolito. Los resultados se muestran en la Figura 12 y reflejan la evolución de la concentración bacteriana durante el tiempo de tratamiento.

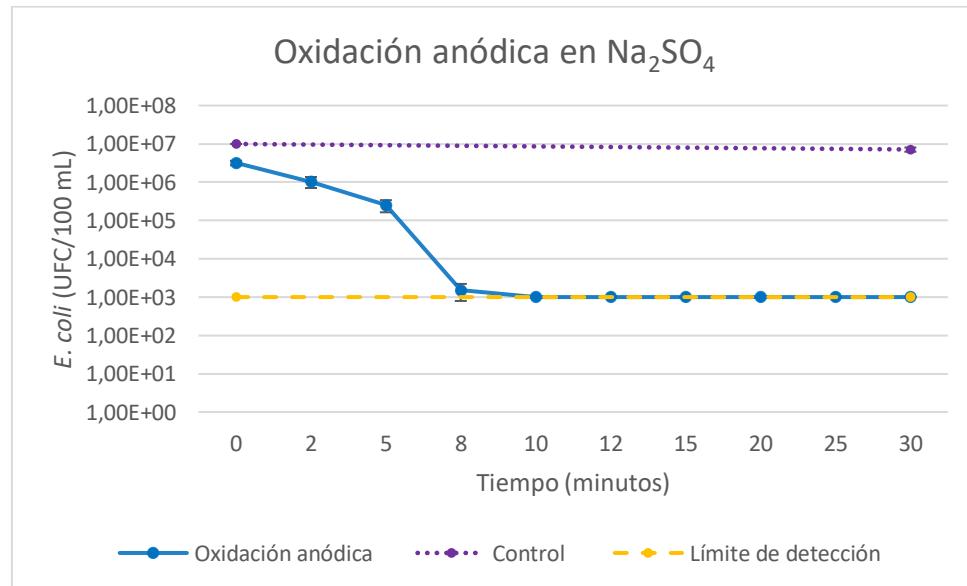


Figura 12. Evolución de la concentración de *E.coli* en Na_2SO_4 durante el tratamiento de oxidación anódica. Elaboración propia.

La serie azul continua corresponde con la aplicación del tratamiento de oxidación anódica y la morada discontinua con un control, en el que se midió únicamente la concentración de bacterias a los tiempos 0 y 30 minutos para comprobar que, solo en presencia de Na₂SO₄ y sin aplicar tratamiento, los microorganismos no son eliminados.

La concentración de *E.coli*, en este caso, se reduce de 3,02.10⁶ UFC/100mL a menos de 10³ UFC/100mL en 10 minutos (Anexo I), más de tres unidades logarítmicas; a partir de este tiempo, la eliminación se estabiliza. Sin embargo, se puede afirmar que el tratamiento de oxidación anódica en presencia de Na₂SO₄ ha sido efectivo para la desinfección de *E.coli* y que, sin aplicar ningún tratamiento, la matriz escogida no afecta a la eliminación de la bacteria porque no existe en ella ninguna especie oxidante disuelta que las degrade.

La rápida muerte bacteriana se puede explicar asumiendo que se han generado radicales sulfato ($\cdot\text{SO}_4^-$). A pesar de que el papel principal de Na₂SO₄ es, simplemente, facilitar el paso de corriente y la generación de ·OH y H₂O₂, las concentraciones de peróxido durante el tratamiento fueron más bajas de lo esperado, por lo que es posible que el ion sulfato, procedente de la disolución directa del Na₂SO₄, se haya oxidado en $\cdot\text{SO}_4^-$ [25]. Esto ocurre a voltajes por encima de ~1,3 V y en estos ensayos, el voltaje siempre ha sido más del doble (Anexo II), por lo que se puede deducir que ha sido esta especie la que ha eliminado, en mayor medida, a los microorganismos. Los radicales sulfatos son altamente oxidantes, como los hidroxilos, aunque son más selectivos y estables y son capaces de penetrar membranas celulares y oxidar proteínas intracelulares (Regalado et al., 2024).



Mediante espectrofotometría, el H₂O₂ fue medido y los resultados se muestran en la Figura 13. Se observa un pico de producción a los 10 minutos (Anexo II), justo cuando se puede afirmar que se han eliminado todas las bacterias. Esto puede indicar que, hasta ese momento, el peróxido de hidrógeno que se producía se consumía mientras degradaba *E.coli*, mediante la lisis de su membrana celular, pero, al eliminarse completamente en el tiempo 10 minutos, surge una concentración de peróxido mucho más alta porque el sistema sigue generándolo, sin que se consuma de ninguna manera (Martínez-Huitle et al., 2015). A los 20 minutos, la producción comienza a estabilizarse y la concentración disminuye por descomposición en agua y oxígeno molecular.

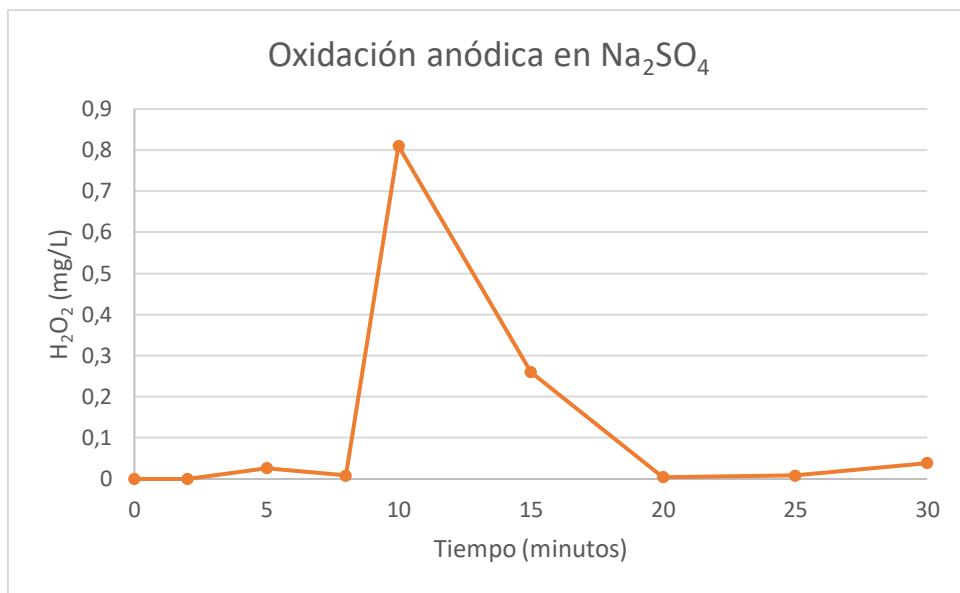


Figura 13. Evolución de la concentración de H_2O_2 en Na_2SO_4 durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

Con estos datos se eligió el tiempo final de los tres tratamientos electroquímicos posteriores en una matriz más compleja, ARDS. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante 90 minutos.

6.2. Inactivación de *Escherichia coli* en agua residual depurada sintética

Los resultados obtenidos en estos ensayos de inactivación bacteriana y producción de peróxido de hidrógeno se pueden consultar en los Anexos I y II, respectivamente.

6.2.1. Aplicación de oxidación anódica

Una vez comprobado que el sistema funciona correctamente en una matriz simple con únicamente sulfato sódico, se procedió a evaluar la eficacia del proceso de oxidación anódica en condiciones más representativas y utilizando como matriz ARDS. Se empleó *E.coli* como primera bacteria indicadora y la evolución de su inactivación se representa en la Figura 14. La concentración presenta un reducción leve y progresiva de alrededor de dos unidades logarítmicas; la concentración inicial es de $1,04 \cdot 10^7$ UFC/100mL y a los 90 minutos es de $4,95 \cdot 10^4$ UFC/100mL (Anexo I).

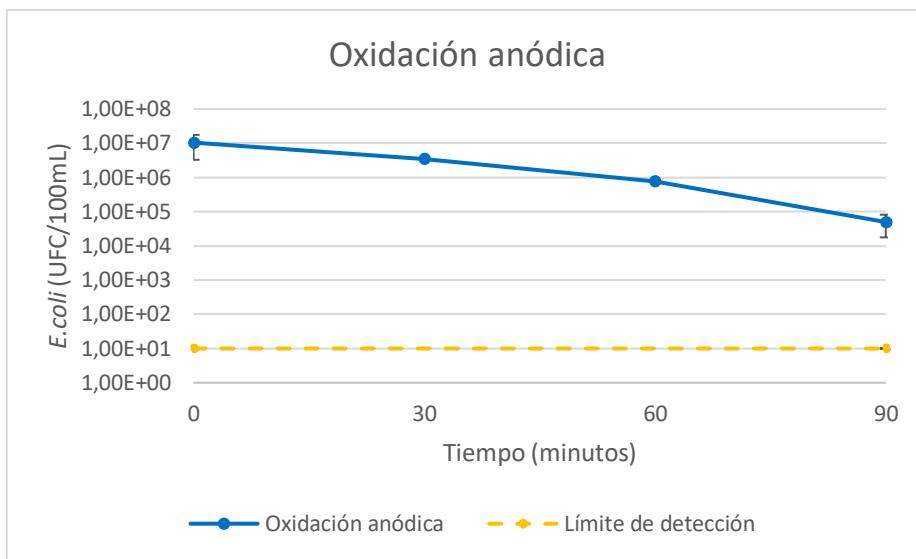


Figura 14. Evolución de la concentración de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica.
Elaboración propia.

En cuanto al H_2O_2 producido, el incremento sostenido de su concentración (Anexo II), representado en la Figura 15, se relaciona fácilmente con la reducción progresiva de *E.coli*, aunque no se consigue su eliminación total a los 90 minutos .

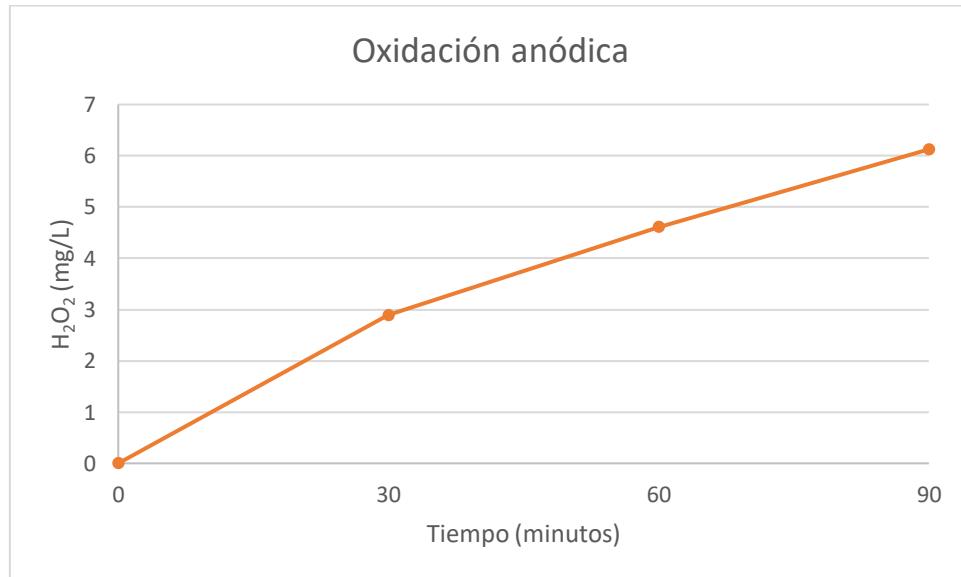
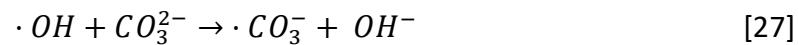
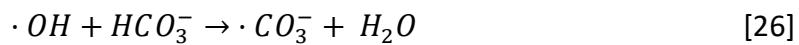


Figura 15. Evolución de la concentración de H_2O_2 en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

En comparación con la inactivación bacteriana en la disolución de Na_2SO_4 aplicando el mismo tratamiento de oxidación anódica, con menor producción de peróxido de hidrógeno se consigue, en menor tiempo, eliminar todas las bacterias en el anterior experimento y esto es debido a las diferencias en la matriz y confirma la acción

bactericida de los radicales sulfato. El ARDS contiene compuestos que actúan como inhibidores de especies reactivas, lo que neutraliza la fracción disponible de las mismas para atacar las bacterias, en cambio, la solución de sulfato de sodio es mucho más limpia y en ella no hay interferencias entre los oxidantes y los microorganismos a eliminar. En particular, los carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonatos (HCO_3^-) que se encuentran en esta matriz, reaccionan con $\cdot\text{OH}$ formando especies menos reactivas como el radical carbonato ($\cdot\text{CO}_3^-$) [26 y 27], que provocan su recombinación y que el contenido de oxidantes sea menor (Ganiyu et al., 2021).



Además, *E.coli* se encuentra más protegida en el ARDS, debido a que puede adsorberse sobre la materia orgánica coloidal, dificultando el acceso de los oxidantes y disminuyendo la eficacia de la oxidación anódica (Tsydenova, 2015).

Los radicales hidroxilo son capaces de causar múltiples daños a nivel celular en *E.coli*. Como bacteria Gram-negativa, posee una membrana externa rica en lipopolisacáridos, una capa delgada de peptidoglucano y una membrana citoplasmática, que contribuyen su principal barrera protectora. Sin embargo, $\cdot\text{OH}$ son capaces de permeabilizar y oxidar la membrana externa, provocando la peroxidación de lípidos, lo que compromete la integridad celular. Una vez atravesada la membrana, los oxidantes generan rupturas en el ADN mediante la oxidación de nucleótidos y así desnaturalizan proteínas esenciales, en consecuencia, se interrumpe la replicación del ADN y la síntesis de proteínas (Martínez-Huitl et al., 2015).

6.2.2. Aplicación de electro-Fenton

Siguiendo con el procedimiento experimental, después de llevar a cabo los experimentos en los que se aplicó el tratamiento más simple, la oxidación anódica, se analiza la efectividad del proceso electro-Fenton y de tres catalizadores de hierro en ARDS para la eliminación de *E.coli*. La evolución de la concentración bacteriana se muestra en la Figura 16.

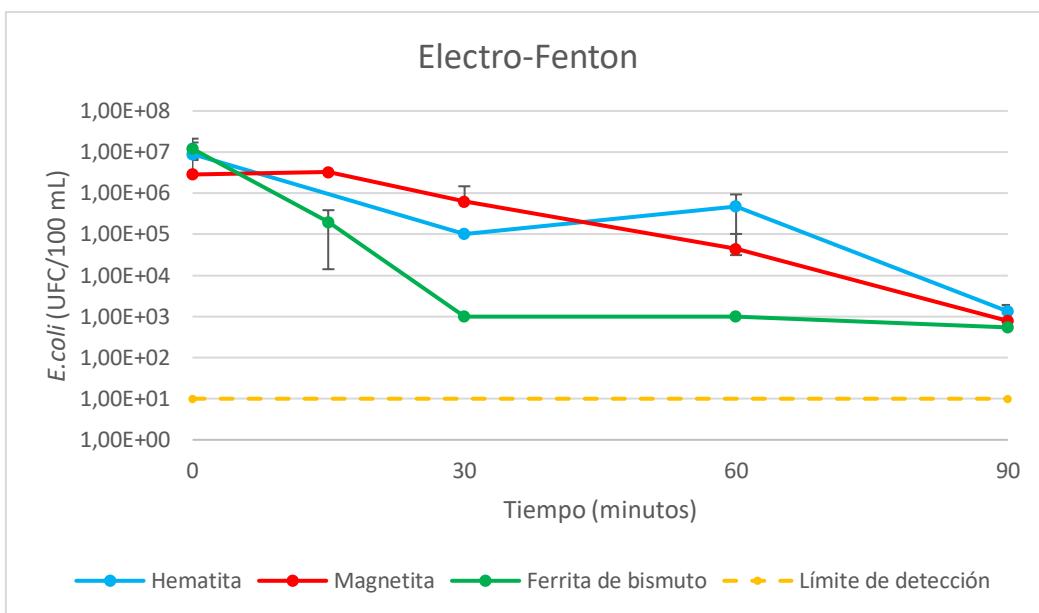


Figura 16. Evolución de la concentración de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

En la anterior figura se pueden observar diferencias entre los 3 catalizadores de hierro utilizados. La hematita y la magnetita consiguen una reducción moderada y similar de la concentración de bacterias, de entre 3 y 4 unidades logarítmicas en 90 minutos (Anexo I). Se observa una oscilación en la serie de la hematita a los 60 minutos, probablemente debido a alguna inexactitud durante la experimentación, pero al observar la desviación estándar del punto en la gráfica, se puede afirmar que ambas series mantienen una tendencia descendente continua. Por otro lado, la ferrita de bismuto muestra la efectividad más destacada, consiguiendo reducir la carga de *E.coli* en más de 4 unidades logarítmicas en tan solo 30 minutos (Anexo I).

La mayor eficiencia del BiFeO_3 en el proceso electro-Fenton se debe a un factor principal: su estructura perovskita romboédrica (grupo espacial R3c). La estructura de la ferrita de bismuto se caracteriza por una red tridimensional de octaedros de FeO_6 conectados, donde los átomos de Bi^{3+} se encuentran desplazados fuera del centro debido al par solitario de electrones 6s. Esta distorsión rompe la simetría de centros e induce la polarización ferroeléctrica intrínseca del material, favoreciendo así la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} y la separación de cargas electrón-hueco, fundamental en el tratamiento electro-Fenton para maximizar la generación de radicales hidroxilo (Catalan y Scott, 2009).

Sin embargo, es el catalizador con menor área superficial específica. La hematita y, sobre todo, la magnetita, presentan unos valores más altos, lo que significa que existen más sitios activos en estos materiales para la generación de $\cdot\text{OH}$ y la adsorción de las bacterias a la superficie de sus partículas. Una superficie específica mayor acerca a los microorganismos a los lugares donde se generan las especies oxidantes, lo cual es ventajoso, ya que estos, al ser muy reactivos, tienen una vida muy corta y una acción local (Papadas et al., 2015). No obstante, Fe_2O_3 y Fe_3O_4 carecen de propiedades

ferroeléctricas, por lo que su rendimiento se basa casi exclusivamente en su capacidad para liberar iones Fe^{2+} y separar cargas eficientemente.

A continuación, se puede observar en la Figura 17 la producción de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento.

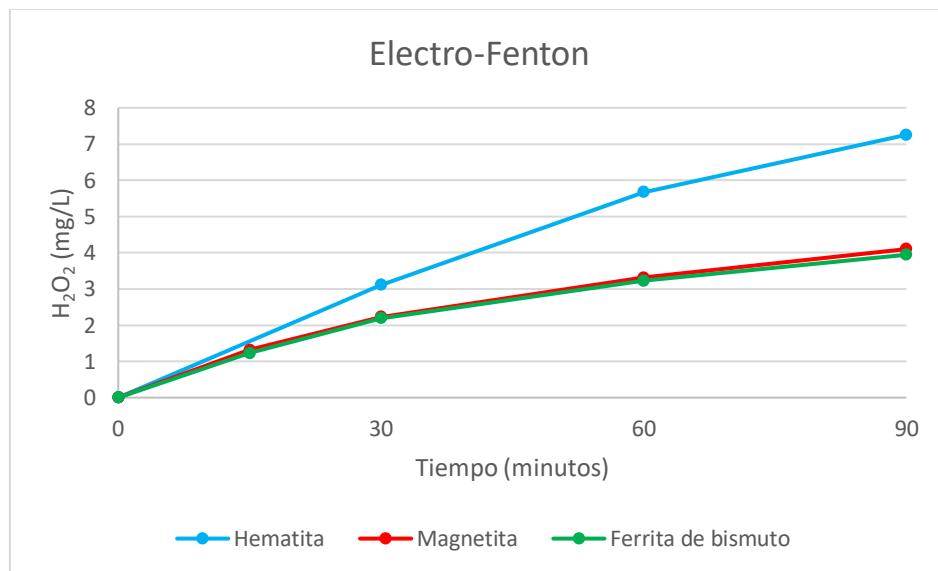


Figura 17. Evolución de la concentración de H_2O_2 en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

Con hematita se produjeron a los 90 minutos 7,26 mg/L de H_2O_2 (Anexo II), es con diferencia el mayor valor de concentración comparado con los obtenidos durante los tratamientos electro-Fenton con magnetita y ferrita de bismuto. Esto puede explicarse si se presta atención al voltaje utilizado durante la experimentación con Fe_2O_3 (Anexo II), este es mayor que el aplicado en los ensayos con Fe_3O_4 y BiFeO_3 , lo que sugiere que, en el medio había una menor conductividad y el sistema electroquímico necesitó más voltaje para mantener el amperaje de ~ 10 mA y debido a esto, se acumuló la especie oxidante al producirse de forma masiva.

A pesar de la mayor concentración de peróxido producida durante el tratamiento electro-Fenton con hematita, no parece que esto haya afectado a la inactivación bacteriana, ya que, aunque se genere mucho H_2O_2 , son los radicales hidroxilo que se formen a partir de él los que realmente provocarán la muerte de las bacterias y ello depende, por otra parte, de la disponibilidad de Fe^{2+} . Fe_2O_3 contiene solo hierro en estado Fe^{3+} , por lo que este óxido férrico tiene que sufrir una reducción para generar Fe^{2+} [17] y que luego este ion reaccione con H_2O_2 [16], lo que entorpece el proceso de eliminación de *E.coli*.

6.2.3. Aplicación de fotoelectro-Fenton

A continuación, se muestran los resultados en la Figura 18 de las concentraciones de *Escherichia coli* obtenidas durante el tratamiento fotoelectro-Fenton, es decir, la combinación del proceso electro-Fenton y luz UV-Vis, utilizando los 3 catalizadores de óxido de hierro que se han estudiado en el trabajo.

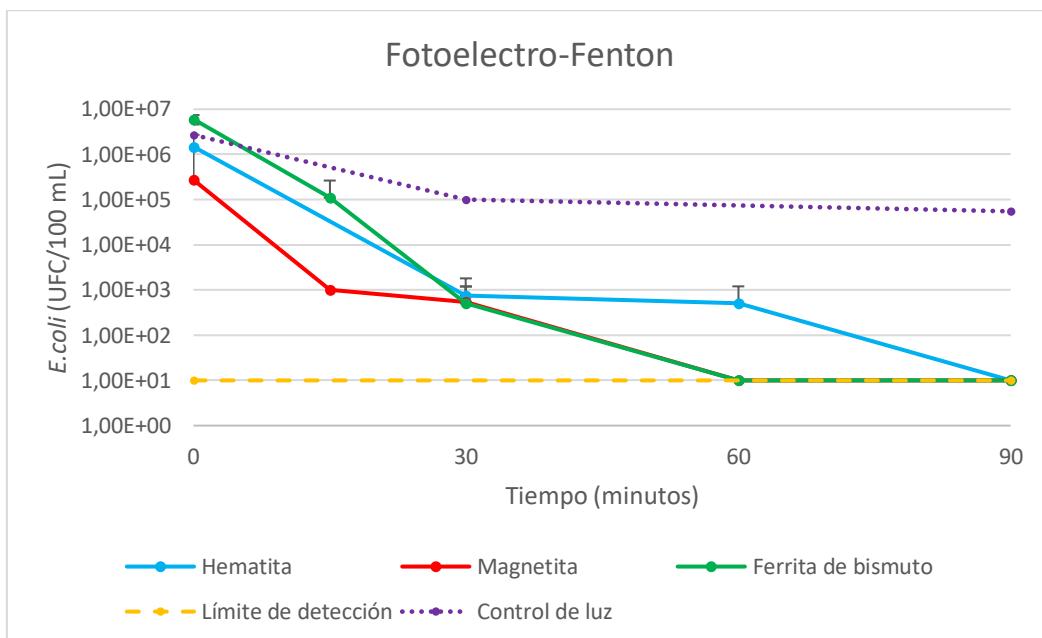


Figura 18. Evolución de la concentración de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

El tratamiento fotoelectro-Fenton ha resultado ser el más efectivo de los tres aplicados, ya que combina la electrogeneración de especies oxidantes, el poder catalizador de los óxidos de hierro y el impacto de la radiación UV-Vis.

La magnetita y la ferrita de bismuto muestran la mayor eficiencia al reducir la concentración de *E.coli* de la forma más rápida, alcanzando el límite de detección (10 UFC/100mL) en 60 minutos; por otro lado, la hematita, necesita 90 minutos para demostrar la misma efectividad que los otros catalizadores, a pesar de que haya una disminución de la concentración progresiva durante el tratamiento (Anexo I).

BiFeO_3 demuestra una vez más ser el mejor catalizador, ya que, este y Fe_3O_4 consiguen la misma reducción de carga bacteriana, pero la concentración inicial en la experimentación con ferrita es mayor que en la magnetita y, sin embargo, ambas series se solapan a los 30 minutos (Anexo I). Es un photocatalizador muy activo bajo luz visible debido a su band gap estrecho ($\sim 2,1\text{-}2,7 \text{ eV}$), lo que le permite absorber luz visible y generar pares electrón-hueco al excitarse los electrones. Estos pueden contribuir a la

formación de más ·OH al reducir oxígeno a peróxido de hidrógeno [14] y después producir los radicales; los huecos positivos, por su lado, pueden oxidar agua o iones OH⁻ en ·OH [28] (Gupta et al., 2019).



Además, como ya se comentó en la anterior gráfica, la ferrita de bismuto presenta una estructura perovskita ferroeléctrica que le permite separar cargas electrón-hueco de una forma muy eficiente. Estas dos propiedades de BiFeO₃ junto con la aplicación de corriente eléctrica, que aumenta más la movilidad de cargas, hacen que el sistema se vuelva altamente sinérgico: la luz activa el material y el voltaje mantiene el ciclo electroquímico y la regeneración del catalizador (Gupta et al., 2019).

Sin embargo, no se puede ignorar el buen comportamiento de la magnetita en este tratamiento de fotoelectro-Fenton. Pese a que el band gap de la magnetita sea casi nulo y provoque que no absorba bien la luz visible, existen estudios que sugieren que la magnetita mejora la generación de radicales hidroxilo, y por tanto la desinfección, porque en su estructura se puede encontrar tanto Fe²⁺ como Fe³⁺, lo que hace que pueda liberar Fe²⁺ directa y más fácilmente que la hematita, que solo contiene Fe³⁺. Adicionalmente, la estructura de espinela inversa otorga a Fe₃O₄ una conductividad semimetallica que facilita el flujo de electrones para que reduzcan O₂ a H₂O₂ [14] y se formen más radicales hidroxilo (Marcinowski et al., 2020).

Por tanto, su estructura semimetallica y su contenido mixto Fe^{2+/3+} le permiten beneficiarse de la luz y ser efectivo, ya que esta puede favorecer reacciones superficiales en la magnetita y la transferencia de electrones inducida por luz y que ocurra así la fotorreducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ [21], precisamente, por no ser un semiconductor típico (Marcinowski et al., 2020). En adición, la magnetita presenta un área superficial específica de 80 m²/g, la mayor de los tres catalizadores; esto indica más sitios activos o puntos donde la luz puede provocar reacciones fotocatalíticas en las que los fotones interactúan con el material, por lo que también explica la eficiencia del proceso fotoelectro-Fenton con magnetita, a pesar de que su band gap es despreciable (Papadas et al., 2015).

La menor eficiencia de la hematita se debe a los siguientes motivos: solo tiene en su fórmula Fe³⁺, por lo que, como se comentó en el apartado anterior, necesita reducirse electroquímicamente a Fe²⁺ antes de participar en la reacción Fenton [6]. Además, su mala separación, baja movilidad y alta recombinación de cargas, provocan que la efectividad de Fe₂O₃ bajo luz se vea limitada y el tratamiento con este catalizador no se vea tan beneficiado por ella como los otros (Sari et al, 2025).

En cuanto al H₂O₂ generado, los resultados se muestran en la Figura 19, y se observa el mismo fenómeno que en el electro-Fenton. En los experimentos con hematita se produjo casi el doble que en los que se realizaron con magnetita y ferrita de bismuto,

por lo que la razón de ello es la misma que anteriormente: una acumulación del compuesto por falta de iones para reaccionar en la reacción Fenton [6]; relacionado con los problemas de separación de cargas que presenta Fe_2O_3 . Por otra parte, si se compara la producción de peróxido en electro-Fenton y en fotoelectro-Fenton, en el tratamiento con luz la generación fue menor y esto tiene una sencilla explicación. H_2O_2 se produce a la vez que se descompone por acción de la radiación, en radicales hidroxilo [20], lo cual es beneficioso para la inactivación de las bacterias, pero reduce su concentración acumulada, además de consumirse en las reacciones que generan $\cdot\text{OH}$ [15 y 16].

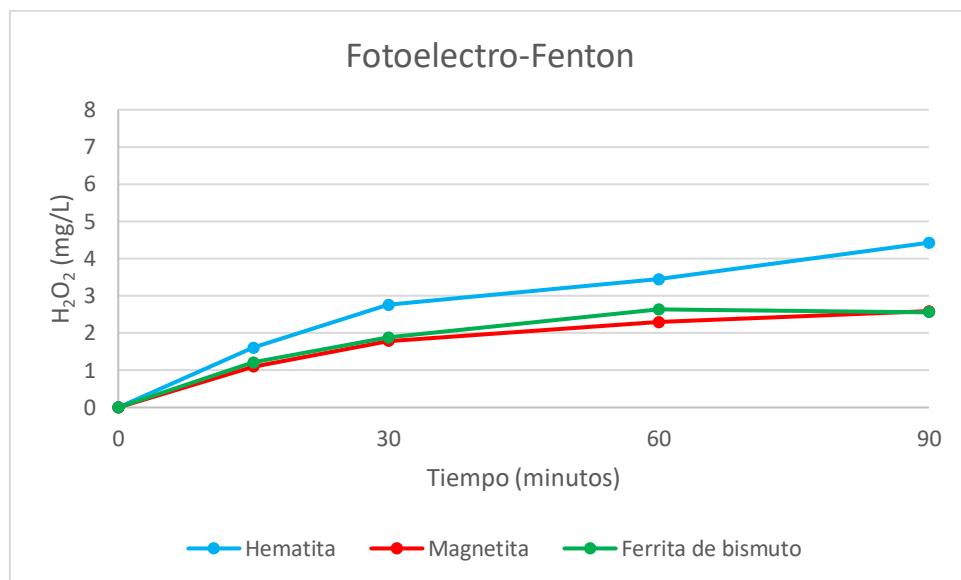


Figura 19. Evolución de la concentración de H_2O_2 en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

Durante los ensayos de control realizados únicamente con irradiación lumínica se observó una leve reducción de *E.coli*. Aunque la luz por sí sola no sea capaz de eliminar completamente la carga de bacterias, sí es cierto que puede inducir cierto estrés oxidativo directo en ellas, y esto puede deberse a la generación de EROS como el oxígeno singlete (1O_2), el cual es oxígeno molecular excitado por fotones y con más energía y reactividad química, además, las bacterias pueden verse afectadas por daño directo a componentes celulares fotosensibles (McGuigan et al., 2012). El efecto sólo de la luz, aunque limitado, contribuye a la inactivación bacteriana, lo que hace que el tratamiento fotoelectro-Fenton, por norma general, vaya a funcionar mejor que el electro-Fenton.

6.3. Inactivación de *Enterococcus faecalis* en agua residual depurada sintética

Después de analizar los resultados obtenidos en los tratamientos aplicados en ARDS para la desinfección de *Escherichia coli*, se puede afirmar que los procesos electro-Fenton y fotoelectro-Fenton con magnetita y ferrita de bismuto fueron los más efectivos, por ello, se aplicaron en la misma matriz con el objetivo de observar la eliminación, esta vez, de *Enterococcus faecalis*, una bacteria más resistente que la primera. Los resultados obtenidos en estos ensayos de inactivación bacteriana y producción de peróxido de hidrógeno se pueden consultar en los Anexos III y IV, respectivamente.

6.3.1. Aplicación de electro-Fenton

El primer tratamiento que se aplicó en la matriz de ARDS para la inactivación de *Enterococcus faecalis* fue el electro-Fenton. La evolución de la concentración bacteriana se puede observar en la siguiente Figura 20.

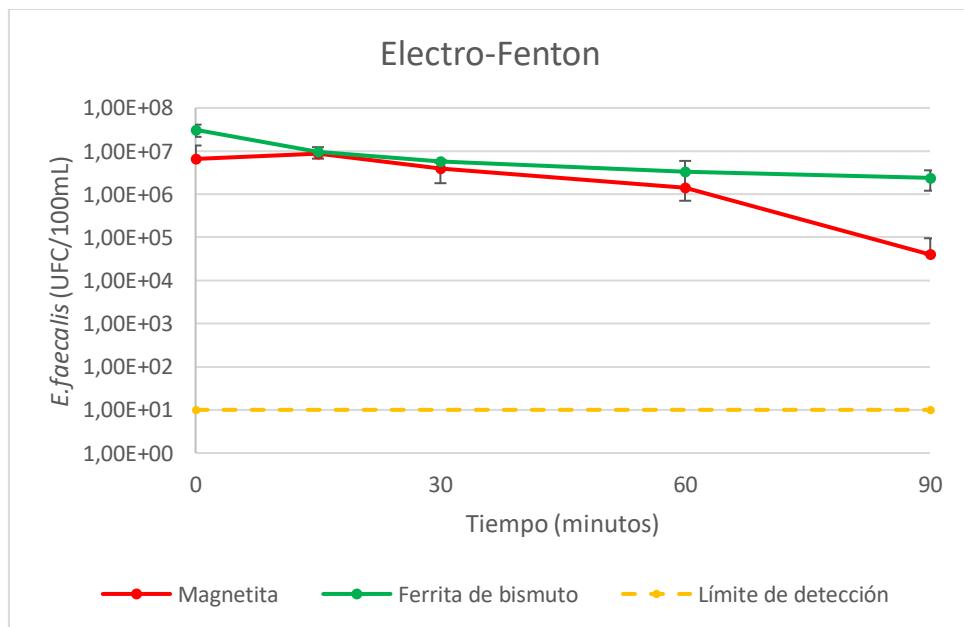


Figura 20. Evolución de la concentración de *E. faecalis* en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

En estos ensayos se observa que la magnetita ofrece, ligeramente, una mayor desinfección de *E.faecalis* que la ferrita de bismuto cuando se aplica el tratamiento electro-Fenton, alcanzando a los 90 minutos $4,00 \cdot 10^4$ UFC/100mL con Fe_3O_4 y $2,39 \cdot 10^6$ con BiFeO_3 , lo que se traduce en una reducción de más de dos unidades logarítmicas con el primer catalizador y de menos de una con el segundo (Anexo III).

La diferencia en la eficacia de eliminación entre las dos bacterias estudiadas, se atribuye a la estructura de sus paredes celulares: *E.coli* es una bacteria Gram-negativa que posee una membrana externa de lipopolisacáridos y una fina capa de peptidoglucano, en cambio, *E.faecalis*, una bacteria Gram-positiva, carece de membrana externa, pero su capa protectora de peptidoglucano es más gruesa, lo que proporciona mayor resistencia ante los agentes oxidantes, ya que neutraliza parte del daño oxidativo. En adición, las bacterias Gram-positivas tienen sistemas antioxidantes y enzimas como las catalasas y peroxidases que neutralizan $\cdot\text{OH}$ o H_2O_2 (Tortora et al, 2007).

Los mecanismos de ataque celular de los radicales hidroxilo, que provocan la eliminación de las bacterias *E.coli* y *E.faecalis*, son los mismos en ambas experimentaciones, aunque menos eficientes en la degradación de la segunda. Además, en cuanto a los catalizadores, como se explicó anteriormente, BiFeO_3 consigue la reducción de la concentración de microorganismos debido a la polarización intrínseca que su estructura perovskita romboédrica le proporciona y que facilita la separación de cargas y, por otro lado, Fe_3O_4 , por la presencia simultánea de Fe^{2+} y Fe^{3+} en su estructura y su buena conductividad semimetálica, es eficaz en los procesos tipo Fenton que se utilizan en la desinfección.

De cualquier manera, se observa que la magnetita ha sido ligeramente más eficaz en la eliminación de *E.faecalis* en el tratamiento electro-Fenton, a diferencia de lo observado en los experimentos con *E.coli*, donde la ferrita de bismuto resultó más efectiva. Esta pequeña diferencia se atribuye a que Fe_3O_4 actúa como una fuente continua de Fe^{2+} , lo que favorece la producción sostenida y abundante de radicales hidroxilo. Por el contrario, BiFeO_3 es más eficiente cuando la generación masiva de estos radicales no es necesaria, como en el caso de la desinfección de *E.coli*, que es una bacteria más susceptible. El catalizador de bismuto favorece la generación localizada de $\cdot\text{OH}$ y una acción más inmediata, lo cual no resulta tan efectivo frente a enterococos, que presentan una mayor resistencia. Aunque por su estructura se podría esperar que la ferrita de bismuto tuviera un alto rendimiento en este tratamiento para la eliminación de *E.faecalis*, el catalizador no supera la ventaja, aunque sutil, que ofrece la magnetita en este caso, en términos de generación continua de oxidantes (Catalan y Scott, 2009).

En estos ensayos, la concentración final de H_2O_2 producida fue ligeramente menor que en la desinfección de *E.coli* con electro-Fenton. Los resultados obtenidos se ven reflejados en la Figura 21.

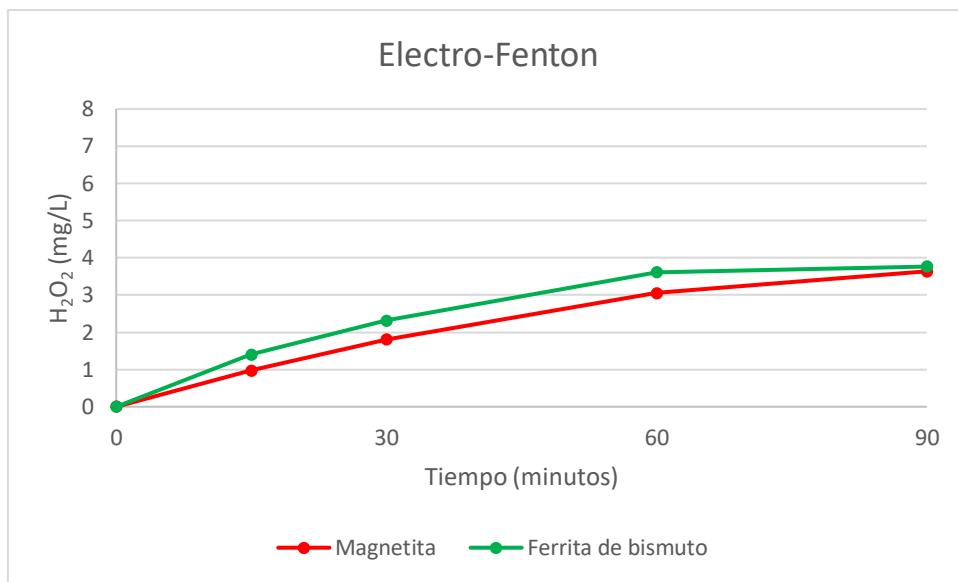


Figura 21. Evolución de la concentración de H_2O_2 en ARDS durante el tratamiento electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

En el experimento pasado se observó una producción de H_2O_2 de aproximadamente 4 mg/L y en los ensayos analizados en este apartado se generaron $\sim 3,7$ mg/L. Esta pequeña diferencia puede atribuirse a dos factores: el menor voltaje aplicado en el sistema durante la desinfección de enterococos y las variaciones mínimas en la composición de la matriz de ARDS, la cual se fue preparando de forma progresiva conforme avanzaban los experimentos. Dichas variaciones pueden influir en parámetros clave del proceso, como la conductividad o la presencia de ciertos iones, afectando a la generación de peróxido de hidrógeno (Ganiyu et al., 2021).

6.3.2. Aplicación de fotoelectro-Fenton

A continuación, se aplicó en la matriz de ARDS para la inactivación de *Enterococcus faecalis* el tratamiento con luz, el proceso fotoelectro-Fenton. Los valores obtenidos sobre la evolución de la concentración bacteriana quedan recogidos en la Figura 22.

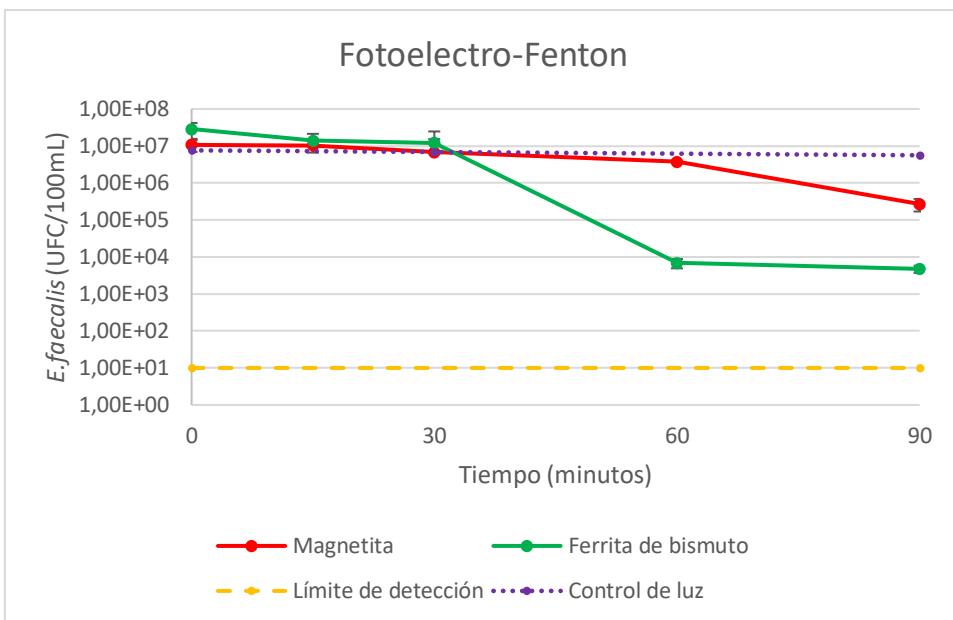


Figura 22. Evolución de la concentración de *E.faecalis* en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

En el tratamiento de desinfección de *Enterococcus faecalis* aplicando fotoelectro-Fenton se observa una clara diferencia en la eficacia de los catalizadores; la ferrita de bismuto consigue una reducción más rápida y drástica a partir del minuto 30 de tratamiento, de casi cuatro unidades logarítmicas, hasta $4,75 \cdot 10^3$ UFC/100mL; mientras que la magnetita, al final del proceso, consigue poco más de la reducción de una unidad logarítmica alcanzando una concentración de $2,7 \cdot 10^5$ UFC/100mL (Anexo III). La innegable efectividad de ambos catalizadores, al igual que en los experimentos de desinfección de *E.coli*, se debe a la interacción entre estos y la luz UV-Vis. No obstante, se observa que, en la desinfección de la bacteria Gram-positiva, el fotoelectro-Fenton con BiFeO_3 es mucho más efectivo que con magnetita y esto se debe a que las condiciones óptimas para que la ferrita muestre su máxima efectividad se dan precisamente bajo luz, porque es capaz de generar más radicales oxidantes al aprovechar la energía luminosa (Sari et al., 2025).

La ferrita de bismuto tiene un band gap adecuado para que los electrones sean excitados y generen pares electrón-hueco que permiten que se formen $\cdot\text{OH}$ por los huecos positivos y que se regenere Fe^{2+} [17] o reduzca O_2 [14] por los electrones, no obstante, es su estructura ferroeléctrica perovskita la que favorece la separación de cargas fotoinducidas y evita su recombinación no productiva, clave para explicar su mayor efectividad en el proceso con luz frente a la magnetita (Gupta et al., 2019). Los electrones se recombinan mucho más fácilmente si hay luz y Fe_3O_4 muestra una recombinación y pérdidas de energía por calor mayores que BiFeO_3 , por lo que su actividad fotocatalítica se ve limitada (Sari et al., 2025). Cabe destacar que con el tratamiento fotoelectro-Fenton con magnetita y ferrita de bismuto para la eliminación de *E.coli*, se obtuvieron unos resultados en los que las reducciones de concentración

eran alta y similares, sin embargo, en este experimento, donde la bacteria tratada es *E.faecalis*, la mayor superficie específica de la magnetita no es capaz de ofrecer una ventaja que provoque la muerte celular.

La producción de peróxido de hidrógeno ha sido menor que en el tratamiento electro-Fenton (Anexo IV) y se debe a los dos factores ya comentados en el apartado anterior: menor voltaje y pequeñas diferencias en la composición de la matriz y, por otro lado, H_2O_2 es, propiamente, un oxidante capaz de inactivar bacterias, por lo que las variaciones de concentración entre procesos, también pueden atribuirse al consumo del compuesto durante los mismos, lo que constituye una evidencia de su efectividad (Martínez-Huitl et al., 2015). Además, los resultados obtenidos en esta experimentación con enterococos, que se pueden observar en la Figura 23, son muy similares a los obtenidos en los ensayos con *E.coli*, lo que refuerza la coherencia del procedimiento experimental y confirma que los valores observados se encuentran dentro de lo esperado.

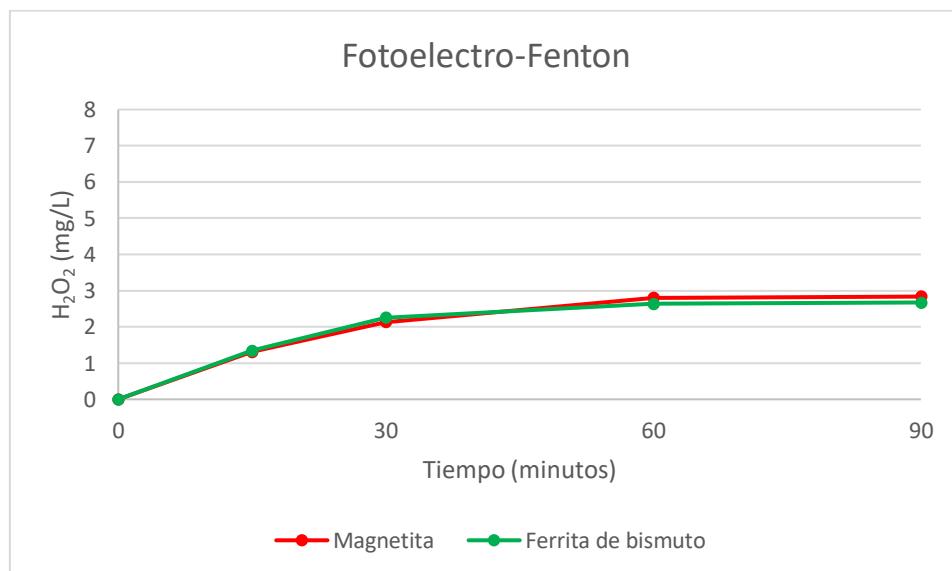


Figura 23. Evolución de la concentración de H_2O_2 en ARDS durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

6.4. Inactivación bacteriana en agua residual depurada real con el tratamiento fotoelectro-Fenton y ferrita de bismuto

Tras la experimentación realizada para la desinfección de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* con tres tratamientos electroquímicos y tres catalizadores de óxido de hierro distintos, la combinación que ha mostrado mayor efectividad en la eliminación de ambas bacterias es el proceso fotoelectro-Fenton con $BiFeO_3$. A

continuación, se muestra un análisis de los resultados obtenidos en ensayos de aplicación del tratamiento para la desinfección de dichos microorganismos en una muestra de agua residual depurada real. Los valores conseguidos de concentraciones bacterianas y producción de H_2O_2 quedan recogidos en los Anexos V y VI, respectivamente.

Antes de comenzar el proceso, en el que se inocularon alrededor de 10^6 y 10^7 UFC/100mL de microorganismos, al igual que en los ensayos anteriores, se hizo un análisis de la concentración de *E.coli* y *E.faecalis* en el agua de salida de la EDAR de Tudela y estos fueron los resultados: se obtuvo una concentración de *E.coli* de $9,1 \cdot 10^4$ UFC/100mL y una concentración de *E.faecalis* de $1,161 \cdot 10^4$ UFC/100mL. Sin embargo, aunque por los resultados obtenidos se pueda decir que el tratamiento convencional de la planta depuradora logra una reducción parcial de la carga microbiológica, no se cumplen los criterios sanitarios exigidos para la reutilización de aguas para ningún uso, dispuestos en el Real Decreto 1085/2024.

En la siguiente Figura 24, en la que se puede observar la evolución de las concentraciones de las dos bacterias estudiadas, ocurren reducciones significativas de ambas a lo largo del tratamiento, lo que indica una notable eficacia del proceso de desinfección en la muestra de agua real de salida de una EDAR.

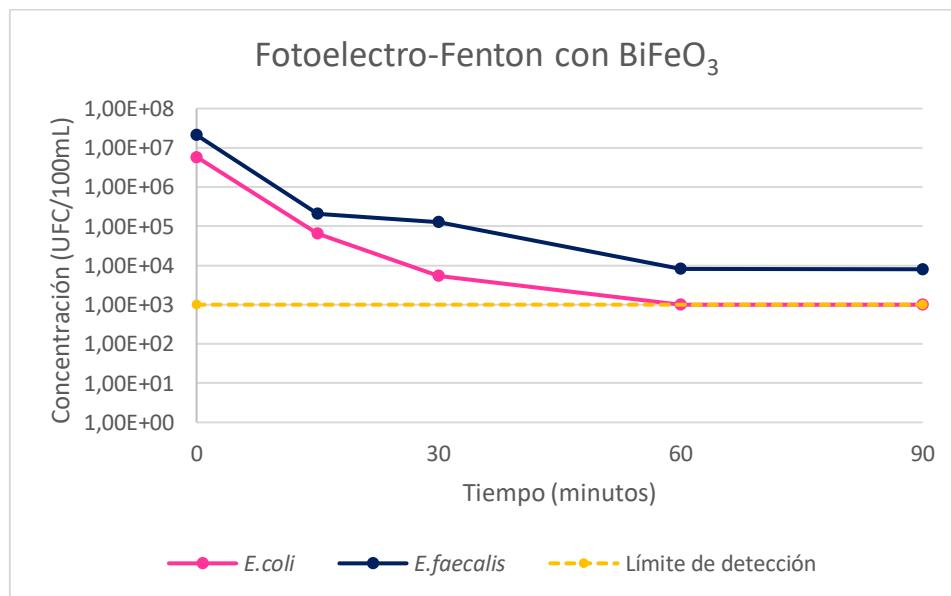


Figura 24. Evolución de las concentraciones de *E.coli* y *E.faecalis* en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto. Elaboración propia.

E.faecalis muestra una disminución de su concentración más moderada que *E.coli*, manteniendo entre los 60 y 90 minutos valores parecidos alrededor de $8 \cdot 10^3$ UFC/100mL (Anexo V). Por otro lado, la bacteria Gram-negativa, llegó al límite de detección de 1.000 UFC/100mL a los 60 minutos, lo que evidencia una mayor susceptibilidad al proceso de

desinfección. Esto se debe a las diferencias estructurales entre las dos bacterias; la pared celular de *E.faecalis* es más gruesa, robusta y resistente (Tortora et al, 2007).

En agua sintética, *E.coli* alcanza el valor de concentración de 10^3 UFC/100mL a los 30 minutos y en agua real a los 60 minutos, esta diferencia en la velocidad de desinfección puede atribuirse a la composición de cada matriz. El agua residual depurada real presenta una mayor carga iónica, mayor DQO y mayores cantidades de nitrógeno total y amonio; como ya se explicó en el apartado 6.2.1., estos compuestos pueden actuar como agentes competidores y disminuir la disponibilidad de EROs. Además, la mayor concentración de SST puede proteger a los microorganismos frente al ataque oxidativo (Ganiyu et al., 2021 y Tsydenova, 2015).

Por otra parte, el valor final de concentración de *E.faecalis* fue el mismo que se obtuvo en los experimentos en ARDS; a pesar de ello, la desinfección, en este caso, es más gradual y continua desde el inicio. Esta diferencia en la cinética de desinfección se debe a la ausencia de interferencias en el agua sintética y ha favorecido que el proceso alcance más rápidamente el umbral necesario para desintegrar las membranas celulares de los enterococos, provocando una eliminación más súbita. En cambio, los ensayos con agua real indican una desinfección progresiva que ha sido causada por la composición más diversa y mayor carga de compuestos en la misma. Estos compuestos consumen los radicales hidroxilo o actúan como barreras físicas y químicas y disminuyen la velocidad de inactivación bacteriana (Ganiyu et al., 2021).

La evolución de la producción de H_2O_2 se puede observar en la Figura 25 y ha sido mayor que cuando se utilizó la matriz sintética (Anexo VI); esto se puede explicar de varias formas. La conductividad del agua salida de la depuradora es mayor, lo que indica mejor eficiencia electroquímica por la mayor disponibilidad de iones para transportar carga, además del mayor voltaje aplicado. Esto mejora la eficacia, especialmente, de la reducción de oxígeno en el cátodo [14], ya que disminuye la resistencia interna de la celda. El agua real también contiene una mezcla de sales naturales disuelta más compleja y que facilita las reacciones redox para formar el peróxido de hidrógeno. El efecto catalítico de trazas metálicas también es relevante, ya que pueden actuar como catalizadores secundarios en la generación de la especie de forma directa o indirecta (Zhang et al., 2022).

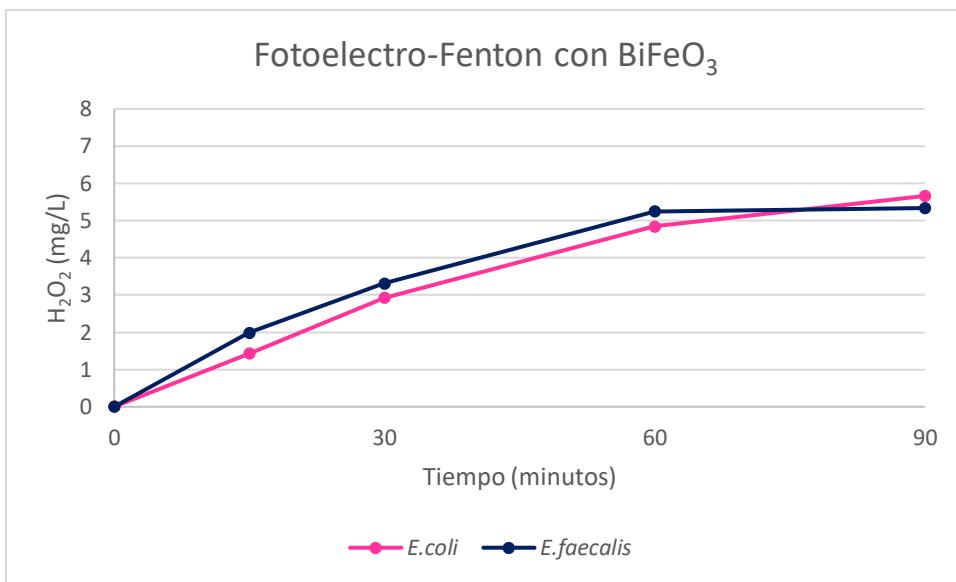


Figura 25. Evolución de la concentración de H_2O_2 en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.coli* y *E.faecalis*. Elaboración propia.

Los resultados obtenidos con agua residual depurada de salida de EDAR, confirman que el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto es eficaz, tanto en condiciones controladas de laboratorio, como en matrices reales más complejas, presentando un alto rendimiento desinfectante. Se trata de una tecnología prometedora para su aplicación en la regeneración de aguas, especialmente en contextos donde se exige el cumplimiento de los criterios sanitarios para su reutilización, tal y como se estable en el Real Decreto 1085/2024. Por tanto, profundizar en el estudio y optimización del proceso puede servir para valorar su implementación como alternativa sostenible en sistemas reales de regeneración y reutilización de aguas depuradas.

7. CONCLUSIONES

Los tratamientos electroquímicos de oxidación avanzada aplicados en este trabajo han demostrado una capacidad significativa para la inactivación de bacterias patógenas presentes en aguas residuales. El tratamiento más eficaz entre los ensayados ha sido el fotoelectro-Fenton, seguido del electro-Fenton, mientras que la oxidación anódica ha demostrado una eficacia menor. La mejora del proceso Fenton mediante luz (UV-Vis) permite la regeneración continua de Fe^{2+} , evita la acumulación de Fe^{3+} y potencia la producción de $\cdot OH$, responsables de la actividad desinfectante.

La incorporación de radicación mediante una lámpara de xenón supone una mejora clara en los tratamientos. La luz favorece tanto la fotólisis de complejos Fe^{3+} [21] como la descomposición de H_2O_2 en radicales $\cdot OH$ [20], contribuyendo a una mayor eficacia de

inactivación bacteriana. Se observa una sinergia clara entre la irradiancia lumínica y la actividad electroquímica, reduciendo el tiempo y aumentando el rendimiento del proceso.

La elección del catalizador ha sido determinante y BiFeO₃ ha mostrado la mayor eficiencia frente a *Escherichia coli*, con una reducción prácticamente total a voltajes moderados (~4-4,3 V). Esto se atribuye a su estructura perovskita, que favorece tanto la separación de cargas como la actividad fotocatalítica bajo radiación. Por otro lado, la magnetita ha sido muy eficaz en el tratamiento electro-Fenton sin luz frente a *Enterococcus faecalis*, debido a su capacidad para liberar Fe²⁺ de forma sostenida durante el proceso. La hematita, en cambio, a pesar de generar mayor cantidad de peróxido de hidrógeno, mostró una eficacia intermedia, limitada por su menor actividad bajo irradiancia y menor eficiencia en la activación del compuesto oxidante.

Por otra parte, se confirma el papel clave del H₂O₂ como precursor principal en la generación de EROs, especialmente radicales hidroxilo, cuya elevada reactividad no selectiva permite la rápida oxidación de componentes celulares esenciales en las bacterias. La producción eficiente de peróxido fue crítica para la eficacia de los tratamientos, observándose que no solo la cantidad, si no la disponibilidad y aprovechamiento efectivo de la especie determinan el éxito del proceso.

En cuanto a la influencia de la estructura bacteriana, *E.coli* fue inactivada con mayor facilidad y rapidez, alcanzando el límite de detección de 1.000 UFC/100mL a los 60 minutos en la mayoría de ensayos. *E.faecalis*, con una pared gruesa de peptidoglucano, requirió tiempos más prolongados de tratamiento para alcanzar concentraciones similares.

La composición de la matriz tuvo un impacto relevante sobre la eficacia de los tratamientos. En soluciones simples de Na₂SO₄, los tratamientos mostraron una cinética más rápida, mientras que en agua residual depurada sintética, se observaron ligeras disminuciones en la eficiencia, atribuibles a la presencia de compuestos orgánicos y otras sustancias interferentes. Además, se demostró que pequeñas variaciones en los parámetros operativos pueden afectar a la producción de H₂O₂ y la efectividad del proceso Fenton. Se trabajó durante los 90 minutos de tratamiento con una corriente constante de ~10 mA, ajustando el voltaje alrededor de 4-5,5 V, según el catalizador y la matriz utilizados, con el objetivo de optimizar la producción de EROs. El análisis, finalmente mostró que los niveles de inactivación deseados se alcanzaban antes del tiempo total, especialmente en el caso de *E.coli* tratada con ferrita de bismuto bajo irradiación. Esto resalta la posibilidad de optimizar los tiempos y el consumo energético y de materiales en futuras aplicaciones.

En los ensayos con agua residual depurada real, la eficacia del tratamiento photoelectro-Fenton con BiFeO₃ se mantuvo elevada, confirmando una vez más su aplicabilidad práctica. Los resultados obtenidos avalan el potencial del tratamiento photoelectro-Fenton con catalizadores como BiFeO₃ como herramienta viable para la desinfección de aguas residuales depuradas. Este tipo de tecnologías avanzadas permiten cumplir con

los requisitos microbiológicos de calidad del Real Decreto 1085/2024 para la reutilización de aguas, sin generar subproductos tóxicos. Además, el uso de luz solar como fuente de energía supone una ventaja adicional en términos de sostenibilidad energética y coste operativo.

De cara a futuros trabajos, sería interesante profundizar en la optimización de las condiciones operativas para reducir aún más el tiempo de tratamiento y el consumo energético o hacerlas más representativas y cercanas a un entorno a escala piloto o industrial. Además, se podría evaluar la eficacia de los tratamientos frente a una gama más amplia de patógenos que pueden ser encontrados en aguas residuales urbanas. También sería relevante investigar la estabilidad a largo plazo de los catalizadores y la posibilidad de su regeneración o reutilización. Por último, la integración de energías renovables en el sistema, como la radiación solar directa, brinda la oportunidad de desarrollar tecnologías sostenibles y eficientes para la desinfección de aguas residuales con fines de reutilización, en línea con los objetivos de economía circular y gestión responsable del agua.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, V. (2021). Estudio de la hidrodinámica y eliminación de coliformes fecales en la laguna de maduración de la depuradora de aguas residuales de la ciudad de Portoviejo, Ecuador, mediante modelos CFD con OpenFoam. Trabajo de Fin de Máster de la Universidad Politécnica de Valencia.
- Berardi, S., Cristino, V., Bignozzi, C.A., Grandi, S., Caramori, S. (2022). Hematite-based photoelectrochemical interfaces for solar fuel production. Inorganica Chimica Acta, 534, 120862.
- Blanco, J. (2009). Degradoación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto-Fenton. Trabajo de Fin de Máster de Universidad Politécnica de Cataluña.
- Catalan, G., y Scott, J.F. (2009). Physics and Applications of Bismuth Ferrite. Advanced Materials, 21(24), 2463–2485.
- Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Benigna, I., Sorlini, S., Torretta, V. (2018). Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants. Sustainability, 10(1), 86.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U. (2003). The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. 664.
- Dang, T.L.T., Imai, T., Le, T.V., Nguyen, D.M.K., Higuchi, T., Kanno, A., Sekine, M. (2016). Synergistic effect of pressurized carbon dioxide and sodium hypochlorite on the inactivation of *Enterococcus spp*. Water Research, 106, 204-213.
- Delacámarra, G., Arenas, M., Marhubi, A., Rodríguez, M. (2017). El sector del abastecimiento y saneamiento urbano en España. Fundación de Isabel II.
- Delgado, Y., Miravet, M.E., Núñez, R. (2008). Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de la Ciudad de La Habana. Hig San Ambient, 8, 387-391.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. Frontiers in Microbiology, 7, 644.
- Ganiyu, S.O., Zhou, M., Martínez-Huitle, C.A. (2018). Heterogeneous electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes: A critical review of fundamental principles and application for water/wastewater treatment. Applied Catalysis B: Environmental, 235, 103-129.

Ganiyu, S.O., Marínez-Huitle, C.A., Oturan, M.A. (2021). Electrochemical advanced oxidation processes for wastewater treatment: Advances in formation and detection of reactive species and mechanisms. *Current Opinion in Electrochemistry*, 27, 100678.

George, I., Crop, P., Servais, P. (2002). Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, 36, 2607-2617.

George, S., Kishen, A., Song, K. (2005). The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. *Journal Endodontics*, 31, 867-872.

Gupta, P.K., Ghosh, S., Pal, A., Roy, S., Joshi, A.G., Ghosh, A.K., Chatterjee, S. (2019). Study of band structure, transport and magnetic properties of BiFeO₃-TbMnO₃ composite. *SN Applied Sciences*, 1, 1607.

Ingerson-Mahar, M., Reid, A. (2011). FAQ: *E. coli*: good, bad, and deadly.

Instituto Nacional de Estadística. (2022). Encuesta sobre el suministro y saneamiento del agua.

Instituto Nacional de Estadística. (2022). Recogida y tratamiento de las aguas residuales españolas por comunidades y ciudades autónomas, tipo de indicador y periodo.

Kuleyin, A., Gök, A., Akbal, F. (2021). Treatment of textile industry wastewater by electro-Fenton process using graphite electrodes in batch and continuous mode. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104782.

La Iglesia, J. (2016). Lagunaje. Módulo Gestión de Aguas Residuales y Reutilización. Escuela de Organización Industrial.

Lee, Y., Imminger, S., Czekalski, N., Von Gunten, U. (2016). Inactivation efficiency of *Escherichia coli* and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine tri-phosphate analyses. *Water Research*, 101, 617-627.

Lee, Y., Von Gunten, U. (2012). Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the transformation of organic micropollutants during oxidative water treatment. *Water Research*, 46(19), 6177-6195.

Ley 11/2005, de 22 de junio, por la que se modifica la Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional.

Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.

López, A. (2018). Evaluación de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental. Tesis doctoral de la Universidad de Zaragoza.

López, A., Mosteo, R., Gómez, J., Lasheras, A.M., Goñi, P., Ormad, M.P. (2016). Evolución de bacterias patógenas en el tratamiento de aguas residuales urbanas. Revista Aguas Residuales.

López, M.A., Castellanos, O.P., Lango, F., Castañeda, M.R., Montoya, J., Sosa, C.A., Ortiz, B. (2021). Oxidación avanzada como tratamiento alternativo para las aguas residuales. Una revisión. Enfoque UTE, 12 (4), 76-87.

Lozano, B., Orteu, E. (2024). Análisis de los aspectos clave del Real Decreto 1085/2024, por el que se aprueba el nuevo Reglamento de Reutilización del Agua. Actualidad Jurídica Ambiental, 151.

Marcinowski, P., Bury, D., Krupa, M., Ścieżyńska, D., Prabhu, P., Bogacki, J. (2020). Magnetite and Hematite in Advanced Oxidation Processes Application for Cosmetic Wastewater Treatment. Processes, 8(11), 1343.

Martínez-Huitel, C.A., Rodrigo, M.A., Sires, I., Scialdone, O. (2015). Single and coupled electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: a critical review. Chemical Reviews, 115, 13362-13407.

McGuigan, K.G., Conroy, R.M., Mosler, H., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E., Fernandez-Ibañez, P. (2012). Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. Journal of Hazardous Materials, 235–236, 29-46.

Melgarejo-Moreno, J., y López-Ortiz, M. I. (2016). Depuración y reutilización de aguas en España. Agua y Territorio, 8, 22-35.

Mendiara, S. (2013). Inactivación de *Escherichia coli* presente en aguas de salida de depuradora mediante cloración y procesos de oxidación avanzada. Trabajo de Fin de Máster de Universidad de Zaragoza.

Metcalf & Eddy, INC. (2002). Ingeniería de las aguas residuales. Tratamiento vertido y reutilización, 2. 103-124.

Mosteo, R., Larumbe, N., Hidalgo, M.C., Miguel, N, Torres-Palma, R. (2024). Assessment of heterogeneous photocatalysis as disinfection step for reuse water: control of bacteria and protozoa. IOA Conference and Exhibition, Porto, Portugal.

Navarro, T.M. (2024). La reutilización del agua y la economía circular. Revista catalana de dret públic, 68, 59-73.

Orruño, M., Garaizabal, I., Bravo, Z., Parada, C., Barcina, I., Arana, I. (2014). Mechanisms involved in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* removal during activated sludge wastewater treatment. Microbiologyopen, 3, 657-667.

Papadas, I., Christodoulides, J.A., Kiouoglou, G., Armatas, G.S. (2015). A high surface area ordered mesoporous BiFeO₃ semiconductor with efficient water oxidation activity. Journal of Materials Chemistry A, 3(4), 1587–1593.

Ramis, J. (2019). Aguas residuales urbanas. 1-76.

Real Decreto 1085/2024, de 22 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de reutilización del agua y se modifican diversos reales decretos que regulan la gestión del agua.

Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.

Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.

Real Decreto-ley 4/2023, de 11 de mayo, por el que se adoptan medidas urgentes en materia agraria y de aguas en respuesta a la sequía y al agravamiento de las condiciones del sector primario derivado del conflicto bélico en Ucrania y de las condiciones climatológicas, así como de promoción del uso del transporte público colectivo terrestre por parte de los jóvenes y prevención de riesgos laborales en episodios de elevadas temperaturas.

Regalado, A., Vizcarreta-Vásquez, D.A., Robles-Gómez, E.E., Natividad, R., Escudero, C.J., Peralta, E. (2024). Data-Based Modeling, Multi-Objective Optimization, and Multi-Criterion Decision-Making to Maximize the Electro-Oxidation of Metoprolol over Boron-Doped Diamond Electrodes in a Flow-By Reactor. *Processes*, 12 (9), 1958.

Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua.

Rodríguez, E.A., Jiménez-Quiceno, J.N. (2023). Resistencia bacteriana a antibióticos en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para salud pública.

Rodríguez-Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*, 44, 464-475.

Rojas, R. (2002). Sistemas de tratamiento de aguas residuales. Gestión integral de tratamiento de aguas residuales, 8-15.

Salcedo, I., Andrades, J.A., Quiroga, J.M., Nebot, E. (2002). Desinfección de aguas residuales urbanas mediante radiación ultravioleta: Aplicación en la EDAR de Jerez de la Frontera. *Tecnología del Agua*, 277, 42-51.

Sanz, J., Lombraña, J.I. y De Luis, A. (2013). Estado del arte en la oxidación avanzada a efluentes industriales: nuevos desarrollos y futuras tendencias. *Afinidad LXX*, 561, 25-33.

Sari, E.T., Maula, E.K., Mufti, N., Aini, P.N., Hidayat, H., Dewi, A.S.P., Sunaryono, S. (2025). Comparison performance of Fe_2O_3 and Fe_3O_4 in their application as photoelectrochemical water splitting. The 4th Material Research Society of Indonesia (MRS-id).

Torres, V., Manjarrez, C.B., Acosta-Muñiz, C.H., Guerrero-Prieto, V.M., Parra-Quezada, R.Á., Noriega Orozco, L.O., Ávila-Quezada, G.D. (2016). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y plantas comestibles. ¿Se han desarrollado mecanismos de internalización bacteriana?. Revista mexicana de fitopatología, 34(1), 64-83.

Tortora, G., Funke, B.R., Case C. (2007). Introducción a la microbiología. 329-334.

Tsydenova, O., Batoev, V., Batoeva, A. (2015). Solar-Enhanced Advanced Oxidation Processes for Water Treatment: Simultaneous Removal of Pathogens and Chemical Pollutants. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(8), 9542-9561.

UNE-EN ISO 3960:2017. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de peróxido. Determinación del punto final yodométrico (visual).

UNE-EN ISO 4833-2:2013. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en superficie.

UNE-EN ISO 6887-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

UNE-EN ISO 9308-2:2012. Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable.

UNESCO. (2023). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2023: Agua para un mundo sostenible. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura.

Valero, P. (2017). Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis doctoral de la Universidad de Zaragoza.

Vasco, J., Mas, M., Salvadó, H. (2009). Caracterización de los microorganismos de depuradoras biológicas urbanas de fangos activos con tratamiento convencional y de eliminación de nutrientes de las comarcas de Lérida. Tecnología y Ciencias del Agua, 29 (305), 68-78.

Yagüe, J. (2005). Regeneración y Reutilización de aguas en el marco del Programa A.G.U.A. Jornadas técnicas de La integración del agua regenerada en la gestión de los recursos: El papel dinamizador del territorio.

Zhang, X., Zhao, X., Zhu, P., Adler, Z., Wu, Z., Liu, Y., Wang, H. (2022). Electrochemical oxygen reduction to hydrogen peroxide at practical rates in strong acidic media. Nature communications, 13, 2880.

9. ANEXOS

A continuación, se muestran los valores exactos obtenidos durante toda la experimentación del trabajo de aplicación de tratamientos electroquímicos para la eliminación de bacterias patógenas en aguas.

Las celdas vacías que se observan en algunas tablas pueden deberse a dos motivos principales: no se dispone del dato porque no se realizó el análisis correspondiente, o bien, el valor corresponde a una desviación estándar que no puedo calcularse.

Este segundo caso ocurre cuando únicamente se obtuvo un dato individual mediante el método Quanti-Tray 2000, ya que no siempre se disponía de resultados por siembra en placa, debido a placas que no mostraban crecimiento o que se descartaban por alguna razón. Dado que las siembras en placa se realizaban por duplicado, permitiendo el cálculo de la desviación estándar, y el Quanti-Tray 2000 se aplicaba una sola vez por punto de muestreo no siempre ha sido posible calcular dicha desviación.

9.1. Anexo I: Concentraciones de *Escherichia coli* durante los tratamientos electroquímicos

En la Tabla 10 se pueden observar los valores de concentración de *E.coli* obtenidos y las desviaciones estándar calculadas con los datos de los ensayos duplicados del primer tratamiento preliminar, realizado en una disolución de sulfato de sodio y donde se aplicó la oxidación anódica con el objetivo de desinfectar la muestra.

Tabla 10. Concentraciones de *E.coli* en Na₂SO₄ durante el tratamiento de oxidación anódica. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Oxidación anódica | | Control | |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 3,19E+06 | 4,19E+05 | 9,93E+06 | 0 |
| 2 | 1,03E+06 | 3,30E+05 | - | - |
| 5 | 2,51E+05 | 8,77E+04 | - | - |
| 8 | 1,50E+03 | 7,07E+02 | - | - |
| 10 | 1,00E+03 | 0 | - | - |
| 12 | 1,00E+03 | 0 | - | - |
| 15 | 1,00E+03 | 0 | - | - |
| 20 | 1,00E+03 | 0 | - | - |
| 25 | 1,00E+03 | 0 | - | - |
| 30 | 1,00E+03 | 0 | 7,13E+06 | 8,96E+05 |

En las siguientes tablas, la Tabla 11, 12 y 13 se pueden consultar las concentraciones de *E.coli* obtenidas y las desviaciones estándar calculadas durante los tratamientos electroquímicos que se realizaron en ARDS: oxidación anódica, electro-Fenton y fotoelectro-Fenton, respectivamente. Además, en las Tablas 12 y 13 se pueden observar más datos, debido a que los valores se dividen en tres columnas, las cuales representan los tres catalizadores de hierro utilizados: la hematita, la magnetita y la ferrita de bismuto.

Tabla 11. Concentraciones de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica. Elaboración propia.

| Oxidación anódica | | |
|-------------------|---------------------------|------------------------|
| Tiempo (minutos) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 1,04E+07 | 7,11E+06 |
| 30 | 3,45E+06 | - |
| 60 | 7,76E+05 | - |
| 90 | 4,95E+04 | 3,18E+04 |

Tabla 12. Concentraciones de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Hematita | | Magnetita | | Ferrita de bismuto | |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 8,90E+06 | 1,23E+07 | 2,85E+06 | 3,54E+06 | 1,20E+07 | 5,09E+06 |
| 15 | - | - | 3,28E+06 | - | 2,00E+05 | 1,86E+05 |
| 30 | 1,02E+05 | - | 6,21E+05 | 8,50E+05 | 1,00E+03 | - |
| 60 | 4,82E+05 | 4,50E+05 | 4,41E+04 | 5,78E+04 | 1,00E+03 | - |
| 90 | 1,33E+03 | 5,77E+02 | 7,80E+02 | 1,09E+03 | 5,43E+02 | 6,46E+02 |

Tabla 13. Concentraciones de *E.coli* en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

| | Hematita | | Magnetita | | Ferrita de bismuto | |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Tiempo (minutos) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 1,48E+06 | 1,24E+06 | 2,73E+05 | - | 6,00E+06 | 1,41E+06 |
| 15 | - | - | 1,00E+03 | - | 1,10E+05 | 1,54E+05 |
| 30 | 7,55E+02 | 1,05E+03 | 5,43E+02 | 6,46E+02 | 5,05E+02 | 7,00E+02 |
| 60 | 5,05E+02 | 7,00E+02 | 1,00E+01 | - | 1,00E+01 | - |
| 90 | 1,00E+01 | - | 1,00E+01 | - | 1,00E+01 | - |

A continuación, se muestra la última tabla del Anexo I, la Tabla 14, en la cual quedan recogidos los resultados de concentraciones de *E.coli* conseguidos en un control de luz, para poder analizar de forma correcta la eficiencia del tratamiento fotoelectro-Fenton.

Tabla 14. Concentraciones de *E.coli* en ARDS durante el control de luz para el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Concentración (UFC/100mL) |
|------------------|---------------------------|
| 0 | 2,7E+06 |
| 30 | 1,0E+05 |
| 90 | 5,5E+04 |

9.2. Anexo II: Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos durante los tratamientos electroquímicos para la desinfección de *Escherichia coli*

En el Anexo II se pueden observar los datos obtenidos sobre la producción de peróxido de hidrógeno durante la desinfección de *E.coli*, junto con los parámetros electroquímicos del sistema aplicados durante la misma: el voltaje y la corriente eléctrica. Todos los datos corresponden a medias calculadas con los valores conseguidos en cada ensayo, los cuales se hicieron por duplicado.

En la Tabla 15 se muestran dichos valores obtenidos durante el primer tratamiento preliminar de oxidación anódica en una disolución de sulfato sódico, para la desinfección de la bacteria Gram-negativa.

Tabla 15. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de *E.coli* en Na₂SO₄. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 3,64 | 10 | 0 |
| 2 | 3,64 | 10 | 0 |
| 5 | 3,64 | 11 | 0,026 |
| 8 | 3,64 | 12 | 0,009 |
| 10 | 3,64 | 12 | 0,810 |
| 15 | 3,64 | 12 | 0,260 |
| 20 | 3,64 | 12 | 0,004 |
| 25 | 3,64 | 12 | 0,009 |
| 30 | 3,64 | 12 | 0,039 |

En la Tabla 16 se pueden observar los valores de concentración de H₂O₂, el voltaje y la corriente eléctrica utilizados en el primer experimento realizado en ARDS y en el que se aplicó la oxidación anódica.

Tabla 16. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de oxidación anódica para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 5,48 | 8 | 0 |
| 30 | 5,48 | 10 | 2,890 |
| 60 | 5,48 | 10 | 4,608 |
| 90 | 5,48 | 10 | 6,125 |

En las siguientes Tablas 17, 18 y 19, se muestran los resultados obtenidos durante la desinfección de *E.coli* en ARDS al aplicar el tratamiento electro-Fenton. Cada una de las tablas corresponde al uso de un catalizador diferente: hematita, magnetita y ferrita de bismuto, respectivamente.

Tabla 17. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con hematita para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,99 | 8 | 0 |
| 30 | 5,24 | 9 | 3,111 |
| 60 | 5,49 | 10 | 5,671 |
| 90 | 5,49 | 10 | 7,255 |

Tabla 18. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con magnetita para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,10 | 8 | 0 |
| 15 | 4,20 | 8 | 1,319 |
| 30 | 4,20 | 9 | 2,222 |
| 60 | 4,20 | 9 | 3,312 |
| 90 | 4,30 | 10 | 4,100 |

Tabla 19. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,08 | 9 | 0 |
| 15 | 4,08 | 9 | 1,226 |
| 30 | 4,08 | 9 | 2,188 |
| 60 | 4,13 | 10 | 3,228 |
| 90 | 4,20 | 10 | 3,944 |

En las siguientes Tablas 20, 21 y 22, se muestran los resultados obtenidos durante la desinfección de *E.coli* en ARDS al aplicar el tratamiento fotoelectro-Fenton. Cada una de las tablas corresponde al uso de un catalizador diferente: hematita, magnetita y ferrita de bismuto, respectivamente.

Tabla 20. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con hematita para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,40 | 10 | 0 |
| 15 | 4,40 | 12 | 1,604 |
| 30 | 4,58 | 14 | 2,761 |
| 60 | 4,48 | 12 | 3,448 |
| 90 | 4,38 | 10 | 4,426 |

Tabla 21. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con magnetita para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,00 | 8 | 0 |
| 15 | 4,00 | 9 | 1,100 |
| 30 | 4,00 | 10 | 1,786 |
| 60 | 4,00 | 10 | 2,294 |
| 90 | 4,00 | 10 | 2,589 |

Tabla 22. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,03 | 9 | 0 |
| 15 | 4,03 | 10 | 1,209 |
| 30 | 4,10 | 11 | 1,884 |
| 60 | 4,10 | 12 | 2,635 |
| 90 | 4,15 | 13 | 2,561 |

9.3. Anexo III: Concentraciones de *Enterococcus faecalis* durante los tratamientos electroquímicos

En las siguientes tablas, la Tabla 23 y 24, se pueden consultar las concentraciones de *E.faecalis* obtenidas y las desviaciones estándar calculadas durante los tratamientos electroquímicos que se realizaron en ARDS: electro-Fenton y fotoelectro-Fenton, respectivamente.

Los valores de la Tabla 23 quedan divididos en dos columnas, las cuales representan los dos catalizadores de hierro utilizados: la magnetita y la ferrita de bismuto.

Tabla 23. Concentraciones de *E.faecalis* en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Magnetita | | Ferrita de bismuto | |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 6,49E+06 | 6,99E+06 | 3,12E+07 | 9,81E+06 |
| 15 | 8,73E+06 | 9,02E+04 | 9,50E+06 | 2,83E+06 |
| 30 | 3,92E+06 | 2,12E+06 | 5,80E+06 | 4,24E+05 |
| 60 | 1,40E+06 | 1,96E+06 | 3,32E+06 | 2,61E+06 |
| 90 | 4,00E+04 | 5,52E+04 | 2,39E+06 | 1,19E+06 |

Por otro lado, en la Tabla 24, además de las columnas correspondientes a magnetita y ferrita de bismuto, se puede observar una tercera columna, correspondiente a un control de luz realizado para analizar de manera correcta la efectividad del tratamiento fotoelectro-Fenton.

Tabla 24. Concentraciones de *E.faecalis* en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con diferentes catalizadores de hierro. Elaboración propia.

| | Magnetita | | Ferrita de bismuto | | Control de luz |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| Tiempo (minutos) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) |
| 0 | 1,07E+07 | 3,79E+06 | 2,87E+07 | 1,32E+07 | 7,60E+06 |
| 15 | 1,03E+07 | 4,75E+05 | 1,39E+07 | 7,31E+06 | - |
| 30 | 6,84E+06 | 8,42E+06 | 1,20E+07 | 1,26E+07 | 6,80E+06 |
| 60 | 3,73E+06 | 3,01E+05 | 6,88E+03 | 1,94E+03 | - |
| 90 | 2,70E+05 | 1,00E+05 | 4,75E+03 | 1,06E+03 | 5,59E+06 |

9.4. Anexo IV: Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos durante los tratamientos electroquímicos para la desinfección de *Enterococcus faecalis*

Las Tablas 25 y 26 recogen los datos de concentraciones de peróxido de hidrógeno producidas durante el tratamiento electro-Fenton para la eliminación de *E.faecalis*, además de el voltaje y corriente eléctrica aplicados. La Tabla 25 presenta los valores obtenidos durante el tratamiento en el que se usó magnetita como catalizador y la Tabla 26, aquellos obtenidos cuando se usó ferrita de bismuto.

Tabla 25. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con magnetita para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,15 | 8 | 0 |
| 15 | 4,15 | 8 | 0,975 |
| 30 | 4,18 | 8 | 1,807 |
| 60 | 4,23 | 9 | 3,059 |
| 90 | 4,28 | 10 | 3,639 |

Tabla 26. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de electro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,10 | 9 | 0 |
| 15 | 4,10 | 9 | 1,405 |
| 30 | 4,10 | 9 | 2,312 |
| 60 | 4,10 | 9 | 3,610 |
| 90 | 4,10 | 9 | 3,766 |

Las Tablas 27 y 28 recogen los datos de concentraciones de peróxido de hidrógeno producidas durante el tratamiento fotoelectro-Fenton para la inactivación de *E.faecalis*, junto al voltaje y corriente eléctrica utilizados. La Tabla 27 presenta los valores obtenidos durante el tratamiento en el que se usó magnetita como catalizador y la Tabla 28, aquellos obtenidos cuando se usó ferrita de bismuto.

Tabla 27. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con magnetita para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,08 | 11 | 0 |
| 15 | 4,08 | 11 | 1,309 |
| 30 | 4,08 | 12 | 2,129 |
| 60 | 4,08 | 12 | 2,804 |
| 90 | 3,95 | 11 | 2,837 |

Tabla 28. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en ARDS durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.faecalis*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 4,10 | 8 | 0 |
| 15 | 4,10 | 10 | 1,343 |
| 30 | 4,08 | 11 | 2,252 |
| 60 | 4,00 | 11 | 2,634 |
| 90 | 3,98 | 11 | 2,674 |

9.5. Anexo V: Concentraciones de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto

La Tabla 29 muestra las concentraciones de ambas bacterias estudiadas y la desviación estándar calculada a partir de los datos obtenidos realizando duplicados de cada ensayo. Estos ensayos consistieron en la aplicación del tratamiento fotoelectro-Fenton con BiFeO₃ para la eliminación de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en una muestra real de agua de salida de la EDAR de Tudela.

Tabla 29. Concentraciones de *E.coli* y *E.faecalis* en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto. Elaboración propia.

| <i>E.coli</i> | | <i>E.faecalis</i> | | |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Tiempo (minutos) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) | Concentración (UFC/100mL) | Desv. est. (UFC/100mL) |
| 0 | 5,87E+06 | 1,65E+06 | 2,11E+07 | 3,71E+06 |
| 15 | 6,50E+04 | 1,41E+04 | 2,10E+05 | 1,56E+05 |
| 30 | 5,50E+03 | 5,20E+03 | 1,28E+05 | 3,54E+03 |
| 60 | 1,00E+03 | - | 8,25E+03 | 3,54E+02 |
| 90 | 1,00E+03 | - | 8,00E+03 | 3,54E+03 |

9.6. Anexo VI: Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*

La Tabla 30 presenta las concentraciones de H₂O₂ obtenidas y el voltaje y la corriente eléctrica aplicados en el tratamiento fotoelectro-Fenton con BiFeO₃ para la eliminación de *Escherichia coli* en una muestra real de agua de salida de la EDAR de Tudela. Los mismos datos son mostrados en la Tabla 31, pero corresponden a la eliminación de *Enterococcus faecalis* en las mismas condiciones operativas, es decir, se utilizó la misma matriz, tratamiento y catalizador.

Tabla 30. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.coli*. Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 5,65 | 8 | 0 |
| 15 | 5,65 | 11 | 1,427 |
| 30 | 5,58 | 11 | 2,929 |
| 60 | 5,25 | 9 | 4,842 |
| 90 | 5,15 | 10 | 5,664 |

Tabla 31. Concentraciones de H₂O₂ y parámetros electroquímicos en agua residual depurada real durante el tratamiento de fotoelectro-Fenton con ferrita de bismuto para la desinfección de *E.faecalis*.
Elaboración propia.

| Tiempo (minutos) | Voltaje (V) | Corriente eléctrica (mA) | H ₂ O ₂ (mg/L) |
|------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 6,00 | 7 | 0 |
| 15 | 6,00 | 9 | 1,991 |
| 30 | 5,80 | 11 | 3,311 |
| 60 | 5,65 | 12 | 5,248 |
| 90 | 5,15 | 9 | 5,338 |