

Pilar Valero Lázaro

Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación

Departamento
Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

Director/es

Mosteo Abad, Rosa
Ormad Melero, María Peña

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones



Tesis Doctoral

REGENERACIÓN DE AGUAS DE SALIDA DE DEPURADORA MEDIANTE PROCESOS CONVENCIONALES Y AVANZADOS DE OXIDACIÓN

Autor

Pilar Valero Lázaro

Director/es

Mosteo Abad, Rosa
Ormad Melero, María Peña

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2017



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación

Memoria

que para optar al Grado de Doctora
por la Universidad de Zaragoza

presenta

Dña. Pilar Valero Lázaro

Zaragoza, Marzo de 2017



Dña. M^a PEÑA ORMAD MELERO Catedrática de Universidad y Dña. ROSA MOSTEO ABAD Profesora Titular, Profesoras del Área de Tecnologías del Medio Ambiente en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN,

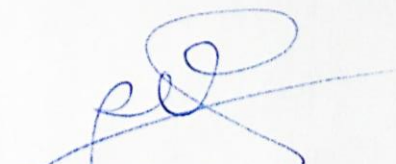
Que el trabajo contenido en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada:

“Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación” realizada por Dña. PILAR VALERO LÁZARO, ha sido realizado bajo nuestra dirección y se corresponde y adecúa al proyecto de tesis aprobado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Zaragoza, a 30 de marzo de 2017.



Fdo.: Prof.^a Dra. M^a Peña Ormad



Fdo. Prof.^a Dra. Rosa Mosteo

Deseo agradecer a todas aquellas personas que han compartido conmigo algún momento a lo largo de todos estos años y que han hecho posible esta tesis, porque ha sido una experiencia no solo profesional sino también personal de la que siempre tendré un buen recuerdo. Por eso, quiero dar las gracias a...

...a la Dra. Rosa Mosteo, por su dirección en la realización de esta tesis, por su dedicación, por su optimismo, por sus conocimientos y su confianza.

...a la Dra. M^a Peña Ormad, por su dirección a lo largo de esta tesis, por sus consejos, por su confianza, por su disposición y su tiempo.

...a José Luis Ovelleiro, por darme la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación, por todo su apoyo y sus ánimos.

...a la Diputación General de Aragón, por la beca predoctoral de investigación concedida.

...a Pili Goñi, Munia y Jorge, por introducirme en el mundo de la microbiología, por sus conocimientos y su ayuda.

...a todos los compañeros de laboratorio que he tenido durante estos años. En especial, quiero dar las gracias a Sarah y Judith, por su colaboración, su paciencia y su interés. A Noelia, Andrea, Silvia y Nati, por su ayuda y su apoyo. También a tantos otros con los que he compartido laboratorio estos años: María, Isabel, Jorge, Lucía, Sara, José, Óscar, Jesús, Josean, Carlos, Loreto, Elena, Diego..., todos habéis contribuido de alguna manera en la realización de este trabajo.

...al departamento, en especial a Pilar Sánchez, Pilar Vilas y Carlos Finol, por estar siempre dispuestos a ayudar.

...al Dr. José María Quiroga y a la Dra. Asunción Acevedo, por hacer posible mi estancia en la Universidad de Cádiz, por su supervisión y sus consejos. A los compañeros de laboratorio del grupo Tecnologías del Medio Ambiente, en especial a María José y Mercedes por sus conocimientos y su ayuda en la realización de los ensayos a escala piloto.

...al Dr. Ricardo Torres, por darme la oportunidad de trabajar en la Universidad de Antioquia, por sus conocimientos y su supervisión. Al Dr. Javier Silva, por su ayuda y su disposición en todo momento. En especial, gracias a Martha por su colaboración y su paciencia. A todos los demás compañeros del grupo GIRAB: Duván, Paola, Dayana, Karen, Florian, Efraím, Lic, Luis, Laura..., por vuestra alegría. Un agradecimiento especial a Mar, por acompañarme en nuestra aventura en Colombia.

...al Dr. César Pulgarin, por darme la oportunidad de trabajar en l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne, por su sabiduría y sus consejos. Al Dr. Stefanos Giannakis, por su supervisión y su disposición, por su dedicación y su paciencia. A todos mis compañeros de laboratorio en el GPAO, en especial a Laura, Marco, Christian, Margaux y Paola, por animar siempre el laboratorio, por las tardes en el Sat y por todos los buenos momentos que compartimos.

...al programa de movilidad becas Iberoamérica del banco Santander y al programa Ibercaja-CAI de estancias de investigación, por las becas otorgadas para poder realizar mis estancias en Colombia y en Suiza.

...a toda mi familia, en especial a mi madre, Luisa, y a mis hermanas, Clara e Isabel, por todo su apoyo y sus ánimos a lo largo de estos años.

...a todos mis amigos y amigas, en especial a Mónica, Lorena y Bea, por estar siempre dispuestas a escucharme y a animarme. A Ángel, por ayudarme a desconectar cuando lo necesitaba. Gracias también a Juli, por ver siempre el lado positivo de las cosas y por hacerme reír.

...a José Luis, por compartir tanto los momentos buenos como los malos durante todos estos años y creer siempre en mí.

A todos vosotros, por hacer esto posible, mil gracias.

A mi madre, Luisa, y a mis hermanas, Clara e Isabel

A José Luis

Summary

More and more, water resources are increasingly coming under stress, leading to water scarcity and quality deterioration. In this context, a wider reuse of treated wastewater appears as an alternative solution to the use of drinking or pre-drinking water for some applications. Thus, wastewater reuse can help lower the pressure on freshwater resources, reducing and preventing pollution of surface water, as well as the overexploitation of aquifers (Draft_V.3.2, 2016).

Urban wastewaters are regulated by the Directive 91/271/CEE, which establishes the maximum concentrations for BOD₅, COD and total suspended solids, but which does not include any microbiological control. As a consequence, conventional wastewater treatment plants (WWTPs) lack of any specific process for disinfection. This fact, along with the fecal origin of the wastewaters, leads to the presence of multitude microorganisms in treated wastewaters, being some of them potentially pathogenic (Levantesi et al., 2010, Tonani et al. 2011, Mosteo et al., 2013).

On 7th December 2007, the Royal Decree 1620/2007 is published to establish the legal regimen for treated water reuse in Spain. Royal Decree 1620/2007 introduces the denomination of reclaimed waters, defined as the treated wastewaters which, where appropriate, have been submitted to an additional or complementary treatment to meet specific water quality criteria with the intent of being used for a range of purposes. Moreover, this Royal Decree includes the quality criteria for the water reuse according to their final use (municipal, agricultural, industrial, recreational or environmental), establishing maximum allowable values for *Escherichia coli*, *Legionella* spp. or *Salmonella* spp., among other parameters.

Therefore, due to the regulations of the Royal Decree 1620/2007, it is necessary to apply additional treatments to adapt the quality of the water being reused so that it meets the legal maximum allowable values. As a consequence, water reclamation facilities have been built and their number and capacity have been increasing over the last years. Towards the end of 2015, Spain had a production of 500 hm³/year of reclaimed water, obtained in more than 320 treated water reclamation plants, mainly located in the Mediterranean coast, the Balearic and Canary archipelagoes and the Madrid Region (MAGRAMA, 2015). Water reclamation plants include, in general, a physical-chemical treatment with sedimentation, followed by sand filters and UV radiation as disinfection step, combined with sodium hypochlorite as the residual disinfectant agent. When water of higher quality

is required, ultrafiltration membrane systems are also used (Plan Nacional de Reutilización de Aguas, 2010).

Against the drawbacks of the conventional disinfection technologies, such as the generation of undesirable organo-halogenated products during chlorination or the fouling of the UV lamps due to the presence of solids or lime, the advanced oxidation processes (AOPs) emerge as an alternative. These technologies are based on the generation of reactive oxygen species (ROS), such as the hydroxyl radical, which have a high oxidizing and disinfectant power (Parsons, 2004).

Among the AOPs, there are several treatments which could be applied for disinfection, such as ozonation combined with hydrogen peroxide, photocatalysis with TiO_2 and the Fenton and photo-Fenton processes.

The research group “Water Quality and Treatment” from the University of Zaragoza, in which this Doctoral Thesis has been carried out, has conducted previous studies, within the framework of the research project “Application of advanced oxidation technologies for the treatment of natural waters from the Ebro River basin” (CTM2005-04585/TECNO), in which the disinfectant power of different treatments such as chlorination, ozonation, peroxone system ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), photocatalysis (UVA-vis/ TiO_2) and photocatalysis with hydrogen peroxide (UVA-vis/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$), have been evaluated for drinking water production (Lanao, 2012). Besides, within the framework of the research project “Treated water reclamation by advanced oxidation processes” (CTM2008-01876/TECNO), the Fenton ($\text{Fe}^{2+/3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) and photo-Fenton (UVA-vis/ $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) processes have been applied to the inactivation of bacteria present in WWTPs effluents (Rodríguez-Chueca, 2013).

In this research work the efficiency of different disinfection processes is evaluated with the bacteria *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus*. The bacterium *E. coli* is commonly used in bibliography as indicator of the disinfection power (Malato et al., 2009, Cho et al., 2010, Spuhler et al., 2010, Moncayo-Lasso et al., 2012, Giannakis et al., 2014, Fagan et al., 2016, Villegas-Guzman et al., 2017). In addition, in this Doctoral Thesis, the research into photocatalysis with a new commercial TiO_2 is carried out and the possible recovery and reuse of this TiO_2 is evaluated. Moreover, the bacterial inactivation efficiency of the photo-electro-Fenton process is studied, a treatment in which the H_2O_2 is generated in an electrolytic cell and on which there are little available references regarding disinfection.

This Doctoral thesis has been carried out within the framework of the research projects “Treated water reclamation by advanced oxidation processes” (CTM2008-01876/TECNO) and “Process evaluation on the treatment of WWTPs water and sludge, for the reduction of microorganisms with health and environmental risks” (CRM2013-41397-R). It also has the funding of the Aragón Government for pre-doctoral grants aimed to the training and recruitment of researchers.

The main objective of this research work is the study of several AOPs which might be suitable as alternatives or complements to the conventional disinfection treatments and which are focused on the removal of bacterial indicators of fecal pollution (*Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus*) present in WWTPs effluents, with the aim of achieving reclaimed water susceptible of being reused.

This main objective includes the following secondary objectives:

- Study of the evolution of the microbial concentrations, especially of the indicator bacteria *Enterococcus* spp. along the treatment stages of a conventional WWTP, in the water line as well as in the sludge line.
- Research into the disinfectant power of conventional treatments and AOPs in WWTP effluents. Among them, chlorination, ozonation (O₃), peroxone system (O₃/H₂O₂), UVA-vis irradiation, UVA-vis/H₂O₂, TiO₂ photocatalysis (UVA-vis/TiO₂), UVA-vis/TiO₂/H₂O₂, electrochemical disinfection, electron-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂) and photo-electro-Fenton (UVA/Fe^{2+/3+}/H₂O₂) processes are evaluated. The variables which can affect the efficiency processes are analyzed: treatment time, type and dose of reagents, type of bacteria, type of water, etc.
- Kinetic modelling of the bacterial inactivation results obtained by the different disinfection treatment applied.
- Estimation of operational costs for each of the applied treatments, considering the cost of the reagents and the electricity consumption.

This Doctoral Thesis has been carried out in the research group “Water Quality and Treatment” of the University of Zaragoza. Besides, this project includes the results obtained during pre-doctoral research stays at the group “Environmental Technology” led by the Professor José María Quiroga Alonso, from the University of Cádiz in Spain; at the “Research Group on Environmental Remediation and Biocatalysis” led by the PhD Ricardo Torres Palma from the University of Antioquia in Colombia, research stay funded by a grant Iberoamérica from the Banco Santander for young professors and researchers, and at the “Group of Advanced Oxidation Processes” led by PhD César Pulgarin from the “École

Polytechnique Fédéral de Lausanne” in Switzerland, stay funded by the Ibercaja-CAI program for research stays.

This Doctoral Thesis document is divided into nine chapters and three appendixes.

Chapter one, “**Introduction and objectives**”, describes the background and the aims of the research work.

Chapter two, “**Materials and methods**”, refers to the equipment, materials and methods used for the physical-chemical and microbiological characterization of the studied samples, along with the tools used for the data treatment.

Chapter three, “**Microbiological control for the reuse of municipal wastewaters**”, presents the risks related to the presence of microbiological pollution in wastewaters, the evolution of microorganisms along the different stages of a WWTP and the legal regulations concerning the treated water reuse. Moreover, a small introduction to the technologies suitable for the production of reclaimed water is included.

Chapter four, “**Bacterial inactivation by chlorination**”, describes the theoretical fundamentals of the chlorination technique, the experimental procedure conducted and the inactivation results obtained over the bacteria *E. coli* and *Enterococcus* sp.

In chapter five, “**Bacterial inactivation by ozonation processes**”, the theoretical fundamentals of the treatments ozonation and peroxone are presented and the experimentation and results obtained by ozonation and peroxone process at laboratory scale applied to *E. coli* and *Enterococcus* sp. inactivation and by ozonation at pilot scale applied to *E. coli* inactivation are included.

Chapter six, “**Bacterial inactivation by titanium dioxide photocatalysis**”, describes the theoretical fundamentals related to disinfection via UV radiation, solar radiation, solar radiation with H₂O₂, TiO₂ photocatalysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂. In addition, the experimental procedures and the *E. coli* and *Enterococcus* sp. inactivation results obtained through UVA-vis, UVA-vis/H₂O₂, UVA-vis/TiO₂ y UVA-vis/TiO₂/H₂O₂ are included.

Chapter seven, “**Bacterial inactivation by photo-electro-Fenton**”, presents the fundamentals of the Fenton and photo-Fenton processes, as well as the ones related to electro-Fenton and photo-electro-Fenton. It also shows the experimentation and results about the *Staphylococcus aureus* inactivation by photo-electro-Fenton and through the different systems that form this process, such as UVA radiation, electrochemical disinfection of electro-Fenton.

Finally, chapter eight “**Conclusions**” summarizes the main conclusions from the present research work and chapter nine “**References**” includes the references cited along the text. The main document is followed by three appendixes.

Results obtained from this research have resulted in the publications which are hereunder detailed:

- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Lázaro L., Ovelleiro J.L. 2015a. Inactivation of *Enterococcus* sp. by Conventional and Advanced Oxidation Processes in Synthetic Treated Urban Wastewater. *Ozone Science and Engineering* 37 (5), 467- 475.
- Valero P., Giannakis S., Mosteo R., Ormad M.P., Pulgarin C. 2017. Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal*, 313, 109-120.
- Miguel N., Lanao M., Valero P., Mosteo R., Ormad M.P. 2016. *Enterococcus* sp. Inactivation by Ozonation in Natural Water: Influence of H₂O₂ and TiO₂ and Inactivation Kinetics Modeling. *Ozone Science and Engineering* 38 (6), 443-451.

This research work has also resulted in the following contributions to congresses:

- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2013. Inactivation of *Enterococcus* sp. by Advanced Oxidation Processes in Treated Urban Wastewater. IOA & IUVA 2013 World Congress & Exhibition. Las Vegas, USA.
- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Guzmán J., Ovelleiro J.L. 2013. Application of AOPs for the inactivation of *Enterococcus* sp. in a WWTP effluent: kinetic modelling. 3rd European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes. Almería, España. ISBN: 978-84-15487-99-9.
- Valero P., Torres J., Guzmán J., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2014. Evaluación de la capacidad de inactivación bacteriana en aguas de un nuevo nano-TiO₂ comercial en suspensión. XI Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas. Alicante, España. ISBN: 978-84-616-9173-9.
- Valero P., Torres J., Ormad M.P., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2014. Evaluation of the bacterial inactivation capacity in water of a new commercial nano-TiO₂ suspension. 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering. Barcelona, España.
- Valero P., Rodríguez-Chueca J., López A., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2015. Desinfección de aguas de salida de depuradora mediante procesos avanzados de

oxidación basados en ozono y en irradiación UVA-visible. XIII Congreso Español de Salud Ambiental. Cartagena, España.

- Valero P., Mosteo R., De Castro R.M., Quero-Pastor M.J., Hinojosa M., Acevedo A., Ormad M.P. 2015b. Disinfection of simulated municipal wastewater effluent by ozonation at laboratory and pilot scale. IOA 2015 World Congress & Exhibition. Barcelona, España. ISBN: 979-10-92607-02-4.
- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2015. Estudio de recuperación y reutilización de TiO_2 en desinfección de aguas. I Congreso Colombiano de Procesos Avanzados de Oxidación. Manizales, Colombia.

Índice General

Índice de figuras.....	vi
Índice de tablas.....	xvi
<u>Capítulo 1. Introducción y objetivos.....</u>	1
<u>Capítulo 2. Materiales y métodos</u>	9
2.1. Metodología analítica para la caracterización de aguas.....	11
2.1.1. Análisis de parámetros microbiológicos.....	11
2.1.1.1. Equipos de laboratorio.....	11
2.1.1.2. Medios de cultivo.....	11
2.1.1.3. Método de siembra en superficie.....	12
2.1.1.4. Método de filtración de membrana.....	13
2.1.1.5. Incubación.....	14
2.1.1.6. Recuento e inactivación.....	14
2.1.1.7. Repetibilidad del método de análisis.....	15
2.1.1.8. Caracterización de cepas bacterianas: tinción de Gram.....	17
2.1.2. Análisis de parámetros físico-químicos.....	18
2.2. Procedimiento experimental de fortificación de muestras.....	25
2.2.1. Fortificación con <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp.....	25
2.2.2. Fortificación con <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.3. Metodología analítica para la caracterización de sólidos (TiO ₂).....	28
2.3.1. Difracción de Rayos X.....	28
2.3.2. Fluorescencia de Rayos X.....	28
2.3.3. Microscopia FESEM.....	29
2.4. Modelos cinéticos de inactivación microbiana.....	30
2.4.1. Descripción de modelos.....	30
2.4.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error.....	35
<u>Capítulo 3. Control microbiológico de aguas residuales urbanas para su reutilización.....</u>	37
3.1. Contaminación microbiológica en las aguas residuales urbanas.....	39
3.1.1. Riesgos de los microorganismos presentes en las aguas residuales urbanas.....	39
3.1.2. Indicadores microbiológicos de contaminación.....	43
3.2. Evolución de los microorganismos en una EDAR convencional.....	47
3.2.1. Aspectos generales.....	47
3.2.2. Descripción de la EDAR objeto de estudio.....	48
3.2.3. Puntos de muestreo y análisis realizados.....	50

3.2.4. Resultados.....	51
3.2.4.1. Evolución de los parámetros microbiológicos	51
3.2.4.2. Evolución de los parámetros físico-químicos.....	56
3.2.4.3. El agua residual depurada.....	57
3.3. Control de la contaminación microbiológica de aguas de salida de EDAR.....	59
3.3.1. Normas de calidad microbiológica en reutilización de aguas residuales depuradas.....	59
3.3.2. Tecnologías aplicables en la regeneración de aguas residuales depuradas.....	61
3.4. Conclusiones relativas a la evolución de los microorganismos en una EDAR convencional	64

Capítulo 4. Inactivación bacteriana mediante cloración 65

4.1. Antecedentes.....	67
4.2. Estudio del poder bactericida del hipoclorito de sodio.....	69
4.2.1. Muestras	69
4.2.2. Agentes desinfectantes empleados.....	70
4.2.3. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	71
4.3. Resultados y discusión	72
4.3.1. Evolución del cloro residual	72
4.3.2. Inactivación de <i>Escherichia coli</i>	73
4.3.3. Inactivación de <i>Enterococcus sp</i>	74
4.3.4. Inactivación bacteriana en función del parámetro CT	74
4.3.5. Modelización cinética	76
4.3.6. Costes de operación.....	82
4.4. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante cloración	83

Capítulo 5. Inactivación bacteriana mediante procesos de ozonización 85

5.1. Antecedentes.....	87
5.1.1. Ozonización.....	87
5.1.2. Proceso peroxona.....	90
5.2. Ensayos de O ₃ y O ₃ /H ₂ O ₂ a escala de laboratorio.....	91
5.2.1. Muestras	91
5.2.2. Agentes desinfectantes	92
5.2.2.1. Ozono: generación a escala de laboratorio	92
5.2.2.2. Peróxido de hidrógeno.....	94
5.2.3. Efecto de la matriz.....	94
5.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	94
5.2.3.2. Resultados y discusión.....	95
5.2.3.3. Modelización cinética	97
5.2.4. Efecto del tipo de bacteria	100

5.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	100
5.2.4.2. Resultados y discusión.....	100
5.2.4.3. Modelización cinética.....	103
5.2.5. Efecto del uso de H ₂ O ₂	105
5.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	105
5.2.5.2. Resultados y discusión.....	106
5.2.5.3. Modelización cinética.....	110
5.2.6. Costes de operación.....	114
5.3. Ensayos de O ₃ a escala piloto.....	117
5.3.1. Muestra.....	117
5.3.2. Agentes desinfectantes.....	117
5.3.3. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	118
5.3.4. Resultados y discusión.....	119
5.3.5. Modelización cinética.....	121
5.3.6. Costes de operación.....	125
5.4. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante procesos de ozonización	127
Capítulo 6. Inactivación bacteriana mediante fotocátalisis con dióxido de titanio 129	
6.1. Antecedentes.....	131
6.1.1. Radiación UV.....	131
6.1.2. Radiación solar.....	133
6.1.3. Radiación solar combinada con H ₂ O ₂	136
6.1.4. Fotocatálisis con TiO ₂	137
6.1.5. Fotocatálisis con TiO ₂ y H ₂ O ₂	139
6.2. Estudio del poder bactericida de agentes físicos y químicos en el proceso objeto de estudio: ensayos previos.....	141
6.2.1. Muestras.....	141
6.2.2. Agentes desinfectantes.....	141
6.2.2.1. Irradiación UVA-vis.....	141
6.2.2.2. Dióxido de titanio Degussa P25.....	143
6.2.2.3. Dióxido de titanio Levenger.....	144
6.2.2.4. Peróxido de hidrógeno.....	144
6.2.3. Efecto de la irradiación UVA-vis.....	145
6.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	145
6.2.3.2. Resultados y discusión.....	145
6.2.3.3. Modelización cinética.....	148
6.2.4. Efecto de la agitación y del TiO ₂ en oscuridad.....	150
6.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	150

6.2.4.2. Resultados y discusión.....	150
6.2.5. Efecto de la irradiación UVA-vis combinada con H ₂ O ₂	152
6.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	152
6.2.5.2. Resultados y discusión.....	152
6.2.5.3. Modelización cinética	154
6.3. Ensayos de fotocatalisis (UVA-vis/TiO ₂)	156
6.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	156
6.3.2. Resultados y discusión	156
6.3.2.1. Efecto de: concentración de TiO ₂ , tipo de TiO ₂ , tipo de bacteria y tipo de matriz.....	156
6.3.2.2. Reactivación bacteriana	161
6.3.3. Modelización cinética	163
6.4. Ensayos de fotocatalisis con H ₂ O ₂ (UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂).....	167
6.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación	167
6.4.2. Resultados y discusión	167
6.4.3. Modelización cinética	168
6.5. Separación y reutilización del TiO ₂	171
6.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	171
6.5.2. Resultados y discusión	171
6.6. Costes de operación.....	175
6.7. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante UVA-vis, UVA-vis/H ₂ O ₂ , UVA-vis/TiO ₂ y UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂	177

Capítulo 7. Inactivación bacteriana mediante procesos foto-electro-Fenton..... 181

7.1. Antecedentes	183
7.1.1. Procesos Fenton y foto-Fenton.....	183
7.1.2. Procesos electro-Fenton y foto-electro-Fenton	185
7.2. Estudio del poder bactericida de agentes físicos y químicos en el proceso objeto de estudio: ensayos previos.....	187
7.2.1. Muestras	187
7.2.2. Agentes desinfectantes	187
7.2.2.1. Sal de Fe ²⁺	187
7.2.2.2. Sal de Fe ³⁺	187
7.2.2.3. Irradiación UVA.....	187
7.2.2.4. Celda electrolítica.....	187
7.2.3. Efecto del pH del medio	188
7.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	188
7.2.3.2. Resultados y discusión.....	188
7.2.4. Efecto de la irradiación UVA.....	189
7.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	189

7.2.4.2. Resultados y discusión.....	190
7.2.5. Efecto de la celda electrolítica (desinfección electroquímica).....	191
7.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	191
7.2.5.2. Resultados y discusión.....	192
7.2.6. Efecto de la combinación de la celda electrolítica con irradiación UVA (desinfección foto- electroquímica).....	194
7.2.6.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	194
7.2.6.2. Resultados y discusión.....	194
7.2.7. Efecto de la combinación de la celda electrolítica y Fe ²⁺ (proceso electro-Fenton).....	196
7.2.7.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	196
7.2.7.2. Resultados y discusión.....	196
7.2.8. Modelización cinética	198
7.3. Estudio del poder bactericida del proceso foto-electro-Fenton	202
7.3.1. Proceso foto-electro-Fenton.....	202
7.3.1.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	202
7.3.1.2. Resultados y discusión.....	202
7.3.2. Efecto de la intensidad de corriente.....	204
7.3.2.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	204
7.3.2.2. Resultados y discusión.....	204
7.3.3. Efecto del tipo de hierro	207
7.3.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	207
7.3.3.2. Resultados y discusión.....	208
7.3.4. Efecto del tipo de ánodo	209
7.3.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación.....	209
7.3.4.2. Resultados y discusión.....	210
7.3.5. Modelización cinética	211
7.4. Costes de operación.....	216
7.5. Estudio comparativo de la eficacia de procesos foto-Fenton y foto-electro-Fenton...	220
7.6. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante procesos foto-electro- Fenton	224
<u>Capítulo 8. Conclusiones.....</u>	227
<u>Capítulo 9. Referencias.....</u>	235
Anexo I	259
Anexo II	281
Anexo III	285

Índice de Figuras

Capítulo 2

Figura 2.1. Esquema del método de diluciones decimales seriadas.....	12
Figura 2.2. Método de filtración por membrana.....	13
Figura 2.3. Método de la tinción de Gram	18
Figura 2.4. Analizador de Carbono Orgánico Total SHIMADZU, modelo TOC-VCSH	19
Figura 2.5. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento	26
Figura 2.6. Colonias de <i>Enterococcus</i> sp. en agar nutritivo	26
Figura 2.7. Equipo de difracción de rayos X.....	28
Figura 2.8. Equipo de fluorescencia de rayos X.....	29
Figura 2.9. Microscopio FESEM	29
Figura 2.10. Curvas de inactivación microbiana (Gyürék y Finch, 1998).....	30

Capítulo 3

Figura 3.1. Envoltura de una bacteria a) Gram-positiva y b) Gram-negativa (Willey et al., 2009).....	39
Figura 3.2. Vías de transmisión e infección de patógenos presentes en las aguas	42
Figura 3.3. Plano de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Tudela	49
Figura 3.4. Puntos de muestreo en la EDAR de Tudela.....	50
Figura 3.5. Evolución de la concentración de <i>Enterococcus</i> spp. a lo largo de la línea de aguas. Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).....	52
Figura 3.6. Evolución de la concentración de <i>Escherichia coli</i> a lo largo de la línea de aguas (Marín et al., 2015). Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).....	53
Figura 3.7. Evolución de la concentración de <i>Enterococcus</i> spp. a lo largo de la línea de fangos. Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).....	53
Figura 3.8. Evolución de la concentración de <i>E. coli</i> a lo largo de la línea de fangos (Marín et al., 2015). Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).....	54
Figura 3.9. Posibles esquemas de tratamiento en una ERAR (Rodríguez-Chueca, 2013)	62

Capítulo 4

Figura 4.1. Planta de lodos activos	69
Figura 4.2. Evolución del cloro libre residual durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro inicial.....	72
Figura 4.3. Inactivación de <i>Escherichia coli</i> durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro.....	73
Figura 4.4. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro.....	74
Figura 4.5. Inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en los ensayos de cloración en función del parámetro CT.....	75
Figura 4.6. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de cloración sobre <i>E. coli</i> con dosis de: a) 4 mg/L de Cl ₂ , b) 15 mg/L de Cl ₂ y c) 30 mg/L de Cl ₂	78
Figura 4.7. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de cloración sobre <i>Enterococcus</i> sp. con dosis de: a) 4 mg/L de Cl ₂ , b) 15 mg/L de Cl ₂ , c) 30 mg/L de Cl ₂ y d) 65 mg/L de Cl ₂	79

Capítulo 5

Figura 5.1. Esquema de la instalación de ozonización	92
Figura 5.2. Recta de calibrado del ozonizador	94
Figura 5.3. Inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización en ARPF y ARDS, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.	95
Figura 5.4. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre <i>E. coli</i> en ARDS.....	98
Figura 5.5. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre <i>E. coli</i> en ARPF.....	99
Figura 5.6. Inactivación de <i>E. coli</i> y de <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.....	101
Figura 5.7. Consumo de ozono necesario para inactivar cada unidad logarítmica de <i>E. coli</i> y de <i>Enterococcus</i> sp. durante el tratamiento de ozonización en ARPF.....	102
Figura 5.8. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.....	104
Figura 5.9. Inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización y peroxona en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.	107

Figura 5.10. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización y peroxona en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.....	108
Figura 5.11. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación de los tratamientos peroxona sobre <i>Escherichia coli</i> en ARPF: a) O ₃ + 1,4 mg H ₂ O ₂ /L y b) O ₃ + 20 mg H ₂ O ₂ /L.....	112
Figura 5.12. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación de los tratamientos peroxona sobre <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF: a) O ₃ + 1,4 mg H ₂ O ₂ /L y b) O ₃ + 20 mg H ₂ O ₂ /L.....	113
Figura 5.13. Costes de operación por unidad logarítmica inactivada mediante los tratamientos de ozonización y peroxona a escala de laboratorio.	115
Figura 5.14. Esquema de la instalación de ozonización a escala piloto.....	117
Figura 5.15. Inactivación de <i>Escherichia coli</i> en agua residual depurada sintética mediante ozonización a escala piloto en función de a) tiempo de tratamiento y b) ozono introducido.....	119
Figura 5.16. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>E. coli</i> obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización a escala piloto con aire: a) 5 g O ₃ /h y b) 11 g O ₃ /h	123
Figura 5.17. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>E. coli</i> obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización a escala piloto con oxígeno y a) 39 g O ₃ /h, b) oxígeno y 41 g O ₃ /h.....	124
Figura 5.18. Costes de operación por unidad logarítmica inactivada de <i>E.coli</i> en ARDS mediante los tratamientos de ozonización a escala piloto.....	125

Capítulo 6

Figura 6.1. Espectro de radiación ultravioleta-visible	131
Figura 6.2. Descripción gráfica del tratamiento SODIS (McGuigan et al., 2012).	134
Figura 6.3. Formación del par hueco-electrón en una partícula de TiO ₂ (Chong et al., 2010).	137
Figura 6.4. Cámara de simulación solar	142
Figura 6.5. Espectro solar natural (línea azul) y simulado: sin filtro de ventana (línea morada) y con filtro de "vidrio de ventana" (línea rosa) (Miguel, 2010).....	142
Figura 6.6. Caracterización del TiO ₂ Degussa P25: a) difractograma XRD y b) imagen FESEM.	143
Figura 6.7. Caracterización del TiO ₂ Levenger: a) difractograma XRD y b) imagen FESEM.....	144
Figura 6.8. Inactivación bacteriana mediante irradiación UVA-vis: a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl, d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.....	146
Figura 6.9. Reactivación bacteriana tras la exposición a irradiación UVA-vis durante diferentes tiempos de tratamiento: a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c)	

<i>Enterococcus</i> sp. en NaCl, d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF. Las barras de error representan el error del análisis.....	147
Figura 6.10. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas mediante irradiación UVA-vis de: a) <i>E. coli</i> en solución salina, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en solución salina, d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.	149
Figura 6.11. Inactivación bacteriana durante los ensayos control en oscuridad para evaluar el efecto de la agitación y la presencia de TiO ₂ sobre: a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl y d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.	151
Figura 6.12. Inactivación de <i>E. coli</i> y de <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/H ₂ O ₂ con distintas concentraciones de H ₂ O ₂	152
Figura 6.13. Inactivación bacteriana en ARPF mediante UVA-vis/H ₂ O ₂ con 680 mg H ₂ O ₂ /L. a) <i>E. coli</i> y b) <i>Enterococcus</i> sp.	153
Figura 6.14. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas en ARPF mediante irradiación UVA-vis con 680 mg H ₂ O ₂ /L de: a) <i>E. coli</i> y b) <i>Enterococcus</i> sp.	155
Figura 6.15. Inactivación bacteriana tras 60 minutos de tratamiento UVA-vis/TiO ₂ con varias concentraciones de TiO ₂ : a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl y d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.	157
Figura 6.16. Inactivación bacteriana en presencia de irradiación UVA-vis y 1 g /L de TiO ₂ Degussa P25 o Levenger: a) a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl y d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.	160
Figura 6.17. Reactivación bacteriana tras la exposición a UVA-vis/TiO ₂ durante diferentes tiempos de tratamiento: a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl, d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF. Las barras de error representan el error del análisis.....	162
Figura 6.18. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>E. coli</i> obtenidas mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO ₂ /L: a) NaCl y TiO ₂ Degussa P25, b) NaCl y TiO ₂ Levenger, c) ARPF y TiO ₂ Degussa P25, d) ARPF y TiO ₂ Levenger.....	165
Figura 6.19. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. obtenidas mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO ₂ /L: a) NaCl y TiO ₂ Degussa P25, b) NaCl y TiO ₂ Levenger, c) ARPF y TiO ₂ Degussa P25, d) ARPF y TiO ₂ Levenger.....	166
Figura 6.20. Inactivación de <i>E. coli</i> y de <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂ con distintas concentraciones de H ₂ O ₂	167
Figura 6.21. Inactivación bacteriana en ARPF mediante UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂ con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 y 680 mg H ₂ O ₂ /L. a) <i>E. coli</i> y b) <i>Enterococcus</i> sp.	168
Figura 6.22. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas en ARPF mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO ₂ /L y 680 mg H ₂ O ₂ /L: a) <i>E. coli</i> y b) <i>Enterococcus</i> sp.....	169
Figura 6.23. Evolución de la turbidez de la fase clarificada en: a) NaCl y b) ARPF.....	172

Figura 6.24. Inactivación bacteriana mediante TiO ₂ /UVA-vis durante 4 ciclos de reutilización del catalizador: a) <i>E. coli</i> en NaCl, b) <i>E. coli</i> en ARPF, c) <i>Enterococcus</i> sp. en NaCl y d) <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.....	173
---	-----

Capítulo 7

Figura 7.1. Mecanismo de inactivación celular en el proceso foto-Fenton a pH casi neutro (Giannakis et al., 2016a).....	184
Figura 7.2. Esquema de la celda electrolítica utilizada en los ensayos electroquímicos.	188
Figura 7.3. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y b) el pH durante el ensayo a pH 3.	189
Figura 7.4. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> , la acumulación de oxidantes totales y H ₂ O ₂ y b) el pH, durante el tratamiento de irradiación UVA en ARDS.	190
Figura 7.5. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ y b) el pH, durante el tratamiento de desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO ₂ _20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 20 mA.....	193
Figura 7.6. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ y b) el pH, durante el tratamiento de desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO ₂ _20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ durante el ensayo Control 20 mA.....	195
Figura 7.7. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento electro-Fenton (EF, GDE+IrO ₂ +5mg Fe ²⁺ /L_20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ durante el ensayo Control 20 mA.....	197
Figura 7.8. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenida mediante irradiación UVA.....	199
Figura 7.9. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenida mediante desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO ₂ _20 mA).....	200
Figura 7.10. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenida mediante desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO ₂ +UVA_20 mA).....	200
Figura 7.11. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenida mediante electro-Fenton (EF, GDE+IrO ₂ +5mg Fe ²⁺ /L_20 mA).....	200
Figura 7.12. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 20 mA (FEF_20 mA, GDE+IrO ₂ +UVA+5mg Fe ²⁺ /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ durante el ensayo Control 20 mA.	203
Figura 7.13. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 30 mA (FEF_30 mA, GDE+IrO ₂ +UVA+5mg Fe ²⁺ /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 30 mA.	205

Figura 7.14. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 40 mA (FEF_40 mA, GDE+IrO ₂ +UVA+5mg Fe ²⁺ /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 40 mA.	206
Figura 7.15. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 30 mA (FEF_Fe ³⁺ _30 mA, GDE+IrO ₂ +UVA+5mg Fe ³⁺ /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H ₂ O ₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 30 mA.	208
Figura 7.16. Evolución de a) la concentración de <i>S. aureus</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento de la muestra ARDS mediante foto-electro-Fenton con ánodo de titanio, Fe ³⁺ y una intensidad de 30 mA (FEF_Fe ³⁺ _Ti_30 mA, GDE+Ti+UVA+5 mg Fe ³⁺ /L).	210
Figura 7.17. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 20 mA (FEF 20 mA, GDE+IrO ₂ +Fe ²⁺ +UVA).	213
Figura 7.18. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 30 mA (FEF 30 mA, GDE+IrO ₂ +Fe ²⁺ +UVA).	213
Figura 7.19. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 40 mA (FEF 40 mA, GDE+IrO ₂ +Fe ²⁺ +UVA).	213
Figura 7.20. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con Fe ³⁺ (FEF Fe ³⁺ 30 mA, GDE+IrO ₂ +5 mg Fe ³⁺ /L+UVA).	214
Figura 7.21. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con ánodo de Ti (FEF Fe ³⁺ _Ti_30 mA, GDE+Ti+5 mg Fe ³⁺ /L+UVA).	214
Figura 7.22. Costes de operación para alcanzar distintos niveles de inactivación de <i>S. aureus</i> mediante desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y foto-electro-Fenton (FEF) bajo distintas condiciones de operación.	218
Figura 7.23. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. mediante foto-Fenton (FF) e inactivación de <i>S. aureus</i> mediante foto-electro-Fenton (FEF) en ARDS. [Fe ⁿ⁺]= 5 mg/L.	220
Figura 7.24. Costes de operación para alcanzar distintos niveles de inactivación bacteriana en ARDS mediante foto-Fenton (FF) y foto-electro-Fenton (FEF) bajo distintas condiciones de operación. [Fe ⁿ⁺]= 5 mg/L.	222
Figura 7.25. Costes de operación estimados para el H ₂ O ₂ comercial y el H ₂ O ₂ electrogenerado.	222

Anexo I

- Figura I. I. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 4 mg Cl₂/L.....261
- Figura I. II. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 15 mg Cl₂/L.....261
- Figura I. III. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 30 mg Cl₂/L.....261
- Figura I. IV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 4 mg Cl₂/L.....262
- Figura I. V. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 15 mg Cl₂/L.....262
- Figura I. VI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 30 mg Cl₂/L.....262
- Figura I. VII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 65 mg Cl₂/L.....263
- Figura I. VIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Escherichia coli* en agua residual depurada sintética. (ARDS).....264
- Figura I. IX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Escherichia coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).264
- Figura I. X. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).265
- Figura I. XI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).265
- Figura I. XII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 20 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).266

- Figura I. XIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).....266
- Figura I. XIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 20 mg H₂O₂/L sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).....267
- Figura I. XV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con aire y 5 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).....267
- Figura I. XVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con aire y 11 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética. (ARDS).....268
- Figura I. XVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con O₂ y 39 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).....268
- Figura I. XVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con O₂ y 41 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).....269
- Figura I. XIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *E. coli* en solución salina (NaCl). 270
- Figura I. XX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *E. coli* en ARPF.....270
- Figura I. XXI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *Enterococcus* sp. en solución salina (NaCl).....270
- Figura I. XXII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *Enterococcus* sp. en ARPF.....271
- Figura I. XXIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis + 680 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en ARPF.....271
- Figura I. XXIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental

observada durante el tratamiento UVA-vis + 680 mg H ₂ O ₂ /L sobre <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.....	271
Figura I. XXV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 sobre <i>E. coli</i> en la solución salina (NaCl).....	272
Figura I. XXVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Levenger sobre <i>E. coli</i> en la solución salina (NaCl).....	272
Figura I. XXVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 sobre <i>E. coli</i> en ARPF.....	272
Figura I. XXVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Levenger sobre <i>E. coli</i> en ARPF.	273
Figura I. XXIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 sobre <i>Enterococcus</i> sp en solución salina (NaCl).....	273
Figura I. XXX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Levenger sobre <i>Enterococcus</i> sp en solución salina (NaCl).....	273
Figura I. XXXI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 sobre <i>Enterococcus</i> sp en ARPF.....	274
Figura I. XXXII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis con 1 g/L TiO ₂ Levenger sobre <i>Enterococcus</i> sp en ARPF.....	274
Figura I. XXXIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis/H ₂ O ₂ con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 y 680 mg H ₂ O ₂ /L sobre <i>E. coli</i> en ARPF.....	274
Figura I. XXXIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO ₂ /UVA-vis/H ₂ O ₂ con 1 g/L TiO ₂ Degussa P25 y 680 mg H ₂ O ₂ /L sobre <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF.....	275

- Figura I. XXXV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de irradiación UVA sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....276
- Figura I. XXXVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO₂_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....276
- Figura I. XXXVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO₂+UVA_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....277
- Figura I. XXXVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento electro-Fenton (EF, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.277
- Figura I. XXXIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 20 mA (FEF 20 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....278
- Figura I. XL. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 30 mA (FEF 30 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....278
- Figura I. XLI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 40 mA (FEF 40 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....279
- Figura I. XLII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con Fe³⁺ (FEF Fe³⁺ 30 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe³⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.....279
- Figura I. XLIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con ánodo de Ti (FEF Fe³⁺_Ti_30 mA, GDE+Ti+5 mg Fe³⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.280

Anexo II

- Figura II. I. Acumulación de oxidantes totales y H₂O₂ durante los tratamientos electroquímicos.....283

Índice de Tablas

Capítulo 2

Tabla 2.1. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos	11
Tabla 2.2. Medios de cultivo utilizados en los análisis microbiológicos.....	12
Tabla 2.3. Tiempo, temperatura y norma de análisis aplicada a cada bacteria estudiada	14
Tabla 2.4. Equivalencia entre unidades logarítmicas de inactivación y porcentajes de inactivación	15
Tabla 2.5. Cálculo del coeficiente de variación del método de siembra en superficie para <i>Enterococcus</i> sp.	16
Tabla 2.6. Coeficientes de variación de los métodos de siembra en superficie y filtración de membrana en el análisis de <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> sp. y <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Tabla 2.7. Equipos de laboratorio Instrumentación, metodología, rango de medida y error para la caracterización físico-química de las muestras de agua.....	24
Tabla 2.8. Modelos cinéticos aplicados en el presente trabajo.....	34
Tabla 2.9. Modelos cinéticos aplicados en estudios previos del grupo Calidad y Tratamiento de Aguas.....	34
Tabla 3.1. Enfermedades bacterianas de transmisión hídrica (USEPA, 2012).....	41
Tabla 3.2. Enfermedades parasitarias (helmintos y protozoos) de transmisión hídrica (USEPA, 2012).....	41

Capítulo 3

Tabla 3.3. Enfermedades víricas de transmisión hídrica (USEPA, 2012)	42
Tabla 3.4. Características generales del agua residual a la entrada y salida de la EDAR de Tudela.....	48
Tabla 3.5. Flujo de <i>Enterococcus</i> spp. en la EDAR muestreada.....	55
Tabla 3.6. Características físico-químicas de las muestras analizadas en la línea de aguas y fangos.....	56
Tabla 3.7. Microorganismos presentes en las aguas de salida de depuradora.....	57
Tabla 3.8. Criterios de calidad para la reutilización de las aguas según sus usos (RD 1620/2007).....	60

Capítulo 4

Tabla 4.1. Composición del agua de alimentación de la planta (Directiva_82/243/CEE, 1982)...	70
Tabla 4.2. Características de la muestra ARPF.....	70

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom modificado aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de cloración.....	76
Tabla 4.4. Parámetros cinéticos del modelo de bifásico aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de cloración.....	77
Tabla 4.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de cloración.	77
Tabla 4.6. Coste de operación y tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF mediante cloración con 15 mg Cl ₂ /L.....	82

Capítulo 5

Tabla 5.1. Composición de la muestra de agua residual depurada sintética (ARDS).....	91
Tabla 5.2. Caracterización físico-química de la muestra de agua residual depurada sintética (ARDS).....	91
Tabla 5.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.....	98
Tabla 5.4. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.....	98
Tabla 5.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.....	98
Tabla 5.6. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.....	98
Tabla 5.7. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra ARPF.....	100
Tabla 5.8. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.	103
Tabla 5.9. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.	103
Tabla 5.10. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.....	103
Tabla 5.11. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.....	104
Tabla 5.12. Resultados físico-químicos en los tratamientos peroxona sobre la muestra ARPF..	106
Tabla 5.13. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.....	110

Tabla 5.14. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.....	111
Tabla 5.15. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.....	111
Tabla 5.16. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado sobre la inactivación de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.....	111
Tabla 5.17. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en ARPF mediante ozonización y peroxona.....	115
Tabla 5.18. Condiciones de los controles y de los experimentos con ozono en los ensayos de ozonización a escala piloto.....	119
Tabla 5.19. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.	122
Tabla 5.20. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.	122
Tabla 5.21. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.	122
Tabla 5.22. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a la inactivación de <i>E. coli</i> en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.	122
Tabla 5.23. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de <i>E. coli</i> en ARDS mediante ozonización a escala piloto.	126

Capítulo 6

Tabla 6.1. Caracterización físico-química de la muestra de solución salina.....	141
Tabla 6.2. Efecto de la irradiación UVA-vis sobre los parámetros físico-químicos: a) pH y b) alcalinidad.....	145
Tabla 6.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.	148
Tabla 6.4. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.	148
Tabla 6.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.	149
Tabla 6.6. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H ₂ O ₂	154
Tabla 6.7. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H ₂ O ₂	154

Tabla 6.8. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H ₂ O ₂ .	154
Tabla 6.9. pH y alcalinidad al inicio y al final de los ensayos UVA-vis/TiO ₂ con distintas concentraciones de TiO ₂ .	158
Tabla 6.10. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en NaCl y en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis.	164
Tabla 6.11. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis.	164
Tabla 6.12. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis.	164
Tabla 6.13. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis/H ₂ O ₂ .	169
Tabla 6.14. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis/H ₂ O ₂ .	169
Tabla 6.15. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO ₂ /UVA-vis/H ₂ O ₂ .	169
Tabla 6.16. Coste de operación y tiempo estimado para la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. con los distintos tratamientos basados en UVA-vis, TiO ₂ y H ₂ O ₂ .	176

Capítulo 7

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).	198
Tabla 7.2. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).	198
Tabla 7.3. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).	199
Tabla 7.4. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a las curvas de inactivación bacteriana en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).	199
Tabla 7.5. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.	211
Tabla 7.6. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.	212

Tabla 7.7. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.	212
Tabla 7.8. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a las curvas de inactivación de <i>S. aureus</i> en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.	212
Tabla 7.9. Voltaje observado durante la desinfección foto-electroquímica y los ensayos foto-electro-Fenton bajo las distintas condiciones de operación.	216
Tabla 7.10. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación mediante desinfección foto-electroquímica y mediante foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación.	217
Tabla 7.11. Consumos específicos de energía por unidad de volumen (EC) necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación mediante desinfección foto-electroquímica y mediante foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación.....	217
Tabla 7.12. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación bacteriana en ARDS mediante foto-Fenton y foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación. $[Fe^{n+}] = 5 \text{ mg/L}$	220

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Ante la creciente escasez de recursos hídricos de calidad y el aumento de su demanda, surge la reutilización de las aguas residuales como una solución alternativa al uso de aguas potables o prepotables para ciertas aplicaciones. De esta manera, la reutilización de aguas residuales pretende corregir los graves problemas de dotación de agua existentes para diversas actividades económicas y minimizar los problemas de degradación del dominio público hidráulico y de sobreexplotación de acuíferos (Draft_V.3.2, 2016).

Las aguas residuales urbanas están reguladas por la Directiva 91/271/CEE, la cual establece concentraciones máximas de DBO₅, DQO y sólidos en suspensión totales, pero no incluye control microbiológico alguno. Como consecuencia, las estaciones convencionales de depuración de aguas residuales no incluyen ninguna etapa específica de desinfección. Este hecho, unido al origen fecal de las aguas residuales, da como resultado la presencia de multitud de microorganismos en las aguas residuales depuradas, siendo algunos de ellos potencialmente patógenos (Levantesi et al., 2010, Tonani et al., 2011, Mosteo et al., 2013).

Frente a la falta de regulación en materia de reutilización de aguas en España, se publica en 2007 el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de reutilización de las aguas depuradas. El RD 1620/2007 introduce la denominación de aguas regeneradas, entendiéndose por éstas como aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. Asimismo, dicho RD recoge los criterios de calidad para la utilización de las aguas según los usos (urbanos, agrícolas, industriales, recreativos o ambientales), estableciendo valores máximos admisibles para *Escherichia coli*, *Legionella spp.* o *Salmonella spp.*, entre otros parámetros.

Por tanto, como consecuencia de la aparición del RD 1620/2007, se hace necesario aplicar tratamientos adicionales que adecuen la calidad del agua a reutilizar dentro de los valores máximos admisibles en la legislación. De esta forma, aparecen las primeras estaciones regeneradoras de aguas, cuyo número y capacidad de tratamiento ha ido aumentando durante los últimos años. A finales de 2015, España contaba con una producción de más de 500 hm³/año de agua regenerada en las más de 320 estaciones de regeneración de aguas depuradas, situadas principalmente en el arco mediterráneo, los archipiélagos de Baleares y Canarias y la Comunidad de Madrid (MAGRAMA, 2015). Las estaciones regeneradoras de aguas cuentan, por lo general, con un tratamiento físico-químico con decantación, seguido de filtros de arena y desinfección mediante radiación ultravioleta combinada con hipoclorito de sodio como agente desinfectante residual. Cuando se requiere un agua de

mayor calidad se emplean también sistemas de filtración de membranas de ultrafiltración (Plan Nacional de Reutilización de Aguas, 2010).

Ante los inconvenientes que presentan las tecnologías de desinfección convencionales, como la generación de subproductos organohalogenados indeseados en la cloración o el ensuciamiento de las lámparas de radiación ultravioleta como consecuencia de la incrustación de cal u otros sólidos, surgen como alternativa los procesos de oxidación avanzada (POAs). Estas tecnologías se basan en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo, que tienen un elevado poder oxidante y desinfectante (Parsons, 2004).

Dentro de los POAs, se encuentran diversos tratamientos, como la ozonización combinada con peróxido de hidrógeno, la fotocatalisis con dióxido de titanio y los procesos Fenton y foto-Fenton.

El grupo de investigación *Calidad y Tratamiento de Aguas* de la Universidad de Zaragoza, en el que se enmarca la presente Tesis Doctoral, ha realizado estudios previos, dentro del marco del proyecto de investigación “Aplicación de Técnicas de Oxidación Avanzada en la Potabilización de Aguas Naturales de la Cuenca del Río Ebro” (CTM2005-04585/TECNO), en los que se ha evaluado el poder desinfectante en aguas prepotables de tratamientos como la cloración, la ozonización, el sistema peroxona (O_3/H_2O_2), la fotocatalisis (UVA-vis/ TiO_2) y la fotocatalisis con TiO_2 y H_2O_2 (UVA-vis/ TiO_2/H_2O_2) (Lanao, 2012). Además, dentro del marco del proyecto de investigación “Regeneración de aguas depuradas mediante procesos de oxidación avanzada” (CTM2008-01876/TECNO), se han estudiado también los procesos Fenton ($Fe^{2+/3+}/H_2O_2$) y foto-Fenton (UVA-vis/ $Fe^{2+/3+}/H_2O_2$) sobre la inactivación de bacterias presentes en aguas de salida de depuradora (Rodríguez-Chueca, 2013).

En el presente trabajo de investigación se evalúa la eficacia de diferentes procesos de desinfección sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*, siendo a nivel internacional la bacteria *E. coli* el microorganismo indicador más utilizado en este tipo de estudios (Malato et al., 2009, Cho et al., 2010, Spuhler et al., 2010, Moncayo-Lasso et al., 2012, Giannakis et al., 2014, Fagan et al., 2016, Villegas-Guzman et al., 2017). Asimismo, en la presente Tesis Doctoral se desarrolla la investigación de fotocatalisis con un nuevo tipo de TiO_2 comercial y se evalúa la posible recuperación y reutilización de este fotocatalizador. Además, se estudia la aplicación del proceso foto-electro-Fenton sobre la inactivación bacteriana, tratamiento en el que el H_2O_2 se genera en una celda electrolítica y del que apenas existen publicaciones en el campo de la desinfección.

Esta Tesis Doctoral se enmarca en los proyectos de investigación “Regeneración de aguas depuradas mediante procesos de oxidación avanzada” (CTM2008-01876/TECNO) y “Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos de EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental” (CRM2013-41397-R). Además cuenta con la financiación del Gobierno de Aragón para becas predoctorales destinadas a la formación y contratación de personal investigador.

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es el estudio de varios procesos de oxidación avanzada, aplicables como alternativa o complemento a los procesos convencionales de desinfección y dirigidos a la eliminación de indicadores bacterianos de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*) presentes en aguas de salida de depuradora, con el fin de obtener aguas regeneradas susceptibles de reutilización.

Este objetivo principal engloba los siguientes objetivos secundarios:

- Estudio de la evolución de la concentración de microorganismos, en concreto de la bacteria indicadora *Enterococcus* spp. a lo largo de las etapas de tratamiento de una estación depuradora de aguas residuales convencional, tanto en la línea de aguas como en la de fangos.
- Investigación del poder desinfectante de tratamientos convencionales y procesos de oxidación avanzada en aguas de salida de depuradora. Entre ellos se evalúan la cloración, la ozonización (O_3), el sistema peroxona (O_3/H_2O_2), la irradiación UVA-vis, UVA-vis/ H_2O_2 , la fotocatalisis con TiO_2 (UVA-vis/ TiO_2), UVA-vis/ TiO_2/H_2O_2 , la desinfección electroquímica, el proceso electro-Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) y el proceso foto-electro-Fenton (UVA/ Fe^{2+}/H_2O_2). Se analizan las variables que pueden influir en la eficacia de los procesos: tiempo de tratamiento, tipo y dosis de reactivos, tipo de bacteria, tipo de matriz, etc.
- Modelización cinética de los resultados de inactivación bacteriana obtenidos mediante los diferentes tratamientos de desinfección aplicados.
- Estimación de los costes de operación de cada tratamiento de desinfección en base a los reactivos y a la electricidad consumidos.

Esta Tesis Doctoral se realiza dentro del grupo consolidado de investigación *Calidad y Tratamiento de Aguas* de la Universidad de Zaragoza. Asimismo, se incluyen los resultados obtenidos en el marco de estancias predoctorales en el laboratorio del grupo *Tecnologías del Medio Ambiente* dirigido por el Catedrático José María Quiroga Alonso, de la

Universidad de Cádiz en España; en el laboratorio del *Grupo de Investigación en Remediación Ambiental y Biocatálisis* dirigido por el Dr. Ricardo Torres Palma de la Universidad de Antioquia en Colombia, estancia financiada mediante una beca Iberoamérica del Banco Santander para jóvenes profesores e investigadores, y en el laboratorio del *Group of Advanced Oxidation Processes* dirigido por el Dr. César Pulgarin en la École Polytechnique Fédérale de Lausanne en Suiza, estancia financiada por el programa Ibercaja-CAI de estancias de investigación.

La memoria de esta Tesis Doctoral se estructura en nueve capítulos y tres anexos.

Tras este primer capítulo “**Introducción y objetivos**”, se describe en el capítulo dos, “**Materiales y métodos**”, la instrumentación, materiales, y métodos empleados para la caracterización físico-química y microbiológica de las muestras de estudio, así como las herramientas empleadas en el tratamiento de los datos obtenidos.

En el capítulo tres, “**Control microbiológico de aguas residuales urbanas para su reutilización**”, se presentan los riesgos asociados a la presencia de contaminación microbiológica en las aguas residuales, la evolución de los microorganismos durante las diferentes etapas de una estación depuradora de aguas residuales y la normativa referente a la reutilización de aguas depuradas. Asimismo, se incluye una pequeña introducción a las tecnologías aplicables para la obtención de agua regenerada.

En el capítulo cuatro, “**Inactivación bacteriana mediante cloración**”, se describen los fundamentos teóricos de la técnica, el procedimiento experimental empleado en los ensayos con NaClO y los resultados de inactivación obtenidos sobre las bacterias *E. coli* y *Enterococcus* sp.

En el capítulo cinco, “**Inactivación bacteriana mediante procesos de ozonización**”, se presentan los fundamentos teóricos de los tratamientos de ozonización y peroxona y se incluye la experimentación realizada y los resultados obtenidos sobre *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante los tratamientos de ozonización y peroxona a escala de laboratorio y sobre *E. coli* mediante ozonización a escala piloto.

En el capítulo seis, “**Inactivación bacteriana mediante fotocátalisis con dióxido de titanio**”, se describen los fundamentos teóricos de la desinfección mediante radiación UV, radiación solar, radiación solar con H₂O₂, fotocátalisis con TiO₂ y fotocátalisis con TiO₂ y H₂O₂. Se incluyen además, los procedimientos experimentales y los resultados de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. obtenidos mediante UVA-vis, UVA-vis/H₂O₂, UVA-vis/TiO₂ y UVA-vis/TiO₂/H₂O₂.

En el capítulo siete, “**Inactivación bacteriana mediante procesos foto-electro-Fenton**”, se presentan los fundamentos teóricos de los procesos Fenton y foto-Fenton, así como de los tratamientos electro-Fenton y foto-electro-Fenton, y se muestra la experimentación realizada sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* mediante foto-electro-Fenton y los distintos sistemas que conforman este proceso, como radiación UVA, desinfección electroquímica o electro-Fenton.

Finalmente, el capítulo ocho recoge las principales “**Conclusiones**” del presente trabajo de investigación y el capítulo nueve contiene las “**Referencias**” bibliográficas que aparecen a lo largo de la memoria. La memoria se completa con tres anexos.

Los resultados de esta investigación han dado lugar a las publicaciones que se detallan a continuación:

- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Lázaro L., Ovelleiro J.L. 2015a. Inactivation of *Enterococcus* sp. by conventional and advanced oxidation processes in synthetic treated urban wastewater. *Ozone Science and Engineering* 37 (5), 467- 475.
- Valero P., Giannakis S., Mosteo R., Ormad M.P., Pulgarin C. 2017. Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal*, 313, 109-120.
- Miguel N., Lanao M., Valero P., Mosteo R., Ormad M.P. 2016. *Enterococcus* sp. inactivation by ozonation in natural water: Influence of H₂O₂ and TiO₂ and inactivation kinetics modeling. *Ozone Science and Engineering* 38 (6), 443-451.

El trabajo reflejado en esta memoria ha dado lugar, además de las publicaciones previamente mencionadas, a contribuciones en diversos congresos, tal y como se muestra a continuación:

- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2013. Inactivation of *Enterococcus* sp. by advanced oxidation processes in treated urban wastewater. IOA & IUVA 2013 World Congress & Exhibition. Las Vegas, USA.
- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Guzmán J., Ovelleiro J.L. 2013. Application of AOPs for the inactivation of *Enterococcus* sp. in a WWTP effluent: kinetic modelling. 3rd European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes. Almería, España. ISBN: 978-84-15487-99-9.
- Valero P., Torres J., Guzmán J., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2014. Evaluación de la capacidad de inactivación bacteriana en aguas de un nuevo nano-

TiO₂ comercial en suspensión. XI Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas. Alicante, España. ISBN: 978-84-616-9173-9.

- Valero P., Torres J., Ormad M.P., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2014. Evaluation of the bacterial inactivation capacity in water of a new commercial nano-TiO₂ suspension. 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering. Barcelona, España.
- Valero P., Rodríguez-Chueca J., López A., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2015. Desinfección de aguas de salida de depuradora mediante procesos avanzados de oxidación basados en ozono y en irradiación UVA-visible. XIII Congreso Español de Salud Ambiental. Cartagena, España.
- Valero P., Mosteo R., De Castro R.M., Quero-Pastor M.J., Hinojosa M., Acevedo A., Ormad M.P. 2015b. Disinfection of simulated municipal wastewater effluent by ozonation at laboratory and pilot scale. IOA 2015 World Congress & Exhibition. Barcelona, España. ISBN: 979-10-92607-02-4.
- Valero P., Mosteo R., Ormad M.P., Ovelleiro J.L. 2015. Estudio de recuperación y reutilización de TiO₂ en desinfección de aguas. I Congreso Colombiano de Procesos Avanzados de Oxidación. Manizales, Colombia.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Metodología analítica para la caracterización de aguas

2.1.1. Análisis de parámetros microbiológicos

El análisis microbiológico conlleva una serie de etapas que incluyen: la preparación de los medios de cultivo y esterilización de todo el material a utilizar, la siembra de la muestra, su incubación y recuento. Todo el material de vidrio utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos. Además, para proporcionar un ambiente de trabajo estéril y evitar la contaminación de las muestras se trabaja siempre en presencia de un mechero Bunsen o en una campana de flujo laminar. A continuación se describe con detalle el procedimiento utilizado para analizar las bacterias de estudio: *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*.

2.1.1.1. Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Control temperatura medios líquidos
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos
Mechero bunsen	-	-	Crear condiciones de esterilidad
Campana de flujo laminar	Cruma	670 FL	Atmósfera estéril
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico
Contador de colonias	Intescience	Scan® 100	Recuento colonias
Micropipetas	Gilson	Pipetman Classic	Medición de volúmenes
Microscopio óptico	Zeiss	Axiostar Plus	Pruebas de confirmación

2.1.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio (Willey et al., 2009). En este trabajo de investigación se han utilizado medios sólidos, que se encuentran en forma de polvo fino o granular. Para su reconstitución, se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en autoclave. Una vez esterilizados, los medios líquidos se dejan enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C, se vierten en placas Petri y se dejan solidificar.

Algunos medios de cultivo pueden requerir la adición de suplementos, como es el caso el agar selectivo Slanetz & Bartley, en el que se adiciona cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) como indicador de color para la identificación de *Enterococcus* sp.

La Tabla 2.2 muestra los medios de cultivo utilizados para las distintas bacterias analizadas en este trabajo.

Tabla 2.2. Medios de cultivo utilizados en los análisis microbiológicos

Bacteria	Medio de Cultivo	Observaciones
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey (Scharlau)	-
<i>Enterococcus</i> sp.	Agar Slanetz & Bartley (Scharlau)	Adición de TTC 1% (10 mL/L)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Plate Count Agar (Merck)	-

2.1.1.3. Método de siembra en superficie

El método de siembra en superficie se realiza mediante el método estándar 9215.C (Eaton et al., 2005) y se utiliza cuando la población bacteriana es elevada. Mediante una pipeta automática se coloca un pequeño volumen conocido de muestra (100 μ L-1000 μ L) en el centro de una placa Petri (90 mm \varnothing) con medio sólido. Con ayuda de una varilla de vidrio estéril, o asa de Drigalski, se extiende la muestra uniformemente por la superficie del agar.

El volumen de agua a analizar depende de la concentración bacteriana de la muestra, siendo el volumen de análisis recomendable entre 100 μ L y 500 μ L, y pudiéndose analizar hasta un máximo de 1000 μ L.

Además, puesto que no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra de agua a analizar, se realizan diluciones decimales seriadas de la muestra inicial, tal y como se describe en la Figura 2.1.

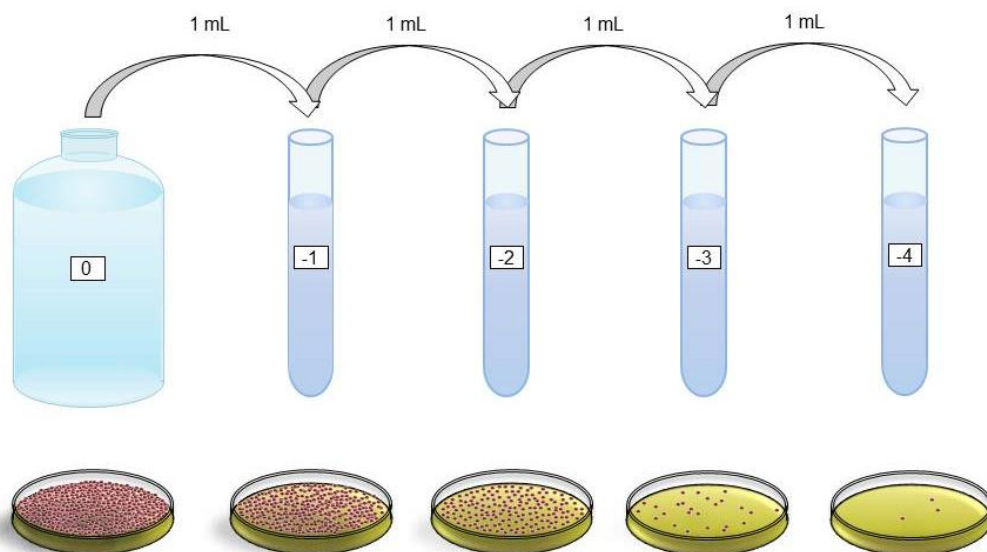


Figura 2.1. Esquema del método de diluciones decimales seriadas

Para realizar las diluciones decimales seriadas se toma 1 mL de la muestra y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl estéril (solución salina estéril). A continuación, se homogeneiza en un agitador vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de solución salina estéril.

2.1.1.4. Método de filtración de membrana

Este método se utiliza cuando la concentración de bacterias en la muestra no es muy elevada. En presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de 0,45 μm de poro sobre el soporte de filtración con ayuda de pinzas previamente flameadas (Figura 2.2.a). Se adapta el embudo (Figura 2.2.b), se humedece el filtro con una pequeña cantidad de solución salina estéril y se vierte la muestra, previamente homogeneizada (Figura 2.2.c). Las muestras cuyo volumen a analizar se encuentra entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, mientras que para las muestras entre 1 y 30 mL, se añaden primero al embudo entre 20-30 mL de solución salina estéril y a continuación, la muestra a filtrar. Finalmente, se retira el embudo y la membrana se coloca sobre el agar solidificado en una placa de Petri pequeña (45 mm \varnothing) (Figura 2.2.d y Figura 2.2.e), cuidando que no quede ninguna burbuja debajo del filtro.

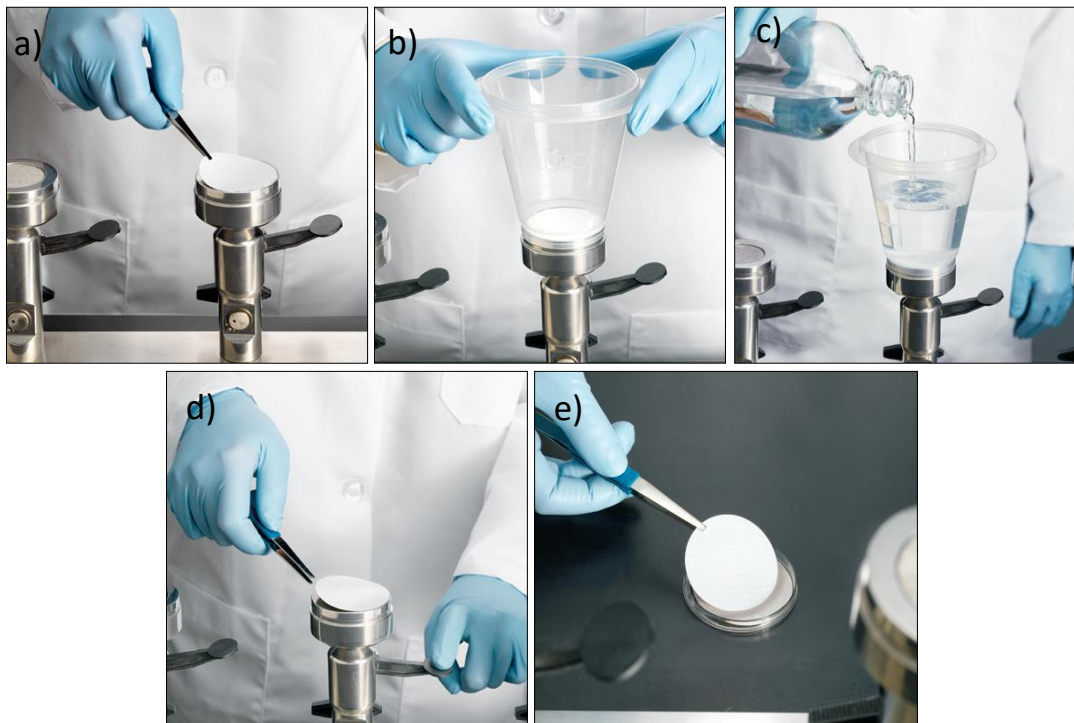


Figura 2.2. Método de filtración por membrana.

2.1.1.5. Incubación

Las placas sembradas se invierten e introducen en una estufa incubadora en las condiciones establecidas según los procedimientos normalizados correspondientes a cada bacteria (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Tiempo, temperatura y norma de análisis aplicada a cada bacteria estudiada

Bacteria	Tiempo de incubación (h)	Temperatura de incubación (°C)	Norma de análisis
<i>Escherichia coli</i>	21±3	44,0±0,5	UNE-EN ISO 9308-1 (AENOR, 2001c)
<i>Enterococcus</i> sp.	44±4	36±2	UNE-EN ISO 7899-2 (AENOR, 2001b)
<i>Staphylococcus aureus</i>	21±3	37±2	-

2.1.1.6. Recuento e inactivación

Teóricamente, cada colonia procede de la multiplicación de una sola célula; sin embargo, una colonia también puede ser el resultado de la multiplicación de un agregado de células. Por otra parte, no todas las células bacterianas son capaces de formar colonias, ya que no crecen en los medios de cultivo. Por ello, en el recuento en placa lo más correcto es hablar de unidades formadoras de colonias (UFC) (Gamazo et al., 2005). Los resultados de cada experimento realizado se expresan en UFC/100 mL.

El número de colonias que aparecen en las placas no ha de ser demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas, ni demasiado pequeño, para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En el método de filtración de membrana se cuentan las placas cuyo número de colonias se encuentra entre 20 y 200. En el método de siembra en superficie se cuentan las placas con un número de colonias entre 30 y 300 (Eaton et al., 2005). Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra por el método de diluciones decimales seriadas, tal y como se explica en el apartado 2.1.1.3.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación [2.1], donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$\text{UFC}/100 \text{ mL} = \text{UFC}/\text{mL muestra analizados} \cdot F_d \cdot 100 \text{ mL} \quad [2.1]$$

Por otra parte, para calcular la inactivación bacteriana o reducción de la concentración de bacterias y por tanto, evaluar la eficacia de desinfección de un tratamiento, se utilizan

unidades logarítmicas. Cuando no se detecta ningún microorganismo en la placa sembrada, el valor que se toma es 1 UFC/100 mL para permitir el cálculo posterior con logaritmos. La ecuación [2.2] describe la inactivación bacteriana, donde N_0 es la población inicial de bacterias y N_t la población que sobrevive tras un determinado tiempo t , ambos parámetros expresados en UFC/100 mL.

$$\text{Inactivación bacteriana} = \text{Log} (N_t/N_0) \quad [2.2]$$

Las unidades logarítmicas de inactivación pueden expresarse también como porcentajes de inactivación o reducción bacteriana. La Tabla 2.4 muestra las equivalencias entre ambos valores.

Tabla 2.4. Equivalencia entre unidades logarítmicas de inactivación y porcentajes de inactivación

Unidades logarítmicas de inactivación	Porcentaje de inactivación
0,5 log	68%
1 log	90%
2 log	99%
3 log	99,9%
4 log	99,99%
5 log	99,999%
6 log	99,9999%
7 log	99,99999%

2.1.1.7. Repetibilidad del método de análisis

Para validar los métodos de siembra utilizados se calcula el coeficiente de variación (CV). El CV representa la repetibilidad del método, es decir, el grado de concordancia entre diferentes medidas realizadas en las mismas condiciones.

El coeficiente de variación se expresa en porcentaje y se calcula mediante la ecuación [2.3], siendo \bar{X} el recuento medio de las colonias en las placas contadas (ecuación [2.4]) y S la desviación estándar de las muestras, una medida de la dispersión de los datos, expresada según la ecuación [2.5], donde n es el número de réplicas de un ensayo y X_i el valor de una réplica determinada (Ibarz, 2008, Lanao, 2012).

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad [2.3]$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad [2.4]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad [2.5]$$

Para obtener la repetibilidad de los métodos empleados se analizan ocho réplicas de una misma muestra. En este trabajo se ha calculado el CV para el análisis de *Enterococcus* sp. mediante siembra en superficie. Para ello se llevó a cabo el análisis de una muestra de concentración previamente conocida sembrando la dilución adecuada (1:1000) para obtener recuentos entre 30 y 300 UFC por placa.

La concentración de *Enterococcus* sp. en cada réplica se calcula mediante la ecuación [2.1] y el resultado se transforma en unidades logarítmicas. Los valores expresados en UFC/100 mL se distribuyen dando lugar a curvas asimétricas (Eaton et al., 2005). Sin embargo, al transformar dichos valores en unidades logarítmicas, los valores se aproximan a una distribución normal. Por tanto el CV se calcula en base a los resultados expresados en forma logarítmica. La Tabla 2.5 refleja los resultados obtenidos, siendo el CV calculado en el presente trabajo para la siembra en superficie de *Enterococcus* sp. de 1,6%.

Tabla 2.5. Cálculo del coeficiente de variación del método de siembra en superficie para *Enterococcus* sp.

Réplica	<i>Enterococcus</i> sp. Siembra en superficie	
	UFC/100 mL	Log
1	2,1·10 ⁸	8,3
2	2,4·10 ⁸	8,4
3	2,1·10 ⁸	8,3
4	1,0·10 ⁸	8,0
5	1,3·10 ⁸	8,1
6	1,4·10 ⁸	8,1
7	1,3·10 ⁸	8,1
8	1,6·10 ⁸	8,2
Media (\bar{X})		8,2
Desviación (S)		0,1
CV (%)		1,6

La repetibilidad de los restantes métodos y bacterias analizadas se muestra en la Tabla 2.6. Estos valores han sido previamente determinados por el grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas (Ibarz, 2008, Rodríguez-Chueca, 2013).

Tabla 2.6. Coeficientes de variación de los métodos de siembra en superficie y filtración de membrana en el análisis de *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*

Bacteria	Método	CV	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Siembra en superficie	1,1 %	(Rodríguez-Chueca, 2013)
<i>Escherichia coli</i>	Filtración de membrana	2,3 %	(Rodríguez-Chueca, 2013)
<i>Enterococcus</i> sp.	Siembra en superficie	1,6 %	Tabla 2.5
<i>Enterococcus</i> sp.	Filtración de membrana	3-10 %	(Ibarz, 2008)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Siembra en superficie	2,0 %	(Rodríguez-Chueca, 2013)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Filtración de membrana	1,3 %	(Rodríguez-Chueca, 2013)

2.1.1.8. Caracterización de cepas bacterianas: tinción de Gram

Para confirmar el correcto aislamiento y, por tanto, descartar la presencia de contaminación en las cepas utilizadas, se realiza de manera aleatoria una tinción de Gram de las colonias obtenidas.

Desarrollada en 1884 por el médico danés Christian Gram, es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología. Es un ejemplo de tinción diferencial, procedimiento que se utiliza para diferenciar organismos en base a sus características de tinción. La tinción de Gram divide las bacterias en dos clases: Gram-negativas y Gram-positivas. Además, esta técnica permite observar la morfología de las bacterias.

El procedimiento de la tinción de Gram se muestra en la Figura 2.3. Previamente, se realiza un frotis de la colonia que se quiere estudiar en un portaobjetos. Cuando la muestra está seca, se procede a la tinción. En el primer paso, el frotis se tiñe con el colorante básico cristal de violeta, el colorante primario. Tras un minuto de contacto, se lava el portaobjetos con agua destilada y se añade el segundo colorante, el lugol. Éste intensifica la interacción entre la célula y el colorante de manera que la célula se tiñe más intensamente. Tras otro minuto de contacto se decolora el frotis lavándolo con acetona o etanol. Este paso produce el aspecto diferencial de la tinción de Gram. Debido al grosor de su pared, las bacterias Gram-positivas retienen el cristal violeta, mientras que las bacterias Gram-negativas, que tienen la pared celular demasiado delgada, lo pierden y aparecen incoloras. Finalmente, el frotis se tiñe de nuevo (tinción de contraste) con un colorante básico de un color diferente al del cristal violeta. La safranina, el colorante de contraste más común, tiñe las bacterias Gram-negativas de color rosa o rojo, dejando a las bacterias Gram-positivas de color morado oscuro (Gamazo et al., 2005).

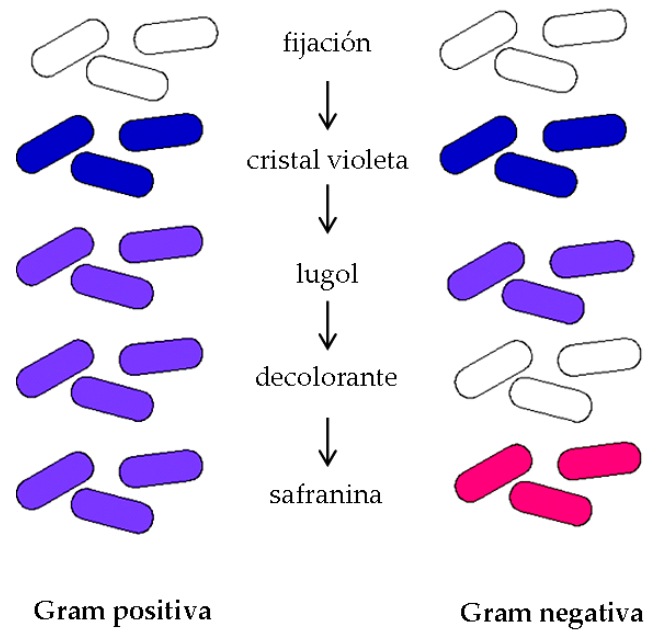


Figura 2.3. Método de la tinción de Gram

2.1.2. Análisis de parámetros físico-químicos

A continuación se describe la metodología analítica empleada para la caracterización físico-química de las muestras acuosas.

- Alcalinidad:** la alcalinidad total de un agua es la suma de todas las bases presentes en ella y refleja su capacidad para neutralizar ácidos. La alcalinidad total se determina mediante valoración según el método estandarizado 2320 B (Eaton et al., 2005). En primer lugar, se valora un volumen de muestra conocido (V_m) con ácido clorhídrico 0,1 N (Panreac), en presencia de indicador de fenolftaleína, hasta desaparición del color rosa. Se añaden unas gotas de indicador mixto verde de bromocresol-rojo de metilo (Panreac) y, a continuación, se valora de nuevo con ácido clorhídrico hasta que la muestra torna de color verde a gris. El valor de la alcalinidad total se calcula a partir del volumen de agente valorante consumido (V_{HCl}), mediante la ecuación [2.6]:

$$\text{Alcalinidad total (mg/L de CaCO}_3\text{)} = V_{HCl} \cdot 5000 / V_m \quad [2.6]$$

- Carbono orgánico disuelto:** La medida del Carbono Orgánico Disuelto (COD) sirve para cuantificar la materia orgánica presente en el agua. Se mide según el método estándar 5310B (Eaton et al., 2005). Para ello se utiliza un equipo SHIMADZU, modelo TOC-V_{CSH} (Figura 2.4).



Figura 2.4. Analizador de Carbono Orgánico Total SHIMADZU, modelo TOC-VCSH

En el agua están presentes dos tipos de carbono: carbono orgánico y carbono inorgánico. El carbono orgánico (COD) corresponde a los compuestos orgánicos, mientras que el carbono inorgánico (CI) se encuentra disuelto en el agua como CO_2 , o bien en forma de compuestos inorgánicos tales como los carbonatos y bicarbonatos. Conjuntamente, ambos tipos de carbonos constituyen el carbono total, CT, y por lo tanto cumplen la relación: $\text{COD}=\text{CT}-\text{CI}$. El equipo utilizado se basa en esta relación para medir el COD.

La muestra a analizar se filtra mediante un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$, se introduce en los viales y se programa el equipo con las rectas de calibrado que mejor se ajusten, según los valores esperados de COD.

- **Cloro libre residual:** La determinación del cloro libre (Cl_2) residual se realiza mediante un fotómetro multiparamétrico de sobremesa, marca Hanna Instruments, modelo HI 83099. El método empleado es una adaptación del método DPD 330.5 de la EPA (USEPA, 1983). La reacción entre el cloro libre y el reactivo DPD origina una coloración rosa en la muestra que se mide utilizando una lámpara de tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a $525\ \text{nm}$.
- **Conductividad:** es la expresión numérica de la capacidad de un agua para transportar la corriente eléctrica. Indica la concentración total de iones en el agua. Su determinación se realiza utilizando un conductímetro CRISON modelo Basic 30 (rango $0,01 - 19.999\ \mu\text{S}/\text{cm}$, error $\leq 0,02\ \mu\text{S}/\text{cm}$), provisto de una célula de dos electrodos (constante de la célula $1\ \text{cm}^{-1}$) y de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 27888:1994 (AENOR, 1994). Para conocer la conductividad de una muestra se introduce la célula en ella, se agita y se espera a que el valor se estabilice. Previamente a la medida de la conductividad, el conductímetro se calibra utilizando una disolución tampón de $1413\ \mu\text{S}/\text{cm}$. Los resultados se expresan en mS/cm o en $\mu\text{S}/\text{cm}$, según el rango de trabajo.

- **Demanda de cloro:** La demanda de cloro (CD) se define como la diferencia entre la dosis de cloro añadida y la concentración de cloro residual medida tras un tiempo de contacto determinado. Es la cantidad mínima de cloro que se necesita añadir a una muestra para satisfacer el consumo de desinfección y oxidación de los compuestos presentes en ella. Para determinar este parámetro se utiliza el método estándar 2350 B (Eaton et al., 2005).

El método consiste en adicionar un exceso de cloro (D_0) a la muestra y analizar el cloro residual (R) no consumido después de un mínimo de 4 horas, siendo la demanda de cloro (CD) la diferencia de ambos valores en mg/L, como indica la ecuación [2.7]:

$$CD = D_0 - R \quad [2.7]$$

Para determinar D_0 se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial de 50.000 mg/L Cl_2 diluido al 10%, en un frasco de 350 mL con tapón de vidrio y se completa hasta rebose con agua destilada. Se colocan 100 mL del contenido del frasco en un Erlenmeyer y se añaden también 5 mL de ácido acético (99'8%, Panreac), 1 g de yoduro potásico (99%, Panreac) y 2 mL de almidón (Scharlau). Se valora con tiosulfato sódico 0,025 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%, Panreac) hasta la desaparición del color. La dosis de cloro exacta suministrada a la muestra se calcula según la ecuación [2.8], donde V_v es el volumen en mL del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido en la valoración, N es la normalidad del mismo (0,025 N) y V_m es el volumen de muestra valorado (100 mL).

$$D_0 \text{ (mg Cl}_2\text{/L)} = V_v \cdot N \cdot 35,5 \cdot 1000 / V_m \quad [2.8]$$

De manera similar, para calcular R, en un frasco de las mismas características se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial diluido al 10% y 5 mL de tampón fosfato (68,1 g KH_2PO_4 y 11,7 g NaOH en 1L de agua destilada), completando el volumen con la muestra objeto de análisis. Se almacena durante mínimo 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad con el tapón sellado herméticamente para evitar pérdidas de cloro por volatilidad. Transcurrido ese tiempo, en el cual el cloro reacciona con la materia orgánica y los microorganismos presentes en la muestra, se mide el cloro residual, R, (ecuación [2.9]).

$$R \text{ (mg Cl}_2\text{/L)} = V_v \cdot N \cdot 35,5 \cdot 1000 / V_m \quad [2.9]$$

La concentración del reactivo de cloración utilizado (R_c) se calcula según la ecuación [2.10]:

$$R_c \text{ (mg Cl}_2\text{/L)} = D_0 \cdot 350/5 \quad [2.10]$$

- **Demanda Química de Oxígeno:** La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es la cantidad de oxígeno consumido por las especies reductoras presentes en el agua. Este parámetro se determina en un fotómetro multiparámetro marca *Hanna Instruments*, modelo HI 83099 mediante una adaptación del Método 410.4 EPA (USEPA, 1993). Los compuestos orgánicos oxidables presentes en la muestra reducen el ión dicromato (naranja) a ión cromo (III) (verde). La cantidad de cromo (III) formada se determina utilizando para ello una lámpara de tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 420 nm.
- **Dureza:** la dureza se define como la suma de las concentraciones de calcio y magnesio, ambas expresadas como carbonato de calcio, en mg/L. La dureza se determina mediante el método estándar 2340 C (Eaton et al., 2005).

La dureza total se determina mediante valoración de un volumen de muestra conocido (V_m) con EDTA 0,01 M (Panreac), en presencia del indicador negro de eriocromo T, hasta que el tono rojo de la muestra vira a color azul (V_T). La dureza total se calcula a partir de la expresión [2.11]:

$$\text{Dureza total (mg/L de CaCO}_3\text{)} = V_T \cdot 1000 / V_m \quad [2.11]$$

- **Nitrógeno amoniacal (N-NH₃):** la determinación del nitrógeno amoniacal se lleva a cabo mediante un fotómetro multiparamétrico de sobremesa Hanna Instruments, modelo HI 83099. El método empleado es una adaptación del Método Nessler de ASTM Manual of Water and Environmental Technology, D1426 (ASTM, 2008). La reacción entre el amoniaco y los reactivos origina una coloración amarilla en la muestra. Para su medición se utiliza una lámpara de Tungsteno con filtro de interferencia de banda estrecha a 420 nm.
- **Oxidantes totales:** la concentración de oxidantes totales se determina mediante yodimetría. Una alícuota se mezcla con KI (0,1 M) y $[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,01 M) y se mide la absorbancia a 350 nm en un espectrofotómetro.
- **Oxígeno disuelto (OD):** para la determinación del oxígeno disuelto se utiliza un medidor de oxígeno disuelto Hanna HI 9146N (rango 0.00 - 45.00 mg/L; resolución 0.01 mg/L) según el método estándar 4500-O G (Eaton et al., 2005).

- **Peróxido de hidrógeno:** La concentración de H_2O_2 se determina de forma semi-cuantitativa mediante un test indicador de peróxidos o cuantitativamente mediante espectrofotometría (Nogueira et al., 2005).

Mediante el test indicador de peróxidos (Merckoquant®), la concentración de H_2O_2 se determina por comparación colorimétrica. La peroxidasa transfiere el oxígeno del peróxido a un indicador redox orgánico, formándose un producto de oxidación azul (0-100 mg/l) o amarillo (100-1000 mg/l). La zona de reacción de la tira de ensayo se compara visualmente con una escala colorimétrica.

En el método espectrofotométrico, la concentración de H_2O_2 se determina mediante adición de metavanadato de amonio (NH_4VO_3 0,06M) a una alícuota, formándose un complejo coloreado cuya absorbancia se mide a 450 nm en un espectrofotómetro.

- **pH:** El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como $-\log[H^+]$. Para determinar el pH de las muestras acuosas se utiliza un pH-metro marca CRISON, modelo GLP 21, previamente calibrado con disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,01. El método utilizado es el 4500-HB del Standard Methods (Eaton et al., 2005).
- **Sólidos en suspensión totales:** Los sólidos en suspensión totales (SST) se analizan con un espectrofotómetro (marca *Hach Lange*, modelo *DR 2800*) a 810 nm o mediante el método estándar 2540D (Eaton et al., 2005).

El método 2540D se basa en la separación de los sólidos por filtración y su posterior secado a 105°C. Un filtro, previamente pesado, se coloca en una unidad de filtración conectada a una bomba de vacío y se introduce una cantidad de muestra adecuada para que el resultado sea representativo. Se recoge el filtro en un vidrio de reloj y se lleva a una estufa a 105°C, por un tiempo mínimo de 1 hora, hasta que se obtenga una pesada constante. Los SST se determinan por diferencia de pesada entre el filtro seco después de haber pasado la muestra y el filtro limpio antes de ser utilizado, según la siguiente expresión [2.12] :

$$SST \text{ (mg/L)} = (\text{Peso}_{\text{filtro+sólidos}} \text{ (g)} - \text{Peso}_{\text{filtro}} \text{ (g)}) \cdot 1000 / V_{\text{muestra}} \text{ (L)} \quad [2.12]$$

- **Sólidos totales:** los sólidos totales (ST) se miden según el método estándar 2540B (Eaton et al., 2005). Se coloca un volumen de muestra determinado en un recipiente previamente pesado y se introduce en un horno a 105°C hasta que la humedad se haya eliminado por completo y la pesada sea constante. Los ST se determinan por diferencia de pesada del recipiente con y sin los sólidos [2.13]:

$$ST \text{ (mg/L)} = (\text{Peso}_{\text{recipiente+sólidos}} \text{ (g)} - \text{Peso}_{\text{recipiente}} \text{ (g)}) \cdot 1000 / V_{\text{muestra}} \text{ (L)} \quad [2.13]$$

- **Temperatura:** es una magnitud física que refleja la cantidad de calor de un cuerpo. La temperatura de las muestras se mide con la sonda de temperatura del pH-metro mencionado o con un termómetro analógico.
- **Turbidez:** la turbidez se define como la reducción de la transparencia de un líquido originada por la presencia de materias sin disolver. La metodología empleada se basa en la norma UNE-EN ISO 7027:2001 (AENOR, 2001a) y se utiliza un turbidímetro marca HANNA Instruments modelo LP 2000 (error $\leq 0,2$ UNT). Los turbidímetros constan de una fuente de luz para iluminar la muestra y detectores fotoeléctricos que miden la intensidad de la luz dispersada a 90° respecto a la fuente. La intensidad de la radiación dispersada por la muestra se compara con la de la disolución patrón. Los resultados se expresan en unidades nefelométricas de turbidez (UNT).

La Tabla 2.7 resume la metodología normalizada utilizada en los análisis físico-químicos, la instrumentación empleada, el rango de medida y el error asociado.

Tabla 2.7. Equipos de laboratorio Instrumentación, metodología, rango de medida y error para la caracterización físico-química de las muestras de agua

Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Rango de Medida	Error	Método Normalizado
Alcalinidad	-	-	-	10-500 mg/L	± 5 mg/L	SM 2320 B
COD	Analizador TOC	Shimadzu	TOC-V _{CSH}	CT: 0-25.000 mg/L Ci: 0-30.000 mg/L	5 - 10 %	SM 5310 B
Cloro libre residual	Fotómetro multiparamétrico	Hanna	HI 83099	0,0 - 5,0 mg/L	≤ 0,02 mg/L	DPD 330.5 EPA (Adaptado)
Conductividad	Conductímetro	Crison	Basic 30	0,01-19,999 µS/cm	≤ 0,5 µS/cm	UNE-EN ISO 27888:1994
Demanda de cloro	-	-	-	> 0,03 mg/L	-	SM 2350 B
DQO	Fotómetro multiparamétrico	Hanna	HI 83099	0 - 1.500 mg/L	± 1 mg/L	EPA 410.4 (Adaptado)
Dureza	-	-	-	-	0,8 %	SM 2340 C
N-NH ₃	Fotómetro multiparamétrico	Hanna	HI 83099	0,0 - 50,0 mg/L	± 0,5 mg/L	ASTM D1426
Oxidantes totales	Espectrofotómetro	Thermo Scientific	Genesys™ 20	-	-	-
Oxígeno disuelto	Medidor OD	Hanna	HI 9146N	0,00 - 45,00 mg/L	± 0,01 mg/L	SM 4500-O G
[H ₂ O ₂]	Tiras colorimétricas	Merck	Merckoquant®	0-100 mg/L 100-1000 mg/L	-	-
pH	Espectrofotómetro	Thermo Scientific	Genesys™ 20	> 5 mg/L	-	Nogueira et al., 2005
pH	pH-metro	Crison	GLP 21	2,00 - 16,00	≤ 0,02	SM 4500 HB
SST	Fotómetro multiparamétrico	Hach Lange	DR 2800	0 - 1.000 mg/L	≤ 0,1 mg/L	-
ST	Estufa	J.P. Selecta	Digitheat	> 2.5 mg/L	-	SM 2540 D
ST	Estufa	J.P. Selecta	Digitheat	> 2.5 mg/L	7%	SM 2540 B
Temperatura	pH-metro	Crison	GLP 21	-20°C - 150°C	≤ 0,3°C	-
Temperatura	Termómetro	-	-	-10 °C - 110 °C	± 0,5°C	-
Turbidez	Turbidímetro	Hanna	LP 2000	0 - 1.000 UNT	≤ 0,2 UNT	UNE-EN ISO 7027:2001

2.2. Procedimiento experimental de fortificación de muestras

2.2.1. Fortificación con *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp.

En algunas ocasiones las muestras empleadas no contienen las bacterias objeto de estudio de forma natural o éstas presentan una concentración demasiado baja para evaluar adecuadamente la eficacia de los tratamientos de desinfección aplicados. Por ello, en determinadas muestras se lleva a cabo el aumento de la población bacteriana de manera artificial, proceso que recibe el nombre de “fortificación”. Para ello, se preparan suspensiones bacterianas concentradas a partir de cultivos puros de la bacteria seleccionada que posteriormente se añaden a las muestras de agua. De esta forma se obtiene una “muestra fortificada” que permite evaluar los diferentes tratamientos de desinfección estudiados. A continuación se explica detalladamente el procedimiento de fortificación de las muestras.

Para la fortificación de muestras con *Escherichia coli* en el presente trabajo se utiliza una cepa salvaje que se conserva en el stock del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza. La cepa fue aislada a partir de aguas de salida de depuradora y ya ha sido identificada y utilizada en estudios previos del grupo (Rodríguez-Chueca, 2013). Por lo tanto, no se considera necesario realizar ninguna prueba bioquímica de confirmación, salvo la tinción de Gram, que se explica en el apartado 2.1.1.8. Esta prueba permite comprobar que la cepa no está contaminada.

La cepa de *Enterococcus* sp. utilizada es una cepa salvaje que proviene del stock del grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas de la Universidad de Zaragoza. Al estar ya identificada y haber sido utilizada en otros estudios previos del grupo (Ibarz, 2008, Lanao, 2012, Rodríguez-Chueca, 2013), no se considera necesario realizar ninguna prueba bioquímica de confirmación, salvo la tinción de Gram (apartado 2.1.1.8).

Para realizar la fortificación de las muestras de agua es necesario preparar una suspensión bacteriana concentrada. Para ello se deja descongelar un vial almacenado a -20°C en el que las células se encuentran conservadas en leche desnatada esterilizada. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento en agar nutritivo (Figura 2.5).

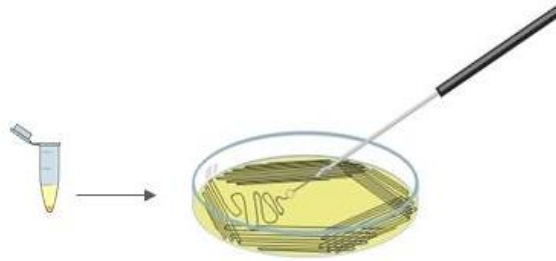


Figura 2.5. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento

Las placas sembradas con *E. coli* se incuban a 44°C durante 24 horas en aerobiosis. En el caso de *Enterococcus* sp. las placas sembradas se incuban a 37°C durante 48 horas en aerobiosis. De esta forma se obtiene un cultivo bacteriano joven y abundante.

El agar nutritivo no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante observar las colonias crecidas tras la incubación para ver si el cultivo es homogéneo. Por ejemplo, las colonias de *Enterococcus* sp. en el agar nutritivo son de color crema, redondas y con límite definido (Figura 2.6).

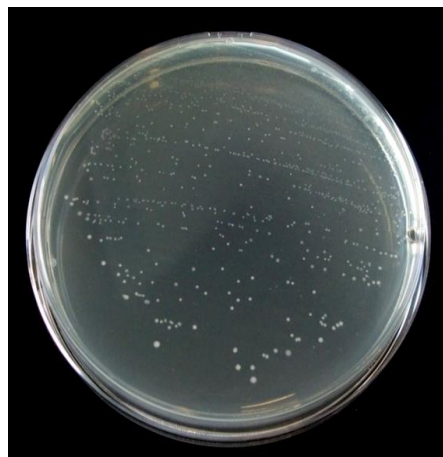


Figura 2.6. Colonias de *Enterococcus* sp. en agar nutritivo

Tras el periodo de incubación, se prepara la suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias a un tubo con solución salina estéril (NaCl 0'9%). La turbidez que presenta la suspensión va aumentando conforme el número de colonias presentes en el inóculo es mayor. Una vez alcanzada la turbidez deseada, se adiciona la suspensión bacteriana a la muestra objeto de estudio, consiguiéndose una concentración en torno a 10^7 - 10^8 UFC/100 mL. Hay que tener en cuenta que las poblaciones bacterianas iniciales para cada uno de los experimentos realizados no son exactamente las mismas debido a la propia dificultad de preparación de la suspensión celular concentrada.

2.2.2. Fortificación con *Staphylococcus aureus*

La cepa de *Staphylococcus aureus* empleada proviene del stock del *Grupo de Investigación en Remediación Ambiental y Biocatálisis* de la Universidad de Antioquia. Se trata de una cepa salvaje previamente identificada y conservada en caldo LB.

Para la preparación de la suspensión concentrada de *S. aureus* se colocan 5 mL de caldo LB esterilizado en un tubo Falcon y se añaden 200 µL del caldo que contiene la cepa stock. El tubo Falcon inoculado se mantiene en agitación y a temperatura constante de 37°C durante el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de 0,6 medida a 580 nm. Este proceso lleva aproximadamente 3-4 horas.

Una vez alcanzada la concentración deseada, se realizan dos diluciones decimales seriadas del inóculo en solución salina estéril. Finalmente, se añade un volumen adecuado de la dilución 1:100 preparada en la muestra objeto de estudio, consiguiéndose una concentración de *S. aureus* de $\sim 10^6$ UFC/100 mL.

2.3. Metodología analítica para la caracterización de sólidos (TiO₂)

2.3.1. Difracción de Rayos X

La Difracción de Rayos X (XRD) permite determinar y cuantificar las fases cristalinas que presenta un sólido, así como estimar su tamaño de partícula. Las medidas de XRD se realizan en el Servicio de Difracción de Rayos X y Análisis por Fluorescencia del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se utiliza un difractómetro marca RIGAKU, modelo D/max 2500 provisto de un ánodo rotante (Figura 2.7). El difractómetro funciona a 40 kV y 80 mA con un ánodo de Cu y se utiliza un monocromador de grafito para seleccionar la radiación Cu-K α . Las condiciones de medida son: $2\theta=10^{\circ}$ - 80° , $\text{step}=0.03^{\circ}$ y $t=1\text{s/step}$. La determinación y cuantificación de fases, así como la estimación del tamaño de partícula, se realizan con el programa MDI-Jade7 y la base de datos JCPDS-International Centre for Diffraction Data-2000. El error del método XRD utilizado es de aproximadamente el 5%.



Figura 2.7. Equipo de difracción de rayos X

2.3.2. Fluorescencia de Rayos X

La Fluorescencia de Rayos X (XRF) permite determinar semicuantitativamente los elementos presentes en un material sólido. Este análisis se realiza en el Servicio de Difracción de Rayos X y Análisis por Fluorescencia del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se utiliza un espectrómetro secuencial de Fluorescencia de rayos X de *Thermo Electron*, serie *ARL* modelo *ADVANT'XP*, equipado con un tubo de rayos X con ventana frontal de Be y ánodo de Rodio (Rh) (Figura 2.8). La muestras se introducen en forma de polvo y se miden en atmósfera de He. Se utiliza el programa "UNIQUANT" de *Thermo scientific*, que permite obtener un análisis semicuantitativo de los elementos comprendidos entre el Na (sodio) y el U (uranio).

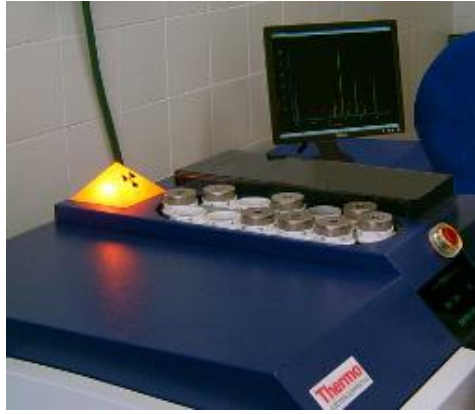


Figura 2.8. Equipo de fluorescencia de rayos X

2.3.3. Microscopia FESEM

La observación de la morfología de las partículas se estudia en el Servicio de Microscopia Electrónica de Materiales del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se utiliza un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Carl Zeiss MERLIN™ (Figura 2.9) dotado con un detector de electrones retro-dispersados y secundarios INCA 350 de Oxford Instruments con resolución de 127 eV a 5,9 KeV.



Figura 2.9. Microscopio FESEM

2.4. Modelos cinéticos de inactivación microbiana

2.4.1. Descripción de modelos

Dentro del campo de la microbiología, se encuentra la microbiología predictiva. Esta disciplina pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos, desarrollando para ello modelos matemáticos que describan y permitan predecir dicha respuesta (Lanao, 2012).

Entre los diferentes tipos de modelos matemáticos existentes, este estudio de investigación se centra en los modelos de inactivación, modelos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. Con esto se pretende poder describir y predecir el nivel de inactivación bacteriana alcanzado en función del tiempo al aplicar cada uno de los tratamientos de desinfección estudiados bajo condiciones específicas de trabajo.

Las curvas de inactivación microbiana pueden tener diferentes formas (Figura 2.10). En el caso más simple, la inactivación microbiana presenta una caída lineal con el tiempo (curva de inactivación A). Esta sencilla cinética asume que todos los microorganismos de la población microbiana presentan la misma sensibilidad al agente desinfectante.

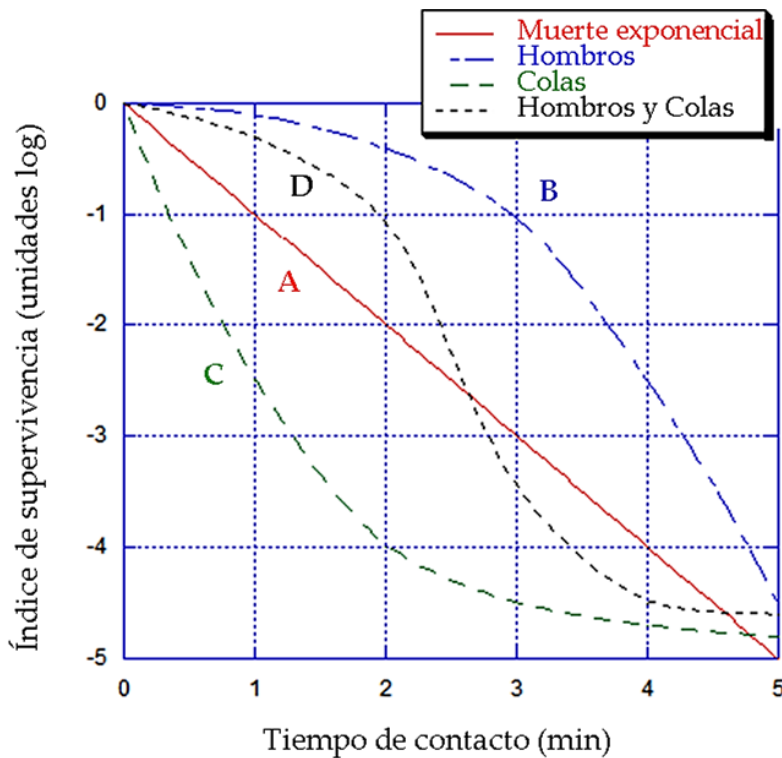


Figura 2.10. Curvas de inactivación microbiana (Gyürék y Finch, 1998)

Sin embargo, a menudo se observan desviaciones del comportamiento lineal, como hombros o colas (Gyürék y Finch, 1998). El fenómeno del hombro (curva B) ocurre cuando hay una fase inicial de retraso en la que una fracción de los microorganismos se mantiene constante durante los primeros instantes del tratamiento, seguida por un descenso lineal. Se atribuye a una mezcla inadecuada del desinfectante en la muestra, un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos clave de inactivación o a una resistencia inicial de los microorganismos.

En cambio, un fenómeno de cola (curva C) tiene lugar cuando, tras un periodo inicial de inactivación lineal rápida, se produce una fase de disminución de la población microbiana lenta. Este efecto se atribuye a la presencia de agrupaciones de microorganismos o de subpoblaciones de resistencia variable al desinfectante, a la adaptación al medio de los microorganismos o a la disminución de la concentración de agente desinfectante durante el tratamiento.

Cuando ambos fenómenos ocurren, la curva de inactivación toma forma sigmoidea (curva D), presentando una fase inicial lenta (hombro), seguida de un descenso lineal y finalizando con un efecto de cola.

En la literatura, existen multitud de modelos cinéticos que tratan de describir los distintos comportamientos de los microorganismos sometidos a la acción de un agente desinfectante, bajo las condiciones particulares del sistema que se estudia.

En 1908, Chick propuso un modelo matemático que consideraba que las reacciones de desinfección siguen una cinética de primer orden respecto a las bacterias supervivientes. Este modelo intenta explicar la desinfección como si de una reacción química se tratara, considerando que la velocidad de reacción depende de las concentraciones relativas de desinfectante y microorganismos, estando el desinfectante en exceso (Chick, 1908). La ecuación [2.14] describe el modelo de Chick, en el que N_t es la concentración de bacterias a tiempo t , N_0 es la concentración bacteriana inicial ($t=0$) y k es la constante de la velocidad de reacción.

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad [2.14]$$

En el mismo año (1908), Watson modifica el modelo de Chick, incluyendo el efecto de la concentración de desinfectante en el proceso de inactivación. El modelo de Chick-Watson se representa mediante la ecuación [2.15], donde C es la concentración del desinfectante y

n es el número de moléculas de desinfectante necesarias para la inactivación microbiana. El parámetro n se describe también como coeficiente de dilución y es un factor empírico que suele considerarse la unidad.

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad [2.15]$$

Años más tarde, Hom (1972) sugiere una alternativa al modelo de Chick-Watson para explicar las desviaciones encontradas en la práctica respecto a la cinética de primer orden. Este modelo (ecuación [2.16]) incluye el parámetro m , que es una constante empírica del modelo. Si la concentración de desinfectante es constante, el modelo se simplifica mediante la inclusión de la concentración en una constante de velocidad aparente ($k^* = k \cdot C$). La ecuación [2.17] muestra el modelo de Hom simplificado, siendo k^* la constante de velocidad aparente de pseudo-primer orden (min^{-1}) (Pernitsky et al., 1995).

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m \quad [2.16]$$

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -k^* \cdot t^m \quad [2.17]$$

Más tarde, (Haas y Joffe, 1994) modifican el modelo de Hom, estableciendo que la concentración de desinfectante varía con el tiempo debido a la demanda de los microorganismos y de otros compuestos presentes en el agua. La ecuación [2.18] representa el modelo de Hom modificado, en el que se asume que la disminución del desinfectante sigue una cinética de primer orden, tal y como describe la ecuación [2.19], donde C_0 es la concentración inicial de desinfectante y k' es la constante de velocidad de descomposición del desinfectante (min^{-1}) (Barbeau et al., 1999).

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m \cdot k \cdot C_0^n \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{n \cdot k' \cdot t}{m}\right)\right]^m \quad [2.18]$$

$$C = C_0 \cdot e^{-k' \cdot t} \quad [2.19]$$

Pruitt y Kamau (1993) proponen un modelo bifásico que considera que hay dos subpoblaciones microbianas que presentan distinta tolerancia al tratamiento. El modelo bifásico se muestra en la ecuación [2.20], donde P es la fracción de microorganismos

supervivientes correspondiente a la subpoblación sensible (subpoblación 1), $(1-P)$ es la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación resistente (subpoblación 2), k_1 es la constante de inactivación de la subpoblación 1 y k_2 la constante de inactivación de la subpoblación 2.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = \log [P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) \cdot e^{-k_2 \cdot t}] \quad [2.20]$$

Geeraerd (2000) plantea un modelo más complejo que permite describir las curvas sigmoideas que presentan fenómenos de hombro y cola. La ecuación [2.21] representa el modelo de Geeraerd, donde N_{res} es la concentración de bacterias supervivientes, k_{max} es la velocidad específica de inactivación de primer orden y SI es la longitud del hombro inicial.

$$N_t = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{(-k_{max} \cdot t)} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SI} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right) + N_{res} \quad [2.21]$$

El modelo de Mafart (2002) es un modelo sencillo que establece que la inactivación microbiana sigue una frecuencia de distribución de Weibull, distribución desarrollada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad. Este modelo asume que la mortalidad microbiana se debe a la incapacidad de las células de resistir ciertas condiciones de estrés tras un tiempo de contacto determinado, siendo este tiempo diferente para cada célula. El modelo de Mafart se describe mediante la ecuación [2.22], donde δ es el parámetro de escala y p el parámetro de forma. El parámetro δ se corresponde con el tiempo necesario para reducir la primera unidad logarítmica decimal de la población bacteriana, es decir, para reducir la población desde N_0 hasta $N_0/10$. El parámetro p indica la forma que presenta la curva de inactivación: cuando $p > 1$, la curva toma forma convexa, mientras que si $p < 1$ la curva presenta forma cóncava. En el caso de que $p = 1$, la ecuación describiría un modelo lineal de primer orden.

$$\log \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad [2.22]$$

La Tabla 2.8 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las curvas de inactivación bacteriana obtenidas en el presente trabajo de investigación.

Tabla 2.8. Modelos cinéticos aplicados en el presente trabajo

Modelo cinético	Ecuación	Coefficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$\log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -k^* \cdot t^m$	k^*, m	(Hom, 1972)
Modelo de Hom modificado	$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m \cdot k \cdot C_0^n \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{n \cdot k' \cdot t}{m}\right)\right]^m$	k, k', n, m	(Haas y Joffe, 1994)
Modelo bifásico	$\log \frac{N_t}{N_0} = \log[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) \cdot e^{-k_2 \cdot t}]$	P, k_1, k_2	(Pruitt y Kamau, 1993)
Modelo de Mafart	$\log \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	(Mafart et al., 2002)
Modelo de Geeraerd	$N_t = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{(-k_{max} \cdot t)} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max} \cdot SI} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}}\right) + N_{res}$	k_{max}, SI	(Geeraerd et al., 2000)

Los modelos cinéticos propuestos han sido previamente utilizados en estudios realizados en el grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas para describir la inactivación de diferentes bacterias en diversas matrices acuosas mediante distintos tratamientos de desinfección (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Modelos cinéticos aplicados en estudios previos del grupo Calidad y Tratamiento de Aguas

Modelos cinéticos	Matriz acuosa	Bacteria de estudio	Tratamiento aplicado	Referencia
Hom			NaClO	
Hom modificado		<i>Enterococcus</i> sp.	UVA-vis, UVA-vis/H ₂ O ₂ , UVA-vis/TiO ₂ , UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂	Lanao, 2012
Bifásico	Agua natural (prepotable)			
Mafart		<i>Clostridium perfringens</i>	O ₃ , O ₃ /H ₂ O ₂ , O ₃ /TiO ₂ , O ₃ /TiO ₂ /H ₂ O ₂	
Geeraerd				
Hom		<i>Escherichia coli</i>		
Bifásico	Agua residual depurada		UVA-vis, UVA-vis/H ₂ O ₂ , UVA-vis/H ₂ O ₂ /Fe ³⁺	Rodríguez-Chueca, 2013
Mafart		<i>Enterococcus</i> sp.		
Hom				
Bifásico	Agua natural (prepotable)	<i>Escherichia coli</i>	O ₃ , O ₃ /H ₂ O ₂ , O ₃ /TiO ₂ , O ₃ /TiO ₂ /H ₂ O ₂	Rodríguez-Chueca et al., 2015a
Mafart				
Hom			NaClO	
Hom modificado				
Bifásico	Agua residual depurada	<i>Enterococcus</i> sp.	O ₃ , O ₃ /H ₂ O ₂	Valero et al., 2015
Mafart				
Geeraerd			UVA-vis/TiO ₂ /H ₂ O ₂	
Hom				
Bifásico	Agua natural (prepotable)	<i>Enterococcus</i> sp.	O ₃ , O ₃ /H ₂ O ₂ , O ₃ /TiO ₂ , O ₃ /TiO ₂ /H ₂ O ₂	Miguel et al., 2016
Mafart				

2.4.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error

Los coeficientes cinéticos de cada modelo descrito anteriormente se obtienen mediante ajuste de las ecuaciones matemáticas a los valores experimentales correspondientes. Para ello se emplea el método de los mínimos cuadrados, que es una técnica de regresión no lineal utilizada a menudo para este fin por otros autores (Pernitsky et al., 1995, Cho et al., 2003, Lanao, 2012, Rodríguez-Chueca, 2013).

En la actualidad, diversos programas informáticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utilizan dos herramientas del programa Microsoft® Excel: la herramienta Solver y la herramienta de GlnaFiT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) (Geeraerd et al., 2005).

No todos los modelos cinéticos propuestos son adecuados para describir cada una de las curvas de inactivación obtenidas en la presente investigación. Para evaluar la calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales, se utilizan dos parámetros de ajuste o índices de error: el coeficiente de correlación (R) y el error cuadrático medio (ECM). También se utiliza con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente.

El coeficiente de correlación, r , se utiliza como una medida global de la calidad del ajuste. Este coeficiente informa sobre el grado de relación que hay entre los valores observados experimentalmente y los estimados mediante los modelos. Cuanto más cercano sea el valor r a 1, mejor es la precisión predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. El coeficiente de correlación viene determinado por la ecuación [2.23], donde \tilde{y}_i son los valores estimados \bar{y} es la media de los valores reales.

$$r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad [2.23]$$

El error cuadrático medio, ECM, sirve para cuantificar la diferencia entre los valores estimados y los valores reales. Se define como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los errores (diferencia entre los valores observados y los valores estimados) y viene determinado por la ecuación [2.24], donde n es el tamaño de la muestra. Un valor de ECM igual a 0 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales.

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [2.24]$$

Por último, se representan gráficamente los valores observados frente a los valores estimados para comparar los diferentes modelos. La bondad del modelo es mayor cuanto más próximos estén los puntos a lo largo de la línea de equivalencia.

**Capítulo 3. Control microbiológico
de aguas residuales
urbanas para su
reutilización**

3.1. Contaminación microbiológica en las aguas residuales urbanas

3.1.1. Riesgos de los microorganismos presentes en las aguas residuales urbanas

Los microorganismos se definen como seres vivos de tamaño igual o inferior a un milímetro de diámetro que no pueden observarse claramente a simple vista y sólo pueden examinarse mediante un microscopio (Willey et al., 2009).

En las aguas residuales, al igual que ocurre en las naturales, pueden encontrarse gran variedad de microorganismos, entre los que se incluyen algas, bacterias, helmintos, hongos, levaduras, protozoos, virus y pequeños animales microscópicos (rotíferos, crustáceos, etc.).

Las **bacterias** son organismos unicelulares procariotas con una estructura celular primitiva. Las bacterias se presentan principalmente en forma de cocos o de bacilos. Los cocos son células más o menos esféricas que aparecen como células individuales o asociadas en agrupaciones. Los bacilos son células con forma de bastón que suelen presentarse individualmente, aunque algunos permanecen juntos tras su división formando parejas o cadenas. Su tamaño es diverso en función de la especie, variando desde 0,1-0,2 μm de ancho a 5-10 μm de largo, aunque hay bacterias más grandes que llegan a alcanzar 0,5 mm de largo (Madigan et al., 2003).

Las bacterias se pueden dividir en dos grupos principales de acuerdo con su respuesta a la tinción de Gram (procedimiento descrito en el apartado 2.1.1.8): bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Las diferencias estructurales entre las paredes celulares de ambos grupos de bacterias se pueden apreciar en la Figura 3.1.

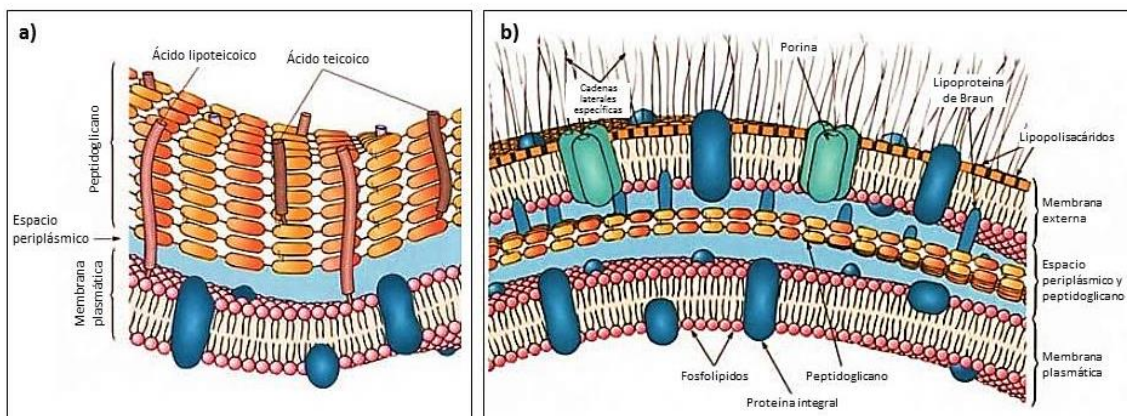


Figura 3.1. Envoltura de una bacteria a) Gram-positiva y b) Gram-negativa (Willey et al., 2009).

La pared Gram-positiva consiste en una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano (un enorme polímero formado por muchas subunidades idénticas)

situada externamente a la membrana plasmática. En cambio, la pared Gram-negativa contiene una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm cubierta por una membrana externa de 7 a 8 nm de grosor. Puesto que su pared de peptidoglicano es más gruesa, las células Gram-positivas son más resistentes a la presión osmótica que las Gram-negativas (Willey et al., 2009).

Los **helmintos** son parásitos con forma de gusano. Son animales invertebrados multicelulares, en los cuales se distinguen células diversas formando órganos con funciones especiales. Se pueden clasificar según la estructura de su alargado cuerpo en planos (trematodos y tenias) o redondos (nematodos). Los helmintos presentan un tamaño muy variable que oscila desde el orden de micrómetros hasta varios metros de longitud. Su ciclo vital incluye las fases de huevo, larva y edad adulta, pudiendo causar enfermedades en todas ellas (Castro, 1996).

Los **protozoos** son organismos eucariotas unicelulares o acelulares cuyos orgánulos presentan un papel funcional de órganos y tejidos de forma compleja. Los protozoos varían mucho en tamaño (2-250 μm), morfología, nutrición y ciclo vital. La mayoría son de vida libre y pueden encontrarse en el agua de manera natural; sin embargo, varias especies son parásitas y viven de sus hospedadores. En condiciones difíciles algunos protozoos adoptan la forma de quistes u ooquistes. Los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* son comunes en las aguas con presencia de contaminación fecal. Ambas especies son patógenas, muy persistentes en el medio ambiente y muy resistentes a los tratamientos de desinfección convencionales, como la cloración (USEPA, 1999).

Los **virus** son agentes infecciosos que tienen una organización acelular simple con una envoltura proteica y un genoma de ácidos nucleicos (desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN)). Todos los virus son parásitos obligados ya que no poseen metabolismo independiente y se reproducen únicamente en el interior de células vivas. Su tamaño oscila desde 20 a 300 nm. Las especies son específicas respecto a la infección, atacando normalmente a un solo tipo de hospedador, ya sean animales, plantas o incluso bacterias (bacteriófagos) (Madigan et al., 2003). Al contrario que las bacterias, los virus no se encuentran en el ser humano de forma natural. Cuando las personas enferman por causa de un virus, generalmente se eliminan del cuerpo humano en grandes cantidades mediante las heces.

Algunos microorganismos pueden ser patógenos, es decir, tienen la capacidad de causar enfermedades. Las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 muestran los agentes infecciosos o patógenos potencialmente presentes en las aguas, así como las enfermedades asociadas a cada uno.

Tabla 3.1. Enfermedades bacterianas de transmisión hídrica (USEPA, 2012)

Patógeno	Enfermedad
Bacteria	
<i>Shigella</i>	Shigellosis (disentería bacilar)
<i>Salmonella</i>	Salmonellosis, gastroenteritis (diarrea, vómitos, fiebra), artritis reactiva, fiebres tifoideas
<i>Vibro cholera</i>	Cólera
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	Gastroenteritis y septicemia, Síndrome Hemolítico Urémico (SHU)
<i>Yersinia</i>	Yersiniosis, gastroenteritis y septicemia
<i>Leptospira</i>	Leptospirosis
<i>Campylobacter</i>	Gastroenteritis, artritis reactiva, síndrome de Guillain-Barré
Micobacterias atípicas	Enfermedad respiratoria (neumonitis por hipersensibilidad)
<i>Legionella</i>	Enfermedad respiratoria (neumonía, fiebre de Pontiac)
<i>Staphylococcus</i>	Infecciones de piel, ojos y oídos; septicemia
<i>Pseudomonas</i>	Infecciones de piel, ojos y oídos
<i>Helicobacter</i>	Gastritis crónica, úlceras, cáncer gástrico

Tabla 3.2. Enfermedades parasitarias (helmintos y protozoos) de transmisión hídrica (USEPA, 2012)

Patógeno	Enfermedad
Helminto	
<i>Ascaris</i>	Ascariasis (infección por lombrices intestinales)
<i>Ancylostoma</i>	Anquilostomiasis
<i>Necator</i>	Necatoriasis
<i>Strongyloides</i>	Strongiloidiasis
<i>Trichuris</i>	Tricuriasis
<i>Taenia</i>	Taeniasis, neurocisticercosis
<i>Enterobius</i>	Enterobiasis
<i>Echinococcus</i>	Hidatidosis
Protozoo	
<i>Entamoeba</i>	Amebiasis (disentería amébrica)
<i>Giardia</i>	Giardiasis (gastroenteritis)
<i>Cryptosporidium</i>	Criptosporidiosis (diarrea, fiebre)
Microsporidia	Diarrea
<i>Cyclospora</i>	Ciclosporiasis (diarrea, hinchazón, fiebre, calambres estomacales y dolor muscular)
<i>Toxoplasma</i>	Toxoplasmosis

Tabla 3.3. Enfermedades víricas de transmisión hídrica (USEPA, 2012)

Patógeno	Enfermedad
Virus	
Enterovirus (Poliovirus, Echovirus, Coxsackie-virus, nuevos Enterovirus)	Gastroenteritis, anomalías cardíacas, meningitis, enfermedades respiratorias, desórdenes nerviosos y otras
Virus de la Hepatitis A y E	Hepatitis infecciosa
Adenovirus	Enfermedades respiratorias, infecciones oculares, gastroenteritis
Rotavirus	Gastroenteritis
Parvovirus	Gastroenteritis
Astrovirus	Gastroenteritis
Calicivirus (Norovirus y Sapovirus)	Gastroenteritis
Coronavirus	Gastroenteritis

Las aguas residuales puede ser fuente de importantes brotes de enfermedades, como el cólera, la disentería o la criptosporidiosis. Gran parte de los microorganismos patógenos llegan al agua mediante las heces de humanos o animales infectados, ya sea de forma puntual, a través de vertidos urbanos, o de forma difusa, a través de aguas de escorrentía de áreas agrícolas y fosas sépticas.

La Figura 3.2 muestra las vías de infección de patógenos asociados al agua (WHO, 2004).

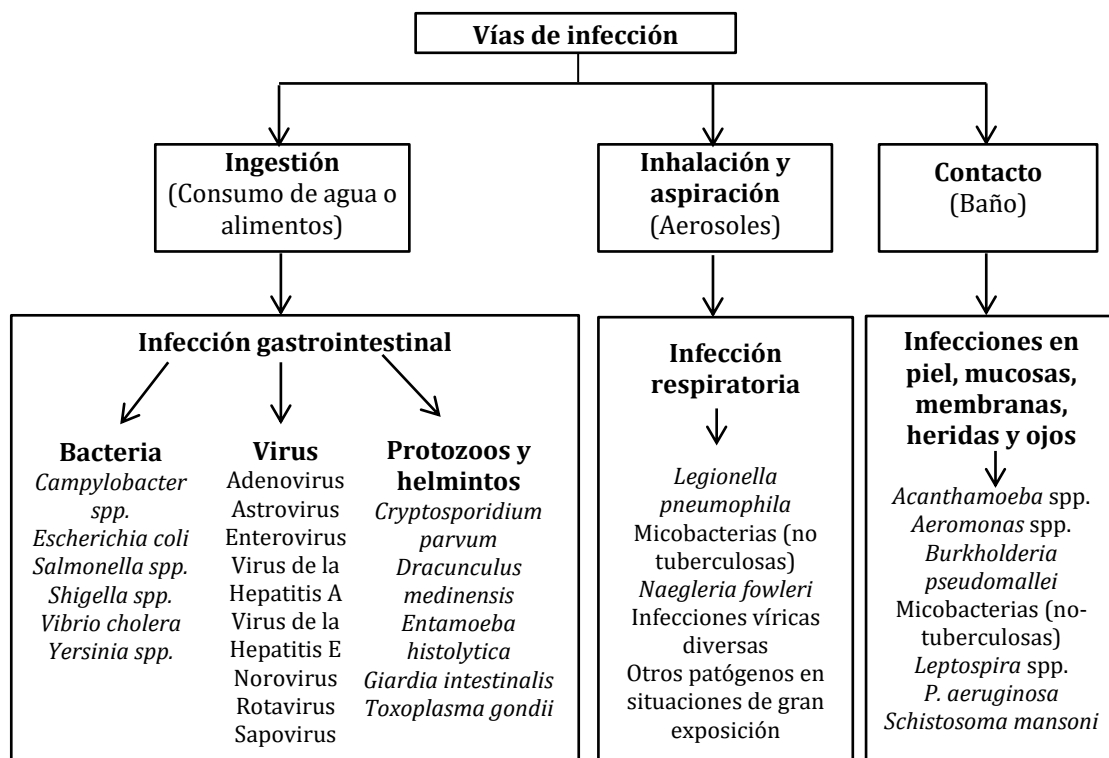


Figura 3.2. Vías de transmisión e infección de patógenos presentes en las aguas

Como se observa en la Figura 3.2, una de las principales vías de transmisión de patógenos es la ingesta directa de agua contaminada, siendo también una posible ruta de infección el consumo de alimentos regados con ésta. Además de la ingesta, existen otras vías de transmisión, como la inhalación, producida cuando el agua está en forma de aerosol, que da lugar a infecciones del tracto respiratorio (ej. *Legionella*, micobacteria atípica). El contacto con el agua, por ejemplo en las aguas de baño, también puede dar lugar a infecciones en sitios tan diversos como la piel o el cerebro (ej. *Naegleria fowleri*, *Burkholderia pseudomallei*).

En la actualidad, está emergiendo un problema asociado a las enfermedades de origen microbiano. Algunos microorganismos han desarrollado resistencia a los fármacos con los que comúnmente se trataban. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación (WHO, 2016). Las aguas residuales urbanas, así como las estaciones de depuración, suponen posibles vías de desarrollo y transmisión de resistencia a los fármacos antimicrobianos, ya que en ellas confluyen multitud de microorganismos y fármacos de distinto origen (Wan y Chou, 2014, Mandal et al., 2015).

3.1.2. Indicadores microbiológicos de contaminación

Conocer el tipo y la concentración de microorganismos presentes en las aguas es fundamental para determinar la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas.

Debido a la gran cantidad de microorganismos que pueden coexistir en una muestra de agua, no resulta viable determinar todos los patógenos presentes, ya que ello supondría llevar a cabo multitud de técnicas de aislamiento y análisis que a menudo son complejas y tienen un coste elevado. Además, la baja concentración en la que pueden encontrarse algunos patógenos dificulta su detección. En su lugar, se utilizan indicadores de contaminación fecal, que son organismos fáciles de determinar cuya medida representa la concentración de patógenos con propiedades similares en el agua. La presencia de indicadores no siempre supone un riesgo por sí misma, sino que indica la posible existencia de patógenos causantes de enfermedades, como bacterias, virus y protozoos que también viven en el sistema digestivo de animales y humanos (WHO, 2006).

Un microorganismo indicador ideal debe cumplir las siguientes características (Borrego et al., 1990):

- Estar presente en las heces humanas y/o animales.

- Estar en el agua en mayor concentración que los patógenos
- No multiplicarse en las aguas naturales
- Tener una persistencia en el agua similar a los patógenos
- Presentar una resistencia a los tratamientos similar a los patógenos
- Ser detectables mediante métodos simples y baratos
- Ser relativamente inocuos para el hombre

Aunque ningún microorganismo reúne todas las propiedades mencionadas, los indicadores que tradicionalmente se han utilizado y se siguen utilizando son los indicadores bacterianos. A continuación se describen más detalladamente algunas de las bacterias utilizadas como indicadores de contaminación fecal en las aguas.

El grupo de los **coliformes** está constituido por bacterias Gram-negativas habituales en la región intestinal de mamíferos y aves. Se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa a 35-37°C. Los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* forman parte de los coliformes. Algunos de ellos son patógenos manifiestos u oportunistas responsables de una gran variedad de infecciones (Guentzel, 1996). Se distingue entre los coliformes totales, que comprenden todos los coliformes de cualquier origen, y los **coliformes fecales**, que son aquellos de origen exclusivamente intestinal, y que además, son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas más altas (44°C).

La especie *Escherichia coli* suele ser la predominante dentro del subgrupo de los coliformes fecales. Se trata de una bacteria anaerobia facultativa, Gram-negativa, con forma de bacilo y un tamaño de 1 a 6 µm. Reside en el colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de cepas de *E. coli* no son patógenas, algunas cepas producen gastroenteritis o infecciones de las vías urinarias. Actualmente es uno de los indicadores más utilizados para determinar la existencia de contaminación fecal en las aguas y para evaluar la eficacia de los tratamientos de desinfección.

El género *Enterococcus spp.* incluye los denominados enterococos intestinales o estreptococos fecales. Este género presenta células esféricas u ovoides (cocos) en parejas o cadenas cortas, no esporuladas, a veces inmóviles, con un tamaño de 0,6 a 2,5 µm. Son bacterias anaerobias facultativas, Gram-positivas, quimioheterótrofas, y mesófilas (Willey et al., 2009). Las especies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae* forman parte de este género. Algunos enterococos, como *Enterococcus faecalis*, son patógenos para el hombre, pudiendo causar importantes infecciones como endocarditis y meningitis. La

mayoría de especies no se multiplican en el medio acuático, por lo que son un buen indicador de contaminación fecal. Además, los enterococos pueden sobrevivir más tiempo en el agua que *E. coli* y presentan mayor resistencia a la desecación y a la cloración (WHO, 2004).

Staphylococcus aureus es una bacteria aerobia o anaerobia facultativa, Gram-positiva, que presenta células esféricas u ovoides en parejas o cadenas, inmóviles y no esporuladas, con un tamaño de 0,5 a 2 μm . Aunque *S. aureus* está presente comúnmente en la microflora humana, puede causar enfermedades tales como furúnculos, abscesos, infecciones de heridas o neumonía (Willey et al., 2009). Esta bacteria está relativamente extendida en el medioambiente, aunque se ubica principalmente en la piel y las membranas mucosas de animales y a veces se detecta en el tracto gastrointestinal. Por ello, suele encontrarse en agua residuales y aguas de baño (WHO, 2004).

La bacteria ***Pseudomonas aeruginosa*** tiene forma de bacilo recto o ligeramente curvado, con medidas de 0,5 a 5 μm . Son bacterias quimioheterótrofas, Gram-negativas, que generalmente realizan una respiración aerobia y se desplazan mediante uno o varios flagelos polares. Este microorganismo está comúnmente presente en heces, suelos, aguas superficiales y residuales, pudiendo multiplicarse en los ambientes acuáticos. Algunas pseudomonas como *P. aeruginosa*, son patógenos muy importantes de animales y plantas, infectando a personas bajas de defensas, invadiendo zonas de quemaduras o produciendo infecciones de las vías urinarias.

La especie ***Clostridium perfringens*** está formada por bacilos Gram-positivos, anaerobios, inmóviles y formadores de esporas. Las esporas o esporos son formas de resistencia que permiten superar situaciones adversas (ej. irradiación UV, pH y temperaturas extremas) que destruirían la célula vegetativa. *Clostridium perfringens* es la especie más habitual en aguas dentro del grupo de las bacterias anaerobias sulfito-reductoras. Su origen no es exclusivamente fecal, ya que pueden encontrarse también en múltiples lugares como suelo, polvo, sedimento marino, etc. Sus esporos sobreviven en el agua mucho más tiempo que los coliformes y pueden ser resistentes a los tratamientos de desinfección si no se realizan de manera adecuada (Lanao, 2012). Es patógena para los animales y para el hombre (Willey et al., 2009).

La ***Salmonella spp.*** son bacilos móviles, Gram-negativos que no fermentan la lactosa, pero que producen sulfuro de hidrógeno o gas mediante la fermentación de carbohidratos. Este género incluye las especies *Salmonella entérica* o *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella bongori* y *Salmonella typhi*). Se encuentran ampliamente distribuidas en el medioambiente

y normalmente llegan a los sistemas acuáticos mediante la contaminación fecal causada por las aguas residuales, el ganado o los animales salvajes. A menudo se encuentran también en los alimentos, como huevos y leche. Pueden causar infecciones tales como gastroenteritis, septicemia y fiebres tifoideas.

El género *Legionella* se utiliza comúnmente como indicador de contaminación, aunque en este caso no se trata de contaminación de origen fecal. Este género, miembro de la familia Legionellaceae, tiene al menos 42 especies. Son bacterias Gram-negativas, con forma de bacilo, no formadoras de esporas. Pueden encontrarse en una gran variedad de ambientes acuáticos naturales, como ríos, arroyos y lagos, y proliferar a temperaturas superiores a 25°C. Por ello se desarrollan muy bien en torres de refrigeración, sistemas de agua caliente y spas. Aunque todas las especies de *Legionella* se consideran potencialmente patógenas para el ser humano, *L. pneumophila* es la responsable de la mayoría de casos de legionelosis. La ruta de infección más común de esta bacteria es mediante inhalación de agua en forma de aerosol (WHO, 2004).

3.2. Evolución de los microorganismos en una EDAR convencional

3.2.1. Aspectos generales

La Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas define las “aguas residuales urbanas” como las aguas residuales domésticas o la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales y/o aguas de correntía pluvial. A su vez, define “aguas residuales domésticas” como las aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios y generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas, y contempla como “aguas residuales industriales” a todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de correntía pluvial.

El agua residual contiene, generalmente, concentraciones elevadas de sólidos en suspensión, materia orgánica biodegradable, nutrientes, microorganismos potencialmente patogénicos y compuestos inorgánicos disueltos. Además, según su procedencia, pueden estar presentes contaminantes prioritarios, sustancias refractarias y metales pesados. El vertido de aguas residuales sin tratar puede dar lugar a problemas en los ecosistemas acuáticos: los sólidos en suspensión y la materia orgánica pueden generar condiciones anaerobias y depósitos de fango; los microorganismos patógenos aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades; los nutrientes producen eutrofización; algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos presentan toxicidad aguda o están considerados como carcinogénicos, mutagénicos o terogénicos; etc.

Como consecuencia, la citada Directiva (91/271/CEE), establece que las aguas residuales urbanas deben cumplir unos requisitos para poder verterse a los cauces receptores. Sin embargo, tan solo incluye límites de vertido para la demanda biológica de oxígeno (DBO_5 , 25 mg/L O_2), la demanda química de oxígeno (DQO, 125 mg/L O_2), los sólidos en suspensión totales (SST, 35 mg/L) y, en zonas propensas a eutrofización, para nitrógeno (10 mg/L N) y fósforo (1 mg/L P).

Con el fin de lograr dichos requisitos y dar cumplimiento a la Directiva 91/271/CEE, las aguas residuales urbanas deben someterse a un tratamiento de depuración en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) antes de ser devueltas a las aguas receptoras.

Generalmente, el tratamiento convencional de depuración del agua residual consta de varias etapas y procesos (Metcalf & Eddy, 2002):

- **Pretratamiento:** inicialmente el agua residual se somete a un proceso de desbaste mediante rejas o tamices para eliminar los sólidos gruesos como ramas y restos de papel. A continuación se retiran las arenas y las grasas en un desarenador-desengrasador. De esta forma se evitan posibles problemas operacionales y de mantenimiento en el resto de las etapas.
- **Tratamiento primario:** consiste en una etapa de coagulación-floculación para sedimentar los sólidos en suspensión y eliminar a su vez parte de la materia orgánica del agua. Se pueden añadir productos químicos (coagulantes y floculantes) para mejorar el rendimiento del proceso de sedimentación.
- **Tratamiento secundario:** una serie de microorganismos se encargan de reducir el contenido en materia orgánica biodegradable. Existen diferentes tipos de tratamientos biológicos: fangos activos, lechos biológicos, biodiscos, etc.
- Finalmente, algunas EDAR incluyen tratamientos adicionales para completar el proceso de depuración, como los procesos de eliminación de compuestos de nitrógeno y fósforo, que reducen el riesgo de eutrofización del medio receptor de las aguas de salida de depuradora (Willey et al., 2009).

Ninguna de las etapas de una EDAR convencional se diseña con el fin de reducir la carga microbiológica presente. Por tanto, se considera de interés evaluar el efecto de cada uno de los procesos incluidos en una EDAR sobre la posible inactivación microbiana. Para ello, se lleva a cabo el análisis microbiológico de muestras tomadas a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y de fangos de una EDAR convencional, utilizando como indicador la bacteria *Enterococcus* spp.

3.2.2. Descripción de la EDAR objeto de estudio

El estudio se realizó en la EDAR de Tudela, diseñada para tratar un caudal de 22.150 m³/día y una carga biológica de 6.879 kg DBO₅/día. Sus valores medios de tratamiento son de 19.997 m³/día y 5.219 kg DBO₅/día. Las características que presenta en general el agua residual a la entrada y salida de la EDAR se recogen en la Tabla 3.4 (NILSA, 2016).

Tabla 3.4. Características generales del agua residual a la entrada y salida de la EDAR de Tudela

	SST	DQO	DBO ₅
Entrada	248	530	244
Salida	16	61	14
Rendimiento	94 %	89 %	94 %

El esquema de tratamiento de la EDAR muestreada se ilustra en la Figura 3.3.

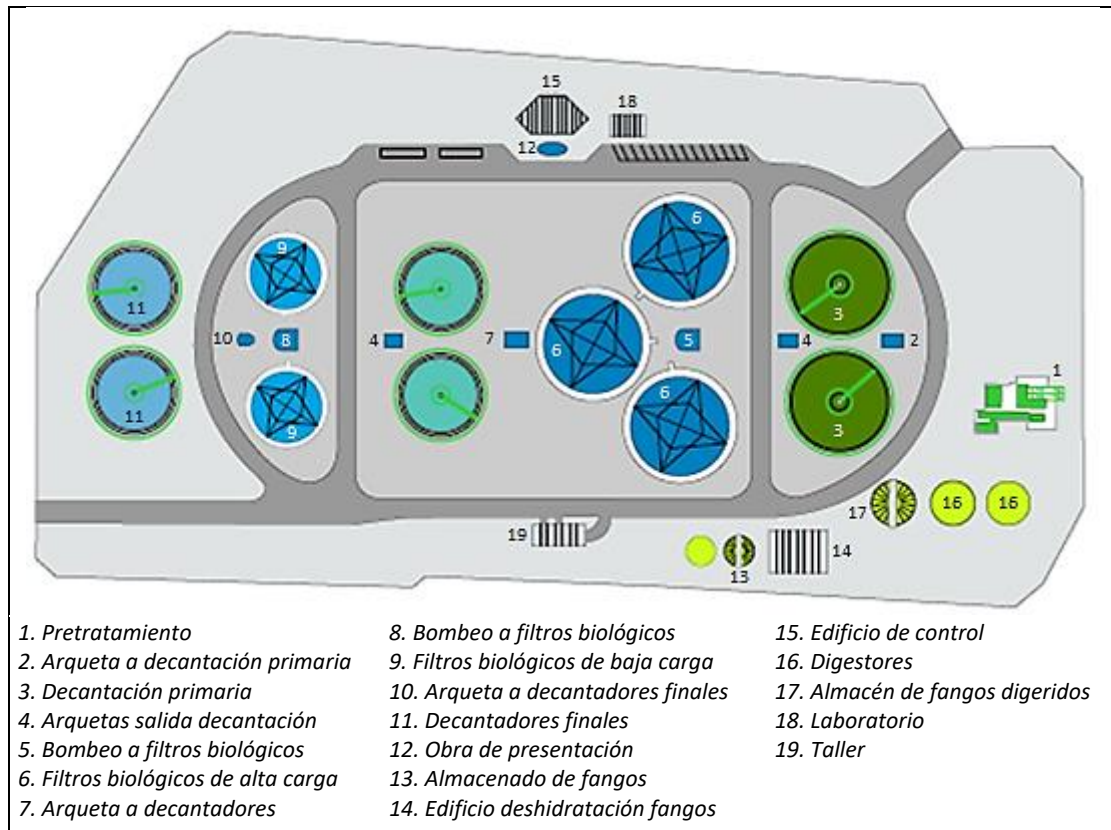


Figura 3.3. Plano de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Tudela

La EDAR cuenta con un pretratamiento de desbaste mediante una reja que elimina los sólidos gruesos y un desarenador/desengrasador para eliminar grasas, aceites, arenas y otras partículas. A continuación el agua residual se dirige a los decantadores primarios, en los que se reduce sustancialmente la concentración de materia en suspensión, la cual sale en forma de fangos. Seguidamente, se bombea el agua hasta los filtros o lechos biológicos de alta carga, en los que una película de microorganismos soportada en rellenos de plástico se encarga de reducir el contenido en materia orgánica. De aquí, el agua pasa a los decantadores secundarios para separar el agua clarificada de los fangos secundarios formados. De nuevo, se bombea el agua hasta unos lechos biológicos de baja carga y sus correspondientes decantadores. Tras estos decantadores finales el agua se vierte ya al cauce receptor (río Ebro).

Los fangos retirados en los decantadores primarios y secundarios se someten a un tratamiento de digestión aerobia para llevar a cabo su higienización y estabilización. Finalmente se deshidratan en una centrífuga, obteniéndose por una parte los fangos deshidratados y por otra el agua de rebose de la centrífuga.

3.2.3. Puntos de muestreo y análisis realizados

Las muestras se tomaron en la EDAR de Tudela el 26 de junio de 2013, a la entrada y salida de cada una de las etapas de tratamiento que tienen lugar en esta depuradora, tanto en la línea de aguas como en la de fangos. La Figura 3.4 muestra de forma esquemática los puntos de muestreo analizados.

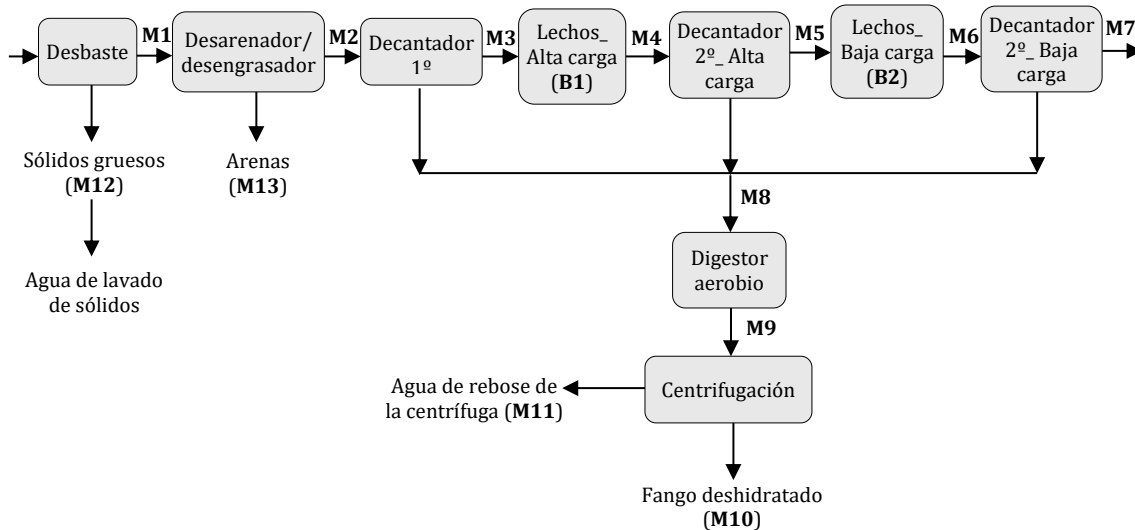


Figura 3.4. Puntos de muestreo en la EDAR de Tudela.

Las muestras, tanto líquidas como sólidas, tomadas en la línea de aguas consisten en: agua de entrada a la estación depuradora sin sólidos gruesos (M1), agua a la salida del desarenador/desengrasador (M2), agua a la salida del decantador primario (M3), agua a la salida de los lechos bacterianos de alta carga (M4) y a la salida del primer decantador secundario (M5), agua a la salida de los lechos bacterianos de baja carga (M6) y a la salida del decantador secundario de los lechos de baja carga, es decir, el efluente (M7). También se toman muestras de los sólidos gruesos retirados en el desbaste (M12) y de las arenas eliminadas en la etapa de desarenado (M13). Además, se toman muestras del biofilm presente en el relleno plástico del tanque de lechos bacterianos de alta carga (B1) y de baja carga (B2).

En la línea de fangos se toman muestras de los fangos semilíquidos procedentes de los decantadores primarios y secundarios (M8), de los fangos semilíquidos a la salida del proceso de digestión aerobia (M9), de los fangos deshidratados (M10) y del agua de rebose de la centrifuga (M11).

La toma de muestras para el análisis microbiológico se realiza según el procedimiento estandarizado indicado en la norma UNE-EN ISO 5667-1 (AENOR, 2007). Las muestras líquidas, semilíquidas y sólidas para el análisis microbiológico se toman en frascos de PET

estériles. Las muestras de biofilm se toman con hisopo y se introducen en un eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de disolución salina estéril (NaCl 0,9%). Todas las muestras se conservan en neveras provistas con bloques refrigerantes a temperatura inferior a 10°C hasta su análisis en el laboratorio. Los análisis bacteriológicos se llevan a cabo en un tiempo inferior a 24 horas.

El análisis de *Enterococcus* spp. en las muestras líquidas y semilíquidas (M1-M9 y M11) se realiza mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.1.1. Para el análisis de las muestras sólidas (M10, M12 y M13) se ponen en contacto 1 g de muestra sólida (peso húmedo) con 10 mL de disolución salina estéril (NaCl 0,9%) y se analiza la concentración en el líquido resultante. El resultado se expresa en *UFC/100mL* para las muestras líquidas, y en *UFC/g peso seco* en el caso de las muestras semilíquidas y sólidas (fangos, sólidos gruesos y arenas). En el caso de las muestras de biofilm tomadas en los lechos bacterianos, el resultado se expresa como Presencia o Ausencia de *Enterococcus* spp., al no poder determinarse la cantidad de biofilm analizada. Todos los análisis se realizan por duplicado.

De manera complementaria, se realizan análisis físico-químico *in-situ* en cada punto de muestreo para los parámetros pH, conductividad, temperatura y oxígeno disuelto (OD). Además, se mide la concentración de sólidos en suspensión totales en las muestras líquidas y la concentración de sólidos totales en las muestras semilíquidas y sólidas, mediante los métodos descritos en el apartado 2.1.2.

3.2.4. Resultados

3.2.4.1. Evolución de los parámetros microbiológicos

Línea de aguas

La concentración de *Enterococcus* spp. en el agua residual bruta y en el agua depurada de salida de la EDAR fue de $1,8 \cdot 10^6$ UFC/100 mL y de $6,4 \cdot 10^3$ UFC/100 mL, respectivamente.

La Figura 3.5 muestra la evolución de la bacteria *Enterococcus* spp. a lo largo de la línea de aguas de la EDAR objeto de estudio. Se observa que la población de enterococos disminuyó a lo largo de toda la línea de aguas de la EDAR, alcanzándose una reducción total de 2,46 unidades logarítmicas de dicha bacteria. Este valor es similar al observado por Wen et al. (2009) en la eliminación de enterococos en aguas residuales mediante fangos activos a escala de laboratorio (-2,5 log) y a escala real (-2,0 log).

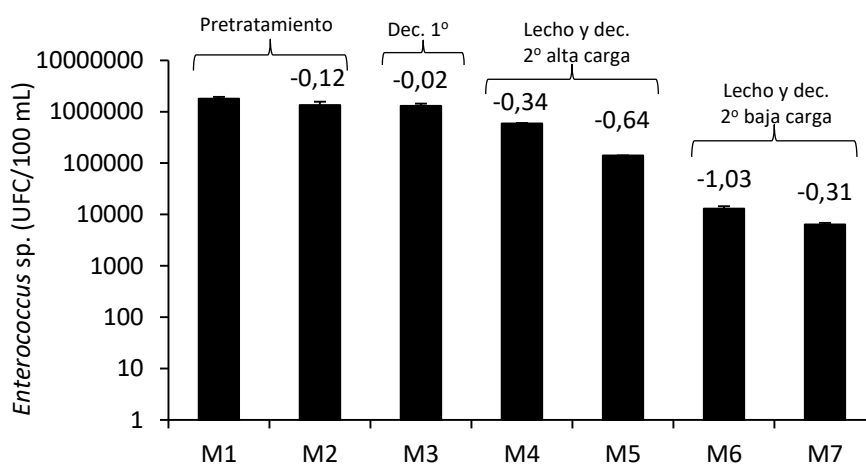


Figura 3.5. Evolución de la concentración de *Enterococcus* spp. a lo largo de la línea de aguas. Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$)

En las etapas de pretratamiento y decantación primaria apenas se redujo la población de *Enterococcus* spp. (-0,14 log.), mientras que en los lechos biológicos y sus decantadores correspondientes tuvo lugar la mayor eliminación de esta bacteria (-2'32 log.) (Figura 3.5). Esta mayor eficacia del tratamiento biológico se debe a que parte de la población de *Enterococcus* spp. presente en el agua queda retenida en el biofilm formado sobre el relleno de los lechos bacterianos. Hecho confirmado mediante la detección de la presencia de esta bacteria en ambas muestras de biofilm analizadas (B1 y B2). Posteriormente, conforme el biofilm va aumentando parte de éste se desprende del relleno, por lo que otra fracción de los enterococos se elimina en los fangos evacuados en los decantadores secundarios.

Por otra parte, tanto los sólidos retirados en el desbaste como en el desarenador mostraron una concentración elevada de *Enterococcus* spp., de $6,6 \cdot 10^6$ UFC/g sólido seco y $2,2 \cdot 10^5$ UFC/g sólido seco, respectivamente.

Trabajos previos realizados en el grupo de investigación de Calidad y Tratamiento de Aguas (Marín et al., 2015) muestran la concentración de *Escherichia coli* a lo largo de las distintas etapas de la EDAR de Tudela.

La Figura 3.6 muestra la evolución de la concentración bacteriana de *Escherichia coli* a lo largo de la línea de aguas de la EDAR objeto de estudio (Marín et al., 2015). Comparando los resultados de *E. coli* (Figura 3.6) con los obtenidos para *Enterococcus* spp. (Figura 3.5) se observa que la concentración inicial de *E. coli* ($3,6 \cdot 10^6$ UFC/100 mL) fue ligeramente superior a la de *Enterococcus* spp. ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/100 mL), así como la concentración a la salida ($1,7 \cdot 10^4$ y $6,4 \cdot 10^3$ UFC/100 mL, respectivamente). Durante la depuración del agua residual se alcanzó una reducción total de *E. coli* de -2,32 unidades logarítmicas, valor muy

parecido al determinado para *Enterococcus* spp. (-2,46 unidades log.), resultando el proceso global igual de efectivo para la eliminación de ambas bacterias.

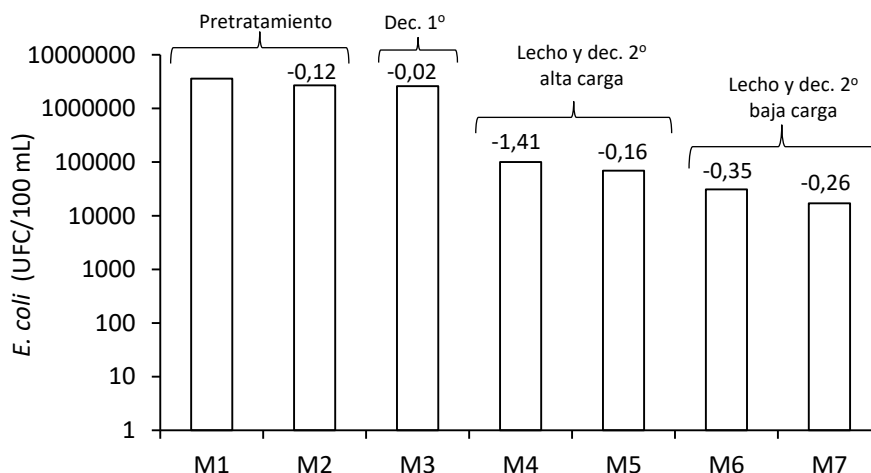


Figura 3.6. Evolución de la concentración de *Escherichia coli* a lo largo de la línea de aguas (Marín et al., 2015). Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).

En la Figura 3.6 se aprecia que durante el pretratamiento y la decantación primaria apenas se produjo reducción bacteriana. Además, ambas etapas fueron igual de eficaces para la eliminación de *E. coli* (Figura 3.6) y de *Enterococcus* spp. (Figura 3.5). La eliminación de estas bacterias del agua residual tuvo lugar fundamentalmente en las etapas de tratamiento biológico en los lechos bacterianos. Sin embargo, mientras que la población de enterococos se redujo principalmente en el segundo tanque de lechos bacterianos, la de *E. coli* se eliminó mayoritariamente en el primero. Los valores de reducción de *Enterococcus* spp. (-2,3 log) y de *E. coli* (-2,2 log) obtenidos en los lechos bacterianos son similares a los observados por Reinthaler et al. (2003) en la eliminación de *E. coli* mediante fangos activados en varias EDARs.

Línea de fangos

La evolución de la concentración de *Enterococcus* spp. en los fangos se muestra en la Figura 3.7.

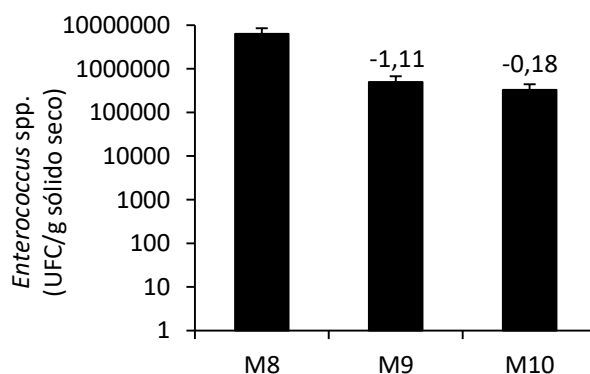


Figura 3.7. Evolución de la concentración de *Enterococcus* spp. a lo largo de la línea de fangos. Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).

Durante el tratamiento de los fangos se produjo una reducción en la concentración de *Enterococcus* spp. de -1,29 unidades logarítmicas, principalmente durante la etapa de digestión aerobia (-1,11 unidades log.). En la deshidratación de los fangos también se redujo ligeramente la población de enterococos (-0,18 unidades log.). El agua retirada en este proceso (M11) contiene la bacteria analizada en baja concentración ($3,50 \cdot 10^3$ UFC/100 ml), valor similar al del agua a la salida de la estación depuradora ($6,35 \cdot 10^3$ UFC/100 ml).

La Figura 3.8 muestra la evolución de la concentración de *E. coli* en la línea de fangos, determinada por Marín et al. (2015).

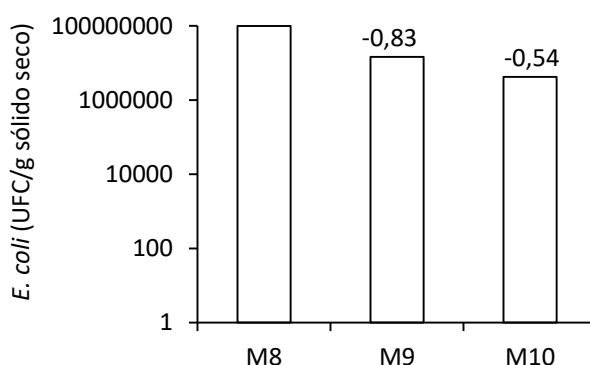


Figura 3.8. Evolución de la concentración de *E. coli* a lo largo de la línea de fangos (Marín et al., 2015). Sobre las barras representadas se indica la reducción bacteriana obtenida en cada etapa ($\log(N_i/N_{i-1})$).

La concentración de *E. coli* determinada en los fangos procedentes de los decantadores (M8) fue superior a la de enterococos, probablemente debido a que la concentración de *E. coli* en el agua residual bruta (M1) era ligeramente superior a la de enterococos. En conjunto, la reducción de la población bacteriana durante el tratamiento de los fangos fue prácticamente la misma para *E. coli* (Figura 3.8) y para enterococos (Figura 3.7), con valores de inactivación de -1,37 y -1,29 unidades logarítmicas, respectivamente. Para ambas bacterias se produjo mayor eliminación durante la etapa de digestión aerobia.

Flujo de *Enterococcus* spp. en la EDAR

Para conocer la distribución completa de *Enterococcus* spp. a lo largo de las líneas de agua y fangos, se realiza una estimación del flujo (\dot{C}) de esta bacteria en cada etapa, expresado como el número de colonias presentes por día (UFC/día). Para ello, se considera el caudal volumétrico propuesto por Marín et al. (2015) para esta EDAR.

La Tabla 3.5 recoge los flujos estimados de *Enterococcus* spp. a lo largo de la EDAR analizada, así como su eliminación ($\Delta \dot{C}$) en cada etapa.

Teniendo en cuenta los flujos calculados, la reducción total de *Enterococcus* spp. en la línea de aguas sería de $3,2 \cdot 10^{14}$ UFC/día y de $4,0 \cdot 10^{13}$ UFC/día en la línea de fangos. La mayor eliminación se produciría en el lecho bacteriano de carga alta (M4) y en la etapa de digestión de fangos (M9), para las respectivas líneas de agua y fangos.

Tabla 3.5. Flujo de *Enterococcus* spp. en la EDAR muestreada.

	Punto de muestreo	Q (m ³ /d)	N _i (UFC/100 mL)	Ĉ _i (UFC/d)	Δ Ĉ (UFC/d)
Línea de aguas	M1	18000	$1,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^{14}$	-
	M2	18000	$1,4 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^{14}$	$-8,1 \cdot 10^{13}$
	M3	17900	$1,3 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^{14}$	$-1,0 \cdot 10^{13}$
	M4	17900	$5,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{14}$	$-1,3 \cdot 10^{14}$
	M5	17840	$1,4 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^{13}$	$-8,1 \cdot 10^{13}$
	M6	17840	$1,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^{12}$	$-2,3 \cdot 10^{13}$
	M7	17780	$6,4 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^{12}$	$-1,2 \cdot 10^{12}$
Línea de fangos	M8	220	$1,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^{13}$	-
	M9	220	$1,6 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^{12}$	$-3,8 \cdot 10^{13}$
	M10	20	$1,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^{12}$	$-1,5 \cdot 10^{12}$
	M11	200	$3,5 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^9$	

A lo largo de la línea de aguas hubo una pérdida de *Enterococcus* spp. en los decantadores (M3 + M5 + M7) de $9,2 \cdot 10^{13}$ UFC/día. Sin embargo, en la línea de fangos, el flujo de entrada al digestor aerobio (M8) fue algo menor, $4,2 \cdot 10^{13}$ UFC/día, aunque ambos valores se encuentran en el mismo rango de concentración.

Los enterococos son seres vivos que durante el proceso de depuración siguen su ciclo biológico de reproducción, crecimiento y muerte celular. Por una parte, la materia orgánica y el oxígeno presentes en el agua les aportan los nutrientes necesarios para su supervivencia. Por otra parte, existen otros microorganismos que pueden competir con los *Enterococcus* spp. por el alimento presente y, a su vez, ésta y otras bacterias pueden servir de alimento para algunos protozoos. De hecho, la reducción en la cantidad de bacterias en los fangos activos está asociada con la presencia de protozoos predadores de bacterias (Tonani et al., 2011).

Además, otros factores como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno o el pH del agua afectan al crecimiento bacteriano. Por tanto, puede haber diversas fluctuaciones en el flujo de *Enterococcus* spp. a lo largo de la EDAR.

3.2.4.2. Evolución de los parámetros físico-químicos

La Tabla 3.6 recoge los resultados de los parámetros físico-químicos analizados en cada punto de muestreo.

Tabla 3.6. Características físico-químicas de las muestras analizadas en la línea de aguas y fangos.

Muestra	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (µS/cm)	OD (mg O ₂ /L)	OD (% sat.)	SST (mg/L)	ST (mg sólido seco/g)	Humedad en sólidos (%)
M1	7,58	20,7	1935	2,00	28	240	-	-
M2	8,53	18,8	1910	1,95	22	220	-	-
M3	7,77	19,8	1976	3,08	45	170	-	-
M4	8,23	20,6	1553	7,11	81	70	-	-
M5	8,11	19,7	1885	7,18	83	30	-	-
M6	8,12	18,6	1924	7,66	85	30	-	-
M7	8,18	17,6	1845	7,95	88	15	-	-
M8	-	-	-	-	-	30018	30	97%
M9	-	-	-	-	-	32320	32	97%
M10	-	-	-	-	-	-	304	70%
M11	-	-	-	-	-	320	-	
M12	-	-	-	-	-	-	110	89%
M13	-	-	-	-	-	-	924	8%

En la línea de aguas, se observa que tanto el pH como la temperatura y la conductividad se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todas las etapas de tratamiento (Tabla 3.6). En general, la presencia de oxígeno disuelto en el agua aumentó en cada etapa, siendo el OD inicial muy bajo (2 mg/L O₂) y obteniéndose a la salida un valor adecuado de este parámetro (8 mg/L O₂). Cabe destacar que el oxígeno disuelto aumentó en gran medida tras pasar por el primer lecho bacteriano, ya que en éste el agua se distribuye mediante sistemas rotativos de aspersión. También se observa una notable reducción de los SST a lo largo de la línea de aguas, produciéndose la mayor eliminación de sólidos en las etapas de decantación primaria y tras el lecho bacteriano de alta carga y su correspondiente decantador secundario.

Por otra parte, en la línea de fangos se consiguió disminuir la humedad desde el 97% de los fangos brutos hasta el 70% presente en los fangos tratados.

3.2.4.3. El agua residual depurada

El agua de salida de la EDAR o agua residual depurada (M7, Tabla 3.6, Figura 3.5 y Figura 3.6) mostró un pH adecuado (pH~8), una buena saturación de oxígeno (~90 %), conductividad relativamente elevada (~2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$), presencia de sólidos en suspensión (15 mg/L) y concentraciones relativamente elevadas de *E. coli* ($1,7 \cdot 10^4$ UFC/100 mL) y de *Enterococcus* spp. ($6,4 \cdot 10^3$ UC/100 mL). Estas características son similares a las que presentan comúnmente las aguas residuales depuradas, las cuales se caracterizan por la presencia de: materia orgánica (peligrosa o no peligrosa), contaminantes inorgánicos (cloruros, nitrógeno, fósforo, metales pesados...), sólidos en suspensión, turbidez y gran variedad de microorganismos (Ormad, 2011).

En la Tabla 3.7 se recogen algunos de los microorganismos a menudo presentes en las aguas de salida de EDAR, así como su rango de concentración.

Tabla 3.7. Microorganismos presentes en las aguas de salida de depuradora

Microorganismo	Concentración	Referencias
<i>Clostridium perfringens</i> (esporos)	$4 \cdot 10^2$ - $8 \cdot 10^4$ UFC*/100 mL	Levantesi et al. (2010), Mosteo et al. (2013), Seeger et al. (2016)
<i>Enterococcus</i> spp.	$1,2 \cdot 10^1$ - $3,1 \cdot 10^6$ UFC/100 mL	Muela et al. (2011), Mosteo et al. (2013), Seeger et al. (2016)
Bacterias <i>Escherichia coli</i>	$6,0 \cdot 10^2$ - $1,4 \cdot 10^7$ UFC/100mL	Levantesi et al. (2010), Muela et al. (2011), Mosteo et al. (2013), Marín et al. (2015), Seeger et al. (2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,6 \cdot 10^4$ - $3,9 \cdot 10^5$ UFC/100mL	Mosteo et al. (2013), Rodríguez-Chueca (2013)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5,1 \cdot 10^3$ - $3,2 \cdot 10^5$ UFC/100mL	Mosteo et al. (2013), Rodríguez-Chueca (2013)
<i>Ancylostoma</i> sp.	$1,2 \cdot 10^3$ huevos/L	Tonani et al. (2011)
Helmintos <i>Ascaris</i> sp.	<50- $4,5 \cdot 10^3$ huevos/L	Tonani et al. (2011), Yaya-Beas et al. (2016)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	$7,0 \cdot 10^3$ huevos/L	Tonani et al. (2011)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	4-8 ooquistes/L	Cheng et al. (2009)
<i>Cryptosporidium hominis</i>	4-8 ooquistes/L	Cheng et al. (2009)
<i>Endolimax nana</i>	$6,7 \cdot 10^2$ quistes/L	Tonani et al. (2011)
Protozoos <i>Entamoeba coli</i>	$1,5 \cdot 10^3$ quistes/L	Tonani et al. (2011)
<i>Entamoeba histolytica</i>	$5,0 \cdot 10^2$ quistes/L	Tonani et al. (2011)
<i>Giardia duodenalis</i>	<3 - $1,7 \cdot 10^3$ quistes/L	Cheng et al. (2009), Tonani et al. (2011)
<i>Microsporidia</i>	Presencia	Izquierdo et al. (2011)
Virus Colifagos somáticos	$1,2 \cdot 10^3$ - $5,3 \cdot 10^4$ UFP**/100 mL	Levantesi et al., (2010), Seeger et al., (2016)
Colifagos de ARN F-específicos	$6,4 \cdot 10^1$ UFP/100 mL	Seeger et al., (2016)

*UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

**UFP: Unidades Formadoras de Placas

Los valores hallados en este estudio para *Enterococcus* spp. y por Marín et al. (2015) para *E. coli* en el agua de salida de la EDAR (Figura 3.5 y Figura 3.6) se encuentran dentro del rango observado comúnmente en este tipo de aguas (Tabla 3.7). Ambas bacterias se utilizan como indicadores de contaminación fecal e indican la presencia de otros microorganismos en el agua.

La composición microbiológica en las aguas de salida de depuradora es altamente variable y depende principalmente de la composición microbiológica del agua residual que entra en las instalaciones de depuración. La diversidad de microorganismos o microbios presentes en el agua residual depende a su vez de multitud de factores, tales como el tamaño de la población, las actividades económicas, los hábitos y costumbres alimentarias y socio-sanitarias, la composición del terreno, la climatología, etc. (Goñi, 2011).

Por tanto, los microorganismos presentes en las aguas residuales urbanas proceden fundamentalmente de excrementos humanos y animales, así como del medioambiente (aire y suelo) al ser arrastrados por las aguas. La proporción y el tipo de microorganismos variarán en función de los factores especificados anteriormente que determinan la cantidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de sales.

Actualmente, ante la creciente demanda de agua y la escasez de recursos hídricos, se plantea la reutilización de aguas residuales depuradas como una posible solución para aumentar la disponibilidad de agua existente. Sin embargo, como se puede apreciar en los resultados obtenidos y en la bibliografía consultada (Tabla 3.6, Tabla 3.7, Figura 3.5 y Figura 3.6), las aguas residuales depuradas todavía contienen sustancias contaminantes y microorganismos en concentraciones relativamente elevadas. Para realizar una buena gestión de las aguas residuales y asegurar que su reutilización está libre de riesgos, se han publicado diversas guías y normativas legales que establecen las directrices a seguir. En el apartado 3.3 se describen las normas en materia de reutilización de aguas residuales depuradas y las tecnologías aplicables para conseguir una calidad adecuada de dichas aguas.

3.3. Control de la contaminación microbiológica de aguas de salida de EDAR

3.3.1. Normas de calidad microbiológica en reutilización de aguas residuales depuradas

A nivel global, la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) propone unas pautas para el uso seguro de aguas residuales, excrementos y aguas grises en su guía “WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater” (WHO, 2006). En sus contenidos, incluye políticas y aspectos regulatorios, uso de aguas residuales en agricultura, usos de aguas residuales y excrementos en acuicultura y uso de excrementos y aguas grises en agricultura. Esta guía establece diferentes valores de reducción de patógenos en el agua a reutilizar según el tipo de cultivo y de riego y sugiere la monitorización de *Escherichia coli* y huevos de helminto como parámetros de control microbiológico.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, USEPA) recoge en su guía “Guidelines for Water Reuse” regulaciones y directrices para la reutilización del agua (USEPA, 2012). Entre los requisitos de control microbiológico se incluye la monitorización de coliformes fecales, *E. coli* o enterococos, con valores máximos admisibles variables en función del uso del agua.

En España, aunque las aguas de salida de depuradora han de cumplir los requisitos establecidos en la Directiva 91/271/CEE, su reutilización conlleva la necesidad de establecer criterios de calidad más estrictos. Como consecuencia, en 2007 se publica el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Este RD fija valores máximos admisibles de parámetros microbiológicos y físico-químicos en función del uso al que vaya destinada el agua (Tabla 3.8).

En general, el RD 1620/2007 exige el control de huevos de nematodos intestinales (géneros *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*), *Escherichia coli*, sólidos en suspensión y turbidez. Además, fija valores límite para *Legionella* spp. en los casos que haya riesgo de aerosolización y en las torres de refrigeración y condensadores evaporativos. La ausencia de *Salmonella* spp. se establece también como criterio de calidad adicional para determinados usos, como el riego de cultivos en los que el agua entra en contacto directo con partes comestibles para alimentación humana o en el uso de aguas de proceso y limpieza para la industria alimentaria. Finalmente, si se riegan pastos para consumo de animales productores de carne hay que controlar también los parásitos *Taenia saginata* y *Taenia solium*.

Tabla 3.8. Criterios de calidad para la reutilización de las aguas según sus usos (RD 1620/2007)

Uso del Agua previsto	Valor Máximo Admisible (VMA)					Otros criterios
	Nematodos Intestinales (huevos/10 L)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 mL)	Sólidos en Suspensión (mg/L)	Turbidez (UNT)		
1. Usos Urbanos						
Calidad 1.1	1	0	10	2		<i>Legionella</i> spp. (100 UFC/L)
Calidad 1.2	1	200	20	10		
2. Usos Agrícolas						
Calidad 2.1	1	100	20	10		<i>Legionella</i> spp. (1.000 UFC/L); <i>Salmonella</i> (Ausencia)
Calidad 2.2	1	1000	35	No se fija límite		<i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i> (1 huevo/L); <i>Salmonella</i> (Ausencia)
Calidad 2.3	1	10000	35	No se fija límite		<i>Legionella</i> spp (100 UFC/L)
3. Usos Industriales						
Calidad 3.1 a) y b)	No se fija límite	10000	35	15		<i>Legionella</i> spp (100 UFC/L)
Calidad 3.1 c)	1	1000	35	No se fija límite		<i>Legionella</i> spp (100 UFC/L); <i>Salmonella</i> (Ausencia)
Calidad 3.2	1	0	5	1 UNT		<i>Legionella</i> spp. (Ausencia UFC/L)
4. Usos Recreativos						
Calidad 4.1	1	200	20	10		<i>Legionella</i> spp. (100 UFC/L)
Calidad 4.2	No se fija límite	10000	35	No se fija límite		Fósforo total: 2 mg/L
5. Usos Ambientales						
Calidad 5.1	No se fija límite	1000	35	No se fija límite		Nitrogeno total: 10 mg N/L; NO ₃ ⁻ : 25 mg NO ₃ ⁻ /L
Calidad 5.2	1	0	10	2		
Calidad 5.3	No se fija límite	No se fija límite	35	No se fija límite		-
Calidad 5.4						La calidad mínima requerida se estudiará caso por caso

Asimismo, el RD 1620/2007 establece que deberá asegurarse el respeto de las Normas de Calidad Ambiental correspondientes, limitando así la entrada al medio ambiente de las sustancias peligrosas que figuran en el Real Decreto 817/2015. Entre ellas se incluyen metales (mercurio, cadmio, plomo...), pesticidas (aldrina, dieldrina, simazina...), subproductos de desinfección (cloroformo) y otras muchas sustancias peligrosas.

En la actualidad, se está elaborando un borrador de Directiva europea que sirva para regular la reutilización del agua a nivel europeo. Dicho borrador propone como parámetros de control microbiológico las bacterias *Escherichia coli* y *Legionella* spp., los esporos de *Clostridium perfringens* y los virus colifagos F-específicos (Borrador_V.3.2, 2016). Además, un grupo europeo de trabajo está elaborando una guía europea de buenas prácticas para la reutilización de aguas depuradas con el objetivo de diseñar estrategias que permitan incrementar la eficacia en el uso de los recursos hídricos (MAGRAMA, 2016).

3.3.2. Tecnologías aplicables en la regeneración de aguas residuales depuradas

Normalmente, para que un agua de salida de depuradora tenga una calidad adecuada que asegure su reutilización libre de riesgos sanitarios y ambientales es necesario aplicar tratamientos adicionales.

En esta línea, el RD 1620/2007 define el término *aguas regeneradas* como: “aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan”.

Los tratamientos de regeneración están dirigidos comúnmente a la eliminación o reducción de la materia en suspensión, la turbidez, las sustancias peligrosas presentes y la desinfección hasta los límites establecidos en la legislación.

Actualmente las tecnologías de tratamiento que se aplican en la regeneración de aguas depuradas son muy variadas (Ormad, 2011), incluyendo la precipitación química, la filtración (filtración convencional y procesos de membrana), la oxidación/desinfección (cloración, ozonización, luz ultravioleta, aireación), la adsorción con carbono activo, el intercambio iónico, los lagunajes, humedales y otros sistemas biológicos, etc.

El tratamiento mínimo necesario dependerá de la calidad y origen del agua bruta así como del destino y características del agua tratada.

El conjunto de instalaciones donde las aguas residuales depuradas se someten a procesos de tratamiento adicional que puedan ser necesarios para adecuar su calidad al uso previsto, recibe el nombre de estación regeneradora de aguas residuales (ERAR). La

Figura 3.9 muestra los posibles esquemas de una ERAR en función de las etapas de tratamiento necesarias.

Un tratamiento de regeneración simple puede incluir un sistema de filtración convencional (en lecho de arena o filtros de malla metálica) y una posterior desinfección, normalmente por rayos ultravioleta (Figura 3.9, línea azul claro). La filtración permite no sólo reducir la concentración de sólidos en suspensión sino también eliminar partículas que albergan bacterias y reducir la turbidez. De esta forma mejora sustancialmente la eficacia de la posterior desinfección mediante radiación ultravioleta (Metcalf & Eddy, 2002).

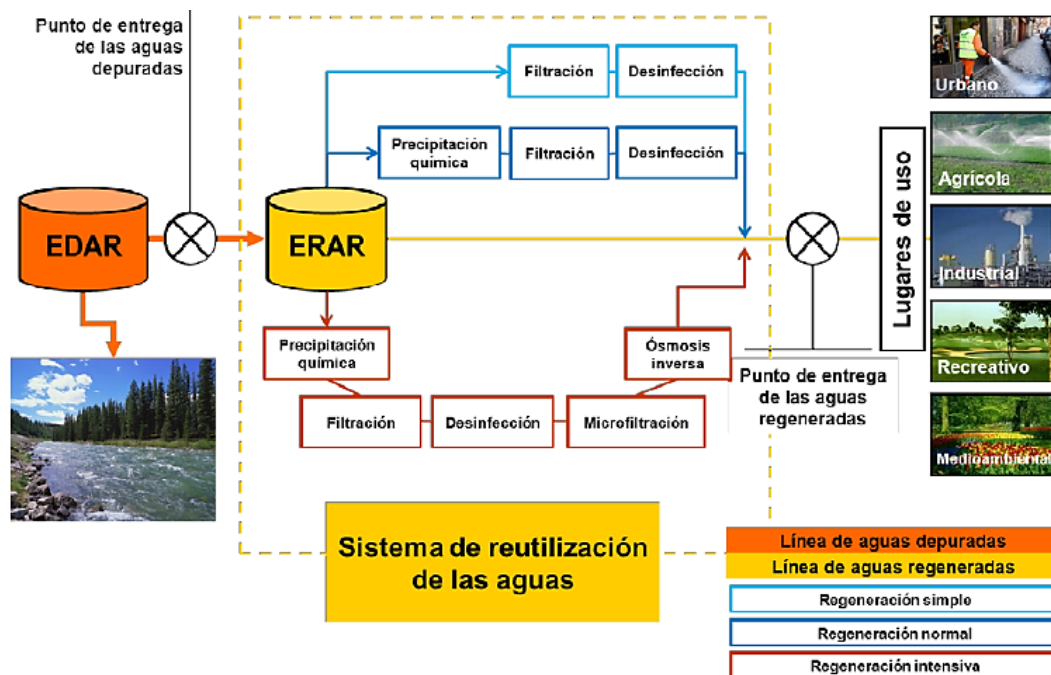


Figura 3.9. Posibles esquemas de tratamiento en una ERAR (Rodríguez-Chueca, 2013).

Un tratamiento de regeneración normal suele incluir una etapa inicial de precipitación química (coagulación, floculación y decantación), seguida de filtración convencional y desinfección con UV/cloración (Figura 3.9, línea azul oscuro). La precipitación química previa se realiza mediante la adición de coagulantes, como sales de hierro o aluminio, y aumenta de manera considerable el rendimiento de eliminación de sólidos en suspensión (Ormad, 2011).

Por último, un tratamiento de regeneración intensivo añade a las etapas anteriores una filtración posterior mediante la aplicación de tecnologías de membranas, compuesta por ultrafiltración o microfiltración seguida de ósmosis inversa (Figura 3.9, línea roja). Este tratamiento permite obtener un agua de mayor calidad y se utiliza como complemento a la línea convencional cuando se precisa la eliminación de sales del agua.

Además, en ocasiones resulta necesaria la aplicación de tratamientos específicos (ej. adsorción mediante carbón activo, oxidación, filtración con membranas, etc.) para garantizar la eliminación de contaminantes peligrosos de naturaleza orgánica (plaguicidas y otras sustancias organocloradas y organofosforadas) e inorgánica, como algunos metales pesados.

Cabe destacar que, en general, en cualquiera de los tratamientos de regeneración mencionados, la inclusión de una etapa de desinfección suele ser indispensable para alcanzar y mantener una calidad adecuada del agua regenerada.

La selección del desinfectante o combinación de desinfectantes más apropiado para cada caso dependerá de las condiciones únicas de cada sistema de abastecimiento de agua (USEPA, 1999). En general, un buen desinfectante de agua debe presentar un balance adecuado de las siguientes características:

- Proveer agua libre de patógenos.
- Evitar la producción de subproductos de desinfección.
- Tener efecto residual desinfectante capaz de evitar el recrecimiento de patógenos y de mantener así la calidad microbiológica del agua a lo largo de todo el sistema de distribución.

Los tratamientos de desinfección convencionales utilizados comúnmente en la regeneración de aguas incluyen la cloración, la ozonización y la radiación UV. La cloración suele generar gran cantidad de subproductos de desinfección, mientras que la ozonización y la radiación UV no presentan efecto residual desinfectante.

Ante la creciente necesidad de encontrar alternativas económica y medioambientalmente sostenibles, así como de evitar los inconvenientes de las técnicas convencionales, se están investigando y desarrollando nuevos métodos de tratamiento del agua, como son los procesos de oxidación avanzada (POA). Estos procesos se basan en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre los que destaca el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) por su elevado poder oxidante (Parsons, 2004). Algunos de los POAs más utilizados incluyen la ozonización a pH elevado, el sistema peroxona, los procesos Fenton y foto-Fenton y la fotocatalisis con TiO_2 .

En este trabajo de investigación se aplican procesos de cloración, ozonización, fotocatalisis con TiO_2 y electro-Fenton para la desinfección de aguas residuales depuradas. En los capítulos 4, 5, 6 y 7 se describe el fundamento teórico de cada tratamiento de desinfección empleado.

3.4. Conclusiones relativas a la evolución de los microorganismos en una EDAR convencional

- Durante la depuración de aguas residuales mediante procesos convencionales, la población de *Enterococcus* spp. presente en el agua residual disminuye, principalmente en la etapa de tratamiento biológico. Cuando se utilizan lechos biológicos, una fracción de estas bacterias queda retenida sobre el biofilm del relleno y posteriormente se desprende, pasando a formar parte de los fangos. En conjunto, a través de las distintas etapas que constituyen la línea de aguas, se consigue reducir la población bacteriana presente en el agua residual más de 2 unidades logarítmicas (>99%).
- De la población de *Enterococcus* spp. presente en los fangos procedentes de la línea de aguas, el proceso de digestión aerobia consigue inactivar más del 90% (>1 log inactivación) y la centrifugación produce una ligera inactivación adicional (-0,2 log) a la vez que reduce el contenido en agua de los fangos. Aun así, en los fangos tratados puede haber concentraciones elevadas de *Enterococcus* sp. (10^5 UFC/g sólido seco).
- La concentración de las bacterias indicadoras *Enterococcus* spp. y *Escherichia coli* muestra una evolución similar a lo largo de las líneas de agua y fangos de una EDAR convencional, siendo las etapas de tratamiento biológico y de digestión aerobia en las que mayor reducción de bacterias se alcanza en las respectivas líneas.
- A pesar de la reducción experimentada a través de la línea de tratamiento, el agua residual depurada que sale de una EDAR convencional puede presentar valores relativamente elevados de las bacterias indicadoras de contaminación fecal *Enterococcus* spp. y *Escherichia coli* (10^3 - 10^4 UFC/100 mL), lo que pone de manifiesto la necesidad de un control microbiológico para asegurar su reutilización libre de riesgos.

Capítulo 4. Inactivación bacteriana mediante cloración

4.1. Antecedentes

La cloración de aguas para abastecimiento humano se lleva empleando desde finales del siglo XIX y en la actualidad es el tratamiento de desinfección de aguas más utilizado. El cloro se puede aplicar como cloro líquido o gaseoso, o bien en forma de hipoclorito de sodio (NaClO) o de calcio (Ca(ClO)₂). La forma en la que se utilice influye en gran medida sobre el sistema de desinfección. El hipoclorito de sodio es la forma más utilizada y se comercializa como un líquido transparente, comúnmente conocido como lejía. Una de las ventajas que supone el uso de NaClO respecto al cloro líquido o gaseoso, es que se evita el peligro que supone el almacenamiento en contenedores a elevadas presiones de vapor (Black & Veatch Corporation, 2011).

El hipoclorito de sodio se disocia en el agua formando ácido hipocloroso (ecuación [4.1]), el cual a su vez, forma el ión hipoclorito (ecuación [4.2]).



La eficacia del proceso de desinfección con cloro varía en función de varios factores ambientales, como el pH del agua o la temperatura. Por ejemplo, la distribución de las especies del cloro HClO y ClO⁻ está determinada por el pH, siendo HClO la especie predominante a pH bajo y también la de mayor efecto germicida. Por otra parte, la inactivación microbiana aumenta al aumentar la temperatura del agua.

Los principales parámetros a tener en cuenta para llevar a cabo la cloración son el tiempo de contacto (T), la dosis o concentración de cloro (C) y la agitación, ya que la desinfección del agua mediante cloración es más eficaz si hay buena mezcla en el punto de aplicación. A menudo, en la práctica suele utilizarse el parámetro CT, combinación de la concentración de cloro y el tiempo de contacto.

El cloro tiene poder residual, por lo que suele utilizarse como desinfectante en las redes de distribución de agua potable.

Uno de los problemas más importantes que plantea la cloración es la formación de subproductos de desinfección, como los trihalometanos (THMs), compuestos formados por reacción del cloro con las sustancias orgánicas presentes en el agua. Los THMs son cancerígenos, por lo que resulta imprescindible minimizar su generación. Para ello hay que considerar diversas variables como la concentración de precursores de THMs, la concentración de cloro libre, el tiempo de contacto, la temperatura, el pH, la concentración de iones bromuro y yoduro, etc. Los THMs más importantes en el agua son el cloroformo,

el bromodichlorometano, el dibromoclorometano y el bromoformo. Durante la cloración, también se pueden formar otros subproductos de desinfección, como los ácidos haloacéticos, los haloacetnitrilos, las haloacetamidas y el hidrato de cloral (Sun et al., 2009, Huang et al., 2013a, Wang et al., 2013).

Generalmente, en un agua residual, el cloro reacciona en cuestión de segundos con el nitrógeno amoniacal presente, dando lugar a la formación de cloraminas (NH_2Cl , N_2HCl , N_3Cl). Las cloraminas también tienen acción desinfectante, aunque inferior al cloro. Simultáneamente, se producen otras reacciones con otros iones inorgánicos como S^{2-} , HS^- , SO_3^{2-} , NO_2^- , Fe^{2+} y Mn^{2+} . Estas sustancias reaccionan tanto con el cloro libre como con las cloraminas, reduciendo ambos compuestos al ion cloruro, que es estable y no bactericida. El consumo de cloro durante los primeros instantes del tratamiento se debe principalmente a su reacción con sustancias inorgánicas, mientras que durante los siguientes minutos el cloro reacciona con los compuestos orgánicos de forma mucho más lenta.

La eliminación de microorganismos durante la cloración se produce por difusión del cloro a través de la pared celular, produciendo una disfunción de los grupos enzimáticos internos y por tanto, inactivando las células. Además, el cloro puede reaccionar con los materiales de la pared celular, por ejemplo, oxidando los grupos amino de proteínas, lo que disminuye la fortaleza de la pared. Sin embargo, la cloración no afecta a la integridad de la célula, por lo que no se observan daños severos en la superficie ni lisis celular (Diao et al., 2004, Cho et al., 2010).

Durante los últimos años, se ha probado la eficacia desinfectante de la cloración sobre bacterias indicadoras (ej. coliformes totales, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila*) y otros microorganismos patógenos como virus (ej. rotavirus, poliovirus) (Tree et al., 2003, Li et al., 2011, Lanao, 2012), amebas de vida libre (ej. *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmanella*) (Dupuy et al., 2014, Miller et al., 2017) o helmintos (ej. *Strongyloides stercoralis*) (Saquer et al., 2007).

Algunos estudios muestran como ciertos microorganismos, como *Cryptosporidium* spp., presentan gran resistencia a la cloración, por lo que su eliminación requiere la combinación de cloro con otros agentes oxidantes como ozono o dióxido de cloro (Corona-Vasquez et al., 2002, Biswas et al., 2003). Otras mejoras introducidas recientemente en la cloración incluyen su aplicación en varias etapas, que aumenta la eficacia de inactivación y disminuye la formación de productos de desinfección (Li et al., 2017a), o su uso conjunto con ultrasonidos (Zhou et al., 2016).

4.2. Estudio del poder bactericida del hipoclorito de sodio

4.2.1. Muestras

En los ensayos de cloración se utiliza un agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF).

Para la obtención de esta muestra se puso en marcha una planta de fangos activos a escala de laboratorio (Figura 4.1), situada en el laboratorio del grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas, perteneciente al departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

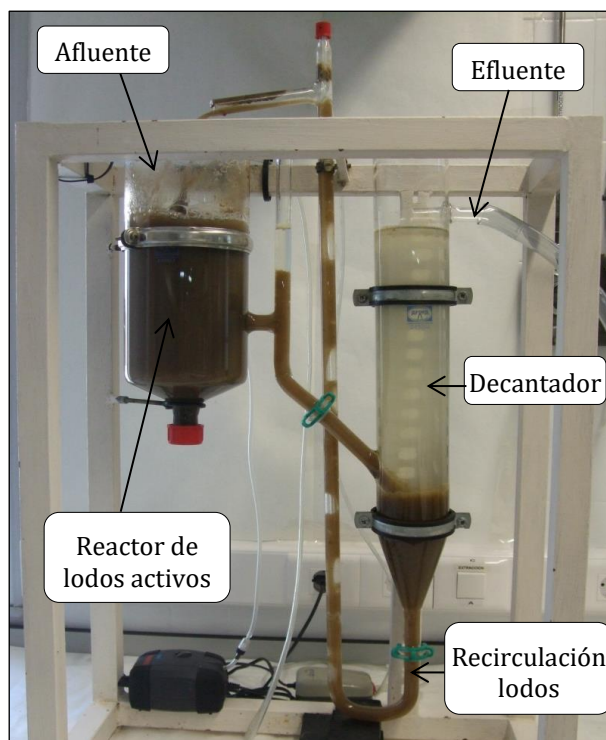


Figura 4.1. Planta de lodos activos

La planta consta de un reactor biológico y un decantador, con un volumen aproximado de 3 L y 2 L respectivamente. Se alimenta agua residual sintética al reactor (Tabla 4.1), a un caudal aproximado de 1 L/h, lo que supone un tiempo de retención hidráulico aproximado de 5 horas. El reactor cuenta con un sistema de aireación, que proporciona el oxígeno necesario a las bacterias encargadas de la depuración y homogeneiza los fangos, provenientes de un sistema de lodos activos de una EDAR real. La reacción genérica que tiene lugar en el reactor se describe en la ecuación [4.3]:

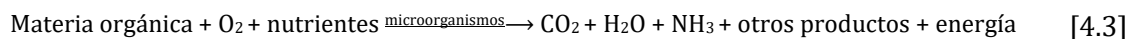


Tabla 4.1. Composición del agua de alimentación de la planta (Directiva 82/243/CEE, 1982)

Compuesto	Concentración (mg/L)
Glucosa	200
Peptona de carne	160
Extracto de carne	110
Urea (CO(NH ₂) ₂)	30
Cloruro de sodio (NaCl)	7
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	4
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2
Hidrógeno fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	28

Tras abandonar el reactor, el agua pasa a un decantador donde sedimentan los fangos. Parte de ellos se recirculan al reactor para mantener en éste una concentración de microorganismos adecuada, de aproximadamente 3000-3500 mg/L. El agua clarificada que rebosa por la parte superior del decantador constituye la muestra que se utiliza en la experimentación.

En la Tabla 4.2 se recogen las características de esta muestra.

Tabla 4.2. Características de la muestra ARPF.

Parámetro	Valor promedio
pH	6,5 - 8,5
Conductividad (µS/cm)	728 - 1660
Turbidez (UNT)	2 - 116
DQO (mg/L O ₂)	22 - 111
COD (mg/L C)	11 - 14
Sólidos en suspensión totales (SST) (mg/L)	5 - 117
Nitrógeno amoniacal (mg/L N-NH ₃)	0,9 - 3,2
Demanda de cloro (mg/L Cl ₂)	39 - 65
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 mL)	10 ⁵ - 10 ⁶
<i>Enterococcus</i> spp. (UFC/100 mL)	10 ⁵ - 10 ⁶

4.2.2. Agentes desinfectantes empleados

Se utiliza hipoclorito de sodio (NaClO, Panreac) con una concentración teórica del 5%. La concentración real de cloro se determina semanalmente mediante el método descrito para el cálculo de la concentración del reactivo de cloración en la demanda de cloro (apartado 2.1.2).

4.2.3. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utiliza como muestra agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (apartado 4.2.1). La muestra se esteriliza en autoclave y se fortifica con la bacteria objeto de estudio, *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp., mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1. La concentración bacteriana inicial en las muestras es de 10^7 - 10^8 UFC/100 mL.

Los ensayos de cloración se realizan en reactores de vidrio de 600 mL utilizando un volumen de muestra de 300 mL. Se emplea hipoclorito sódico como desinfectante, adicionando a la muestra distintas dosis de cloro entre 4 y 65 mg/L Cl_2 . Tras la adición del oxidante, la muestra clorada se mantiene en agitación a 100 r.p.m. para favorecer la mezcla. A partir del instante en que se adiciona el reactivo, se toman alícuotas a distintos intervalos para valorar el efecto del cloro sobre la población de estudio a lo largo del tiempo. La duración máxima del tratamiento son 30 minutos.

El cloro residual de las alícuotas extraídas se neutraliza con tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99'5%, Panreac) para parar su efecto bactericida. El análisis microbiológico se realiza de inmediato tras la finalización del experimento.

Además, se realizan ensayos en paralelo en los que no se añade tiosulfato sódico con el fin de determinar la concentración de cloro residual a lo largo del tratamiento.

Las dosis de cloro aplicadas varían desde 4 mg/L Cl_2 , dosis correspondiente a la demanda de cloro de un agua natural (Lanao, 2012), hasta 65 mg/L Cl_2 , que es la demanda de cloro de la muestra objeto de este estudio (Tabla 4.2). Se aplican también concentraciones intermedias de 15 y 30 mg/L Cl_2 para estudiar la influencia de la dosis de cloro en el tratamiento.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Evolución del cloro residual

La Figura 4.2 muestra la evolución del cloro libre residual durante los experimentos de cloración.

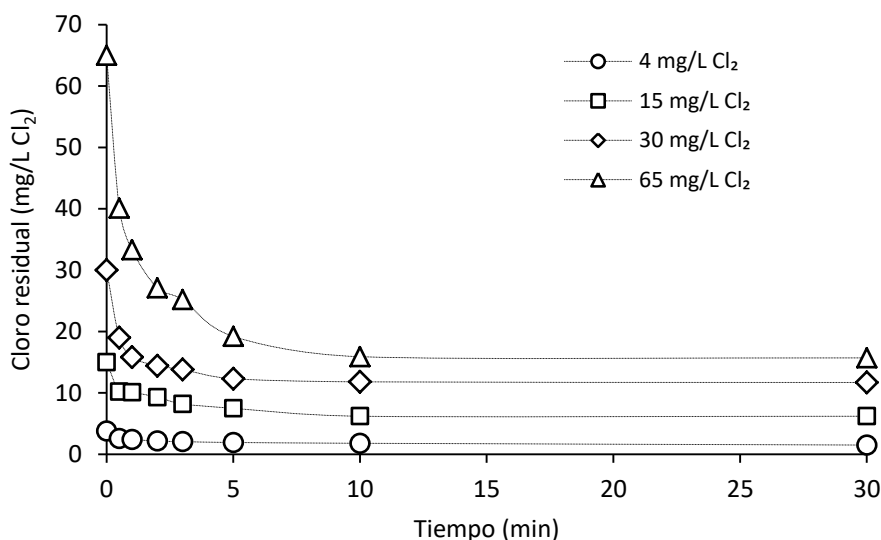


Figura 4.2. Evolución del cloro libre residual durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro inicial.

Se observa que para todos los tiempos y dosis muestreadas quedó cloro residual sin reaccionar (Figura 4.2), lo que confirma la necesidad de añadir tiosulfato sódico en las alícuotas para poder determinar la inactivación alcanzada en función del tiempo.

Todas las dosis estudiadas presentaron una tendencia de desaparición del cloro similar. Inicialmente se produjo una rápida disminución de la concentración del cloro durante los primeros segundos o minutos del tratamiento, seguida de una etapa en la que la concentración de cloro residual se mantuvo prácticamente constante.

Este comportamiento puede deberse a la rápida reacción que tiene lugar entre el cloro y algunos compuestos inorgánicos como, por ejemplo, el NH_3 presente en la muestra (Tabla 4.2). Esta reacción daría lugar a la formación de cloraminas (Deborde y von Gunten, 2008), compuestos que presentan también poder desinfectante pero menor que el del cloro (Black & Veatch Corporation, 2011). Además, el cloro puede reaccionar en cuestión de segundos con otros compuestos presentes en la muestra, como Mg^{2+} o SO_4^{2-} . Simultáneamente, pero de manera más lenta, el cloro puede oxidar los compuestos orgánicos (ej. glucosa, peptonas y sus compuestos de degradación) y atacar a los microorganismos que se encuentran en la muestra.

4.3.2. Inactivación de *Escherichia coli*

La Figura 4.3 representa las curvas de inactivación de *E. coli* durante los ensayos con distintas dosis de cloro.

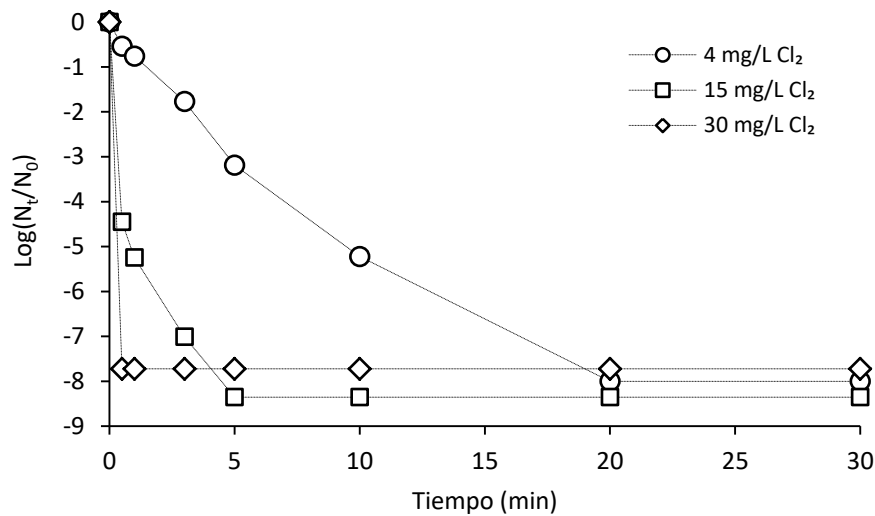


Figura 4.3. Inactivación de *Escherichia coli* durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro.

La inactivación total de *E. coli* se logró con todas las dosis de cloro estudiadas (Figura 4.3). En general, se observa que al aumentar la dosis de cloro la desinfección es más rápida, es decir, que para un tiempo dado se consigue mayor inactivación bacteriana cuanto más hipoclorito sódico se añade.

Con la dosis menor (4 mg/L de Cl₂), la carga microbiana se redujo más de 3 unidades logarítmicas en tan sólo 5 minutos y a los 10 minutos la inactivación superó las 5 unidades log. La eliminación completa de *E. coli* (-8 log) se consiguió tras solo 20 minutos de tratamiento, pese a ser la dosis que presentó la desinfección más lenta y el menor consumo de cloro (~2 mg/L de Cl₂). Según otros autores (Templeton et al., 2009, Huang et al., 2013b, Fiorentino et al., 2015), con dosis bajas de cloro (1 – 2 mg/L de Cl₂) y tiempos cortos de tratamiento (10 – 15 minutos) se pueden alcanzar eliminaciones de entre 5 y 7 unidades logarítmicas de *Escherichia coli* en agua de salida de depuradora.

Al aplicar la dosis de 15 mg/L de Cl₂ se observó una rápida inactivación inicial, con más de 4 log de reducción en los primeros 30 segundos de tratamiento, periodo del ensayo durante el cual se produjo el mayor consumo de cloro (~5 mg/L de Cl₂). Al cabo de 5 minutos el cloro eliminó toda presencia bacteriana (-8 log) con una disminución en la concentración de cloro de ~8 mg/L.

Con la dosis mayor (30 mg/L de Cl₂) la inactivación total fue casi inmediata, eliminando más de 7 unidades logarítmicas en 30 segundos, con un consumo de cloro de 11 mg/L.

4.3.3. Inactivación de *Enterococcus* sp.

La Figura 4.4 presenta las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los ensayos con distintas dosis de cloro. En general, la velocidad de desinfección aumentó al aumentar la dosis de cloro aplicada.

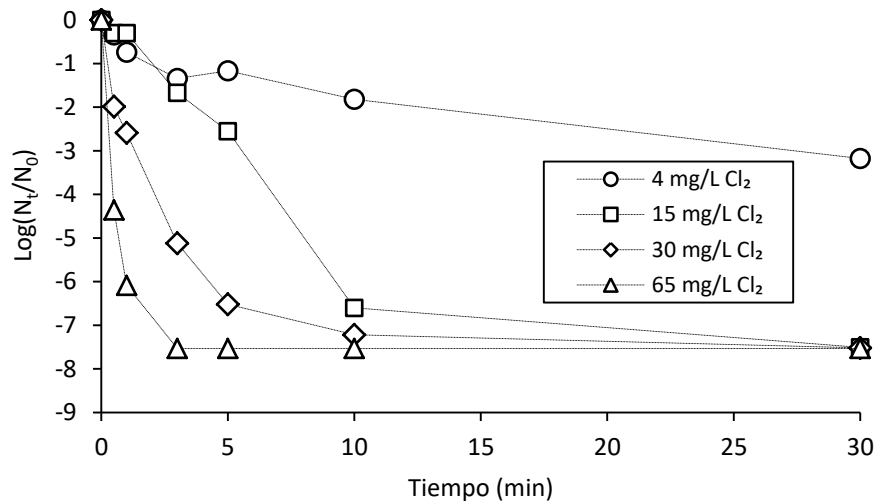


Figura 4.4. Inactivación de *Enterococcus* sp. durante los ensayos de cloración con distintas dosis de cloro.

Con la dosis de cloro más baja (4 mg/L Cl₂) no se consiguió inactivar por completo la población de enterococos, alcanzándose una inactivación de 3 log tras 30 minutos de tratamiento. Este valor es comparable con los niveles de desinfección de *Enterococcus* sp. observados por otros autores en la cloración de efluentes secundarios de EDARs a escala real (Tyrrell et al., 1995, Srinivasan et al., 2011).

Al adicionar la demanda de cloro correspondiente a la muestra (65 mg/L de Cl₂) se produjo una rápida disminución de *Enterococcus* sp. durante los primeros instantes del ensayo (Figura 4.4). A los 30 segundos de tratamiento se obtuvo una reducción bacteriana de más de 4 unidades logarítmicas, alcanzándose a los 3 minutos de experimento, con un consumo de cloro de 40 mg/L Cl₂, la desinfección completa de la muestra (-7.5 log).

Con las dosis intermedias de 15 y 30 mg/L de Cl₂ se alcanzó también la inactivación total de *Enterococcus* sp., tras 30 minutos de tratamiento. El consumo de cloro necesario para inactivar por completo los enterococos presentes fue notablemente inferior con las dosis de intermedias (9 y 18 mg/L de Cl₂ consumido, respectivamente) que con la dosis mayor (40 mg/L de Cl₂ consumido).

4.3.4. Inactivación bacteriana en función del parámetro CT

Tanto de los resultados obtenidos para *E. coli* como para *Enterococcus* sp. (Figura 4.3 y Figura 4.4) se deduce que, para llevar a cabo la desinfección de la muestra estudiada bajo

las condiciones de operación aplicadas, no es necesario satisfacer su demanda de cloro. Por tanto, se pueden aplicar dosis menores de cloro que, aumentando el tiempo de tratamiento, consigan el mismo resultado de desinfección. Esta relación se refleja en la Figura 4.5, donde se representa la inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. frente al parámetro CT (concentración de cloro x tiempo de contacto).

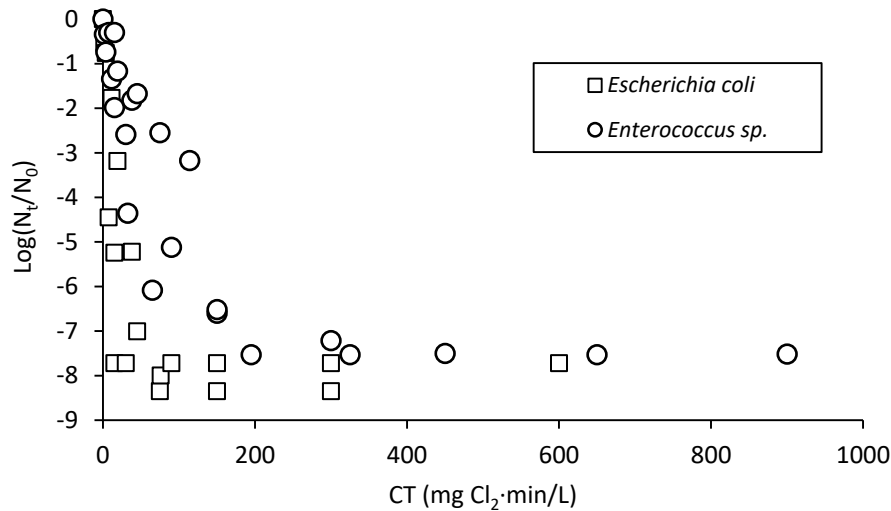


Figura 4.5. Inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en los ensayos de cloración en función del parámetro CT.

En la Figura 4.5 se observa que, en general, todos los valores CT para cada bacteria siguen la misma tendencia. Mientras que para la inactivación total de *E. coli* sería necesario un valor CT de aproximadamente 75 mg Cl₂·min/L, para *Enterococcus* sp. harían falta más de 200 mg Cl₂·min/L. Por tanto, aplicando, por ejemplo, una dosis de 5 mg/L de Cl₂ la desinfección completa de *E. coli* tendría lugar en 15 min y la de *Enterococcus* sp. en 40 min. Estos valores de CT se encuentran dentro del rango propuesto (25 - 450 mg Cl₂·min/L) para la adecuada eliminación de coliformes fecales en la guía sobre reutilización de agua publicada por la EPA de Estados Unidos (USEPA, 2012).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que una dosis de cloro excesivamente baja puede no ser suficiente para lograr la desinfección total o requerir tiempos de tratamiento largos, como ocurre al aplicar la dosis de 4 mg/L de Cl₂ en la inactivación de *Enterococcus* sp. (Figura 4.4). Además, dosis bajas de cloro pueden dar lugar a la posterior reactivación y recrecimiento de las bacterias tratadas (Li et al., 2013).

Por otra parte, los resultados obtenidos (Figura 4.3, Figura 4.4 y Figura 4.5) indican que, la bacteria *E. coli* presenta mayor sensibilidad a la desinfección con cloro que *Enterococcus* sp. Durante la cloración, el cloro es capaz de difundir a través de la pared celular. Una vez en el interior, produce la disfunción de los grupos enzimáticos, lo que conlleva finalmente la inactivación celular (Diao et al., 2004). En general, en dosis bajas, el cloro puede oxidar

algunos compuestos de la pared celular, pero no produce su rotura. Sin embargo, las envolturas bacterianas juegan un papel importante en la inactivación, ya que regulan el acceso del cloro al interior de la célula (Virto et al., 2005). Puesto que *E. coli* es una bacteria Gram-negativa y *Enterococcus* sp. es Gram-positiva, la composición de su pared celular es distinta y por ello, la resistencia que presentan a la entrada de cloro al interior es diferente.

4.3.5. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. obtenidas en los tratamientos de cloración se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom modificado, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

El modelo de Hom modificado asume que la población bacteriana se inactiva a lo largo del tratamiento conforme el desinfectante se va descomponiendo. El modelo bifásico reconoce la existencia de dos poblaciones con distinta resistencia al tratamiento, respondiendo ambas a una cinética de primer orden. Finalmente, el modelo de Mafart también asume que existe una distribución de resistencias frente al tratamiento dentro de la población bacteriana, pero estas resistencias siguen la distribución de Weibull.

Las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5 muestran los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de correlación (r) y el error cuadrático medio (ECM).

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom modificado aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración

Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	Bacteria	k (min ⁻¹)	k'(min ⁻¹)	m	n	ECM	r
4	<i>E. coli</i>	2,81	3,92	0,85	0,02	0,06	1,00
	<i>Enterococcus</i> sp.	2,13	3,69	0,67	0,03	0,14	0,97
15	<i>E. coli</i>	8,77	16,6	1,70	0,07	0,25	0,99
	<i>Enterococcus</i> sp.	2,53	4,64	0,90	0,02	0,32	0,98
30	<i>E. coli</i>	45,3	16,3	1,85	0,75	0,00	1,00
	<i>Enterococcus</i> sp.	3,63	9,29	1,28	0,05	0,12	0,99
65	<i>Enterococcus</i> sp.	8,14	15,8	1,98	0,11	0,02	1,00

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos del modelo de bifásico aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración

Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	Bacteria	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	r
4	<i>E. coli</i>	0,99692318	1,48	0,63	0,11	1,00
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,93265892	1,35	0,15	0,16	0,98
15	<i>E. coli</i>	0,99999971	20,4	0,27	0,77	0,93
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,99999952	1,52	0,11	0,36	0,99
30	<i>E. coli</i>	0,99999998	47,9	0,10	0,01	0,99
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,99999969	4,04	0,10	0,55	0,98
65	<i>Enterococcus</i> sp.	0,99999996	15,1	0,02	0,44	0,98

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración.

Dosis de cloro (mg/L Cl ₂)	Bacteria	p	δ (min)	ECM	r
4	<i>E. coli</i>	0,721	1,09	0,19	1,00
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,469	2,56	0,14	0,98
15	<i>E. coli</i>	0,163	0,00003	0,58	0,98
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,561	0,72	0,99	0,94
30	<i>E. coli</i>	0,054	1,22·10 ⁻¹⁶	0,48	0,98
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,259	0,00782	0,84	0,95
65	<i>Enterococcus</i> sp.	0,126	0,000001	0,72	0,96

La Figura 4.6 y la Figura 4.7 muestran gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales durante el tratamiento de cloración de *E. coli* y *Enterococcus* sp., respectivamente, con las distintas dosis de cloro. En el Anexo I se incluyen las gráficas que muestran el error de cada modelo, mediante la representación de los valores estimados frente a los valores obtenidos experimentalmente (Figuras I.I-I.VII).

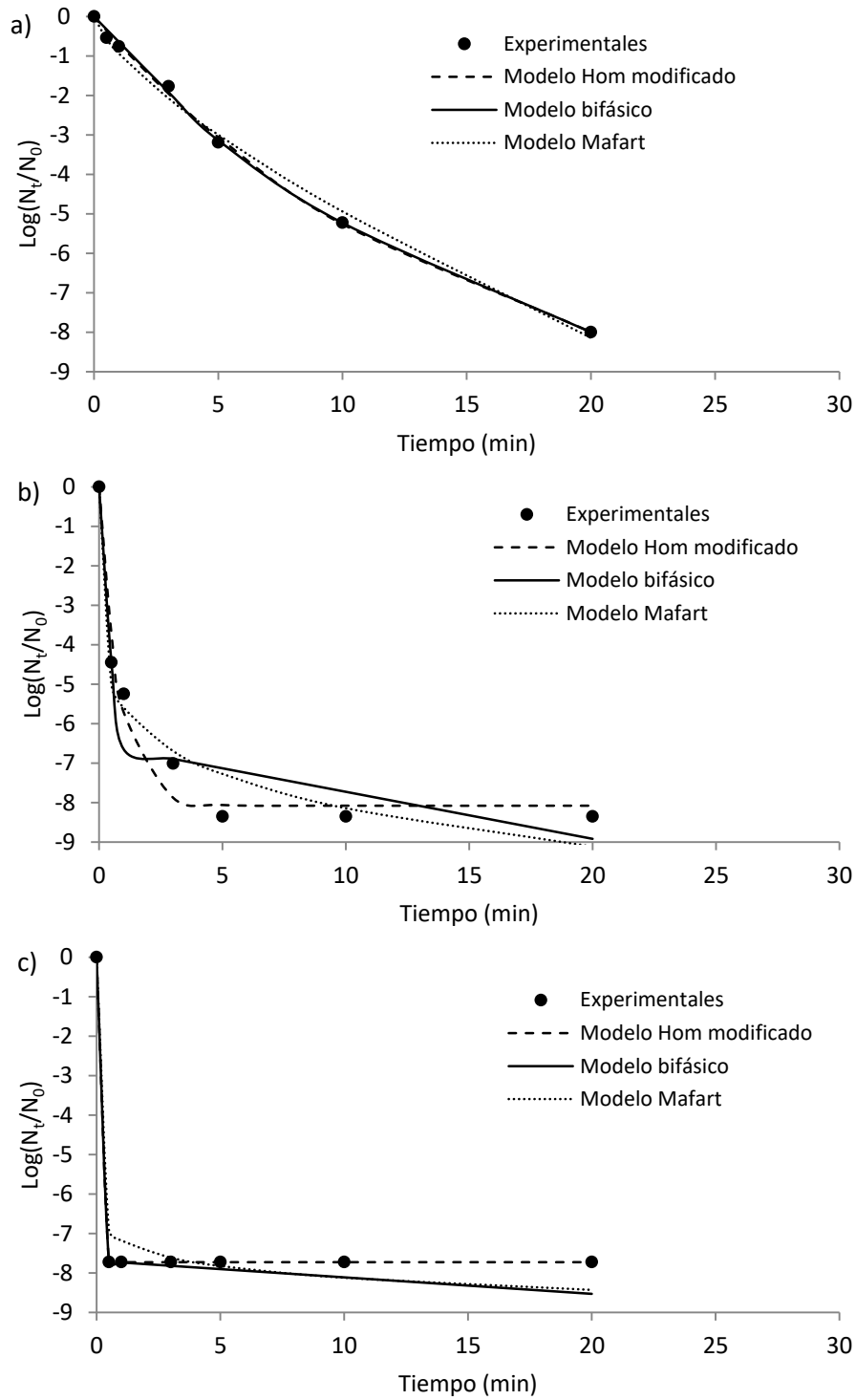


Figura 4.6. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de cloración sobre *E. coli* con dosis de: a) 4 mg/L de Cl_2 , b) 15 mg/L de Cl_2 y c) 30 mg/L de Cl_2 .

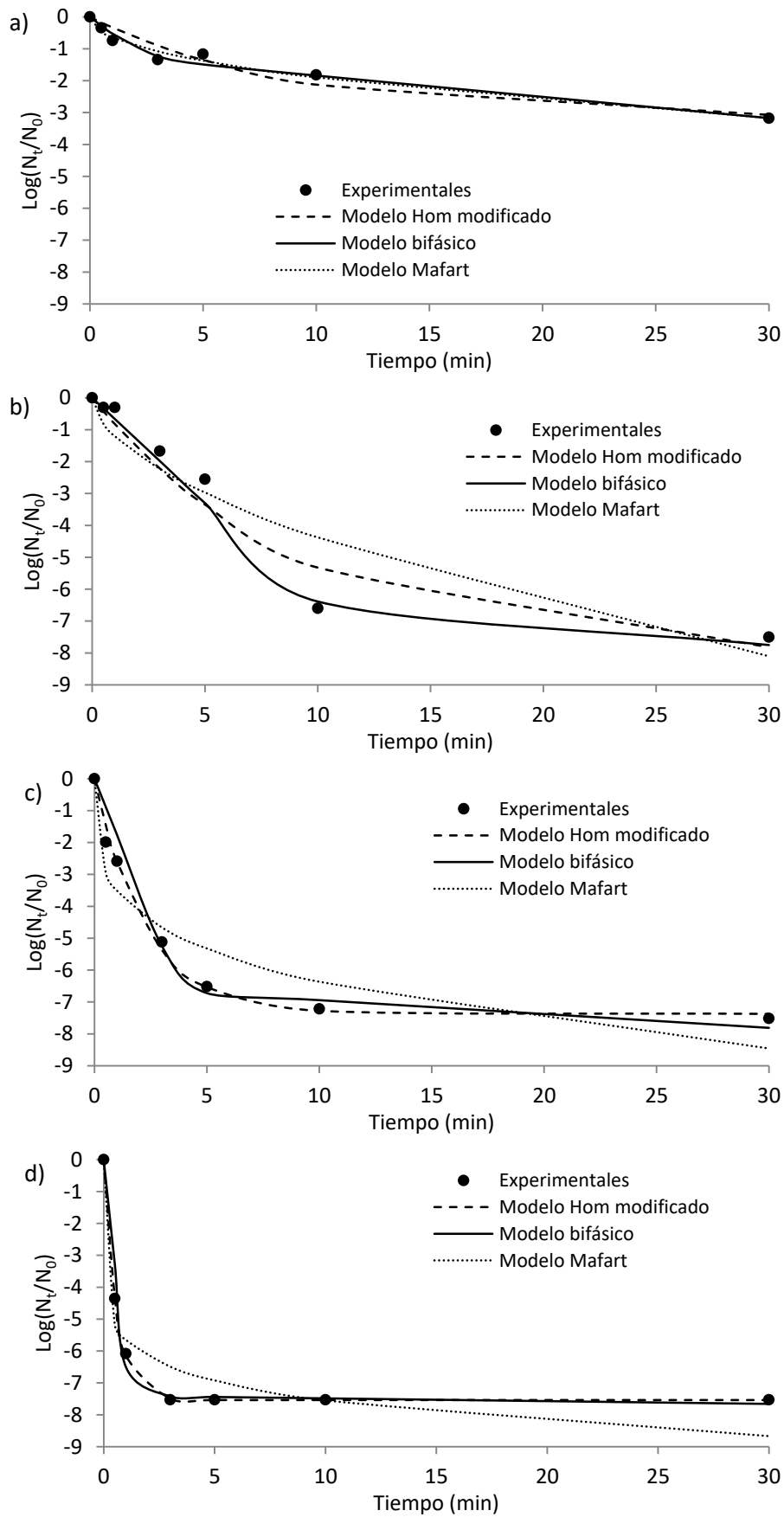


Figura 4.7. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de cloración sobre *Enterococcus* sp. con dosis de: a) 4 mg/L de Cl_2 , b) 15 mg/L de Cl_2 , c) 30 mg/L de Cl_2 y d) 65 mg/L de Cl_2 .

En general, los índices ECM y r presentan valores cercanos a 0 y a 1, respectivamente, lo que indica una buena adecuación de los tres modelos a los valores experimentales de inactivación obtenidos. De acuerdo con las representaciones gráficas (Figura 4.6 y Figura 4.7), el ajuste del modelo de Hom modificado y del modelo bifásico sería ligeramente mejor que el del modelo de Mafart.

Respecto al modelo de Hom modificado (Tabla 4.3), se observa que los valores de las constantes cinéticas de velocidad de inactivación (k) y de descomposición del desinfectante (k'), aumentan conforme aumenta la concentración de cloro aplicada. Para todas las dosis, las constantes de inactivación fueron superiores para *E. coli* que para *Enterococcus* sp., siendo comparables los valores obtenidos para *E. coli* con 15 mg/L de Cl_2 y para *Enterococcus* sp. con 65 mg/L de Cl_2 .

Los valores de los parámetros del modelo bifásico recogidos en la Tabla 4.4 indican la existencia de una subpoblación 1 más sensible al tratamiento de cloración, cuya constante de inactivación es k_1 , y otra subpoblación 2 más resistente, que presenta una constante de inactivación menor, k_2 . Al incrementar la dosis de cloro, la constante k_1 y P , la fracción de la población sensible al tratamiento, aumentan, mientras que k_2 disminuye. Esto indica que en algunos casos puede darse un efecto de cola, debido a la mayor resistencia al cloro que presenta parte de la población bacteriana ($1-P$). En este modelo se observa de nuevo la mayor sensibilidad de *E. coli* frente a *Enterococcus* sp., tal y como reflejan las constantes k_1 y k_2 , superiores para *E. coli*.

Por último, según el modelo de Mafart (Tabla 4.5) el valor del parámetro de forma, p , es inferior a 1 en todos los casos, lo que supone que las curvas de inactivación presentan forma cóncava y, por tanto, aparecen fenómenos de cola. Este hecho se muestra también en la representación de las curvas de inactivación para *E. coli* (Figura 4.6) y para *Enterococcus* sp. (Figura 4.7), cuya forma es prácticamente lineal o ligeramente cóncava y hay ausencia de hombro inicial. Por otra parte, el parámetro de escala, δ , se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana. Se observa que conforme aumenta la dosis de cloro el parámetro δ disminuye hasta alcanzar valores muy pequeños. Con la dosis de 4 mg/l de Cl_2 se necesitan 1,1 y 2,6 minutos para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de *E. coli* o de *Enterococcus* sp., respectivamente. Sin embargo, al aplicar a la muestra dosis de cloro mayores, esta reducción es casi instantánea. De nuevo, los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para el modelo de Mafart indican una inactivación más rápida de *E. coli* que de *Enterococcus* sp.

Los fenómenos de cola observados para ambas bacterias suelen estar relacionados con la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas con distinta resistencia a los agentes desinfectantes, la presencia de agrupaciones de bacterias o las asociaciones de éstas con partículas, lo que influye en la difusión del cloro hasta las células (Dietrich et al., 2007, Ramseier et al., 2011, Li et al., 2013).

En términos generales, la cloración proporcionó una desinfección rápida y eficaz de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en el agua de salida de depuradora. Sin embargo, considerando el COD de la muestra (11-14 mg/L de C) y las dosis de cloro aplicadas (≥ 4 mg/L de Cl_2), es muy probable que se generen subproductos de desinfección en concentraciones elevadas. Valero (2008) determinó la concentración de trihalometanos (THMs) formados en un agua residual depurada de características similares (COD ~ 9 mg/L de C) utilizando 0,5 mg/L de Cl_2 , obteniendo una concentración total de THMs de 661 $\mu\text{g/L}$, siendo el cloroformo el principal subproducto (340 $\mu\text{g/L}$ de CHCl_3). Aunque el RD 1620/2007 sobre la reutilización del agua no regula directamente estos parámetros, indica que debe asegurarse el respeto de las normas de calidad ambiental (NCAs) correspondientes. En las aguas superficiales se fija un valor medio anual de 2'5 $\mu\text{g/L}$ para el cloroformo, según el Real Decreto 817/2015, que establece las NCAs para las sustancias prioritarias. Por ello, es muy importante controlar la formación de THMs durante la cloración, reduciendo en lo posible las dosis de cloro y el tiempo de contacto sin perder poder de desinfección.

4.3.6. Costes de operación

La estimación del coste de un tratamiento es un factor de decisión importante a la hora de elegir qué tecnología es más viable para su implementación en un caso real. A gran escala, el coste total depende de multitud de factores, como la calidad y el flujo del efluente a tratar, la configuración del sistema de tratamiento, las condiciones de operación, las necesidades de mantenimiento, etc. (Azbar et al., 2004, Murillo et al., 2010).

En este apartado se muestra el coste del tratamiento de cloración, considerando tan sólo el coste de operación. Para ello, se tiene en cuenta el coste del hipoclorito de sodio (NaClO). Para la realización del cálculo se utiliza la dosis de cloro mínima con la que se alcanza la inactivación total de *Enterococcus* sp. (15 mg Cl₂/L), ya que esta bacteria es más difícil de eliminar que *E. coli*.

Según la empresa suministradora Ercros, el coste del hipoclorito de sodio con una riqueza en cloro del 15% p/v es de 97 €/Tm (Lanao, 2012). El precio del tratamiento se estima para un volumen de muestra de 1 m³. La expresión utilizada para realizar el cálculo es la siguiente (ecuación [4.4]):

$$\text{Coste NaClO} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis Cl}_2 \left(\frac{\text{mg Cl}_2}{\text{L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L NaClO}}{150000 \text{ mg Cl}_2} \cdot \frac{1'15 \text{ kg NaClO}}{1 \text{ L NaClO}} \cdot \frac{97 \text{ €}}{1000 \text{ kg NaClO}} \quad [4.4]$$

En la Tabla 4.6 se recoge el coste de operación y los tiempos necesarios para alcanzar cada nivel de inactivación, calculados según el modelo cinético bifásico, que es el que presenta un ajuste más adecuado a los datos experimentales.

Tabla 4.6. Coste de operación y tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de *Enterococcus* sp. en ARPF mediante cloración con 15 mg Cl₂/L.

Tratamiento	Coste (€/m ³)	Tiempo (min)					
		-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
NaClO	0,0112	1,5	3,0	4,5	6,1	7,6	9,2

Puesto que la dosis de NaClO añadida es fija, el coste de este reactivo es el mismo independientemente de la inactivación alcanzada (Tabla 4.6). Sin embargo, el tiempo de tratamiento es mayor cuanto más eliminación se requiere. En general, la desinfección mediante cloración presenta un consumo de reactivos bajo, con un coste de operación bajo y tiempos de tratamiento cortos.

4.4. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante cloración

- El agua de salida de depuradora muestra una demanda de cloro elevada de más de 60 mg Cl₂/L, valor mucho mayor que el que puede presentar un agua natural superficial (<15 mg Cl₂/L, habitualmente).
- Durante la cloración de un agua residual depurada se produce, en primer lugar, una desaparición de cloro muy rápida, asociada principalmente a la reacción de éste con compuestos inorgánicos, seguida de una fase en la que el cloro disminuye muy lentamente, como consecuencia de la reacción más lenta con la materia orgánica presente. La reacción entre el cloro y los compuestos orgánicos conlleva la formación de subproductos de desinfección indeseados, como los trihalometanos.
- Bajo las condiciones de estudio, la cloración consigue desinfectar eficazmente el agua residual depurada con unos costes de operación muy reducidos (0,01 €/m³), pudiéndose alcanzar la inactivación bacteriana total en cuestión de unos pocos minutos (-7 log. en 3 min) cuando se utiliza una dosis de cloro igual o superior a la demanda de cloro. Sin embargo, no es necesario satisfacer esta demanda de cloro para alcanzar la inactivación total de las bacterias presentes. Se pueden aplicar dosis de cloro menores que, aumentando el tiempo de tratamiento, consigan el mismo resultado de desinfección (ej. -7 log. en 30 min con 15 mg Cl₂/L).
- No obstante, dosis de cloro excesivamente bajas (4 mg Cl₂/L) pueden ser insuficientes para lograr la desinfección total del agua de salida de depuradora o requerir tiempos de tratamiento prolongados (>30 min), a lo que hay que añadir la falta de cloro residual en concentración suficiente para mantener la inactivación alcanzada.
- En general, el modelo de Hom modificado y el modelo bifásico se ajustan bien a las curvas experimentales de inactivación bacteriana observadas al aplicar la cloración en agua residual depurada. Los coeficientes cinéticos del modelo de Hom indican un aumento tanto en la velocidad de desinfección como en la velocidad de descomposición del cloro al aumentar la dosis de cloro aplicada (4 - 65 mg Cl₂/L). Por otra parte, el modelo bifásico describe el fenómeno de cola que se produce en algunos casos e indica la existencia de dos subpoblaciones que presentan distinta resistencia al cloro, como consecuencia de la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas.
- La bacteria Gram-negativa *E. coli* muestra más sensibilidad a la cloración que la bacteria Gram-positiva *Enterococcus* sp. debido a las diferencias en su pared celular, que es la encargada de regular el acceso de cloro al interior de la célula.

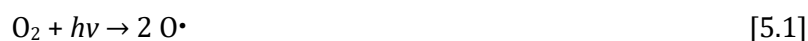
Capítulo 5. Inactivación bacteriana mediante procesos de ozonización

5.1. Antecedentes

5.1.1. Ozonización

El ozono (O_3) se usó por primera vez para el tratamiento de aguas prepotables a escala industrial en 1893 en Holanda y desde entonces se está utilizando tanto para la desinfección como para la oxidación de compuestos en las estaciones de potabilización (USEPA, 1999). El ozono es una forma alotrópica del oxígeno. A temperatura ambiente es un gas incoloro e inestable que presenta un olor característico incluso en bajas concentraciones.

Para su aplicación, el ozono se genera “in situ” a partir de aire seco u oxígeno mediante descargas eléctricas (descarga de corona) o a través de reacciones fotoquímicas. Inicialmente se produce la descomposición del oxígeno diatómico (ecuación [5.1]) y posteriormente tiene lugar la combinación de un átomo y una molécula de oxígeno (ecuación [5.2]) (Glaze, 1987).

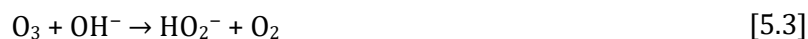


El ozono en el agua puede reaccionar mediante dos mecanismos: de forma directa o indirecta (Hoigné y Bader, 1983). Cuando el pH del agua a tratar es ácido, prevalece la reacción directa del ozono, que es muy selectiva. Por ejemplo, el ozono puede reaccionar con compuestos orgánicos, como los presentes en la pared celular de los microorganismos, por adición electrofílica a los dobles enlaces. Por otra parte, el ozono se descompone en el agua catalizado por los iones hidróxido y otros productos (von Gunten, 2003), generando radicales hidroxilo ($\cdot OH$), que reaccionan de manera no selectiva con las sustancias y microorganismos presentes. En general, a pH neutro el ozono reacciona mediante los dos mecanismos citados (Matilainen y Sillanpää, 2010).

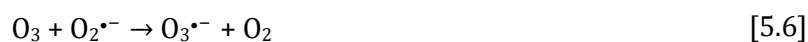
Para favorecer la formación de $\cdot OH$ pueden llevarse a cabo diversas estrategias como aumentar el pH, adicionar H_2O_2 , combinar el O_3 con luz ultravioleta o catalizadores, etc.

Esta generación de ROS a partir del ozono en medio acuoso tiene lugar a través de reacciones en cadena conocidas como “reacciones por vía indirecta” (Hoigné y Bader, 1976). El mecanismo radicalario se describe a continuación (ecuaciones [5.3] - [5.11]) (Tomiyasu et al., 1985, Andreozzi et al., 1999).

En una primera etapa, se produce la descomposición del ozono en presencia de iones hidróxido y se generan radicales hidropéroxido (HO_2^\bullet), que, en la disolución acuosa, están en equilibrio con su base conjugada, el ion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (ecuaciones [5.3] - [5.5]).



A continuación, los radicales formados generan reacciones en cadena que dan lugar a la producción del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (ecuaciones [5.6] - [5.8]). Los propagadores de las reacciones en cadena pueden ser moléculas inorgánicas y orgánicas, como los grupos arilo, alcoholes primarios y ácidos húmicos. Los radicales hidroxilo generados reaccionan con el ozono, según la ecuación [5.9], generando de nuevo $\text{O}_2^{\bullet-}$ que inician la reacción en cadena (ecuación [5.6]).



Finalmente, algunas reacciones (ecuaciones [5.10] y [5.11]) conducen a la ruptura de la cadena de reacciones.



Además, en el agua pueden existir ciertas sustancias o especies que son capaces de consumir radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) sin regenerar el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), lo que conlleva también la ruptura de la cadena de reacciones. Estas sustancias o especies inhibidoras reciben el nombre de atrapadores de radicales o "scavengers". Los scavengers más comunes son los iones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) y actúan según las ecuaciones [5.12] y [5.13]:



Cuando la ozonización se aplica en desinfección, los radicales hidroxilo actúan de manera similar al ozono, oxidando los componentes estructurales de la pared celular, por ejemplo, causando la peroxidación de los lípidos presentes en la membrana celular (Maness et al., 1999). Puesto que los radicales hidroxilo tienen un potencial de oxidación (2,80 V) superior al del ozono (2,07 V), son más reactivos y pueden atacar más efectivamente a los componentes de la estructura externa de la célula, que en ocasiones resisten a la acción del ozono (Cho y Yoon, 2006).

Durante la ozonización, la inactivación bacteriana se produce por el ataque simultáneo de la pared y del interior de la célula. El ozono y los radicales hidroxilo generados reaccionan con los compuestos de la pared celular causando la liberación de proteínas, la peroxidación de lípidos y aumentando la permeabilidad de la célula. Una vez que estas reacciones se han completado lo suficiente, se produce la penetración en el plasma celular y las consiguientes reacciones con los componentes intracelulares. Por tanto, la muerte celular durante la ozonización está principalmente relacionada con los daños en la superficie celular, que acaban causando la lisis de la bacteria (Diao et al., 2004, Cho et al., 2010).

A diferencia del cloro, el ozono generalmente no forma subproductos de desinfección halogenados (THMs, ácidos haloacéticos, etc.) cuando interacciona con la materia orgánica presente en el agua. Sin embargo, si en el efluente hay iones bromuro sí que pueden formarse subproductos bromados (bromato, bromoformo, acetonitrilos brominados...), los cuales suponen un gran riesgo para la salud. Otro inconveniente del ozono es que no posee actividad residual (USEPA, 1999).

En estudios previos realizados en el Grupo de Investigación Calidad y Tratamiento de Aguas se ha evaluado la eficacia de la ozonización en aguas prepotables sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. y *Clostridium perfringens* (Lanao et al., 2008, Lanao, 2012, Rodríguez-Chueca et al., 2015, Miguel et al., 2016).

Otros autores han aplicado la ozonización a otras bacterias como *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Mycobacterium fortuitum* o *Legionella* (Lee et al., 2015a, Verma et al., 2016, Li et al., 2017b). También existen estudios sobre el efecto del ozono en la eliminación de virus (Xu et al., 2002, Gerrity et al., 2011) y protozoos, especialmente de *Cryptosporidium* (Kim et al., 2007, Ran et al., 2010).

Una de las líneas de investigación importantes en relación con la ozonización, incluye el control del recrecimiento microbiano tras el tratamiento (Lee et al., 2015b, Becerra-Castro et al., 2016).

5.1.2. Proceso peroxona

El proceso peroxona (O_3/H_2O_2) consiste en combinar ozono con peróxido de hidrógeno para aumentar la generación de radicales hidroxilo, es decir, para favorecer el mecanismo indirecto de la ozonización. En este caso, el ciclo de descomposición del ozono se acelera y se produce mayor concentración de radicales hidroxilo (Glaze, 1987).

La desinfección de patógenos tiene lugar mediante reacción directa con el ozono o mediante reacción con los radicales hidroxilo generados (Hoigné y Bader, 1978).

El peróxido de hidrógeno en disolución acuosa se disocia en el anión hidroperóxido, según la ecuación [5.14]. La reacción del HO_2^- con ozono inicia una cadena de reacciones radicalarias similar a la descrita para la ozonización a pH elevado (ecuaciones [5.4] - [5.11]), que da lugar a la formación de radicales hidroxilo (Andreozzi et al., 1999).



Uno de los parámetros a optimizar en el sistema peroxona es el ratio $O_3:H_2O_2$, ya que el peróxido de hidrógeno actúa como generador de $\cdot OH$ pero también como “atrapador” de estos radicales (ecuaciones [5.15] y [5.16]):



El sistema peroxona es igual o incluso más efectivo que la ozonización en la desinfección del agua. La inactivación se debe principalmente a la acción del ozono y de los radicales hidroxilo, ya que el peróxido de hidrogeno por sí solo requiere de grandes concentraciones y tiempos de contacto para eliminar bacterias y virus (USEPA, 1999).

Durante los últimos años se ha investigado la eficacia de la combinación de ozono y peróxido de hidrógeno en la eliminación de diversos microorganismos: *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Clostridium perfringens*, bacterias resistentes a antibióticos, *Pseudomonas* sp., etc. (Lanao et al., 2008, Lee et al., 2011, Lanao, 2012, Tachikawa y Yamanaka, 2014, Rodriguez-Chueca et al., 2015, Miguel et al., 2016).

5.2. Ensayos de O₃ y O₃/H₂O₂ a escala de laboratorio

5.2.1. Muestras

En los ensayos de ozonización se utilizan dos tipos de muestra: agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF, apartado 4.2.1) y agua residual depurada sintética (ARDS), cuya composición se describe a continuación. Ambas matrices se esterilizan y se fortifican con las bacterias de estudio, *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp (apartado 2.2.1), según los ensayos a realizar.

Agua residual depurada sintética (ARDS)

La preparación de la muestra de agua residual depurada sintética se realiza conforme a lo descrito en estudios previos realizados por otros autores (Polo-López et al., 2012, Rodríguez-Chueca, 2013, Rodríguez-Chueca et al., 2014) y su composición se detalla en la Tabla 5.1. Las características físico-químicas del agua residual depurada sintética se recogen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.1. Composición de la muestra de agua residual depurada sintética (ARDS)

Compuesto	Concentración (mg/L)
Peptona de carne	32
Extracto de carne	22
Urea (CO(NH ₂) ₂)	6
Hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO ₃)	96
Cloruro de sodio (NaCl)	7
Cloruro de potasio (KCl)	4
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	4
Sulfato de calcio (CaSO ₄ ·2H ₂ O)	60
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	60
Hidrógeno fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	0,28

Tabla 5.2. Caracterización físico-química de la muestra de agua residual depurada sintética (ARDS)

Parámetro	Valor promedio
pH	7,7
Conductividad (μS/cm)	282
Turbidez (UNT)	<1
DQO (mg O ₂ /L)	56
COD (mg C/L)	21
SST (mg/L)	<1

5.2.2. Agentes desinfectantes

5.2.2.1. Ozono: generación a escala de laboratorio

A escala de laboratorio, el ozono se genera "in situ" mediante un ozonizador Fischer modelo 500, situado en el laboratorio del grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas, perteneciente a la Universidad de Zaragoza.

La Figura 5.1 muestra un esquema de la instalación de ozonización.

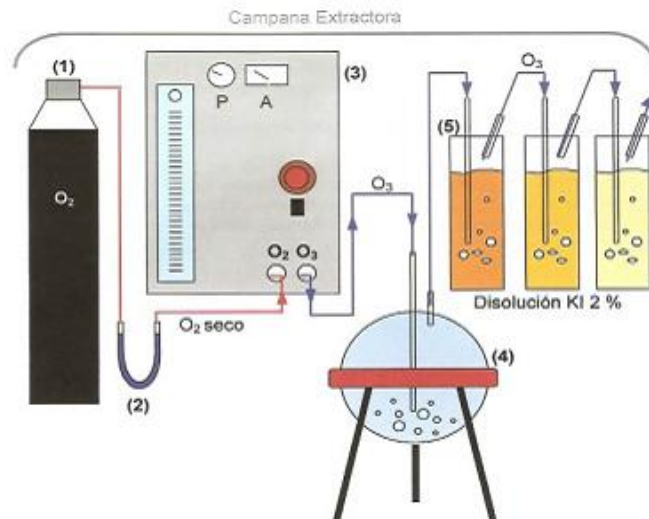
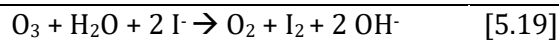
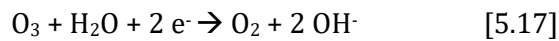


Figura 5.1. Esquema de la instalación de ozonización

Se aporta oxígeno al ozonizador desde una botella de gas comprimido conectada directamente al equipo. El flujo de oxígeno introducido se regula mediante una válvula situada en el frontal del ozonizador. Esto permite controlar la generación de ozono, que es proporcional al caudal de oxígeno introducido. Entre la botella de gas y el ozonizador, se coloca un lecho de sílica gel para eliminar la humedad de la corriente de O_2 antes de entrar en el ozonizador, asegurando así que el gas de entrada esté seco. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye la corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular da lugar a las moléculas de ozono.

El ozonizador se conecta a un reactor cerrado de vidrio que funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. Este reactor es de vidrio Pyrex con forma esférica y tiene una capacidad de 2 L. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso (O_3 introducido). La transferencia del ozono al agua produce un burbujeo que proporciona agitación a la muestra, favoreciendo el contacto ozono-agua.

El flujo de ozono introducido se mantiene constante a lo largo de cada experimento y se calcula mediante calibración del equipo, tal y como se describe más adelante en este apartado. Todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción (O_3 no consumido), por lo que el exceso debe destruirse. Para ello se conectan en serie al reactor dos o tres borbotadores que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno, mientras que el yoduro se oxida a yodo (I_2) (ecuaciones [5.17], [5.18] y [5.19]). El experimento debe llevarse a cabo en una campana de extracción ya que el ozono es tóxico.



El O_3 consumido por la muestra se calcula mediante la ecuación [5.20]. La concentración de ozono residual disuelto en el agua resulta muy pequeña en comparación con el ozono no consumido, por lo que se considera despreciable.

$$O_3 \text{ consumido} = O_3 \text{ introducido} - (O_3 \text{ no consumido} + O_3 \text{ residual disuelto}) \quad [5.20]$$

Para conocer la cantidad de ozono producido, es decir, la cantidad de ozono introducido en la muestra, se procede a la calibración del ozonizador a escala de laboratorio. Para ello se realizan una serie de ensayos a diferentes tiempos, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Se conectan dos borbotadores en serie directamente a la salida del ozonizador, conteniendo cada uno 250 mL de KI (Panreac) al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50 L/h, utilizando una potencia de ozonización de 1,5 W y aplicando una presión de oxígeno de 1 bar. Finalmente, la cantidad de ozono presente en los borbotadores se calcula por el método yodométrico estandarizado 2350 E (Eaton et al., 2005). Este método se utiliza tanto en la calibración del equipo para conocer el ozono producido, como en la realización de experimentos para determinar el ozono no consumido.

La Figura 5.2 muestra la recta de calibrado del ozonizador, que representa el ozono generado ($mg O_3$) en función del tiempo de tratamiento y permite calcular el ozono introducido en la muestra.

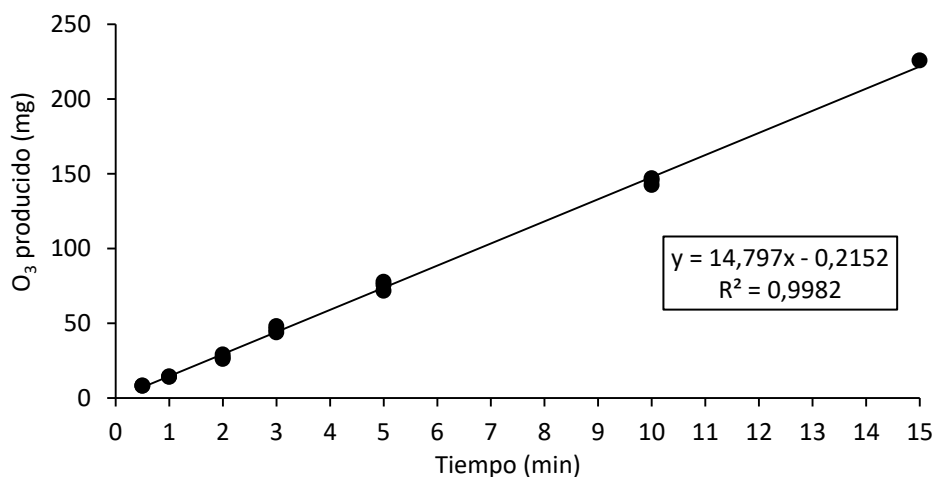


Figura 5.2. Recta de calibrado del ozonizador

5.2.2.2. Peróxido de hidrógeno

Se utiliza peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Panreac) con una concentración del 30% (p/v).

5.2.3. Efecto de la matriz

En este apartado se compara la inactivación alcanzada sobre la bacteria *E. coli* mediante ozonización en dos matrices distintas de agua residual depurada.

5.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utilizan dos tipos de muestra: agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF, apartado 4.2.1) y agua residual depurada sintética (ARDS, apartado 5.2.1). Ambas matrices se esterilizan y se fortifican con la bacteria de estudio *Escherichia coli* (apartado 2.2.1), obteniéndose una concentración bacteriana de 10⁷-10⁸ UFC/100 mL.

Los ensayos se llevan a cabo en la instalación a escala de laboratorio descrita en el apartado 5.2.2.1. Se utiliza un volumen de muestra a tratar de 1 L, colocado en reactores de vidrio de 2 L de capacidad y a temperatura ambiente (23°C). Se realizan ensayos individuales para cada tiempo de tratamiento, introduciendo un caudal de ozono constante de 888 mg/h de O₃ y determinando el ozono consumido en cada caso. De esta forma se aplican distintas dosis de ozono a la muestra según el tiempo seleccionado, pudiéndose relacionar la inactivación bacteriana alcanzada con la cantidad de ozono consumido por la muestra. El ozono residual presente en las muestras se neutraliza con tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃·5H₂O, 99'5%, Panreac) para parar el efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes.

5.2.3.2. Resultados y discusión

La Figura 5.3 muestra la inactivación de *Escherichia coli* en las muestras de agua residual depurada sintética (ARDS) y de agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF). La inactivación se representa en función del tiempo (Figura 5.3a), de la cantidad de ozono introducido (Figura 5.3b) y de la cantidad de ozono consumido (Figura 5.3c).

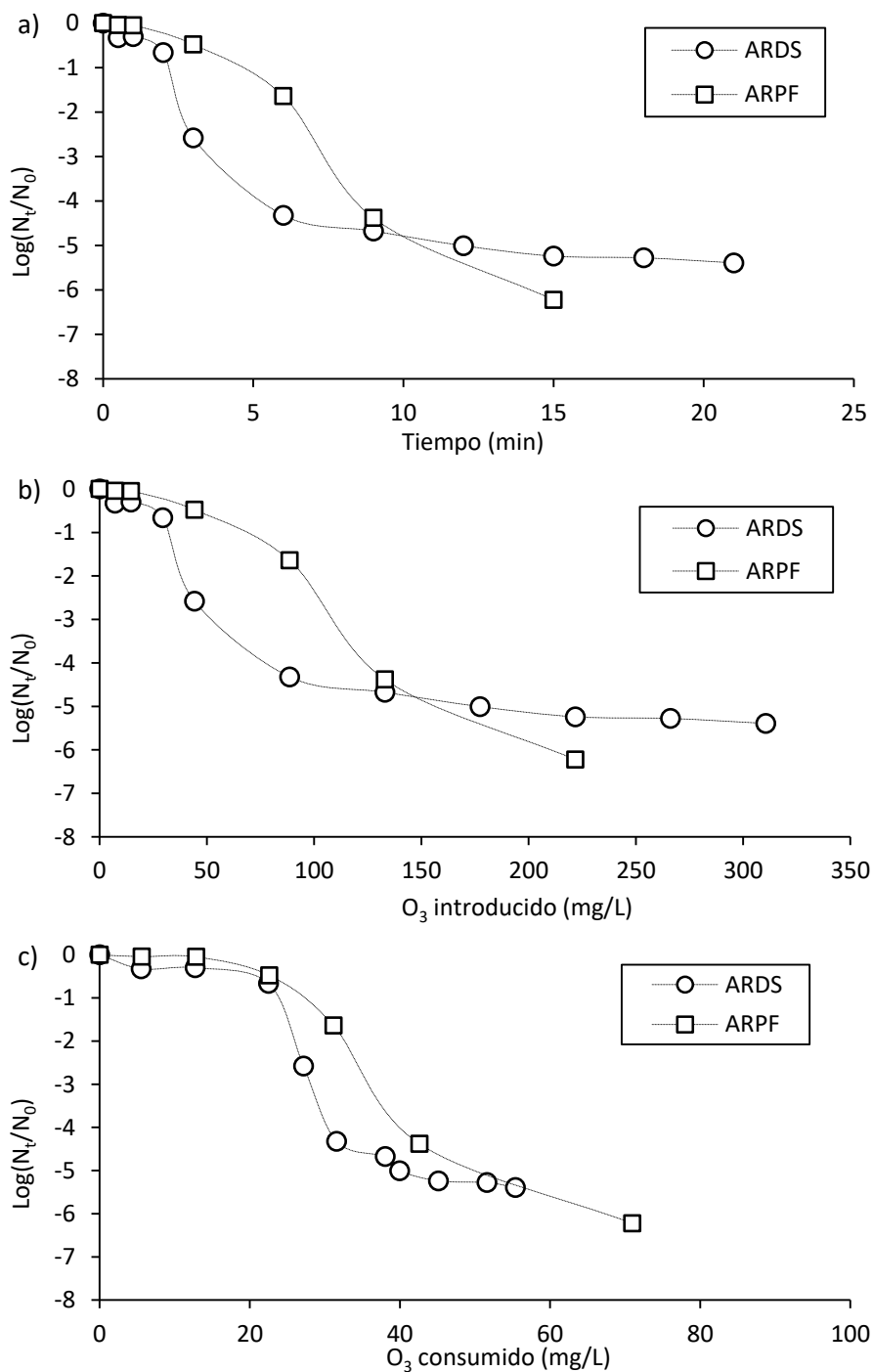


Figura 5.3. Inactivación de *E. coli* mediante ozonización en ARPF y ARDS, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.

Las curvas de inactivación obtenidas para ambas matrices mostraron forma sigmoidea (Figura 5.3). Esto significa que durante los primeros minutos del tratamiento la disminución de la población bacteriana fue lenta, seguida de un periodo de inactivación más rápido casi lineal y finalmente tuvo lugar un fenómeno de cola.

Durante la fase inicial de retraso u hombro, la inactivación en las dos matrices fue similar. En la muestra ARDS el hombro tuvo una duración aproximada de 2 minutos, con una cantidad de ozono introducido de 29 mg/L de O₃ y un consumo de ozono de 22 mg/L de O₃. En ARPF estos valores fueron de 3 minutos, 44 mg/L de O₃ introducido y 23 mg/L de O₃ consumido. Esta fase de retraso en la inactivación puede deberse a distintos factores, ya sea a una mezcla inadecuada del ozono en la muestra, a un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos, a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del ozono, a la síntesis de nuevos componentes vitales o a la presencia de materia oxidable en la muestra (Hunt y Mariñas, 1997, Geeraerd et al., 2000, Huber et al., 2005, Lanao, 2012). Probablemente, en este periodo inicial la mayor parte del ozono introducido fue consumido por la materia orgánica presente y no por las bacterias.

A continuación tiene lugar una etapa lineal, en la que la inactivación es rápida, alcanzándose, en ambas matrices, más de 4 logaritmos de desinfección tras 9 minutos de ozonización. La dosis de ozono introducido fue de 133 mg/L y el ozono consumido fue similar en las dos muestras, con 38 mg/L y 43 mg/L de O₃ consumido en ARDS y en ARPF, respectivamente. En general, en las aguas residuales depuradas, al aplicar dosis de ozono relativamente elevadas sobre *E. coli*, se producen en primer lugar daños en la membrana celular, lo que favorece la difusión del ozono al interior de la célula. A continuación el ozono ataca a los componentes intracelulares, incluyendo los ácidos nucleicos (ej. ADN), causando finalmente la inactivación de la célula (Lee et al., 2016).

Finalmente se observa un fenómeno de cola en ambas matrices, periodo durante el cual la concentración bacteriana se redujo más lentamente. Este efecto de cola se observa a menudo en la desinfección mediante ozonización. Algunos estudios atribuyen este fenómeno a la existencia de una fracción de bacterias con membranas celulares que presentan mayor resistencia al ataque del ozono (Lee et al., 2016), mientras que otros plantean que la materia coloidal actúa de escudo frente al ataque del ozono (Huber et al., 2005, Zimmermann et al., 2011).

Se observa también que la cantidad de ozono consumido (Figura 5.3c) fue inferior a la de ozono introducido (Figura 5.3b), lo que significa que hay pérdidas de ozono considerables en el sistema y el contacto entre el ozono y la muestra debería mejorarse para reducirlos.

En aguas superficiales naturales, Rodríguez-Chueca et al. (2015) observaron la ausencia de hombro inicial durante la inactivación de *E. coli* mediante ozonización, alcanzando más de -3,5 unidades logarítmicas de inactivación tras un minuto de tratamiento y un consumo de ozono de 8 mg O₃/L. Bajo esas condiciones de operación, en el presente trabajo de investigación apenas se obtuvo inactivación de *E. coli* (<-0,3 log) en sendas matrices de agua residual depurada, probablemente debido al mayor contenido en materia orgánica de éstas respecto al agua natural. Sin embargo, el fenómeno de cola tuvo lugar en todas las matrices acuosas.

En resumen, la composición de la matriz afecta a la eficacia de la desinfección. En aguas residuales depuradas, como ARDS y ARPF, la inactivación se retrasa inicialmente como consecuencia de la presencia de materia oxidable (ej. COT) que reacciona con el ozono. Sin embargo, el efecto de cola observado es probable que esté relacionado con la existencia de una subpoblación de *E. coli* más resistente al ozono. En general, la inactivación es algo más rápida en la matriz ARDS que en ARPF, aunque ambas presentan una tendencia similar, especialmente en términos de ozono consumido.

5.2.3.3. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* obtenidas en el tratamiento de ozonización en las dos matrices de agua residual depurada se analizan mediante 4 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd.

Dos de los modelos matemáticos utilizados, el modelo bifásico y el de Mafart, coinciden con los modelos seleccionados para el tratamiento de cloración. El modelo de Hom asume que no hay disminución del desinfectante a lo largo del tratamiento y, puesto que el ozono se suministra de manera continua al reactor que alberga la muestra, se considera que la concentración de ozono aplicada es constante, siendo esta suposición consistente con el modelo de Hom. Además, dado que las curvas de inactivación parecen presentar fenómenos de hombro, una fase de inactivación lineal y efecto final de cola, se utiliza también el modelo de Geeraerd.

Las Tablas 5.3- 5.6 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de correlación (r) y el error cuadrático medio (ECM).

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.

Matriz	k^* (min^{-1})	m	ECM	r
ARDS	1,23	0,53	0,70	0,90
ARPF	0,23	1,23	0,44	0,97

Tabla 5.4. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.

Matriz	P	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	r
ARDS	0,99995741	1,65	0,12	0,30	0,98
ARPF	0,99990127	1,15	0,35	0,66	0,96

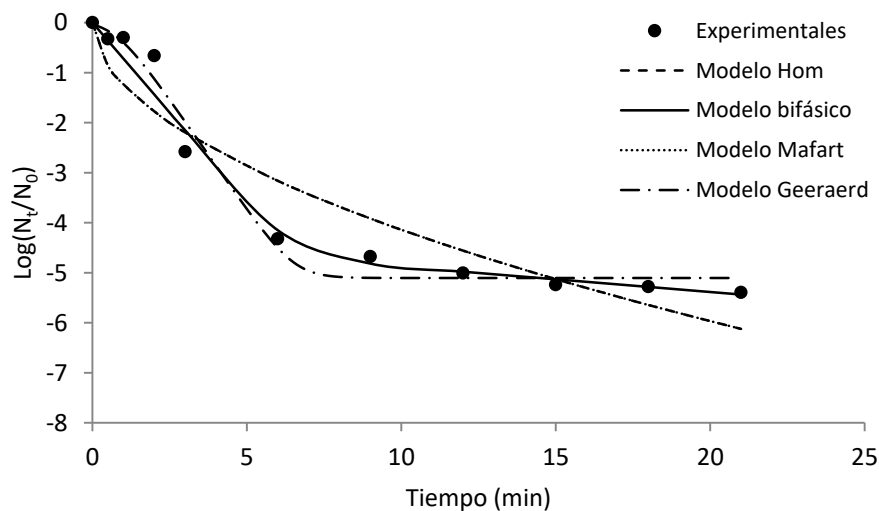
Tabla 5.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.

Matriz	p	δ (min)	ECM	r
ARDS	0,527	0,68	0,70	0,95
ARPF	1,232	3,28	0,44	0,98

Tabla 5.6. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a la inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala de laboratorio en ARDS y en ARPF.

Matriz	SI (min)	$k_{\text{máx}}$ (min^{-1})	ECM	r
ARDS	0,80	2,03	0,37	0,98
ARPF	4,28	2,07	0,21	1,00

Las Figuras 5.4 y 5.5 muestran gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales durante el tratamiento de ozonización de *E. coli* en ARDS y en ARPF, respectivamente. En el Anexo I se incluyen las gráficas que muestran el error de cada modelo (Figuras I.VIII y I.IX).

Figura 5.4. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre *E. coli* en ARDS.

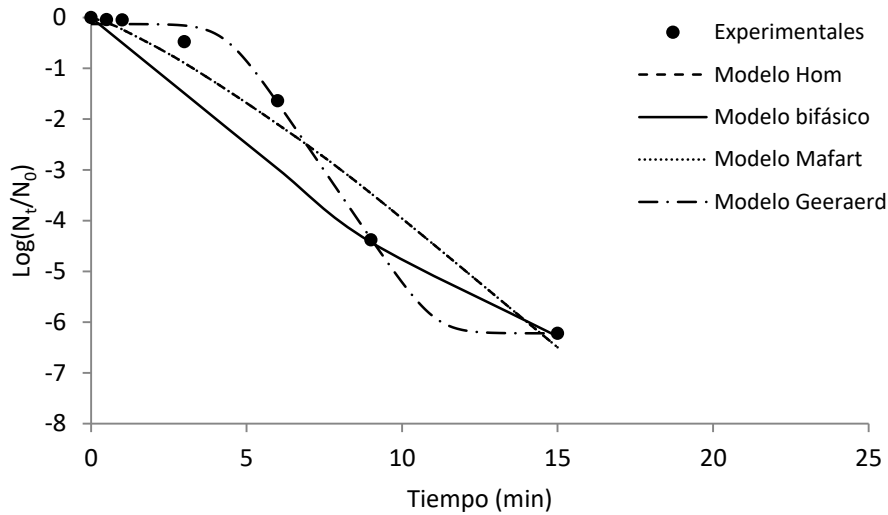


Figura 5.5. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre *E. coli* en ARPF.

En general, los índices *ECM* y *r* presentan valores cercanos a 0 y a 1, respectivamente, lo que indica una buena adecuación de los cuatro modelos a los valores experimentales de inactivación obtenidos. Sin embargo, en la representación gráfica (Figura 5.4 y Figura 5.5) se puede observar que el modelo de Geeraerd es el que mejor describe la inactivación experimental en ambas matrices.

En la Figura 5.4 y en la Figura 5.5 se observa también que el modelo de Hom y el de Mafart coinciden. Dichos modelos sólo permiten describir o bien el efecto inicial de retraso (hombro) o el efecto final de cola, por lo que no se ajustan bien a los datos experimentales.

De manera similar, el modelo bifásico describe adecuadamente el tramo final de cola de las curvas de inactivación obtenidas en sendas matrices, pero no se ajusta al tramo inicial de hombro ni a la fase lineal de desinfección.

Por último, el modelo de Geeraerd presenta un buen ajuste a los datos experimentales. La constante de velocidad de inactivación de primer orden, $k_{máx}$, es casi idéntica para ambas matrices (Tabla 5.6), mientras que la longitud del hombro inicial es notablemente superior en el agua de salida de la planta de fangos activos (4,28 min) que en el agua residual depurada sintética (0,80 min). Esta diferencia en el retraso producido en la desinfección se debe a la distinta composición de las muestras, siendo más prolongado el hombro inicial en la matriz con mayor cantidad de materia oxidable por el ozono.

5.2.4. Efecto del tipo de bacteria

5.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utiliza como muestra agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF, apartado 4.2.1). La muestra se esteriliza en autoclave y se fortifica con la bacteria objeto de estudio, *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp., mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1. La concentración bacteriana inicial en las muestras es de 10^7 - 10^8 UFC/100 mL.

El procedimiento experimental y las condiciones de operación coinciden con las descritas en el apartado 5.2.3.1. Se utiliza la instalación de ozonización a escala de laboratorio (apartado 5.2.2.1), introduciendo un caudal de ozono constante de 888 mg/h de O_3 y realizando ensayos individuales para cada tiempo de tratamiento. El volumen de muestra a tratar es de 1 L y los ensayos se realizan a temperatura ambiente (23°C). El ozono residual presente en las muestras se neutraliza con tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 99,5%, Panreac).

Se analizan el pH, la conductividad y la turbidez de la muestra antes y después de los tratamientos aplicados.

5.2.4.2. Resultados y discusión

La Tabla 5.7 recoge la evolución de los parámetros físico-químicos durante el tratamiento de ozonización. Se observa que durante el tratamiento con ozono no hubo cambios importantes en el pH, la conductividad o la turbidez del agua. Esta ausencia de variación en estos parámetros concuerda con lo observado por Lanao (2012) durante la desinfección de aguas naturales mediante ozonización.

Tabla 5.7. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra ARPF.

Tratamiento	Ozonización	
	t = 0 min	t =15 min
Parámetro		
pH	6,7	6,9
Conductividad ($\mu S/cm$)	1142	1144
Turbidez (UNT)	48	41

La Figura 5.6 muestra la inactivación mediante ozonización a escala de laboratorio de las bacterias *Escherichia coli* y de *Enterococcus* sp. en la muestra ARPF. La inactivación se representa en función del tiempo (Figura 5.6a), de la cantidad de ozono introducido (Figura 5.6b) y de la cantidad de ozono consumido (Figura 5.6c).

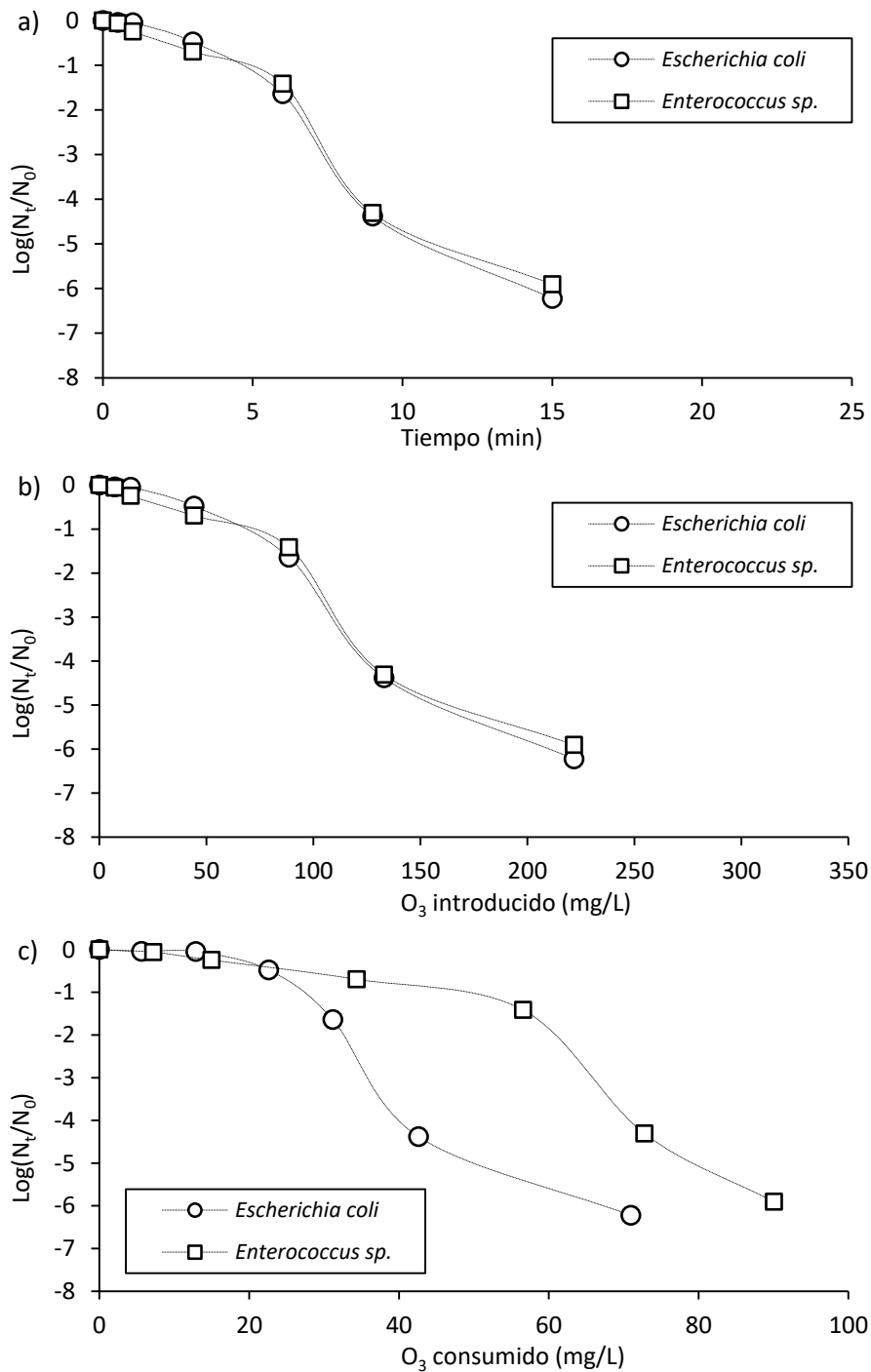


Figura 5.6. Inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* mediante ozonización en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.

Las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* obtenidas mediante ozonización presentaron forma sigmoidea (Figura 5.6). La desinfección de ambas bacterias fue similar en términos de tiempo y de ozono introducido, mientras que el consumo de ozono difirió. Las dosis de ozono aplicadas, de hasta 70-90 mg/L de O_3 consumido, son similares a las utilizadas por otros autores en la desinfección de aguas con resultados de inactivación parecidos (Gehr et al., 2003, Lanao, 2012, Rodríguez-Chueca et al., 2015).

En la Figura 5.6 se observa que durante los 6 primeros minutos de tratamiento se produjo una inactivación más lenta, alcanzándose en este tiempo una eliminación de -1,6 log y -1,4 log de *E. coli* y de *Enterococcus sp.*, respectivamente. Esto supuso una cantidad de ozono introducido de 89 mg/L en ambos casos. Tras esta fase inicial de retraso, la desinfección fue más rápida y mostró un descenso lineal, logrando reducir la población de *E. coli* en -4,3 log y la de *Enterococcus sp.* en -4,4 log tras 9 minutos de ozonización. Para este tiempo de tratamiento la cantidad de ozono introducido fue de 133 mg/L. Finalmente, tuvo lugar un fenómeno de cola en el que la inactivación fue de nuevo más lenta. Tras 15 minutos de tratamiento se eliminaron -6,2 y -5,9 unidades logarítmicas de *E. coli* y de *Enterococcus sp.*, respectivamente, lo que supuso 222 mg/L de O₃ introducido.

Por otra parte, el consumo de ozono fue diferente para cada bacteria. La Figura 5.7 muestra la cantidad de ozono consumida para eliminar cada unidad logarítmica de las bacterias estudiadas.

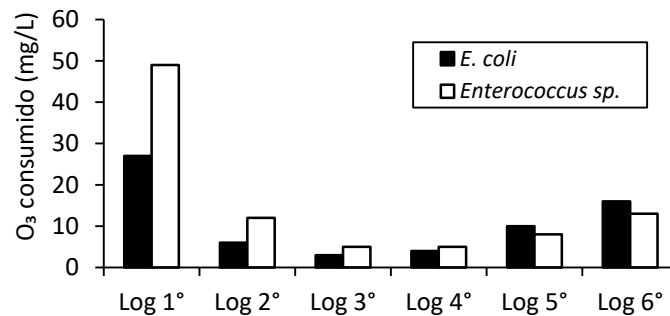


Figura 5.7. Consumo de ozono necesario para inactivar cada unidad logarítmica de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* durante el tratamiento de ozonización en ARPF.

En la Figura 5.7 se observa que el consumo de ozono necesario para eliminar la primera unidad logarítmica de sendas bacterias fue considerablemente mayor que para el resto. Durante la fase intermedia lineal el requerimiento de ozono por unidad logarítmica inactivada fue menor. Si se comparan las dos bacterias estudiadas, para conseguir la inactivación de las dos primeras unidades logarítmicas de *Enterococcus sp.* se necesita un mayor consumo de ozono que para *E. coli*. Sin embargo, el consumo de ozono a partir de la tercera unidad logarítmica de inactivación fue similar para ambas bacterias.

Esta diferencia en el consumo de ozono puede deberse a diversos factores. Por una parte, es posible que los enterococos presenten mayor resistencia a la desinfección con ozono, ya que su pared celular se compone de una capa de peptidoglicano más gruesa que la de *E. coli*. Esto supondría que se requeriría más ozono en el caso de los enterococos para que se produzcan daños significativos en la membrana celular y el ozono sea capaz de entrar al interior de la célula e inactivarla. Algunos estudios muestran que *E. coli* es más sensible que otras bacterias al ataque del ozono (Xu et al., 2002, Verma et al., 2016).

Otra posible causa de las diferencias en el consumo de ozono de sendas bacterias puede deberse a la composición variable de las muestras de salida de la planta de fangos, ya que se trata de un sistema de depuración con organismos vivos que se ven afectados por condiciones ambientales. Una concentración más elevada de sólidos en suspensión o materia orgánica reduce el poder desinfectante de la ozonización (Lazarova et al., 2013).

En resumen, la inactivación de ambas bacterias en ARPF mediante ozonización fue similar en términos de tiempo y de ozono introducido; sin embargo, el consumo de ozono fue superior para *Enterococcus* sp. que para *E. coli*, lo que puede ser consecuencia de las diferencias estructurales en las membranas de ambas bacterias y/o de variaciones en la composición de la matriz.

5.2.4.3. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. obtenidas tras el tratamiento de ozonización de la muestra ARPF se analizan mediante 4 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd.

Las Tablas 5.8- 5.11 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de correlación (r) y el error cuadrático medio (ECM).

Tabla 5.8. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	k^* (min^{-1})	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	0,23	1,23	0,44	0,97
<i>Enterococcus</i> sp.	0,25	1,18	0,46	0,96

Tabla 5.9. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	P	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	0,99990127	1,15	0,35	0,66	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	0,99984433	1,13	0,33	0,66	0,94

Tabla 5.10. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	1,232	3,28	0,44	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	1,184	3,23	0,46	0,98

Tabla 5.11. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante ozonización a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	SI (min)	$k_{m\acute{a}x}$ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	4,28	2,07	0,21	1,00
<i>Enterococcus</i> sp.	4,81	2,23	0,31	0,99

La Figura 5.5 y la Figura 5.8 muestran gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp., respectivamente, mediante el tratamiento de ozonización en agua de salida de la planta de fangos activos. En el Anexo I se incluyen las gráficas que muestran el error de cada modelo, mediante la representación de los valores estimados frente a los valores obtenidos experimentalmente (Figuras I.IX y I.X).

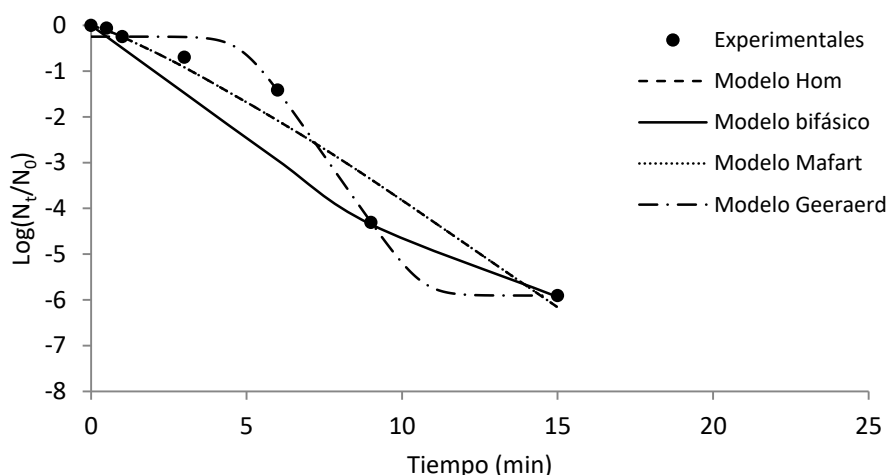


Figura 5.8. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización sobre *Enterococcus* sp. en ARPF.

En general, los cuatro modelos propuestos parecen adecuados para la descripción de los datos experimentales obtenidos, ya que los valores de *ECM* y *r* son cercanos a 0 y 1, respectivamente. Por otra parte, en las Figuras 5.5 y 5.8 se aprecia que el modelo de Geeraerd es el que mejor se ajusta a los datos experimentales de inactivación mediante ozonización de ambas bacterias estudiadas (Valero et al., 2013).

Los parámetros cinéticos calculados para el modelo de Hom (Tabla 5.8) presentan valores muy similares tanto para la inactivación de *E. coli* como para la de *Enterococcus* sp. El coeficiente empírico *m* muestra un valor ligeramente superior a 1, lo que significa que las curvas descritas mediante este modelo son convexas y no permiten modelizar el efecto de cola observado.

El modelo bifásico también muestra valores similares para las dos bacterias de estudio (Tabla 5.9) Según este modelo habría dos subpoblaciones con distinta resistencia al ozono

en cada caso. Este modelo no describe apropiadamente el fenómeno inicial de hombro pero sí el efecto de cola.

El modelo de Mafart establece que el tiempo necesario para alcanzar la primera unidad logarítmica de desinfección sería de 3,28 minutos para *E. coli* y 3,23 minutos para *Enterococcus* sp (Tabla 5.10). Además, en ambos casos la forma de la curva descrita es convexa, ya que $p > 1$, por lo que este modelo tampoco se ajusta bien a la forma sigmoidea de las curvas obtenidas experimentalmente.

Por último, el modelo de Geeraerd proporciona un buen ajuste según los valores ECM y R, así como mediante la representación gráfica. La distancia del hombro inicial es ligeramente superior para *Enterococcus* sp. que para *E. coli* (Tabla 5.11) y la constante de inactivación, $k_{m\acute{a}x}$, es muy similar para ambas bacterias

5.2.5. Efecto del uso de H₂O₂

5.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utiliza como muestra agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (apartado 4.2.1). La muestra se esteriliza en autoclave y se fortifica con la bacteria objeto de estudio, *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp., mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1. La concentración bacteriana inicial en las muestras es de 10⁷-10⁸ UFC/100 mL.

El procedimiento experimental y las condiciones de operación coinciden con las descritas en el apartado 5.2.3.1. Se utiliza la instalación de ozonización a escala de laboratorio (apartado 5.2.2.1), introduciendo un caudal de ozono constante de 888 mg/h de O₃ y realizando ensayos individuales para cada tiempo de tratamiento. El volumen de muestra a tratar es de 1 L y los ensayos se realizan a temperatura ambiente (23°C).

Para los tratamientos peroxona se añade peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30% p/v, Panreac) en distintas dosis, 1'4 mg/L (0'04 mM) y 20 mg/L H₂O₂ (0'6 mM), e inmediatamente después se procede a la aplicación del ozono. Algunos autores han trabajado con dosis bajas de H₂O₂ (0'7 - 1'4 mg/L H₂O₂) con buenos resultados en la desinfección (Sommer et al., 2004, Lanao, 2012), mientras que otros recomiendan establecer una relación molar H₂O₂:O₃ de 0,5:1 (Bellamy et al., 1991, Ormad et al., 1997, Miguel, 2010). La dosis de 20 mg/L H₂O₂ (0'6 mM H₂O₂) satisface la relación molar H₂O₂:O₃ de 0,5:1, considerando una cantidad de ozono consumido de 60 mg/L O₃ (1'2 mM O₃), valor a partir del cual se

observa una inactivación bacteriana más rápida para la bacteria más resistente a la ozonización (Figura 5.6c).

Tanto el ozono como el peróxido de hidrógeno residual presentes en las alícuotas para análisis microbiológico se neutralizan con tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99'5%, Panreac) para evitar que sigan ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes.

Se analizan el pH, la conductividad y la turbidez de la muestra antes y después de los tratamientos aplicados.

5.2.5.2. Resultados y discusión

La Tabla 5.12 recoge la evolución de los parámetros físico-químicos durante los tratamientos peroxona con 1,4 y 20 mg/L de H_2O_2 . Se observa que durante estos ensayos no hubo cambios importantes en el pH, la conductividad o la turbidez del agua, observación similar a la descrita por Lanao (2012) durante la desinfección de aguas naturales mediante peroxona.

Tabla 5.12. Resultados físico-químicos en los tratamientos peroxona sobre la muestra ARPF.

Tratamiento	Peroxona (1,4 mg H_2O_2 /L)		Peroxona (20 mg H_2O_2 /L)	
	t = 0 min	t = 15 min	t = 0 min	t = 15 min
pH	7,0	6,8	6,8	6,6
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1164	1153	1091	1094
Turbidez (UNT)	57	59	48	51

La Figura 5.9 muestra la inactivación de *E. coli* en el agua de salida de la planta de fangos activos durante los tratamientos de peroxona con 1,4 y 20 mg/L de H_2O_2 . Se incluyen también los resultados de inactivación mediante ozonización para facilitar la comparación.

La reducción de la población de *E. coli* alcanzada tras 15 minutos de tratamiento peroxona con 1,4 mg H_2O_2 /L fue de -6,5 log (Figura 5.9a), valor muy similar al obtenido en la ozonización, siendo el caudal de ozono introducido el mismo en ambos casos. Sin embargo, a diferencia de la curva de inactivación sigmoidea obtenida mediante ozonización, el tratamiento peroxona con 1,4 mg H_2O_2 /L dio lugar a una desinfección casi lineal con el tiempo, sin presencia de hombro inicial. El consumo de ozono en función de la inactivación alcanzada fue similar en una etapa inicial, hasta aproximadamente los 30 mg/L de O_3 consumido, siendo finalmente mayor en el tratamiento peroxona 1,4 mg H_2O_2 /L (84 mg O_3 /L) que en la ozonización (71 mg O_3 /L).

Por otra parte, el aumento de la dosis de H_2O_2 en el tratamiento peroxona hasta los 20 mg H_2O_2/L redujo la eficacia de la inactivación, obteniéndose una reducción de -3,2 log de *E. coli* tras 15 minutos de tratamiento. De nuevo, la curva de inactivación mediante este tratamiento presentó forma casi lineal con el tiempo y hombro inicial al ser representada frente al ozono consumido. Se observa también que, para alcanzar un mismo nivel de desinfección, el consumo de ozono fue mayor en el tratamiento peroxona con 20 mg H_2O_2/L que con 1,4 mg H_2O_2/L .

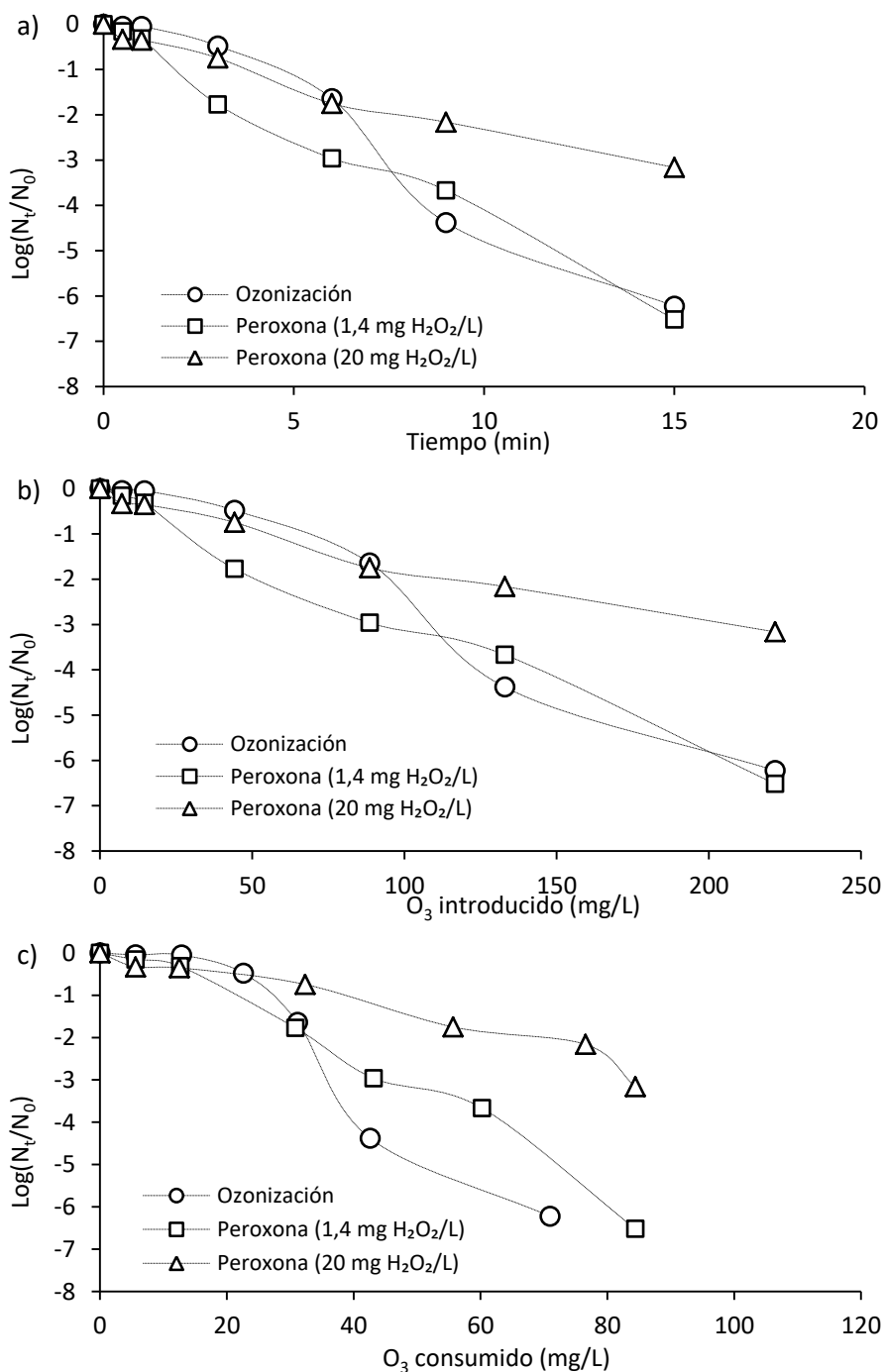


Figura 5.9. Inactivación de *E. coli* mediante ozonización y peroxona en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.

La Figura 5.10 muestra la inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos activos durante los tratamientos de peroxona con 1,4 y 20 mg/L de H₂O₂. Se incluyen también los resultados de inactivación mediante ozonización para facilitar la comparación.

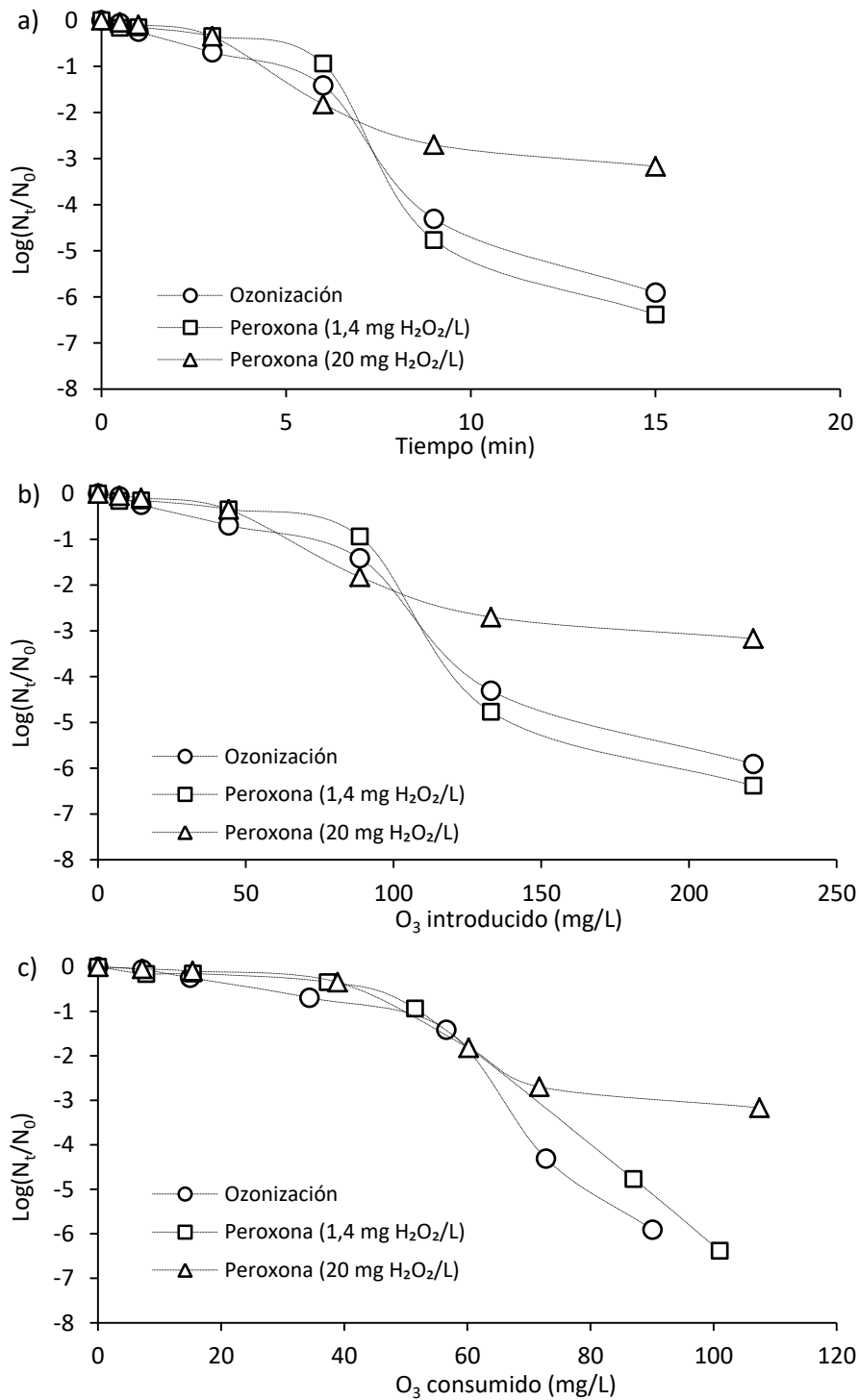


Figura 5.10. Inactivación de *Enterococcus* sp. mediante ozonización y peroxona en ARPF, representada en función de a) el tiempo de tratamiento, b) el ozono introducido y c) el ozono consumido.

La inactivación de *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L presentó forma sigmoidea. La fase inicial de retraso, en la que se redujo en -1 log la población bacteriana inicial, duró aproximadamente 6 minutos y tuvo un consumo de ozono de 52 mg/L. A continuación se produjo una inactivación rápida, seguida de un tramo final con efecto de cola, alcanzándose -6,4 log de eliminación de *Enterococcus* sp. tras 15 minutos y 101 mg/L de O₃ consumido. La curva de inactivación obtenida mediante este tratamiento fue similar a la observada mediante ozonización. La principal diferencia entre ambos sistemas residió en que en el tratamiento peroxona el consumo de ozono fue ligeramente superior que en la ozonización.

Con la dosis de 20 mg H₂O₂/L la inactivación de *Enterococcus* sp. siguió también una tendencia sigmoidea, aunque en este caso la desinfección obtenida al final del tratamiento apenas llegó a las -3,2 unidades logarítmicas. El ozono consumido para eliminar las 2 primeras unidades logarítmicas fue similar en ambos tratamientos peroxona, pero aumentó considerablemente en el sistema con 20 mg H₂O₂/L en la desinfección de las sucesivas unidades logarítmicas (Figura 5.10c).

En general, tanto para *E. coli* como para *Enterococcus* sp. el sistema peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L dio lugar a una desinfección similar a la obtenida mediante ozonización, mientras que la combinación de ozono con 20 mg H₂O₂/L redujo notablemente la eficacia del proceso.

De acuerdo con diversos estudios, el peróxido de hidrógeno activa el mecanismo indirecto de actuación del ozono, favoreciendo la generación de especies reactivas del oxígeno, como el radical hidroxilo (Glaze, 1987, Andreozzi et al., 1999). Este hecho explicaría el mayor consumo de ozono con el aumento de la presencia de H₂O₂. Considerando la cantidad de H₂O₂ añadido, 1,4 mg/L y 20 mg/L, la reacción entre el ozono y el peróxido de hidrógeno (ecuación [5.4]), supondría un consumo de ozono de 2 mg/L y 28 mg/L, respectivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se producen multitud de reacciones simultáneamente y la formación de radicales da lugar a la generación de reacciones en cadena entre los diversos compuestos que hay en la matriz acuosa.

En el sistema peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L es posible que la formación de radicales •OH aumente ligeramente, produciendo un consumo de ozono y una inactivación final algo mayor que en ausencia de H₂O₂. En cambio, con la dosis de 20 mg H₂O₂/L, el peróxido de hidrógeno actuó como generador de •OH pero también como “atrapador” de estos (ecuaciones [5.15] y [5.16]), reduciendo así el poder desinfectante del tratamiento. Cho y Yoon (2006), en su estudio sobre *Bacillus subtilis*, observaron un aumento en la

inactivación (respecto a la ozonización) al aplicar ozono combinado con 0,7 y 1,4 mg H₂O₂/L. Sin embargo, proponen que, en presencia de “scavengers” de radicales la eficacia de ambos sistemas, ozonización y peroxona, es la misma.

En la bibliografía consultada se muestra un aumento en la eficacia de inactivación, en comparación con la ozonización, al aplicar el tratamiento peroxona con dosis bajas de H₂O₂. Lanao et al. (2008) obtuvieron una desinfección de *Clostridium perfringens* en agua natural más rápida al aplicar el tratamiento peroxona. Rodríguez-Chueca et al. (2015) observaron una eliminación de *E. coli* en aguas superficiales de -5 log mediante ozonización y de -7 log mediante peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L. Miguel et al. (2016) obtuvieron cinéticas de inactivación de *Enterococcus* sp. en agua superficial más rápidas en el tratamiento peroxona que en la ozonización.

En conclusión, la combinación de ozono con H₂O₂ en dosis bajas (1,4 mg H₂O₂/L) no produjo ningún efecto importante, con respecto a la ozonización, sobre la inactivación de ambas bacterias estudiadas en la muestra ARPF. En cambio, la combinación de ozono con dosis de H₂O₂ relativamente elevadas (20 H₂O₂/L) redujo la eficacia de desinfección en varias unidades logarítmicas respecto a la ozonización, probablemente debido a la actuación del H₂O₂ como “scavenger” de radicales.

5.2.5.3. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. obtenidas tras el tratamiento peroxona se analizan mediante 4 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd.

Las Tablas 5.13-5.16 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de correlación (*r*) y el error cuadrático medio (*ECM*).

Tabla 5.13. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	Tratamiento	k* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,54	0,92	0,22	0,99
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,40	0,77	0,10	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,18	1,34	0,68	0,92
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,32	0,88	0,32	0,94

Tabla 5.14. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	Tratamiento	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,99187424	1,15	0,69	0,28	0,99
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,9003223	0,76	0,33	0,10	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,9998327	1,20	0,42	0,96	0,90
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,9976738	0,75	0,09	0,26	0,97

Tabla 5.15. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	Tratamiento	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,92	1,97	0,22	1,00
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,77	3,30	0,10	1,00
<i>Enterococcus</i> sp.	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	1,34	3,62	0,68	0,96
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	0,88	3,65	0,32	0,97

Tabla 5.16. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento peroxona a escala de laboratorio en ARPF.

Bacteria	Tratamiento	SI (min)	k _{máx} (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	0,00	0,90	0,53	0,97
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	-0,83	0,52	0,15	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	Peroxona (1,4 mg H ₂ O ₂ /L)	5,47	3,01	0,14	1,00
	Peroxona (20 mg H ₂ O ₂ /L)	2,44	1,09	0,12	1,00

La Figura 5.11 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* en ARPF durante los tratamientos peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L (Figura 5.11a) y con 20 mg H₂O₂/L (Figura 5.11b). En el Anexo I se incluyen las gráficas que muestran el error de cada modelo, mediante la representación de los valores estimados frente a los valores obtenidos experimentalmente (Figuras I.XI y I.XII).

Según los valores *ECM* y *r* y las representaciones gráficas de los cuatro modelos, todos ellos presentan un buen ajuste a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* mediante peroxona con 1,4 mg/L y 20 mg/L de H₂O₂.

En ambos tratamientos el modelo de Hom (Tabla 5.13) presenta unos valores del parámetro *m* algo inferiores a la unidad, lo que significa que las curvas de inactivación son ligeramente cóncavas. En el sistema peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L la constante aparente del modelo, *k**, es superior a la obtenida con 20 mg H₂O₂/L, lo que supone una velocidad de inactivación de *E. coli* mayor en el primer caso.

De forma similar, las constantes de inactivación k_1 y k_2 del modelo bifásico (Tabla 5.14) indicarían que la velocidad de desinfección es mayor en el sistema con menor concentración de H_2O_2 .

Según el modelo de Mafart (Tabla 5.15), las curvas de inactivación obtenidas mediante los tratamientos peroxona tienen forma cóncava, puesto que $p < 1$, lo que puede conllevar la aparición de un efecto de cola. Además, de acuerdo con el parámetro δ , el tiempo necesario para eliminar la primera unidad logarítmica de *E. coli* sería de 2,0 y 3,3 minutos mediante peroxona 1,4 mg H_2O_2/L y 20 mg H_2O_2/L , respectivamente.

El modelo de Geeraerd (Tabla 5.16) presenta valores ECM cercanos a 0 y r próximos a 1 y su representación gráfica se ajusta a los datos experimentales. Sin embargo, no resulta adecuado para describir la inactivación de *E. coli* mediante peroxona ya que no existe hombro inicial, por lo que el parámetro SI (longitud del hombro inicial) adquiere valores nulos o negativos.

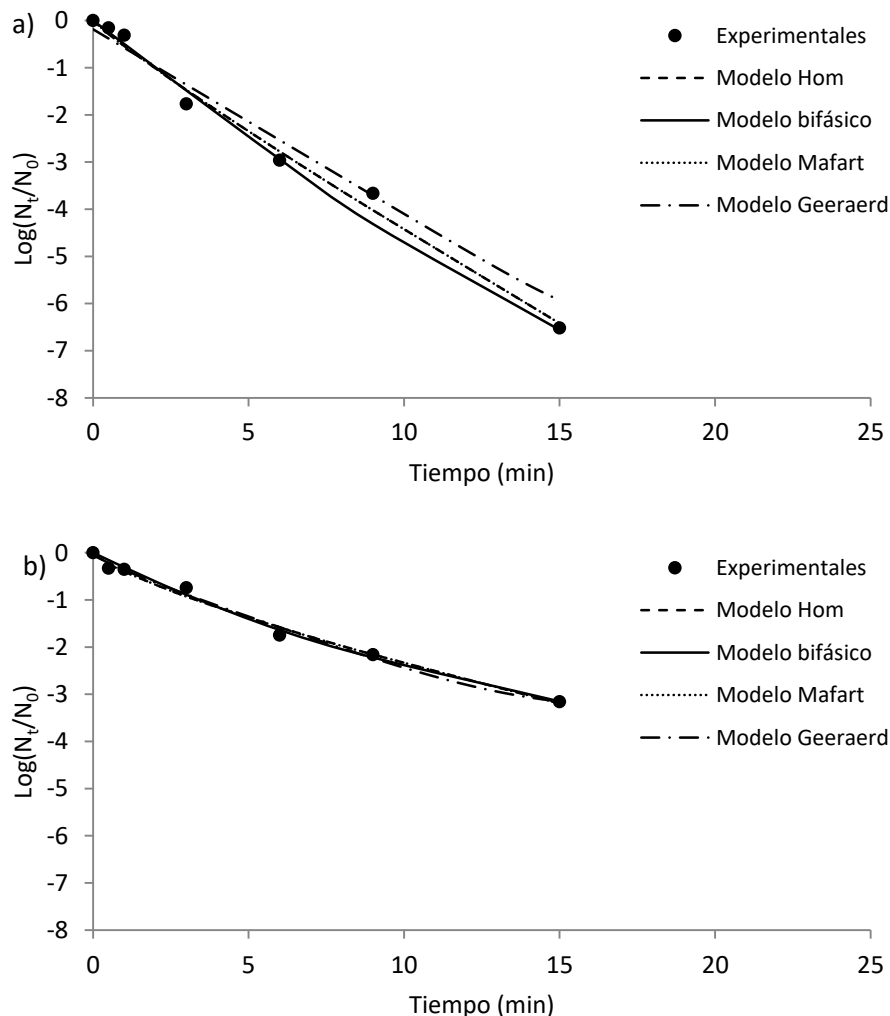


Figura 5.11. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación de los tratamientos peroxona sobre *Escherichia coli* en ARPF: a) $O_3 + 1,4 \text{ mg } H_2O_2/L$ y b) $O_3 + 20 \text{ mg } H_2O_2/L$.

La Figura 5.12 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos activos durante los tratamientos peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L (Figura 5.12a) y con 20 mg H₂O₂/L (Figura 5.12b). En el Anexo I se incluyen las gráficas que muestran el error de cada modelo, mediante la representación de los valores estimados frente a los valores obtenidos experimentalmente (Figuras I.XIII y I.XIV).

En general, el ajuste de los cuatro modelos a las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. es bueno según los valores *ECM* y *r*. Sin embargo, en algunos casos la representación gráfica muestra que, como ocurría en la ozonización, los modelos no siguen la tendencia de los datos experimentales.

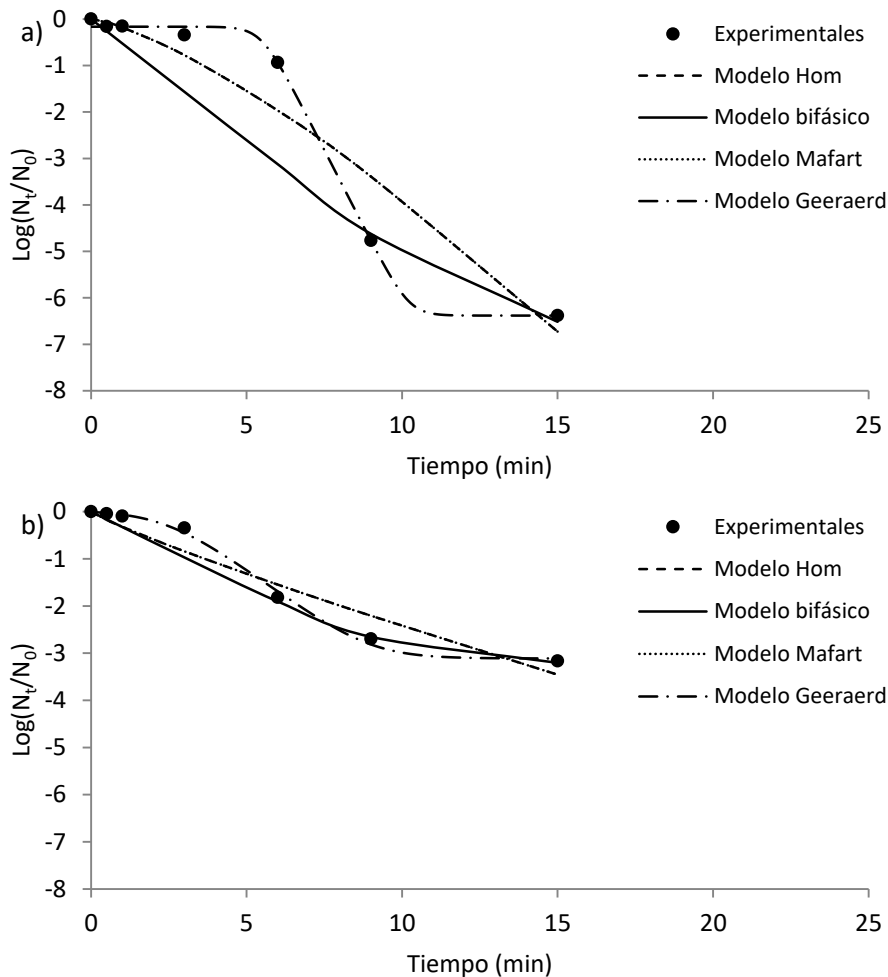


Figura 5.12. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas durante la aplicación de los tratamientos peroxona sobre *Enterococcus* sp. en ARPF: a) O₃ + 1,4 mg H₂O₂/L y b) O₃ + 20 mg H₂O₂/L.

Las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidas al aplicar los tratamientos peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L y 20 mg H₂O₂/L presentaron forma sigmoidea, por lo que los modelos de Hom, Mafart y bifásico no consiguen describir los fenómenos simultáneos de hombro y cola.

El modelo de Geeraerd sí es adecuado para modelizar curvas sigmoideas y se ajustó adecuadamente a la representación gráfica de los datos experimentales. Según este modelo, el hombro inicial (SI) tiene menor duración en el tratamiento peroxona con 20 mg H_2O_2/L , pero la velocidad de inactivación ($k_{m\acute{a}x}$) es mayor con la dosis de 1,4 mg H_2O_2/L (Tabla 5.16). En la ozonización (Tabla 5.11), los valores SI y $k_{m\acute{a}x}$ fueron menores que para peroxona con 1,4 mg H_2O_2/L .

5.2.6. Costes de operación

Para calcular los costes de operación de los tratamientos de ozonización se considera únicamente el coste del ozono generado. En los tratamientos peroxona se incluye también el coste del peróxido de hidrógeno, con un precio de 0,21 €/kg H_2O_2 al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza (Lanao, 2012). Para calcular el coste del ozono generado se tiene en cuenta solo el coste de la electricidad (0,134087 €/kWh (Iberdrola, 2017)), ya que a escala real el ozonizador se alimentaría con aire u oxígeno atmosféricos.

A escala de laboratorio, el ozonizador funciona con un caudal de oxígeno de 50 L/h O_2 y una potencia de 1,5 W (888 mg/h O_3 de ozono generado). El volumen de muestra tratado en cada ensayo es 1L. El coste de operación del tratamiento se estima para un volumen de muestra de 1 m³. Las ecuaciones [5.21] y [5.22] muestran las expresiones utilizadas para el cálculo del coste del ozono generado y del peróxido de hidrógeno añadido en cada tratamiento:

- Coste del ozono generado:

$$\text{Coste } O_3 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Coste electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = t \text{ (min)} \cdot \frac{1,5 \text{ W}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} \cdot \frac{0,134087 \text{ €}}{1000 \text{ Wh}} \quad [5.21]$$

- Coste H_2O_2 :

$$\text{Coste } H_2O_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Dosis} \left(\frac{\text{mg } H_2O_2}{1 \text{ L}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L } H_2O_2}{300000 \text{ mg } H_2O_2} \cdot \frac{1,1 \text{ kg } H_2O_2}{1 \text{ L } H_2O_2} \cdot \frac{0,21 \text{ € } H_2O_2}{1 \text{ kg } H_2O_2} \quad [5.22]$$

Para calcular el coste de operación se estima primero el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar cada nivel de eliminación de *Enterococcus* sp. en ARPF, que es la bacteria que presenta mayor resistencia a los tratamientos con ozono. Para ello se utiliza el modelo cinético de Geeraerd, por ser el que presenta mejor ajuste a los datos experimentales en todos los casos.

La Figura 5.13 recoge los costes de operación estimados para los tratamientos de ozonización y peroxona a escala de laboratorio.

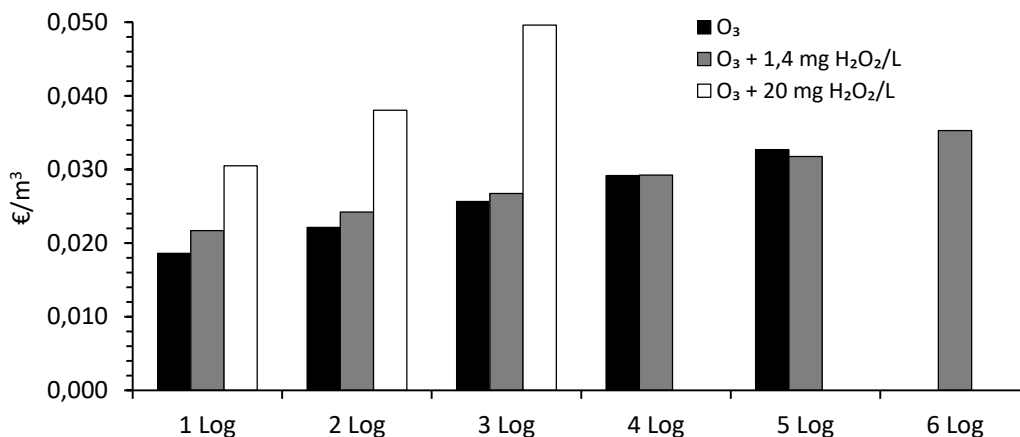


Figura 5.13. Costes de operación por unidad logarítmica inactivada mediante los tratamientos de ozonización y peroxona a escala de laboratorio.

La Tabla 5.17 recoge los tiempos de tratamiento estimados para alcanzar distintos niveles de inactivación bacteriana mediante ozonización y peroxona.

Tabla 5.17. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de *Enterococcus* sp. en ARPF mediante ozonización y peroxona.

Tratamiento	Tiempo (min)					
	-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
O ₃	5,6	6,6	7,7	8,7	9,8	-
O ₃ + 1,4 mg H ₂ O ₂ /L	6,2	6,9	7,7	8,4	9,2	10,2
O ₃ + 20 mg H ₂ O ₂ /L	4,5	6,8	10,2	-	-	-

Como muestra la Fig. 5.13, en todos los casos el coste de operación aumenta conforme se alcanza mayor inactivación bacteriana. Esto se debe a que se requiere más tiempo de tratamiento para obtener un grado de desinfección mayor (Tabla 5.17) y, por tanto, se necesita introducir más ozono, lo que se traduce en un consumo de electricidad más elevado.

Además, en la Figura 5.13 se observa que en algunos casos no se ha podido estimar el coste de operación, puesto que se produce fenómenos de cola y el modelo cinético empleado no contempla inactivación posterior.

En general, el coste de operación de la ozonización y del tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L aplicados a la inactivación de *Enterococcus* sp. es similar en ambos casos. El tratamiento peroxona con 20 mg H₂O₂/L presenta un coste mayor y la inactivación de más de -3 log supondría un coste de operación muy elevado debido al efecto de cola observado (Figura 5.10).

En comparación con la cloración, los tratamientos de ozonización y peroxona tienen un coste de operación algo mayor y requieren tiempos de tratamiento ligeramente superiores para alcanzar el mismo grado de desinfección.

5.3. Ensayos de O₃ a escala piloto

5.3.1. Muestra

En los ensayos de ozonización a escala piloto se utiliza agua residual depurada sintética (ARDS apartado 5.2.1) fortificada con la bacteria *Escherichia coli* (apartado 2.2.1). La concentración bacteriana inicial en las muestras es de 10⁷ UFC/100 mL.

5.3.2. Agentes desinfectantes

Ozono: generación a escala piloto

La Figura 5.14 muestra un esquema de la instalación de ozonización a escala piloto utilizada en los experimentos de desinfección del presente trabajo de investigación. La planta piloto se encuentra situada en las instalaciones del grupo de investigación *Tecnologías del Medio Ambiente* de la Universidad de Cádiz. Esta planta piloto ha sido utilizada con anterioridad en trabajos de investigación de tratamiento de aguas y se describe con detalle en estudios previos (Quero-Pastor et al., 2014a, 2014b).

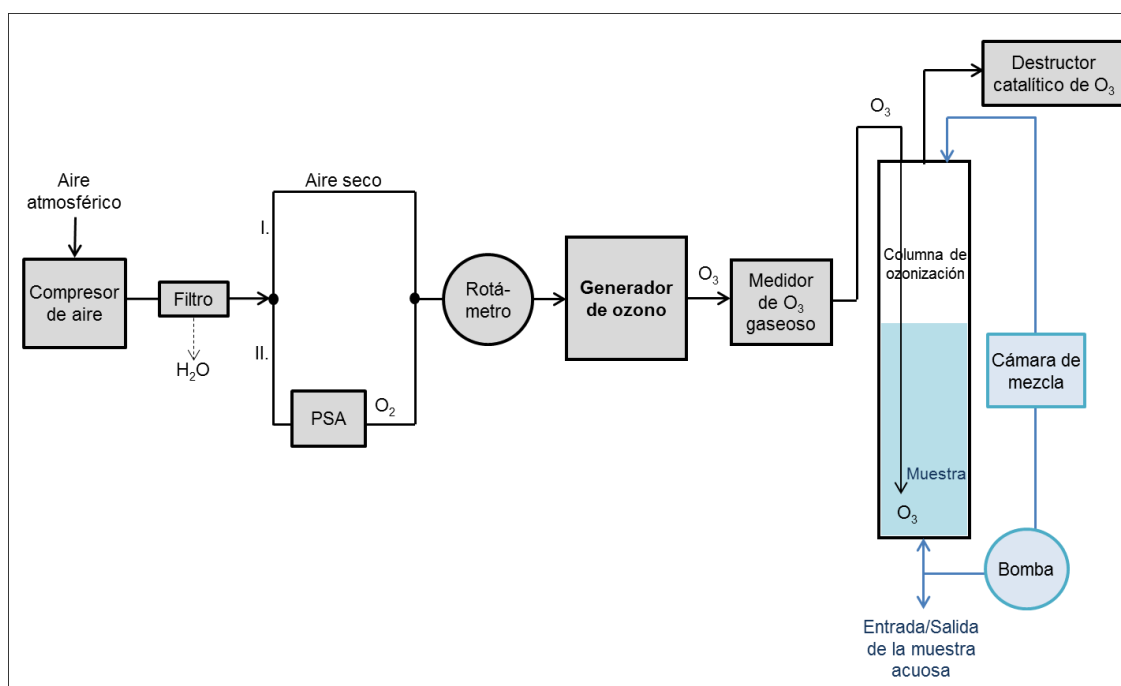


Figura 5.14. Esquema de la instalación de ozonización a escala piloto.

La planta piloto de ozonización está construida con materiales inertes y resistentes a la acción del ozono (policloruro de vinilo, vidrio y acero inoxidable). El ozono se produce mediante un generador de ozono GZ15 de descarga-corona de alta frecuencia. En primer lugar se comprime aire atmosférico y se seca mediante un filtro de condensados. El generador de ozono puede alimentarse con el aire seco (Figura 5.14,I) o bien con oxígeno atmosférico concentrado obtenido mediante tecnología de adsorción por presión (PSA)

(Figura 5.14,II). Los experimentos de ozonización a escala piloto se llevan a cabo en un reactor que consiste en una columna de contacto de 2 metros de altura y 50 litros de volumen de trabajo. El ozono se introduce mediante un difusor y la muestra pasa a través de una cámara de mezcla.

La producción de ozono se calcula de forma estimada según la ecuación [5.23], a partir de los datos de flujo de gas (aire u oxígeno) medidos en el rotámetro (Q) y la concentración de ozono en la mezcla gaseosa (C).

$$\text{O}_3 \text{ introducido } \left[\frac{\text{g O}_3}{\text{h}} \right] = Q \left[\frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right] \cdot C \left[\frac{\text{g O}_3}{\text{m}^3} \right] \quad [5.23]$$

El ozono no consumido por la muestra se conduce hacia un destructor catalítico de ozono, por lo que el ozono consumido no puede ser determinado.

5.3.3. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Cada ensayo se realiza con 20 L de muestra, la cual se recircula continuamente en el sistema con un caudal de 1250 L/h. Se toman alícuotas para el análisis microbiológico a diferentes tiempos de residencia. El ozono residual en las alícuotas se neutraliza inmediatamente con tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99'5%, Panreac) para parar la reacción de desinfección

Inicialmente, se realizan ensayos control en ausencia de ozono para evaluar la posible inactivación causada por otros factores, como la agitación en la cámara de mezcla o la presencia de aire u oxígeno en el agua. Durante estos ensayos control el generador de ozono permanece apagado.

En los ensayos con ozono, se utilizan diferentes flujos de aire u oxígeno para alimentar el generador de la planta piloto. De esta forma, la concentración de ozono a la salida del generador varía en cada experimento y da lugar a diferentes producciones de ozono. La Tabla 5.18 muestra las condiciones de operación durante los ensayos control y los experimentos de ozonización.

Las mayores producciones de ozono se obtuvieron al utilizar oxígeno en vez de aire. Además, hay que tener en cuenta que las condiciones atmosféricas, como la temperatura del aire o la humedad, pueden afectar a la producción de ozono en los generadores (Chen y Wang, 2005, Ono et al., 2014). Como consecuencia, en la Tabla 5.18 se aprecia que con el mismo flujo de aire se obtuvieron concentraciones de ozono diferentes. Por otra parte, flujos de oxígeno distintos (4 ó 10 L/min) generaron producciones de ozono similares (41 ó 39 g O_3 /h, respectivamente).

Tabla 5.18. Condiciones de los controles y de los experimentos con ozono en los ensayos de ozonización a escala piloto.

Experimento	Gas	Q (L/min)	C (g O ₃ /m ³)	Producción de O ₃ (g/h)
Control	Aire atmosférico	10	0	0
Control	Oxígeno concentrado	10	0	0
Ozonización	Aire atmosférico	10	18±1	11±1
Ozonización	Aire atmosférico	10	8±1	5±1
Ozonización	Oxígeno concentrado	4	170±10	41±2
Ozonización	Oxígeno concentrado	10	65±5	39±3

5.3.4. Resultados y discusión

La Figura 5.15 representa la inactivación de *Escherichia coli* para los experimentos control sin ozono y los ensayos de ozonización a escala piloto en función del tiempo (Figura 5.15a) y del ozono introducido (Figura 5.15b).

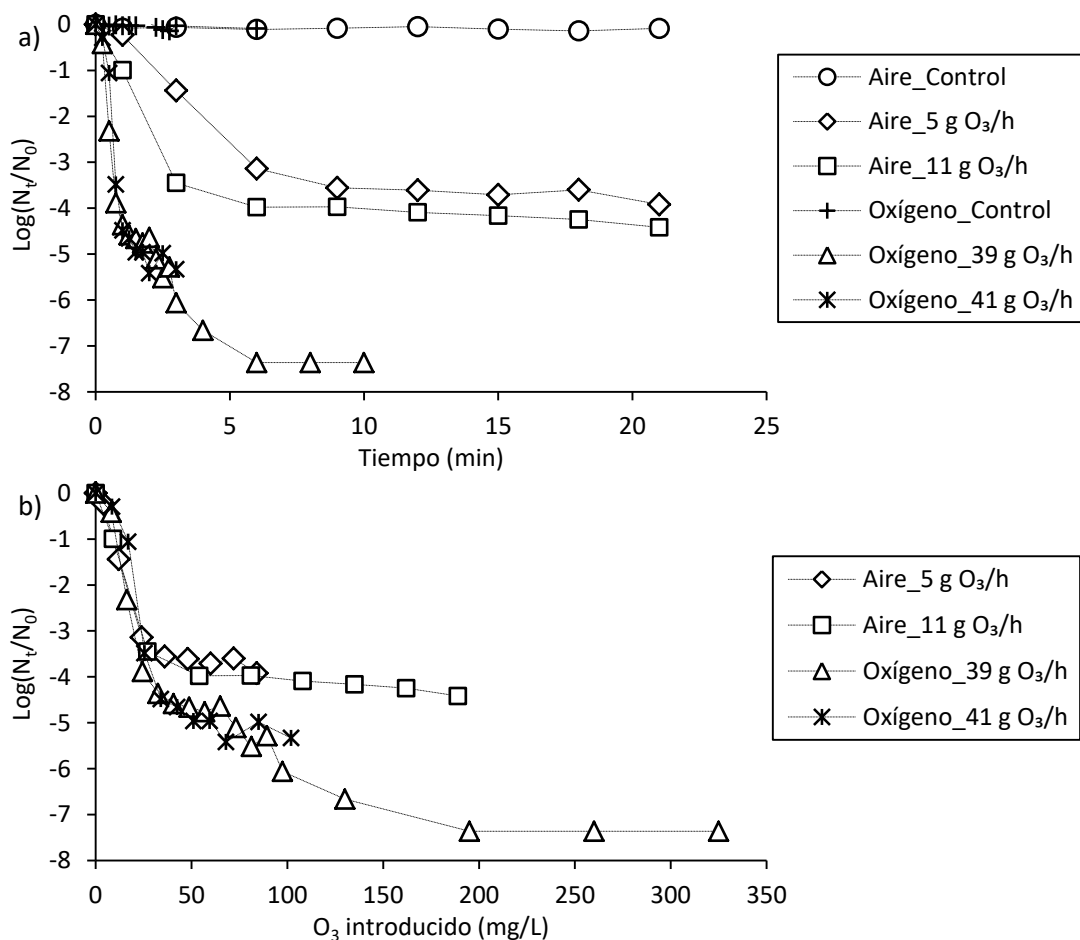


Figura 5.15. Inactivación de *Escherichia coli* en agua residual depurada sintética mediante ozonización a escala piloto en función de a) tiempo de tratamiento y b) ozono introducido.

En ausencia de ozono, la población de *E. coli* se mantuvo invariable durante los ensayos control, por lo que, la recirculación de la muestra a través de la cámara de mezcla y la presencia de aire u oxígeno no produjeron inactivación bacteriana.

En presencia de ozono, la inactivación de *E. coli* fue más rápida cuando se utilizó oxígeno, en lugar de aire, para alimentar el generador (Figura 5.15a). En función del tiempo, en todos los casos se observó un periodo inicial de inactivación lineal rápida. En los ensayos con aire, éste tuvo una duración aproximada de 6 y 3 minutos, alcanzando -3,1 log y -3,5 log, para los ensayos con aire_5 g O₃/h y aire_11 g O₃/h, respectivamente. En los dos ensayos con oxígeno el periodo de inactivación lineal rápida duró 1 minuto aproximadamente y eliminó -4,5 log de *E. coli*. A continuación se produjo una etapa de cola, para todas las condiciones de operación estudiadas, en la que la disminución de la población bacteriana fue más lenta. Finalmente, se lograron más de -4 unidades logarítmicas de inactivación tras 21 minutos de tratamiento con aire como alimentación del generador y la inactivación total (-7,4 log) tras 6 minutos de aplicación de ozono generado a partir de oxígeno (Valero et al., 2015a).

En términos de ozono introducido (Figura 5.15b), se observaron curvas de inactivación muy similares para los dos ensayos con aire y para los dos ensayos con oxígeno, pese a las diferentes condiciones de operación empleadas. Se puede apreciar la aparición de un pequeño hombro inicial cuando se utilizó oxígeno para alimentar el generador. Este retraso en la inactivación de *E. coli* se debió a que las alícuotas fueron tomadas tras tiempos de tratamiento muy cortos (<1min). Puesto que este valor es inferior al tiempo de retención hidráulico del reactor (2,4 min), la mezcla del agua y el ozono pudo no haber sido completa durante ese periodo inicial.

Sin tener en cuenta el pequeño hombro inicial, la desinfección en función del ozono introducido presentó una etapa inicial de inactivación rápida que fue similar en todos los casos hasta los 25 mg O₃/L y -3,5 unidades logarítmicas de eliminación. En los ensayos con oxígeno, esta fase inicial se prolongó hasta los 35 mg O₃/L y -4,5 log eliminados. A continuación tuvo lugar un fenómeno de cola, que fue más marcado en la ozonización con aire, ya que tras ~200 mg/L de ozono introducido se lograron sólo -4,4 logaritmos de inactivación, en comparación con los -7,4 log (inactivación total) alcanzados con oxígeno como alimentación. Este efecto de cola se observa a menudo en la ozonización y se atribuye a diversos factores como la presencia de subpoblaciones con mayor resistencia al ozono, a la agrupación de bacterias o a la presencia de materia coloidal (Hunt y Mariñas, 1997, Huber et al., 2005, Smeets et al., 2006, Lee et al., 2016).

Las diferencias encontradas en este estudio entre los valores de inactivación obtenidos mediante la aplicación de ozono generado con aire o con oxígeno pueden deberse a la diferencia de velocidad con la que el ozono se transfiere a la muestra. Según Hunt y Mariñas (1999), para un tiempo de contacto fijo, se producen más lisis y más daños en la membrana y en el ADN celular cuanto mayor es la dosis de ozono aplicada a la muestra. En este estudio, cuando el generador se suplió con oxígeno la producción de ozono fue mayor y, por tanto, las bacterias fueron expuestas más rápidamente a mayores cantidades de ozono. Este hecho pudo evitar que las bacterias tuvieran tiempo de poner en marcha sus mecanismos de reparación frente al estrés oxidativo, produciendo así una inactivación mayor que con el uso de aire para la generación de ozono. Además, es posible que en los generadores alimentados con aire se produzcan NO_x , junto con el O_3 (Kogelschatz et al., 1988), y que ambos compuestos reaccionen, disminuyendo así la disponibilidad de ozono para la desinfección bacteriana. En estudios previos realizados en la planta piloto de ozonización utilizada en este trabajo, se observó también que la eficacia en la degradación de ibuprofeno y ácido clofíbrico aumentó al alimentar el generador de ozono con oxígeno en vez de con aire (Quero-Pastor et al., 2014a).

Comparando los resultados obtenidos a escala piloto (Figura 5.15) con los obtenidos a escala de laboratorio en el agua residual depurada sintética (Figura 5.3), se observan algunas similitudes. Excepto por la longitud del hombro inicial, las curvas de inactivación en función del O_3 introducido para la ozonización a escala piloto con aire (Figura 5.15b) fueron muy similares a la curva de inactivación en función del O_3 introducido para la ozonización a escala de laboratorio (Figura 5.3b). Por otra parte, las curvas de inactivación en función del O_3 introducido para la ozonización a escala piloto con oxígeno (Figura 5.15b) fueron muy similares a la curva de inactivación en función del O_3 consumido para la ozonización a escala de laboratorio (Figura 5.3c). Por tanto, es probable que cuando el generador de la instalación a escala piloto se alimenta con oxígeno la muestra consume casi la totalidad del ozono, mientras que cuando la alimentación se basa en aire se generen compuestos que reaccionen con el ozono, reduciendo así su disponibilidad y la efectividad del tratamiento.

5.3.5. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* obtenidas mediante ozonización a escala piloto de agua residual depurada sintética se analizan mediante 4 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd.

Las Tablas 5.19-5.22 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos, mediante el coeficiente de correlación (r) y el error cuadrático medio (ECM).

Tabla 5.19. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación de *E. coli* en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.

Condiciones operación	k^* (min^{-1})	m	ECM	r
Aire 5 g O_3/h	1,09	0,45	0,48	0,90
Aire 11 g O_3/h	2,07	0,27	0,50	0,89
Oxígeno 39 g O_3/h	3,67	0,42	0,55	0,92
Oxígeno 41 g O_3/h	3,47	0,53	0,82	0,84

Tabla 5.20. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación de *E. coli* en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.

Condiciones operación	P	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	r
Aire 5 g O_3/h	0,99961798	1,20	0,04	0,13	0,99
Aire 11 g O_3/h	0,99983210	2,71	0,06	0,07	1,00
Oxígeno 39 g O_3/h	0,99982221	11,1	1,47	0,30	0,98
Oxígeno 41 g O_3/h	0,99997510	9,65	0,58	0,43	0,96

Tabla 5.21. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación de *E. coli* en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.

Condiciones operación	p	δ (min)	ECM	r
Aire 5 g O_3/h	0,45	0,83	0,48	0,90
Aire 11 g O_3/h	0,27	0,07	0,50	0,89
Oxígeno 39 g O_3/h	0,42	0,05	0,55	0,92
Oxígeno 41 g O_3/h	0,53	0,09	0,82	0,84

Tabla 5.22. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a la inactivación de *E. coli* en agua residual depurada sintética mediante ozonización escala piloto.

Condiciones operación	SI (min)	$k_{\text{máx}}$ (min^{-1})	ECM	r
Aire 5 g O_3/h	0,79	1,47	0,13	1,00
Aire 11 g O_3/h	0,24	2,96	0,17	0,99
Oxígeno 39 g O_3/h	0,17	5,82	1,12	0,82
Oxígeno 41 g O_3/h	0,37	18,66	0,30	0,99

La Figura 5.16 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala piloto cuando se utiliza aire para alimentar el generador de ozono. En el Anexo I se incluyen las gráficas con el error de cada modelo, mediante la representación de los valores estimados frente a los valores obtenidos experimentalmente (Figuras I.XV y I.XVI).

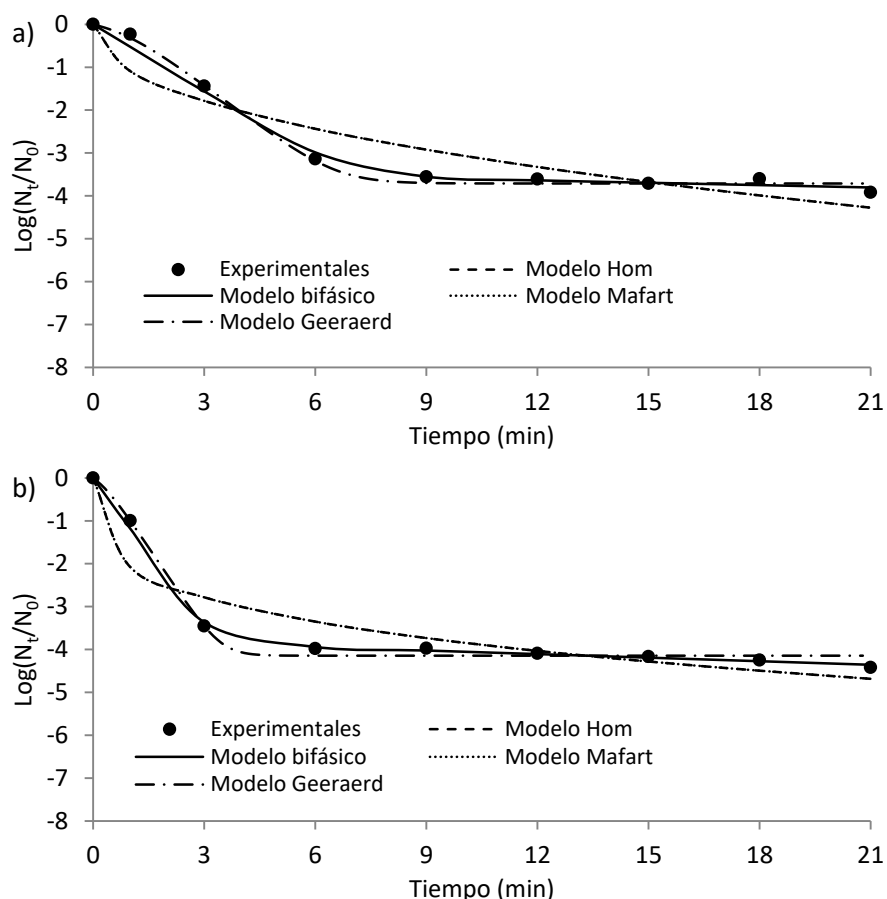


Figura 5.16. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *E. coli* obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización a escala piloto con aire: a) 5 g O₃/h y b) 11 g O₃/h

Los modelos cinéticos que mejor se ajustan a las curvas de inactivación obtenidas mediante ozonización a escala piloto con aire como alimentación del generador de ozono, son el modelo bifásico y el modelo de Geeraerd (Figura 5.16).

Según el modelo bifásico (Tabla 5.20) existen dos subpoblaciones de *E. coli*, una más sensible al ozono que presenta una constante de inactivación k_1 de 1,2 min⁻¹ y de 2,7 min⁻¹ para las producciones de 5 g O₃/h y de 11 g O₃/h, respectivamente, y otra subpoblación más resistente. En ambos casos, la subpoblación resistente aparece tras la eliminación de las ~3,4-3,8 primeras unidades logarítmicas de *E. coli* y su constante de inactivación, k_2 , es muy baja (0,04 y 0,06 min⁻¹), lo que supone un fenómeno de cola muy prolongado.

El modelo de Geeraerd (Tabla 5.22) permite describir además los hombros iniciales de las curvas, aunque en este caso son muy cortos, 0,8 min y 0,2 min para las producciones de 5 g O₃/h y de 11 g O₃/h, respectivamente. La constante de velocidad de inactivación $k_{máx}$, presenta valores de 1,5 min⁻¹ y 3,0 min⁻¹, por lo que es proporcional a la producción de ozono empleada.

La Figura 5.17 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* mediante ozonización a escala piloto cuando se utiliza oxígeno para alimentar el generador de ozono. En el Anexo I se incluyen las gráficas con el error de cada modelo (Figuras I.XVII y I.XVIII).

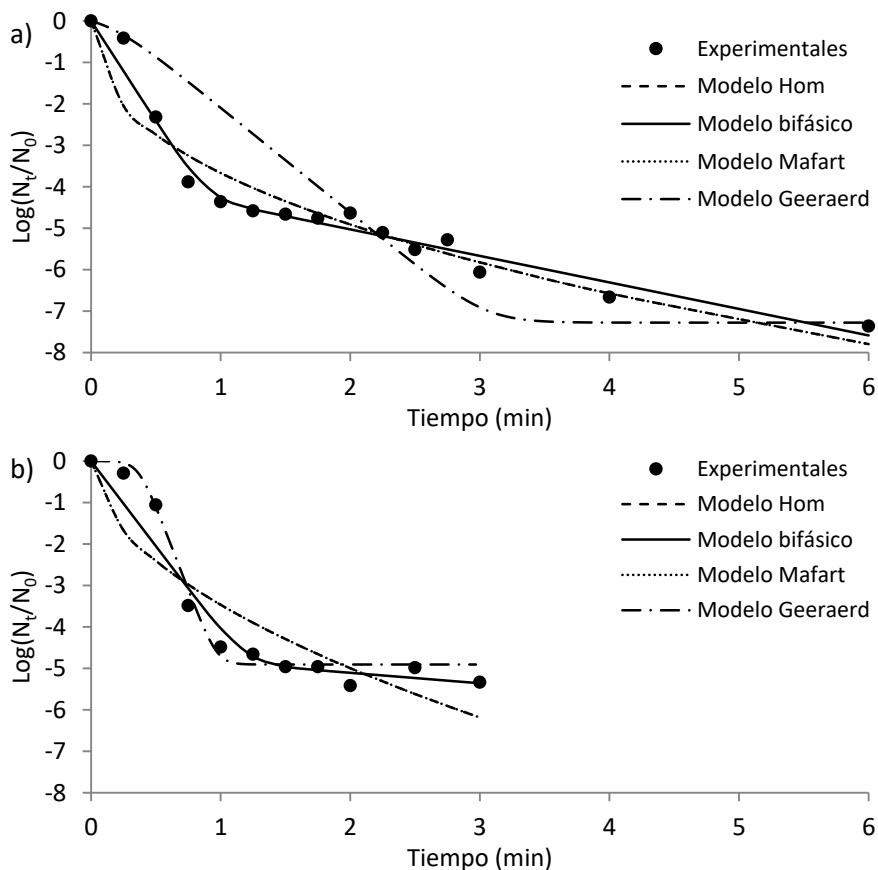


Figura 5.17. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *E. coli* obtenidas durante la aplicación del tratamiento de ozonización a escala piloto con oxígeno y a) 39 g O₃/h, b) oxígeno y 41 g O₃/h.

Las dos curvas de inactivación obtenidas mediante ozonización a escala piloto con oxígeno como alimentación del generador de ozono se describen adecuadamente mediante el modelo bifásico. Este modelo (Tabla 5.20) muestra constantes de velocidad de inactivación mucho más elevadas para la subpoblación sensible al tratamiento (11 min⁻¹ y 9,8 min⁻¹) que para la resistente (1,5 min⁻¹ y 0,6 min⁻¹).

El modelo de Geeraerd presenta un buen ajuste para la curva de inactivación observada para la producción de 41 g O₃/h (Figura 5.17b). Sin embargo, este modelo no se adecúa a la curva obtenida con la producción de 39 O₃/h (Figura 5.17a), puesto que asume que el fenómeno de cola está causado por una subpoblación resistente que se mantiene constante en el tiempo, lo que no se ajusta a los datos observados, en los que la población va inactivándose progresivamente.

5.3.6. Costes de operación

Para calcular los costes de operación de los tratamientos de ozonización a escala piloto se considera únicamente el coste del ozono generado, teniendo en cuenta el coste de la electricidad consumida (0,134087 €/kWh (Iberdrola, 2017)).

A escala piloto, el ozonizador funciona con una potencia de 220 W y diversos caudales de aire u oxígeno, dando lugar a distintas producciones de ozono (Tabla 5.18). Se calculan los costes de operación para los ensayos con aire_11 g O₃/h y oxígeno_39 g O₃/h, que son las condiciones que alcanzan mejores resultados para cada gas de alimentación. El volumen de muestra tratado en cada ensayo son 20 L. El coste de operación del tratamiento se estima para un volumen de muestra de 1 m³. La ecuación [5.24] muestra la expresión utilizada para el cálculo del coste del ozono generado en cada tratamiento:

$$\text{Coste O}_3 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \text{Tiempo (min)} \cdot \frac{220 \text{ W}}{20 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} \cdot \frac{0,134087 \text{ €}}{1000 \text{ Wh}} \quad [5.24]$$

Para calcular el coste de operación por cada unidad logarítmica inactivada se estima primero el tiempo de tratamiento necesario mediante el modelo cinético bifásico, que es el que mejor se ajusta en ambos casos.

La Figura 5.18 muestra los costes de operación calculados para alcanzar distintos niveles de inactivación de *E. coli* en ARDS mediante los tratamientos de ozonización a escala piloto bajo las distintas condiciones de operación.

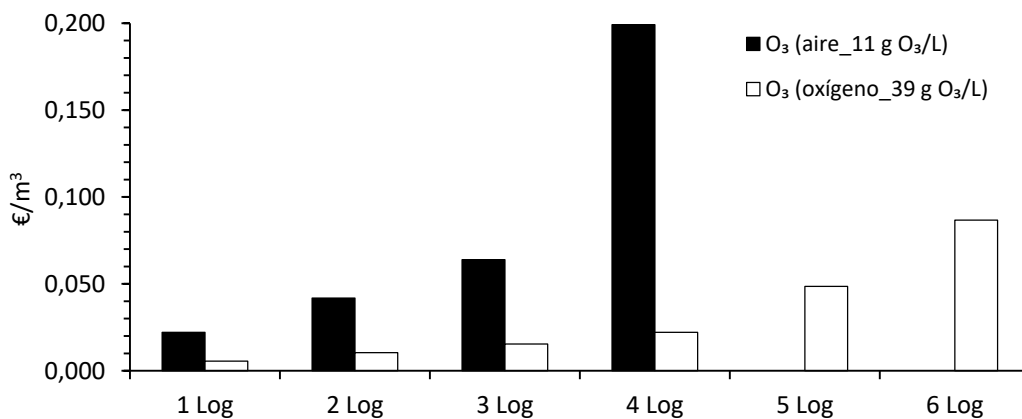


Figura 5.18. Costes de operación por unidad logarítmica inactivada de *E. coli* en ARDS mediante los tratamientos de ozonización a escala piloto.

La Tabla 5.23 recoge los tiempos de tratamiento estimados para alcanzar distintos niveles de inactivación bacteriana mediante ozonización a escala piloto.

Tabla 5.23. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos niveles de inactivación de *E. coli* en ARDS mediante ozonización a escala piloto.

Tratamiento	Tiempo (min)					
	-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
O ₃ (aire_11 g O ₃ /L)	0,9	1,7	2,6	8,1	44	80
O ₃ (oxígeno_39 g O ₃ /L)	0,2	0,4	0,6	0,9	2,0	3,5

En primer lugar, en la Figura 5.18 se observa que en algunos casos no aparece el coste de operación estimado. Esto se debe a que bajo esas condiciones de trabajo se produjeron fenómenos de cola, por lo que los tiempos de tratamiento serían muy prolongados (Tabla 5.23) y los costes de operación muy elevados ($> 1\text{€}/\text{m}^3$).

Cuando el generador de ozono se alimenta con oxígeno, el coste de operación es notablemente menor que cuando se alimenta con aire. Además, la alimentación con oxígeno permite producir flujos de ozono más elevados y reducir el tiempo de tratamiento, respecto a la alimentación con aire.

En comparación con los ensayos a escala de laboratorio, realizados sólo con oxígeno, (Figura 5.13), la ozonización a escala piloto (Figura 5.18) presenta un coste mayor cuando se utiliza aire y un coste menor cuando se emplea oxígeno, excepto cuando se requiere eliminar más de 5 unidades logarítmicas.

Por otra parte, la ozonización a escala piloto con oxígeno (Figura 5.18) tiene un coste de operación similar o mayor que la cloración (Tabla 4.6), según el grado de desinfección requerido. Bajo las condiciones de operación seleccionadas para los cálculos (39 g O₃/h en ozonización y 15 mg Cl₂/L), la ozonización a escala piloto produce una inactivación bacteriana más rápida que la cloración.

Finalmente, cabe mencionar que, aunque no están incluidos en los costes de operación, los gastos de inversión y de mantenimiento de los equipos empleados en ozonización tienen un coste muy elevado.

5.4. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante procesos de ozonización

A escala de laboratorio:

- La ozonización a escala de laboratorio presenta un poder de desinfección del agua residual depurada considerable, inactivando alrededor de 6 unidades logarítmicas en 15 minutos.
- Las curvas de inactivación obtenidas mediante procesos basados en ozono presentan, en general, forma sigmoidea. Por una parte, la presencia de materia orgánica y/o una mezcla inadecuada del ozono y la muestra retrasan la inactivación bacteriana, produciendo fenómenos de hombro. Por otra parte, la agrupación de bacterias y/o la existencia de subpoblaciones bacterianas más resistentes al ozono producen fenómenos de cola, haciendo necesario aplicar dosis de ozono elevadas, de más de 200 mg/L de O₃ introducido, para alcanzar la inactivación total. El modelo cinético de Geeraerd permite describir adecuadamente la forma sigmoidea mencionada.
- La combinación de ozono con dosis bajas de H₂O₂ (1,4 mg/L) muestra un poder desinfectante similar al de la ozonización (-6 log en 15 min). Si el ozono se combina con dosis más elevadas de H₂O₂ (20 mg/L), se reduce la eficacia de inactivación respecto a la ozonización (-3 log en 15 min), probablemente debido al efecto “scavenger” producido por el H₂O₂ en exceso, a la vez que aumenta el coste de operación. Por tanto, bajo las condiciones de estudio, la ozonización resulta un tratamiento más recomendable para la inactivación bacteriana de aguas residuales depuradas que el proceso peroxona, debido a la mayor sencillez que presenta el proceso solo con O₃.
- La bacteria *Enterococcus* sp. es más resistente al ataque del ozono que *E. coli*, requiriendo un consumo de ozono mayor para alcanzar el mismo nivel de desinfección.
- El pH, la conductividad y la turbidez permanecen prácticamente constantes durante los tratamientos de ozonización y peroxona de aguas de salida de depuradora.
- La ozonización, considerando únicamente el consumo eléctrico durante el tratamiento, presenta un coste de operación relativamente bajo, de entre 0,02 y 0,03 €/m³, según el nivel de inactivación deseado. Este coste de operación podría reducirse si se mejora el sistema de contacto entre el ozono y la muestra, ya que existen pérdidas de ozono considerables en el sistema, reflejadas en la diferencia entre el ozono introducido y el consumido.

A escala piloto:

- La ozonización a escala piloto presenta un poder de desinfección del agua residual depurada considerable, inactivando alrededor de 7 unidades logarítmicas en 6 minutos y con unas pérdidas mínimas de ozono no consumido.
- El uso de oxígeno como alimentación del generador proporciona flujos de ozono elevados capaces de lograr en pocos minutos la inactivación total de las bacterias presentes en agua residual depurada (-7 log en 6 min).
- Cuando el generador de ozono se alimenta con oxígeno se produce una desinfección más rápida y eficaz que cuando se alimenta con aire, tal y como sugieren los parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd.
- El uso de aire como alimentación del generador produce la formación de óxidos de nitrógeno que pueden reaccionar con el ozono y disminuir la eficacia del proceso, lográndose una inactivación de -5 log en 21 min y dando lugar a un fenómeno de cola que aumenta el consumo de ozono necesario y, por tanto, el coste de operación.
- La ozonización a escala piloto con oxígeno como alimentación del generador presenta un coste de operación relativamente bajo (0,01 - 0,09 €/m³), teniendo en cuenta únicamente el consumo eléctrico durante el tratamiento.

**Capítulo 6. Inactivación bacteriana
mediante fotocátalisis
con dióxido de titanio**

6.1. Antecedentes

6.1.1. Radiación UV

Se denomina radiación ultravioleta (UV) a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 100 nm y los 400 nm. Su nombre se debe a que su rango empieza en longitudes de onda menores que las del color violeta; sin embargo, esta luz es invisible para el ojo humano.

La radiación UV se divide en diversos subtipos según su longitud de onda (Figura 6.1): ultravioleta de vacío (VUV) (100 nm – 200 nm), ultravioleta C (UVC) (200 nm – 280 nm), ultravioleta B (UVB) (280 nm - 315 nm) y ultravioleta A (UVA) (315 nm - 400 nm) (USEPA, 1999). La energía de la radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda, por lo que la radiación más energética es la VUV y la de menor energía es la UVA.

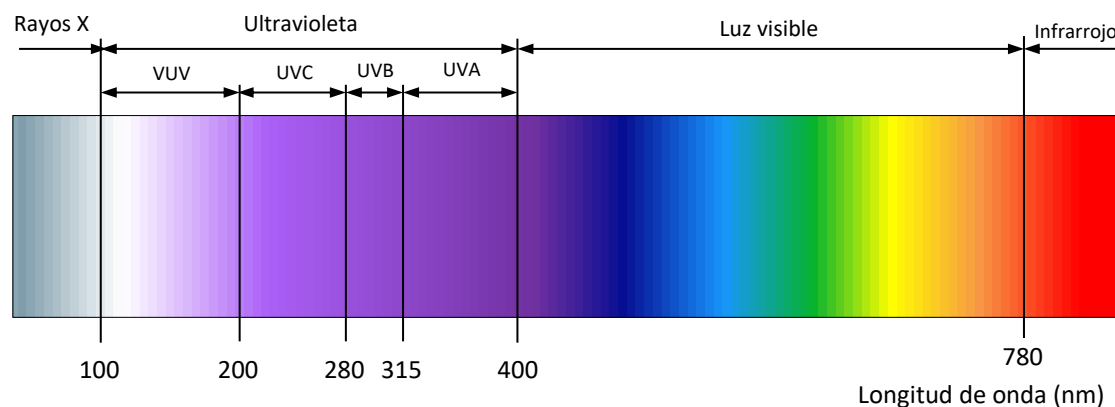
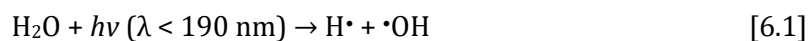


Figura 6.1. Espectro de radiación ultravioleta-visible

Algunos contaminantes son capaces de absorber determinadas longitudes de onda de radiación UV, pasando a un estado excitado a partir del cual tiene lugar su degradación. Además, el agua puede absorber la radiación UV por debajo de 190 nm, produciéndose así la fotólisis del agua y la formación de ROS, tal y como muestra la ecuación [6.1]:



En términos de acción germicida, el rango UV óptimo se encuentra entre 245 y 285 nm. Para llevar a cabo la desinfección mediante UV se utilizan distintos tipos de lámparas: lámparas de baja presión que emiten su máxima energía a 254 nm; lámparas de media presión que emiten en longitudes de onda desde 180 a 1370 nm; o lámparas que emiten a cualquier otra longitud de onda con gran intensidad, también llamadas de luz “pulsada”.

El grado de destrucción o inactivación del microorganismo a eliminar está directamente relacionado con la dosis de UV, calculada mediante la ecuación [6.2]:

$$D = I \cdot t \quad [6.2]$$

donde D es la dosis de UV ($W \cdot \text{min}/\text{m}^2$), I es la intensidad de la radiación (W/m^2) y t es el tiempo de exposición (min).

A diferencia de la mayoría de desinfectantes, la radiación UV no inactiva los microorganismos mediante interacción química. La inactivación se produce debido a la absorción de la luz por el microorganismo, que causa reacciones fotoquímicas que dañan irreparablemente los ácidos nucleicos y/o alteran los componentes esenciales para el desarrollo de las funciones vitales de la célula. La longitud de onda que produce mayores daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) es de aproximadamente 254 nm, que corresponde al rango UVC (Wolfe, 1990). Otras longitudes de onda, como 200 nm, también pueden ser absorbidas por el ADN; sin embargo, no existen aplicaciones prácticas para la inactivación de microorganismos mediante UV con longitudes de onda entre 190 y 210 nm (USEPA, 1999).

Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, contienen la información genética necesaria para la reproducción de la célula, por tanto, dañar estas sustancias puede esterilizar eficazmente el microorganismo. Normalmente, el daño se produce por dimerización de las moléculas de pirimidina, que son las bases del ADN y del ARN. Una vez que las moléculas de pirimidina se juntan, se produce la distorsión de la estructura helicoidal de los ácidos nucleicos, impidiendo su replicación o causando mutaciones en la célula (Snider et al., 1991).

Las lesiones en los ácidos nucleicos causadas por la radiación UV pueden revertirse mediante mecanismos de reparación celulares. En presencia de luz se puede producir foto-reactivación de la célula, gracias a la acción reparadora de la enzima fotoliasa. En la oscuridad tienen lugar otras vías de recuperación, como la reparación por escisión de bases, la reparación mediante polimerasas o el bypass de lesiones (Sinha y Hader, 2002).

Otro de los problemas asociados a la radiación UV es la presencia de puntos muertos en el reactor. Estos pueden deberse a una mala geometría del reactor o a la presencia de sustancias (partículas en suspensión o agregados de microorganismos) en el agua que absorben o dispersan la luz, impidiendo así la exposición de los patógenos a la radiación UV.

Para evitar estos inconvenientes, además de realizar un buen diseño del reactor, puede ser necesario aplicar un tratamiento previo de filtración (Brahmi et al., 2010). Si se desea aumentar la eficacia del tratamiento, la radiación UV puede combinarse con otros agentes germicidas, como el ozono y/o el peróxido de hidrógeno (USEPA, 1999).

La radiación UV no tiene poder residual, por lo que se suele utilizar conjuntamente con algún desinfectante químico secundario que proteja el sistema de distribución del agua frente a la proliferación de coliformes y la formación de biofilms.

Una de las ventajas de la radiación UV es que, al ser energía en forma de ondas electromagnéticas, su eficacia no está limitada por los parámetros químicos de calidad del agua. El pH, la temperatura, la alcalinidad y el carbono inorgánico total no afectan la eficacia del proceso; sin embargo, la dureza puede causar problemas de suciedad en las lámparas (AWWA y ASCE, 2012).

Puesto que no se introducen agentes químicos en el agua, ni se alteran las propiedades físico-químicas de ésta, la formación de THMs y otros subproductos de desinfección por la acción de la radiación UV es mínima.

La radiación UV es una de las técnicas más utilizadas para la desinfección de aguas depuradas y ha sustituido a la cloración en muchas instalaciones de tratamiento de aguas residuales (Metcalf & Eddy, 2002).

Durante los últimos años se ha estudiado la inactivación mediante UV de diversos microorganismos como bacterias (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella*...), microalgas (*Chlorella*, *Microcystis*, *Oocystis*, *Scenedesmus*...) o virus (virus de la hepatitis E, norovirus) (Barrado-Moreno et al., Moreno-Andrés et al., Barrett et al., 2016, Guerrero-Latorre et al., 2016, Bilotta et al., 2017). Además, la radiación UV es muy eficaz contra los protozoos patógenos *Cryptosporidium* y *Giardia* (Hijnen et al., 2006).

6.1.2. Radiación solar

La radiación solar que llega a la superficie terrestre comprende un rango que va desde el infrarrojo hasta el ultravioleta del espectro electromagnético. Dentro de este intervalo, la luz ultravioleta, que supone tan solo un 7% de la radiación, presenta las mejores propiedades de desinfección. La irradiación solar que incide en un día despejado de verano sobre el ecuador es de unos 1120 W/m². Esto supone una energía óptica de 1'12 kJ/m² disponibles cada segundo para inactivar cualquier microbio patógeno presente en el agua expuesta a la radiación solar. Este valor se reduce conforme la latitud aumenta alejándose del ecuador.

La desinfección del agua mediante luz solar, conocida como SODIS (del inglés, Solar Disinfection), consiste en colocar el agua en un recipiente de plástico o vidrio y exponerlo al sol durante varias horas. El tiempo de exposición puede variar entre 6 y 48 horas, dependiendo de diversos factores como la intensidad de la luz solar, la sensibilidad del patógeno a eliminar o la turbidez del agua. La Figura 6.2 presenta una descripción gráfica del tratamiento SODIS. Debido a su sencillez y a su bajo coste, esta técnica se utiliza en la actualidad en más de 50 países en vías de desarrollo (McGuigan et al., 2012).

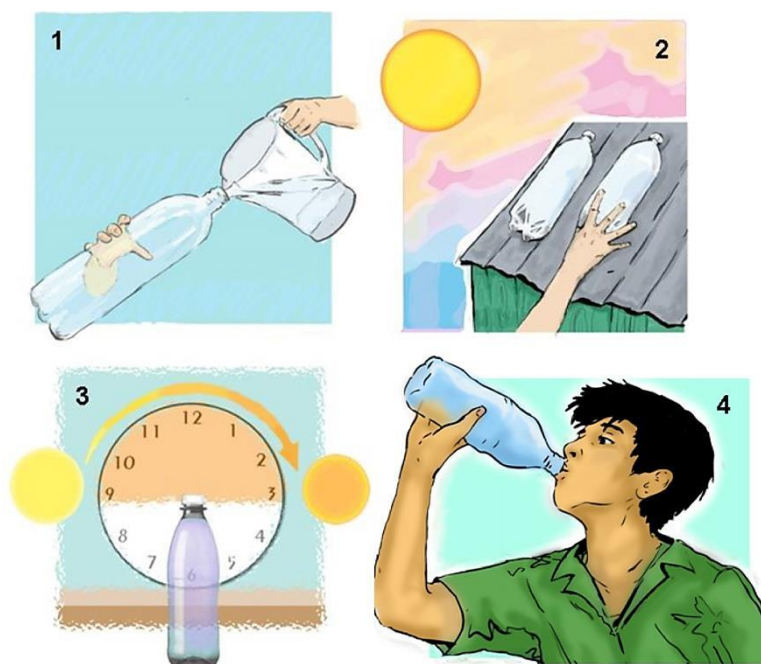


Figura 6.2. Descripción gráfica del tratamiento SODIS (McGuigan et al., 2012).

El poder germicida de la radiación solar se basa en el efecto combinado del calentamiento térmico, inducido por la radiación infrarroja, y los procesos fotoquímicos causados por la radiación UV (McGuigan et al., 1998).

De la radiación UV emitida por el sol, tan solo una pequeña parte alcanza la superficie terrestre. La capa de ozono retiene prácticamente la totalidad de los rayos UVC y gran parte de los UVB, por lo que la radiación UV de origen solar que llega a la tierra se compone principalmente de radiación UVA y un pequeño porcentaje de UVB. Ambos componentes, UVA y UVB, contribuyen a la desinfección mediante diversos mecanismos.

La radiación UVB puede ser absorbida por componentes del ADN y ARN celular, causando importantes lesiones en las bases de pirimidina y purina (Clingen et al., 1995, Yoon et al., 2000), lo que conlleva mutaciones de la célula o incluso su muerte (Sinha y Hader, 2002). La radiación UVA puede causar también daños directos en el material genético celular, pero en menor medida que la luz UVB (Giannakis et al., 2016a, 2016b). De hecho, las

lesiones celulares causadas por la luz UVA se atribuyen predominantemente al ataque por ROS. Estas especies reactivas del oxígeno se forman mediante reacciones de foto-oxidación que tienen lugar cuando sustancias fotosensibles endógenas absorben los fotones de radiación UVA (Ravanat et al., 2001, Pfeifer et al., 2005).

Además, durante la exposición a luz UVA puede producirse un proceso (foto-)Fenton intracelular. Por una parte, las células producen H_2O_2 durante su respiración o debido a la activación de flavoenzimas por la radiación UVA (Hockberger et al., 1999, Imlay, 2003). Por otra parte, la luz UVA puede dar lugar a la liberación de hierro de las ferritinas o mediante oxidación de los clusters de sulfuro de hierro o las proteínas enterobactinas (Hoerter et al., 1996, Pourzand et al., 1999). La interacción entre el H_2O_2 generado y el hierro liberado produce ROS en el interior de la célula mediante reacciones Fenton.

Las ROS generadas pueden atacar diversos componentes de la célula, como ADN, ARN, lípidos y proteínas, iniciando complejas cadenas de reacciones que producen la pérdida de funciones celulares, mutaciones y bloqueo de la replicación del ADN (Cabiscol et al., 2000).

Para contrarrestar los efectos causados por las lesiones inducidas por la radiación solar, los microorganismos cuentan con diversos mecanismos de reparación, que se llevan a cabo tanto en ausencia como en presencia de luz. Dichos mecanismos se describen en el apartado 6.1.1 de la presente memoria. Además, las células pueden evitar el estrés oxidativo causado por las ROS mediante enzimas atrapadoras de radicales, como la superóxido dismutasa, la peroxidasa o la catalasa (Hoerter et al., 2005).

Existen multitud de estudios encaminados a investigar la eficacia de la radiación solar en la inactivación de diferentes microorganismos como bacterias (Boyle et al., 2008, Keogh et al., 2015, Lawrie et al., 2015, Castro-Alfárez et al., 2017), virus (Davies-Colley et al., 2005, Heaselgrave et al., 2006, Fisher et al., 2012), protozoos (McGuigan et al., 2006, Méndez-Hermida et al., 2007, McGuigan et al., 2012), hongos y levaduras (Lonnen et al., 2005, Sichel et al., 2007, Giannakis et al., 2016c) o helmintos (Heaselgrave y Kilvington, 2011).

Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es que depende de las condiciones climáticas. Su eficacia se reduce en presencia de nubosidad y presenta variaciones estacionales y diarias. Una turbidez del agua elevada también reduce la efectividad del proceso. Además, el sistema SODIS sólo sirve para tratar volúmenes pequeños de agua.

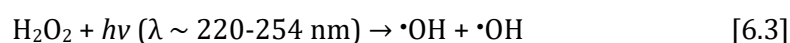
Para aprovechar la radiación solar y mejorar su eficacia en la desinfección, se han desarrollado diferentes tratamientos de oxidación avanzada que combinan la luz solar con

agentes químicos (ej. H₂O₂) y/o fotocatalizadores (ej. TiO₂ y sales de hierro). Algunos de estos tratamientos se desarrollan en apartados posteriores.

6.1.3. Radiación solar combinada con H₂O₂

La combinación de la radiación solar con ciertas sustancias, como el H₂O₂, puede incrementar la formación de ROS. En general, la adición de H₂O₂ en presencia de radiación solar acelera la descomposición de la materia orgánica y aumenta la velocidad de inactivación de los microorganismos.

De la radiación solar que llega a la tierra, que comprende un rango que va desde el ultravioleta al infrarrojo, tan sólo un 7% se encuentra en el rango UV (100 - 400 nm), y de ese porcentaje, una pequeña parte corresponde al rango UVC (100 - 280 nm), ya que la mayoría de esta radiación queda retenida por la capa de ozono. La luz UVC puede producir la fotólisis del H₂O₂, dando lugar a la generación de ROS (ecuación [6.3]).



Normalmente para generar una cantidad de ROS suficiente para desinfectar el agua se necesitan concentraciones de H₂O₂ relativamente elevadas. Sin embargo, el H₂O₂ en exceso actúa como atrapador de radicales (ecuaciones [5.15] y [5.16]), haciendo el proceso menos efectivo, por lo que es necesario alcanzar un compromiso (Parsons, 2004).

Además de los mecanismos descritos anteriormente para la radiación solar (apartado 6.1.2), la inactivación bacteriana en presencia de luz solar y H₂O₂ se puede producir por diversas causas (Spuhler et al., 2010, Giannakis et al., 2016a, 2016b): i) el ataque directo de la membrana por el H₂O₂ y sus especies del oxígeno derivadas, ii) la difusión del H₂O₂ externo al interior de la célula, iii) el aumento de la liberación de hierro mediante reacciones de oxidación de los clusters de sulfuro asistidas por el H₂O₂ y iv) la inactivación de las enzimas reguladoras de ROS (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa) por la radiación UVA. La combinación de todos estos mecanismos favorece las reacciones Fenton intracelulares, que causan la acumulación de ROS y el consiguiente estrés oxidativo en la célula. En el apartado 7.1.1 se desarrollan los fundamentos de los procesos Fenton y foto-Fenton.

Además, el H₂O₂ tiene cierto poder residual, ya que su presencia dificulta la reparación celular, inhibiendo así el recrecimiento microbiológico tras la exposición a la luz solar (Spuhler et al., 2010).

La sinergia entre el H_2O_2 y la radiación solar en la inactivación de microorganismos se conoce desde hace décadas (Hartman y Eisenstark, 1978) y su eficacia ha sido probada sobre virus, bacterias y hongos (Hartman et al., 1979, Rincón y Pulgarin, 2006, Varghese et al., 2007, Sichel et al., 2009, Ortega-Gómez et al., 2014, Polo-López et al., 2017, Valero et al., 2017). Sin embargo, existe poca información disponible sobre los subproductos generados durante el tratamiento y su toxicidad asociada (Malato et al., 2009). Puesto que no se conocen los efectos del H_2O_2 sobre el cuerpo humano a largo plazo, se desaconseja su utilización para la producción de agua potable.

6.1.4. Fotocátalisis con TiO_2

La fotocátalisis consiste en utilizar un catalizador semiconductor que, al irradiarse a determinada longitud de onda y en presencia de oxígeno, pasa a un estado excitado que da lugar a la formación de ROS.

El dióxido de titanio (TiO_2) es uno de los fotocatalizadores heterogéneos más utilizados en el tratamiento de agua, debido a su elevada actividad fotocatalítica, a su gran estabilidad, a su bajo impacto ambiental y a su bajo precio (Malato et al., 2009).

La Figura 6.3 muestra el mecanismo de formación de ROS en una partícula semiconductor de TiO_2 en presencia de un contaminante del agua (P).

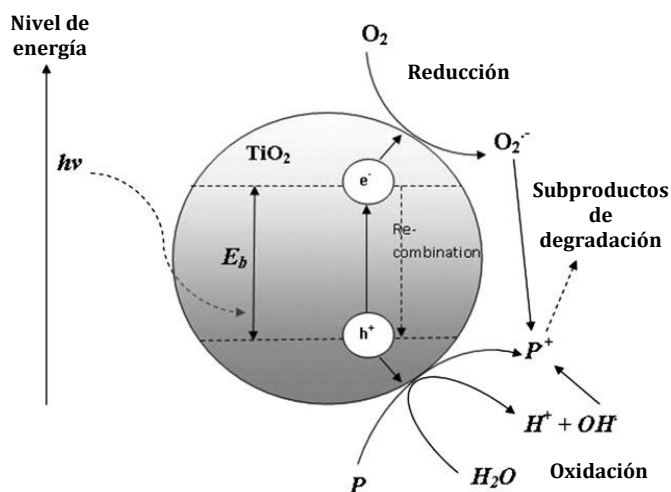


Figura 6.3. Formación del par hueco-electrón en una partícula de TiO_2 (Chong et al., 2010).

El TiO_2 es un semiconductor que presenta una energía del salto de banda de 3.0 eV, por lo que su exposición a longitudes de onda entre 300 y 390 nm induce la foto-excitación de los electrones desde la banda de valencia hasta la banda de conducción. Esto da lugar a la creación de pares hueco (h^+) – electrón (e^-) (ecuación [6.4]). Los electrones generados pueden reaccionar con el oxígeno molecular presente en el agua, produciendo así aniones radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y su base conjugada, el radical hidropéroxido (HO_2^{\bullet}), según las

ecuaciones [6.5] y [6.6]. Por otra parte, el agua puede reaccionar en los huecos del catalizador formando radicales hidroxilo, tal y como muestra la ecuación [6.7] (Fujishima et al., 2000, Augugliaro et al., 2006).



Si hay compuestos orgánicos presentes en el agua, estos pueden degradarse en los huecos formados en la superficie del TiO_2 y/o mediante los radicales generados (Matilainen y Sillanpää, 2010), dando lugar a la aparición de compuestos intermedios, que pueden continuar degradándose hasta su mineralización en CO_2 y agua.

La inactivación bacteriana durante la fotocatalisis con TiO_2 tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se produce la adsorción de las bacterias en la superficie del TiO_2 . La composición de la matriz acuosa tiene una gran influencia en esta primera etapa (Gogniat et al., 2006). De esta manera, las ROS generadas por el TiO_2 atacan la membrana celular, oxidando lípidos y proteínas y causando daños en la capas de peptidoglicano y de lipopolisacáridos. A continuación, se produce la pérdida de funciones esenciales de la célula, como la actividad respiratoria, teniendo lugar finalmente la muerte bacteriana (Maness et al., 1999).

La eficacia de la fotocatalisis en la inactivación microbiana se ve afectada por multitud de variables, como la intensidad y el rango de la radiación, el tipo de microorganismo, la concentración microbiana inicial (Rizzo, 2009), la temperatura, el pH (Rincón y Pulgarin, 2004a), la presencia y el tipo de materia orgánica e inorgánica (Ireland et al., 1993, Rincón et al., 2001), la concentración y el tipo de catalizador, la estructura y el tamaño de las partículas del catalizador y el diseño del reactor fotocatalítico (Rincón y Pulgarin, 2004b, Cushnie et al., 2009).

Durante los últimos años, gran parte de la investigación en fotocatalisis se está centrando en el diseño de plantas piloto y en el desarrollo de catalizadores más eficaces, a menudo modificados o dopados con sustancias que aumentan su poder bactericida (Andronic et al., 2016, Yu et al., 2016, Mangayayam et al., 2017). Sin embargo, pese a la multitud de fuentes de dióxido de titanio disponibles, el TiO_2 Degussa P25 sigue siendo un estándar internacional debido a sus características bien definidas y a su buena fotoactividad.

Además, puesto que el TiO_2 se activa en presencia del rango UV del espectro solar, la fotocátalisis con radiación solar está siendo objeto de múltiples estudios para la inactivación de microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Cryptosporidium parvum*, *Enterococcus* sp., *Clostridium perfringens*, etc. (Lanao et al., 2010, Lanao et al., 2012, Fagan et al., 2016, Abeledo-Lameiro et al., 2017).

El TiO_2 se puede aplicar en suspensión o inmovilizado sobre una superficie que actúe como soporte. Cuando el TiO_2 está en suspensión, hay mayor superficie disponible para la interacción contaminante-catalizador, por lo que aumenta la eficacia del proceso (Gumy et al., 2006, Van Grieken et al., 2010). No obstante, la principal desventaja de este proceso es la necesidad de recuperar el TiO_2 en suspensión tras el tratamiento para facilitar su reutilización posterior y obtener un efluente libre de partículas de catalizador. Durante los últimos años, la emisión de nanopartículas se está convirtiendo en un problema de creciente preocupación debido a su posible toxicidad (INSHT, 2008). Para separar el TiO_2 de la matriz acuosa pueden emplearse diversas tecnologías, como la sedimentación o la filtración con membranas. Sin embargo, estas técnicas suelen presentar problemas, como velocidad de sedimentación insuficiente o ensuciamiento de las membranas (Augugliaro et al., 2006, Keller et al., 2010, Hsiung et al., 2016).

Independientemente del modo de aplicación, en suspensión o fijo, el TiO_2 puede reutilizarse, lo que se traduce en la reducción de costes asociados. La reutilización de TiO_2 se ha implementado con éxito durante varios ciclos en la degradación de múltiples contaminantes (azul de metileno, fenol, fármacos, etc.), mostrando poca o nula desactivación (Suryaman et al., 2009, Dou et al., 2012, Miranda-García et al., 2014, Salaeh et al., 2017). Sin embargo, existe poca bibliografía disponible sobre reutilización de TiO_2 en ensayos de desinfección (Van Grieken et al., 2009, Pablos et al., 2012).

6.1.5. Fotocátalisis con TiO_2 y H_2O_2

Uno de los problemas que plantea el uso de TiO_2 es la recombinación del par hueco-electrón, que, en ausencia de un aceptor de electrones adecuado, limita la efectividad del proceso. Una estrategia para inhibir este efecto de recombinación es añadir otros aceptores de electrones a la reacción que, además, contribuyan a aumentar la producción de ROS (Malato et al., 2009). El peróxido de hidrógeno es un oxidante utilizado con este fin (ecuación [6.8]).



En general, la adición de H_2O_2 es beneficiosa y aumenta la efectividad del proceso. Sin embargo, el efecto depende de la dosis de H_2O_2 , existiendo un rango óptimo de concentración. Si se sobrepasa cierta concentración, el H_2O_2 puede adsorberse sobre la superficie del TiO_2 , ocupando los huecos formados y reaccionando con los radicales hidroxilo producidos (Chong et al., 2010). La adición de H_2O_2 en dosis adecuadas consigue aumentar la velocidad de reacción, lo que se traduce en la disminución de las dimensiones de los fotoreactores, que son el componente más caro y una barrera para su comercialización, reduciendo así el coste del proceso.

Algunos estudios muestran el efecto sinérgico de la fotocatalisis con TiO_2 combinada con H_2O_2 sobre la inactivación de microorganismos como *E. coli*, *Enterococcus* sp. o *Legionella jordanis* (Pablos et al., 2013, Fiorentino et al., 2015, Valero et al., 2015b, Polo-López et al., 2017), mientras que en otras investigaciones se ha observado que la eficacia del tratamiento UV-vis/ TiO_2 no mejora sustancialmente en presencia de H_2O_2 (Lanao et al., 2010, Lanao et al., 2012, Abeledo-Lameiro et al., 2017).

Los mecanismos de desinfección en la fotocatalisis combinada con peróxido de hidrógeno incluyen los descritos para la radiación solar, la radiación solar con H_2O_2 y la fotocatalisis.

6.2. Estudio del poder bactericida de agentes físicos y químicos en el proceso objeto de estudio: ensayos previos

6.2.1. Muestras

Se utilizan dos tipos de muestra: agua residual sintética tratada en una planta de fangos activos a escala de laboratorio (ARPF, apartado 4.2.1) y solución salina (NaCl) cuya composición se describe a continuación.

Solución salina (NaCl)

La muestra de solución salina consiste en agua destilada con NaCl (Panreac) al 0,9% (p/v) esterilizada en autoclave a 121°C y 1 atm durante 15 minutos. Las características físico-químicas de dicha muestra se recogen en la Tabla 6.1 .

Tabla 6.1. Caracterización físico-química de la muestra de solución salina

Parámetro	Valor promedio
pH	6,2
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	13200
Turbidez (NTU)	<1
DQO ($\text{mg O}_2/\text{L}$)	<1
COD ($\text{mg C}/\text{L}$)	<1
SST (mg/L)	<1
Alcalinidad ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	<5
Dureza ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	<5

Para la realización de los experimentos, la muestra de solución salina estéril se fortifica con la bacteria de estudio, *Escherichia coli* o *Enterococcus* sp., de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1, obteniendo una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/100 mL

6.2.2. Agentes desinfectantes

6.2.2.1. Irradiación UVA-vis

Para la realización de los experimentos con luz UVA-visible se emplea una cámara de simulación solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ como fuente de irradiación (Figura 6.4).

Esta cámara solar está equipada con una lámpara de xenón que emite luz a una longitud de onda entre 290 y 800 nm, simulando la luz solar natural. Mediante dos filtros que

cubren la lámpara de xenón, un filtro de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320), se consigue la emisión del rango de radiación utilizado en los tratamientos de desinfección. Este rango se sitúa entre 320 y 800 nm, y comprende las radiaciones UVA y visible, ya que el filtro de ventana intercepta las longitudes de onda por debajo de los 320 nm, eliminando el rango UVB, tal y como se muestra en la Figura 6.5.



Figura 6.4. Cámara de simulación solar

La presencia del filtro de ventana evita que las radiaciones UVB y UVC causen la inactivación directa de las bacterias mediante lesiones en el ADN celular que impidan su replicación. De esta forma, se permite el estudio de la influencia de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) sobre la inactivación de las bacterias, mecanismo de destrucción bacteriana que tiene lugar en el rango de la radiación UVA (315-400 nm) (Robertson et al., 2005, Lanao, 2012).

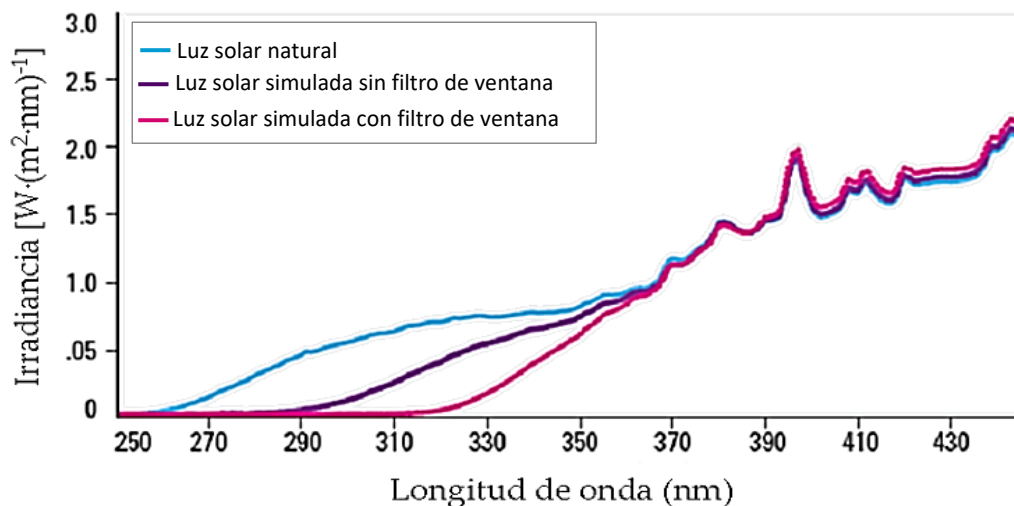


Figura 6.5. Espectro solar natural (línea azul) y simulado: sin filtro de ventana (línea morada) y con filtro de "vidrio de ventana" (línea rosa) (Miguel, 2010).

La cámara solar está equipada con un regulador de intensidad y de tiempo de exposición. La intensidad de la irradiación seleccionada para todos los experimentos es de 500 W/m²,

valor que corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural ecuatorial al medio día y se utiliza por diversos autores en sus estudios (Yuranova et al., 2004, Miguel, 2010, Lanao et al., 2012). La temperatura máxima que se puede alcanzar en la cámara solar es de 35°C, establecida mediante un controlador de temperatura.

6.2.2.2. Dióxido de titanio Degussa P25

El TiO₂ Degussa P25 se comercializa en forma de polvo. Según los análisis realizados de XRD y XRF (descritos en el apartado 2.3), está compuesto por dos fases cristalinas de dióxido de titanio, anatasa (87%) y rutilo (13%) (Figura 6.6a). Las partículas de este catalizador son redondeadas y de aspecto homogéneo (Figura 6.6b), con un tamaño medio de partícula de 25 nm, calculado a partir de los datos de XRD.

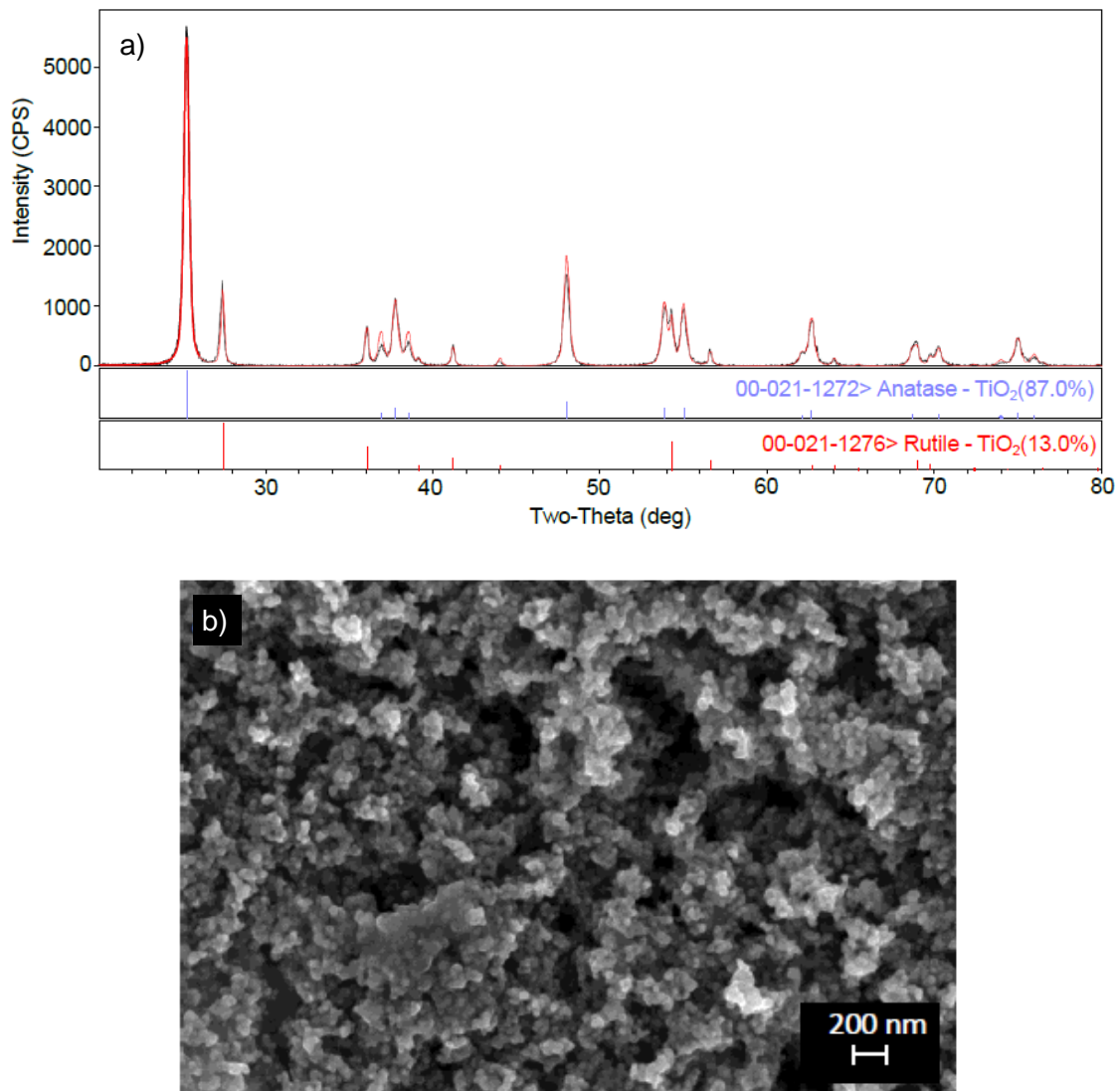


Figura 6.6. Caracterización del TiO₂ Degussa P25: a) difractograma XRD y b) imagen FESEM.

6.2.2.3. Dióxido de titanio Levenger

El TiO_2 Levenger se comercializa en forma de suspensión acuosa. Según los análisis realizados de XRD y XRF (descritos en el apartado 2.3), está compuesto por dos fases cristalinas de dióxido de titanio, anatasa (79%) y rutilo (9%), y contiene también $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8%) y ZnCO_3 (4%) (Figura 6.7a). La concentración de SST (apartado 2.1.2) en la suspensión es de 106 g/L, por lo que el contenido de TiO_2 es de aproximadamente 93 g/L. Este catalizador presenta partículas redondeadas y otras de mayor tamaño (>300 nm) con bordes lisos (Figura 6.7b), siendo el tamaño medio de partícula de 23 nm, calculado a partir de los datos de XRD.

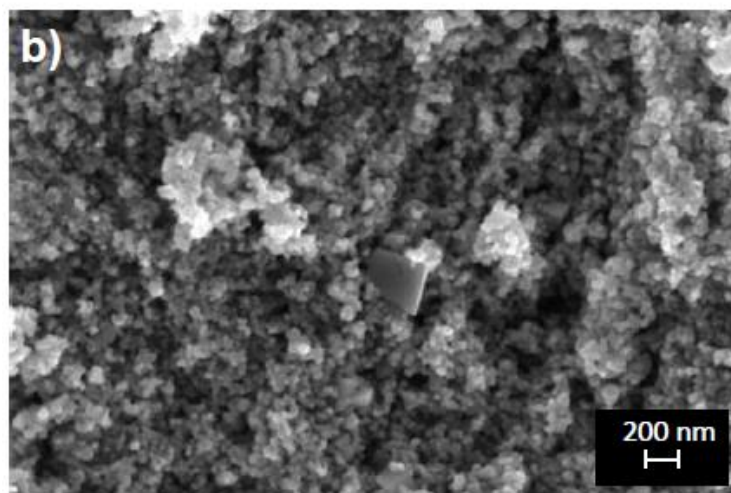
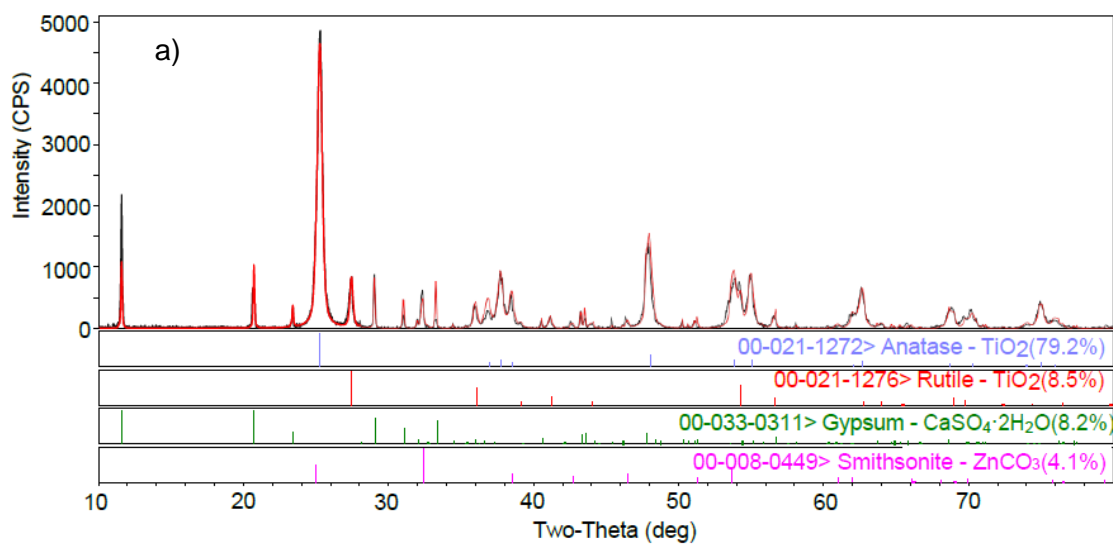


Figura 6.7. Caracterización del TiO_2 Levenger: a) difractograma XRD y b) imagen FESEM

6.2.2.4. Peróxido de hidrógeno

Se utiliza peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Panreac) con una concentración del 30% (p/v).

6.2.3. Efecto de la irradiación UVA-vis

6.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utilizan dos tipos de muestra: solución salina (NaCl, apartado 6.2.1) fortificada con las bacterias de estudio (10^6 - 10^7 UFC/100 mL) y ARPF, que contiene de forma natural las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. (10^5 - 10^6 UFC/100 mL).

Para los ensayos de inactivación bacteriana con irradiación UVA-vis o ensayos de fotólisis se colocan 100 mL de muestra en reactores de cuarzo de 250 mL y se introducen en la cámara solar (apartado 6.2.2.1). Las muestras se mantienen con agitación constante para proporcionar un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. Se realizan ensayos a distintos tiempos de exposición a la irradiación UVA-vis, hasta un máximo de 180 minutos. Los análisis microbiológicos se llevan a cabo de inmediato. En ensayos adicionales se determinan el pH y la alcalinidad (apartado 2.1.2) al inicio y tras 60 minutos de tratamiento. Los ensayos de inactivación mediante irradiación UVA-vis se llevan a cabo al menos por duplicado.

Se realizan también ensayos de recrecimiento o supervivencia bacteriana. Para ello, las muestras (solución salina o ARPF) se exponen a UVA-vis durante diferentes tiempos de tratamiento y posteriormente se almacenan en oscuridad a temperatura ambiente. La concentración bacteriana se analiza a las 4 h, 24 h y 48 h tras la finalización de la exposición a la luz UVA-vis.

6.2.3.2. Resultados y discusión

Evolución de pH y alcalinidad

La Tabla 6.2 muestra el pH y la alcalinidad de las muestras de solución salina (NaCl) y ARPF al inicio y tras 60 minutos de exposición a irradiación UVA-vis.

Tabla 6.2. Efecto de la irradiación UVA-vis sobre los parámetros físico-químicos: a) pH y b) alcalinidad.

Muestra	pH		Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	
	0 min	60 min	0 min	60 min
NaCl	6,2	6,2	0	0
ARPF	7,6	8,2	155	148

En la solución salina el pH permaneció constante tras 60 min de tratamiento. Además, la muestra NaCl no presentó alcalinidad inicial, ni tampoco tras la exposición a UVA-vis.

En cambio, tras 60 min de tratamiento, en la matriz ARPF se produjo un ligero aumento del pH y un ligero descenso de la alcalinidad, parámetro que presentó un valor inicial relativamente elevado.

Inactivación bacteriana

La Figura 6.8 representa las curvas de inactivación de *Escherichia coli* y de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento de fotólisis (UVA-vis) en NaCl y en ARPF.

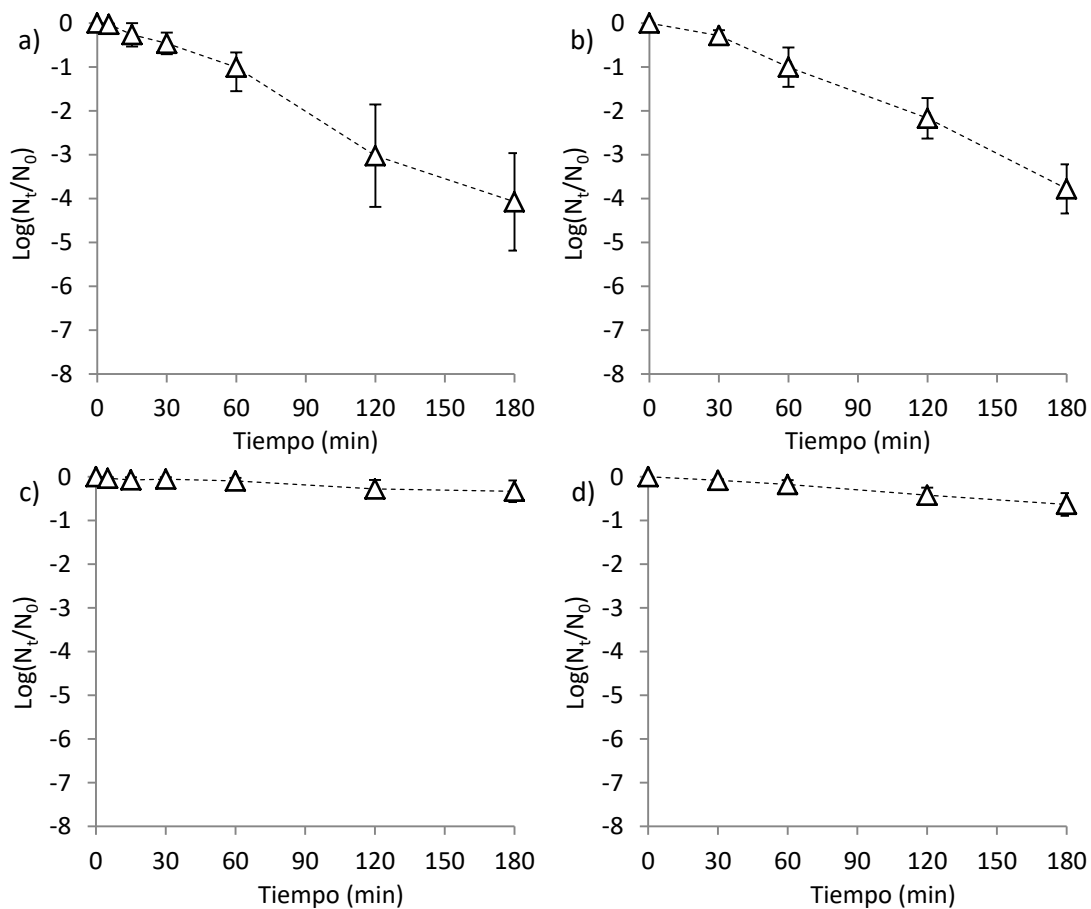


Figura 6.8. Inactivación bacteriana mediante irradiación UVA-vis: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en NaCl, d) *Enterococcus* sp. en ARPF.

La Figura 6.8 muestra que la inactivación de cada bacteria (*E. coli* o *Enterococcus* sp.) mediante fotólisis siguió una tendencia similar tanto en NaCl como en ARPF. La inactivación de *E. coli* fue casi lineal, llegando a alcanzar -4,1 log y -3,8 log de reducción en NaCl y en ARPF, respectivamente, tras 180 minutos. En el caso de *Enterococcus* sp. la reducción de la población no superó los -0,3 log en NaCl y los -0,6 log en ARPF.

Puesto que no se observa una influencia clara de la matriz, estos resultados sugieren que durante la irradiación con UVA-vis, el mecanismo de inactivación está controlado principalmente por mecanismos internos de la célula, como procesos Fenton y/o foto-Fenton intracelulares (Giannakis et al., 2016a, b). Además, en ningún caso la temperatura de las muestras superó los 30°C tras el tratamiento UVA-vis, por lo que se descarta la inactivación térmica.

Respecto al tipo de bacteria, otros estudios muestran también la mayor sensibilidad de *E. coli* a la irradiación UVA, tanto en agua desionizada como en agua residual depurada (Van Grieken et al., 2010, Rodríguez-Chueca, 2013). Esta diferencia en la respuesta de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. hacia la irradiación UVA se atribuye a diferencias en la estructura celular y/o a mecanismos de reparación celular diferentes en cada bacteria (Robertson et al., 2005, Chung et al., 2009).

Reactivación bacteriana

Uno de los principales problemas asociados a la inactivación mediante UVA-vis es que no tiene poder residual. Para evaluar la durabilidad de la desinfección alcanzada tras la exposición a irradiación UVA-vis se realizaron ensayos de recrecimiento bacteriano en oscuridad.

La Figura 6.9 ilustra el recrecimiento o supervivencia de las bacterias en la oscuridad tras haber sido expuestas a irradiación UVA-vis durante diferentes periodos de tiempo.

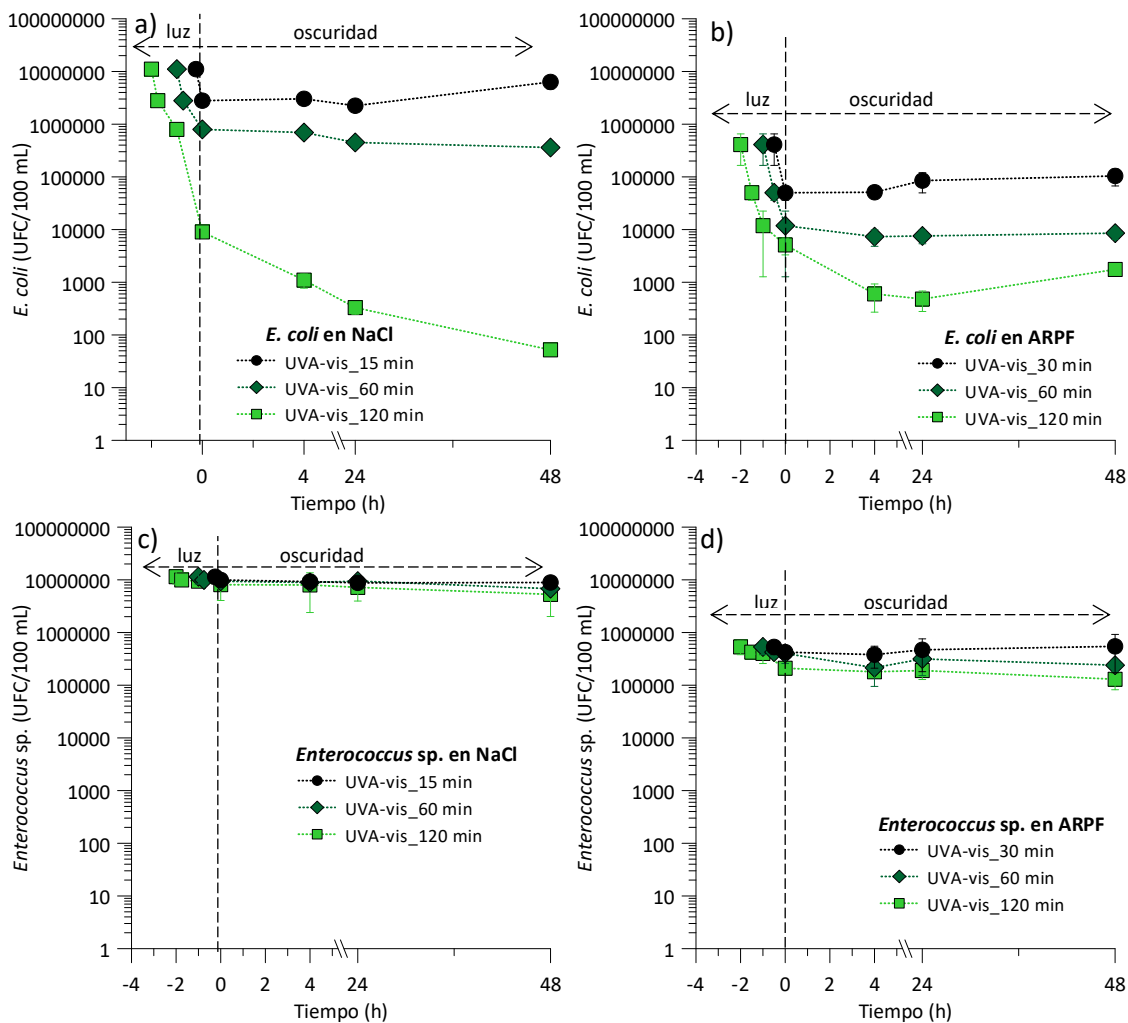


Figura 6.9. Reactivación bacteriana tras la exposición a irradiación UVA-vis durante diferentes tiempos de tratamiento: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en NaCl, d) *Enterococcus* sp. en ARPF. Las barras de error representan el error del análisis.

En la Figura 6.9 se observa que el comportamiento de las bacterias fue diferente dependiendo del tiempo de exposición a la radiación UVA-vis. En general, tanto las células de *E. coli* como las de *Enterococcus* sp. expuestas durante periodos cortos, es decir, 15 min en NaCl y 30 min en ARPF, presentaron un ligero recrecimiento tras 48 horas en oscuridad.

Sin embargo, la exposición más prolongada a UVA-vis (60 min y 120 min) produjo una ligera inactivación adicional en la mayoría de los casos. Este aumento en la inactivación fue especialmente notablemente en el ensayo con *E. coli* en NaCl tratada durante 120 minutos con UVA-vis, en el que se observó una disminución adicional de más de -2 log tras 48 horas en oscuridad. Por el contrario, en ARPF, la reducción de la población de *E. coli* bajo esas condiciones no fue tan significativa. En la solución salina, la ausencia de nutrientes y la presencia de una concentración relativamente elevada de sales dificultan la supervivencia de las células tratadas (Giannakis et al., 2014). En el caso de *Enterococcus* sp., su concentración apenas disminuyó en ninguna de las dos matrices, incluso 48 horas después del tratamiento de 120 minutos, probablemente debido a que las células no sufrieron daños excesivamente importantes durante la exposición a la luz UVA-vis.

6.2.3.3. Modelización cinética

Las curvas de inactivación obtenidas mediante irradiación UVA-vis (Figura 6.8) se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Las Tablas 6.3-6.5 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.

Bacteria	Matriz	k^* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	0,012	1,13	0,17	0,99
	ARPF	0,004	1,30	0,06	1,00
<i>Enterococcus</i> sp.	NaCl	0,004	0,86	0,03	0,95
	ARPF	0,002	1,13	0,01	1,00

Tabla 6.4. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.

Bacteria	Matriz	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	1,0000000	0,052	0,052	0,20	0,99
	ARPF	1,0000000	0,045	0,045	0,21	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	NaCl	0,6795691	0,003	0,011	0,03	0,96
	ARPF	1,0000000	0,008	0,008	0,02	1,00

Tabla 6.5. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante irradiación UVA-vis.

Bacteria	Matriz	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	1,13	50	0,17	0,99
	ARPF	1,30	65	0,06	1,00
<i>Enterococcus</i> sp.	NaCl	0,86	620	0,03	0,98
	ARPF	1,12	268	0,01	1,00

La Figura 6.10 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en solución salina y en ARPF mediante el tratamiento de irradiación UVA-vis. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I.XIX-I.XXII).

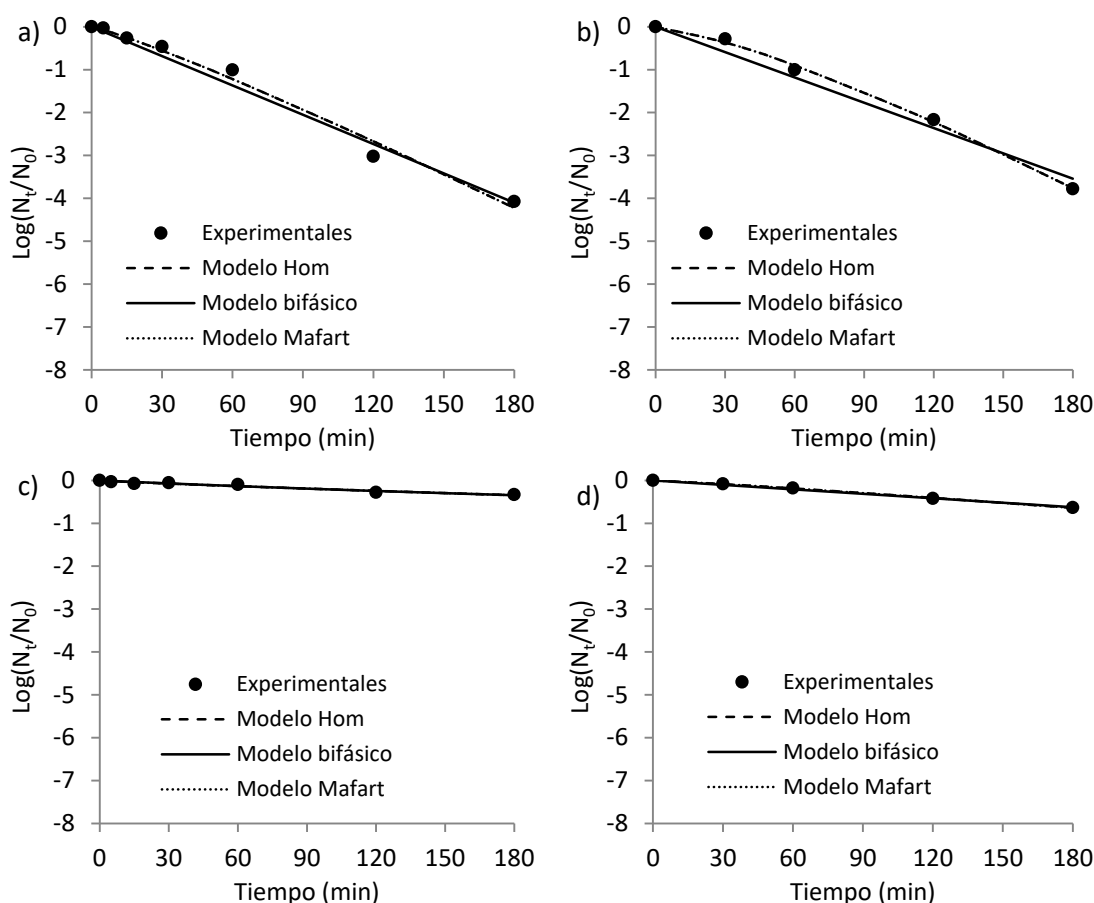


Figura 6.10. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas mediante irradiación UVA-vis de: a) *E. coli* en solución salina, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en solución salina, d) *Enterococcus* sp. en ARPF.

En general, los 3 modelos presentan un buen ajuste a los datos experimentales, tal y como muestran los valores ECM y r (Tablas 6.3-6.5) y las representaciones gráficas (Figura 6.10). Sin embargo, en todos los casos el modelo bifásico presenta valores iguales o muy similares para k_1 y k_2 , lo que significa que, según este modelo, la inactivación es lineal y no existen dos subpoblaciones con distinta resistencia a la luz UVA-vis.

El parámetro m del modelo de Hom y el parámetro p del modelo de Mafart indican también que las curvas de inactivación son casi lineales, aunque con forma ligeramente convexa en la mayoría de casos y ligeramente cóncava para *Enterococcus* sp. en solución salina.

Para cada bacteria, el parámetro δ del modelo de Mafart, parámetro que corresponde al tiempo de irradiación UVA-vis necesario para eliminar la primera unidad logarítmica bacteriana, presenta valores del mismo orden de magnitud en las dos matrices (Tabla 6.5). Además, el valor de δ es mucho mayor para *Enterococcus* sp. que para *E. coli*, lo que evidencia la mayor sensibilidad de esta bacteria Gram-negativa al tratamiento.

6.2.4. Efecto de la agitación y del TiO₂ en oscuridad

6.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utilizan dos tipos de muestra: solución salina (NaCl, apartado 6.2.1) con una concentración bacteriana de 10⁶-10⁷ UFC/100 mL y ARPF, que contiene de forma natural las bacterias de estudio *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. (10⁵-10⁶ UFC/100 mL).

Para los ensayos control en oscuridad se colocan 100 mL de muestra en reactores de cuarzo de 250 mL. Se realizan cuatro tipos de ensayos diferentes: i) sin agitación ni TiO₂, ii) con agitación y sin TiO₂, iii) con agitación y 1 g/L de TiO₂ Degussa P25 y iv) con agitación y 1 g/L de TiO₂ Levenger. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 180 minutos, y los análisis microbiológicos se llevan a cabo de inmediato. Los ensayos se realizan al menos por duplicado.

6.2.4.2. Resultados y discusión

La Figura 6.11 muestra la inactivación bacteriana (*E. coli* y *Enterococcus* sp.) alcanzada en los diferentes ensayos realizados en oscuridad en las matrices NaCl y ARPF.

En la solución salina (Figura 6.11a y Figura 6.11c) se observa que, en general, la agitación y la presencia de 1 g TiO₂/L no causaron un descenso de la población bacteriana.

En esta matriz solo se produjo inactivación de la bacteria *E. coli* en presencia de TiO₂ Levenger y agitación (Figura 6.11a), alcanzando más de -1,5 unidades logarítmicas de inactivación tras 180 minutos. Algunos estudios confirman que el mecanismo de inactivación de la fotocatalisis implica inicialmente la adsorción de las bacterias en la superficie del TiO₂ (Gogniat et al., 2006, Rizzo, 2009, Pablos et al., 2013). Además, la presencia de Ca²⁺, que está en la solución debido a la composición del TiO₂ Levenger,

puede favorecer esta atracción entre las bacterias y las partículas de catalizador (Pablos et al., 2013). Otros autores han observado que la bacteria *E. coli* adsorbida sobre el TiO₂ puede presentar alteraciones en la integridad de su membrana cuando se encuentra en soluciones de NaCl-KCl, incluso en ausencia de luz (Gogniat et al., 2006).

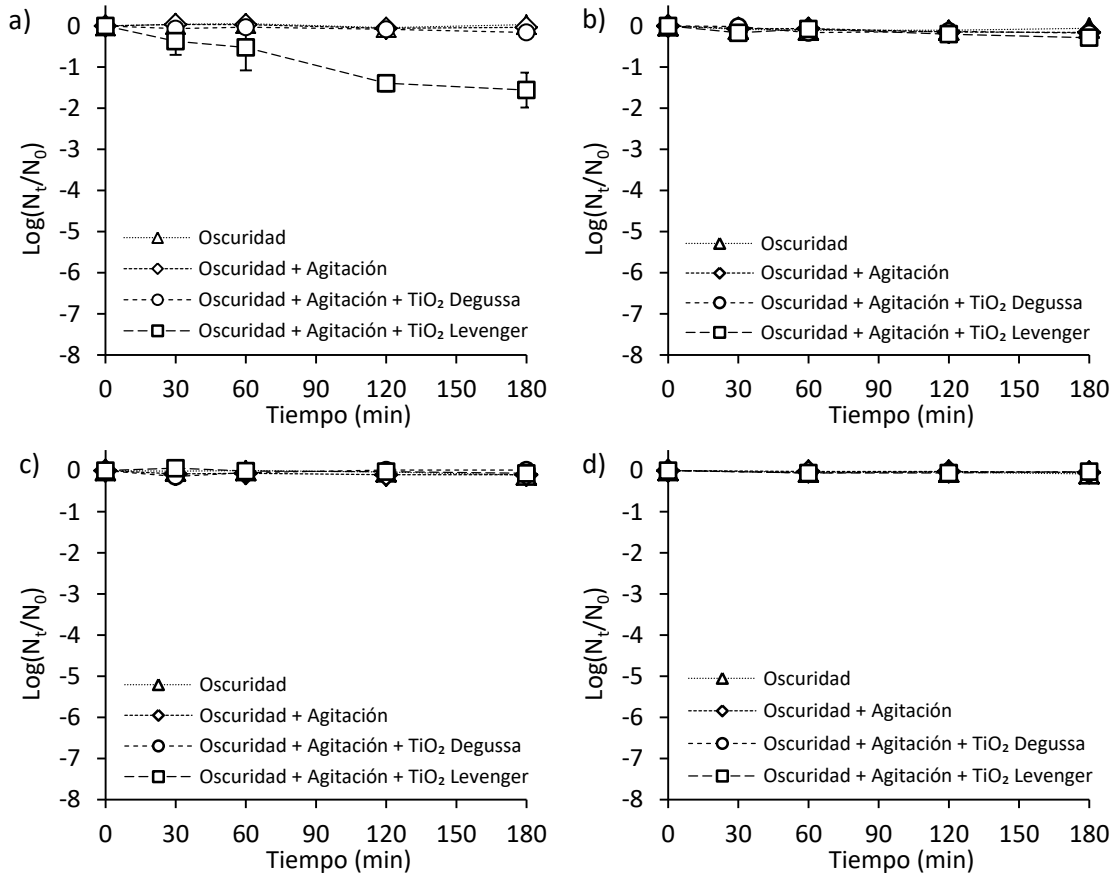


Figura 6.11. Inactivación bacteriana durante los ensayos control en oscuridad para evaluar el efecto de la agitación y la presencia de TiO₂ sobre: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en NaCl y d) *Enterococcus* sp. en ARPF.

La bacteria Gram-positiva *Enterococcus* sp. en NaCl no mostró disminución de la población en ninguno de los ensayos control realizados en la oscuridad (Figura 6.11c). Esto significa que hay algunas diferencias en el modo de acción del TiO₂ dependiendo del tipo de pared celular. Van Grieken et al. (2010) muestran un comportamiento de las bacterias *E. coli* y *Enterococcus* sp. en agua destilada similar al observado en el presente trabajo de investigación en NaCl, siendo la bacteria Gram-negativa *E. coli* más sensible a factores de estrés, como la agitación o la presencia de partículas de TiO₂.

Por otra parte, en la muestra ARPF apenas se produjo inactivación de ninguna de las dos bacterias (<0,3 log) tras 180 minutos en oscuridad (Figura 6.11b y Figura 6.11d), lo que coincide con otros estudios realizados en aguas de salida de EDAR (Rincón y Pulgarin, 2004c, Van Grieken et al., 2010).

6.2.5. Efecto de la irradiación UVA-vis combinada con H₂O₂

6.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utiliza la muestra ARPF (apartado 4.2.1) con una concentración bacteriana de 10⁷-10⁸ UFC/100 mL (*Escherichia coli* o *Enterococcus* sp.).

Para los ensayos con irradiación UVA-vis y H₂O₂ se colocan 100 mL de muestra en reactores de cuarzo de 250 mL y se añade H₂O₂ en distintas dosis (1,4 – 680 mg H₂O₂/L). Los reactores se introducen en el interior de la cámara solar (apartado 6.2.2.1) y las muestras se mantienen con agitación constante para proporcionar un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. Se realizan ensayos de 30 minutos para todas las concentraciones de H₂O₂ y ensayos de distinta duración para la concentración de 680 mg H₂O₂/L. Los análisis microbiológicos se llevan a cabo de inmediato.

6.2.5.2. Resultados y discusión

La Figura 6.12 representa la inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/H₂O₂ con distintas concentraciones de H₂O₂.

En general, se observa que la inactivación aumenta conforme se aplican dosis de H₂O₂ mayores (Figura 6.12). Para ambas bacterias, con las dosis de 1,4 y 20 mg H₂O₂/L se obtiene una inactivación similar a la alcanzada mediante irradiación UVA-vis en ausencia de H₂O₂ (Figura 6.8). En cambio, con las dosis de 200 y 680 mg H₂O₂/L la reducción de la población de *E. coli* es notablemente mayor que con solo irradiación UVA-vis. En el caso de *Enterococcus* sp., el aumento de la eficacia de desinfección en presencia de H₂O₂ no es tan evidente, incluso con las dosis más elevadas de H₂O₂.

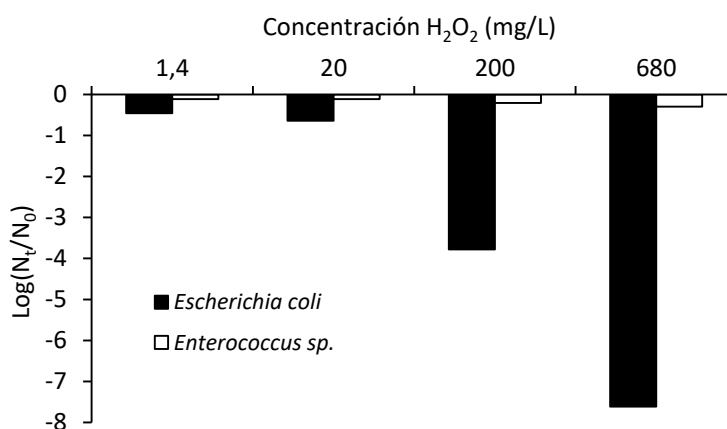


Figura 6.12. Inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/H₂O₂ con distintas concentraciones de H₂O₂.

Algunos estudios muestran que existen bacterias, como *Clostridium perfringens*, que presentan gran sensibilidad al tratamiento UVA-vis/ H_2O_2 , inactivándose por completo en pocos minutos incluso con concentraciones muy bajas de H_2O_2 (1,4 mg H_2O_2 /L) (Lanao et al., 2010). En cambio, otros estudios indican que hay bacterias, como *Enterococcus* sp., que son más resistentes y se necesitan dosis de H_2O_2 mayores para mejorar la eficacia del proceso (Lanao et al., 2012). En general, la bibliografía consultada muestra que la combinación de irradiación UVA con H_2O_2 aumenta la velocidad de inactivación bacteriana (Rincón y Pulgarin, 2006, Ortega-Gómez et al., 2012, Rodríguez-Chueca et al., 2015b).

La exposición a irradiación UVA-vis en presencia de H_2O_2 puede dar lugar a diversos mecanismos de inactivación. Por ejemplo, el H_2O_2 y sus ROS derivadas pueden atacar directamente la membrana celular o puede tener lugar la difusión del H_2O_2 externo al interior de la célula, lo que favorece las reacciones Fenton y/o foto-Fenton intracelulares (Spuhler et al., 2010). Puesto que la pared celular de *E. coli* es más fina que la de *Enterococcus* sp., es posible que la bacteria Gram-negativa *E. coli* sea más sensible a los ataques de las ROS y permita más fácilmente la difusión del H_2O_2 , aumentando así la inactivación celular.

Para ambas bacterias, se realizaron también experimentos UVA-vis/ H_2O_2 con la dosis mayor de H_2O_2 durante tiempos de tratamiento más prolongados. La Figura 6.13 ilustra las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. mediante irradiación UVA-vis combinada con 680 mg H_2O_2 /L.

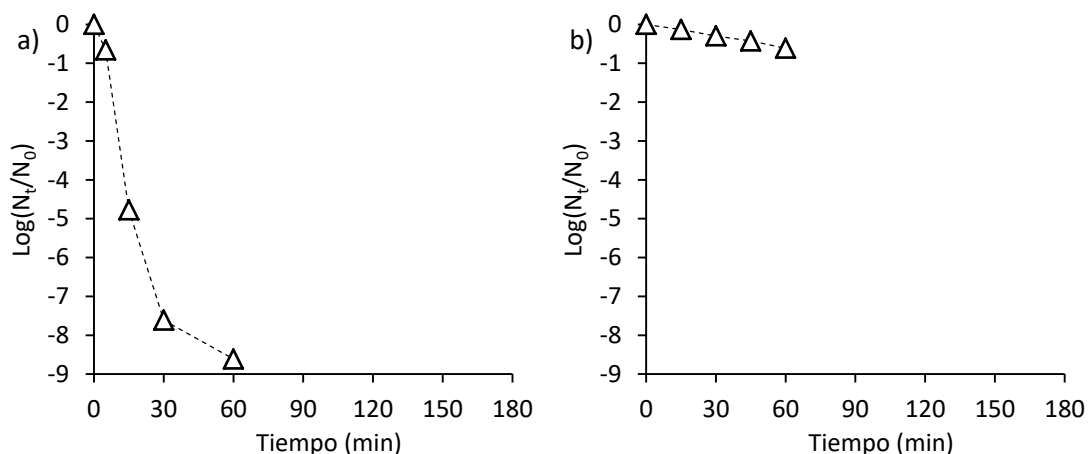


Figura 6.13. Inactivación bacteriana en ARPF mediante UVA-vis/ H_2O_2 con 680 mg H_2O_2 /L. a) *E. coli* y b) *Enterococcus* sp.

De nuevo, en la Figura 6.13 se observan grandes diferencias entre el comportamiento de *E. coli* y el de *Enterococcus* sp. La desinfección total de *E. coli* se alcanzó tras 60 minutos de tratamiento UVA-vis con 680 mg H_2O_2 /L. Estas condiciones de operación resultaron muy

agresivas para esta bacteria Gram-negativa, que en tan solo 15 minutos mostró casi -5 log de inactivación. Sin embargo, la población de *Enterococcus* sp. solo disminuyó en -0,6 log tras 60 minutos, mostrando una mayor resistencia al tratamiento.

6.2.5.3. Modelización cinética

Las curvas de inactivación obtenidas mediante irradiación UVA-vis/H₂O₂ (Figura 6.13) se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Las Tablas 6.6-6.8 recogen los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 6.6. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H₂O₂.

Bacteria	Matriz	k* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,897	0,57	1,01	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	ARPF	0,007	1,08	0,00	1,00

Tabla 6.7. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H₂O₂.

Bacteria	Matriz	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,9999998	0,690	0,075	0,40	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	ARPF	1,0000000	0,023	0,023	0,01	1,00

Tabla 6.8. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante irradiación UVA-vis con H₂O₂.

Bacteria	Matriz	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,57	1	1,01	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	ARPF	1,08	94	0,00	1,00

La Figura 6.14 muestra gráficamente el ajuste de cada modelo a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF mediante el tratamiento de irradiación UVA-vis con 680 mg H₂O₂/L. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I.XXIII-I.XXIV).

En general, el ajuste de los tres modelos a los datos experimentales de ambas bacterias es bueno. En el caso de *E. coli* (Figura 6.14a), el modelo bifásico es el que mejor se ajusta a los valores observados, planteando la existencia de dos subpoblaciones de distinta resistencia al tratamiento. Por otra parte, tanto el modelo de Hom como el de Mafart asumen que la

curva de inactivación tiene forma cóncava y y, además, el parámetro δ del modelo de Mafart indica una rápida inactivación (~ 1 min) de la primera unidad logarítmica de *E. coli* (Tabla 6.8).

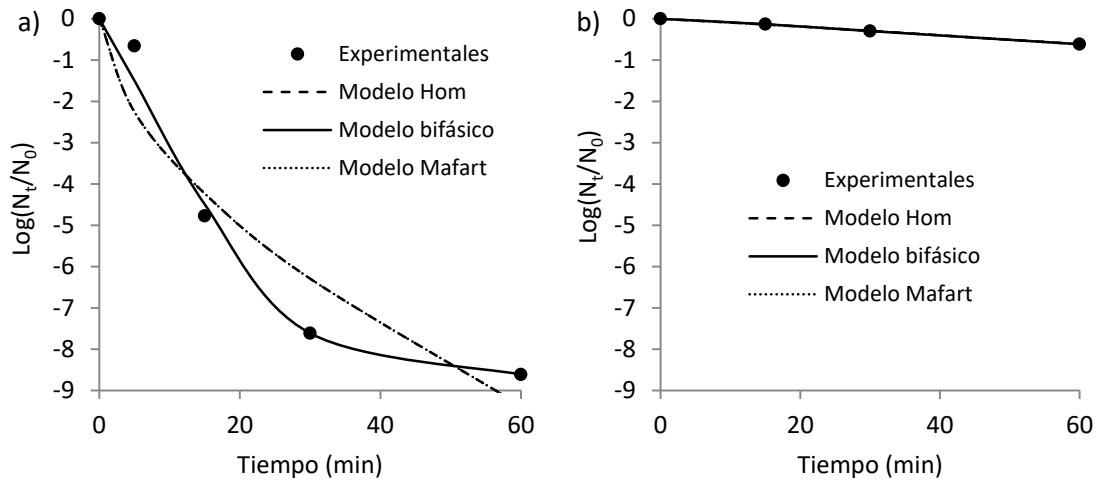


Figura 6.14. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas en ARPF mediante irradiación UVA-vis con 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$ de: a) *E. coli* y b) *Enterococcus sp.*

Respecto a *Enterococcus sp.*, los tres modelos cinéticos se ajustan bien a la forma lineal de la curva de inactivación mediante UVA-vis con 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$. Los modelos de Hom y Mafart presentan un valor de m y de p , respectivamente, próximo a 1, lo que indica forma lineal. El modelo bifásico (Tabla 6.7) presenta valores iguales para k_1 y k_2 , descartando la existencia de dos subpoblaciones de distinta resistencia. El parámetro δ del modelo de Mafart establece un tiempo de tratamiento de 94 minutos para eliminar la primera unidad logarítmica de *Enterococcus sp.*, valor mucho mayor que el observado para *E. coli* (Tabla 6.8).

Los valores de los parámetros cinéticos calculados para la inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* mediante UVA-vis/ H_2O_2 (Tablas 6.6-6.8) indican una eliminación bacteriana más rápida de este tratamiento que de la irradiación UVA-vis en ausencia de H_2O_2 (Tablas 6.3-6.5.), especialmente en el caso de *E. coli*.

6.3. Ensayos de fotocatalisis (UVA-vis/TiO₂)

6.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utilizan dos tipos de muestra: solución salina (NaCl, apartado 6.2.1) fortificada con las bacterias de estudio (10⁶-10⁷ UFC/100 mL) y ARPF, que contiene de forma natural las bacterias de estudio *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. (10⁵-10⁶ UFC/100 mL).

Para realizar los ensayos de fotocatalisis se colocan 100 mL de muestra en reactores de cuarzo de 250 mL, se añade la concentración de TiO₂ requerida en cada caso y se introducen en la cámara solar (apartado 6.2.2.1), manteniéndolos con agitación constante para proporcionar un medio aireado y una mezcla perfecta. Se utilizan dos tipos de TiO₂ comercial, TiO₂ Degussa P25 y TiO₂ Levenger, descritos en los apartados 6.2.2.2 y 6.2.2.3, respectivamente. Se evalúan distintas concentraciones de TiO₂ (0,25 g/L – 2 g/L) y distintos tiempos de tratamiento, hasta un máximo de 180 minutos. Los análisis microbiológicos se realizan de inmediato. En ensayos adicionales se determinan el pH y la alcalinidad (apartado 2.1.2). Los ensayos de inactivación mediante UVA-vis/TiO₂ se llevan a cabo al menos por duplicado.

Se realizan también ensayos de recrecimiento o supervivencia bacteriana. Para ello, las muestras (NaCl o ARPF) se exponen a UVA-vis/TiO₂ durante diferentes tiempos de tratamiento y posteriormente se almacenan en oscuridad a temperatura ambiente. La concentración bacteriana se analiza a las 4 h, 24 h y 48 h posteriores.

6.3.2. Resultados y discusión

6.3.2.1. Efecto de: concentración de TiO₂, tipo de TiO₂, tipo de bacteria y tipo de matriz

La Figura 6.15 y la Tabla 6.9 muestran la inactivación bacteriana y el pH y la alcalinidad, respectivamente, en las matrices NaCl y ARPF durante la fotocatalisis con distintas concentraciones de TiO₂ y una duración del tratamiento de 60 minutos.

En general, no se observó influencia de la concentración o el tipo de TiO₂, excepto para *Enterococcus* sp. en NaCl (Figura 6.15c), donde se obtuvo mayor desinfección con el TiO₂ Degussa P25 y, además, el aumento de la concentración del TiO₂ Levenger dio lugar a mayor eliminación de bacterias. En esa matriz, la inactivación de *E. coli* fue muy rápida (Figura 6.15a), alcanzando el límite de detección en 60 minutos con ambos tipos de TiO₂ e incluso con la dosis más baja aplicada (0,25 g TiO₂/L). Probablemente, durante la inactivación de *E. coli* se habría producido un comportamiento del TiO₂ similar al observado con *Enterococcus* sp. si el tiempo de tratamiento hubiese sido más corto.

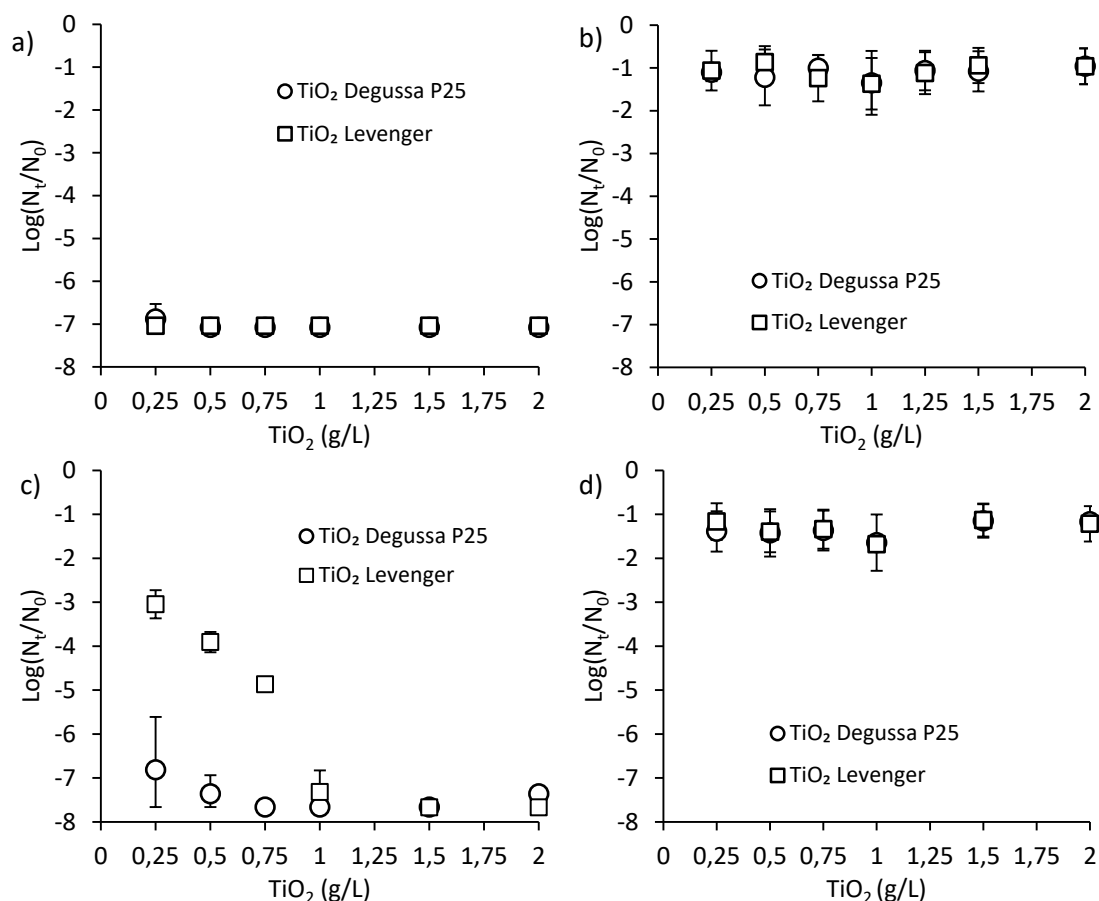


Figura 6.15. Inactivación bacteriana tras 60 minutos de tratamiento UVA-vis/TiO₂ con varias concentraciones de TiO₂: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en NaCl y d) *Enterococcus* sp. en ARPF.

La menor eficacia del TiO₂ Levenger observada en la matriz NaCl (Figura 6.15c) puede deberse a la presencia de compuestos inorgánicos en el catalizador (CaSO₄·H₂O y ZnCO₃). Estos compuestos aumentan el pH (~7) y la alcalinidad de la solución salina (Tabla 6.9). Aunque un pH entre 4 y 9 tiene muy poca influencia sobre la inactivación bacteriana (Rincón y Pulgarin, 2004a, Chong et al., 2011), la presencia de SO₄²⁻ y HCO₃⁻, incluso en bajas concentraciones, puede reducir notablemente la efectividad del proceso. Por una parte, el HCO₃⁻ actúa como scavenger de radicales [•]OH (Parsons, 2004) y, por otra parte, el aumento de la alcalinidad produce la aglomeración de las partículas de TiO₂, disminuyendo así la disponibilidad de los huecos foto-generados para la producción de ROS (Jefferson et al., 2016). Además, los iones SO₄²⁻ pueden adsorberse fácilmente en la superficie del TiO₂ y, por tanto, inhibir la inactivación bacteriana (Rincón y Pulgarin, 2004a). Cuando se aumenta la concentración de TiO₂ Levenger, existe probablemente una competición entre la mayor disponibilidad de partículas de catalizador (y el consecuente aumento de ROS generadas) y el aumento de aniones de efecto inhibitor. Por el contrario, con el TiO₂ Degussa P25 no se añaden otras sustancias adicionales, por lo que la alcalinidad se mantiene en 0 mg CaCO₃/L y el pH disminuye ligeramente (~5,5) (Tabla 6.9).

Tabla 6.9. pH y alcalinidad al inicio y al final de los ensayos UVA-vis/TiO₂ con distintas concentraciones de TiO₂

Matriz	Tipo TiO ₂	[TiO ₂]	pH		Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	
			0 min	60 min	0 min	60 min
NaCl	Degussa P25	0,25	5,8	5,8	0	0
		0,5	5,7	5,8	0	0
		0,75	5,5	5,5	0	0
		1	5,5	5,5	0	0
		1,5	5,4	5,4	0	0
		2	5,3	5,4	0	0
	Levenger	0,25	7,2	7,1	24	24
		0,5	7,2	7,3	45	43
		0,75	7,3	7,3	65	63
		1	7,3	7,3	85	80
		1,5	7,3	7,3	135	130
		2	7,2	7,4	175	170
ARPF	Degussa P25	0,25	7,6	8,2	153	148
		0,5	7,5	8,3	150	148
		0,75	7,5	8,3	148	143
		1	7,4	8,3	145	143
		1,5	7,3	8,3	145	143
	Levenger	0,25	7,8	8,3	165	158
		0,5	7,7	8,3	180	178
		0,75	7,6	8,3	193	190
		1	7,6	8,4	200	205
		1,5	7,6	8,4	230	228

En la matriz ARPF (Figura 6.15b y Figura 6.15d) no se observó efecto del tipo de TiO₂ con ninguna de las dos bacterias. Puesto que ambos TiO₂ tienen un ratio anatasa:rutilo similar, es razonable que su actividad fotocatalítica también lo sea (Valero et al., 2014). Además, al haber ya una alcalinidad elevada en esta matriz, la presencia de SO₄²⁻ y HCO₃⁻ adicionales del TiO₂ Levenger no produce disminución de la eficacia de la fotocatalisis respecto al TiO₂ Degussa. En cuanto al efecto de la concentración de TiO₂, en el rango estudiado no parece ser importante, pese a la ligera mejora que parece haber con la dosis de 1 g TiO₂/L. El aumento de la dosis de TiO₂ produce probablemente dos efectos opuestos. Por una parte, aumenta la superficie de catalizador, favoreciendo la generación de ROS, y, por otra parte, disminuye la profundidad de penetración de la luz en la suspensión, debido al efecto de apantallamiento que generan las propias partículas de TiO₂ (Cho et al., 2004).

Al comparar las dos matrices estudiadas se observa que, en general, la eficacia de desinfección mediante UVA-vis/TiO₂ fue notablemente menor en ARPF (Figura 6.15b y d) que en NaCl (Figura 6.15a y c), con ambos TiO₂ y para ambas bacterias. Como consecuencia, se deduce que la matriz acuosa afecta en gran medida a la inactivación

bacteriana. Gogniat et al. (2006) proponen que la adsorción de las bacterias en las partículas de TiO_2 es un paso clave en la inactivación mediante fotocátalisis y que está influenciada por la composición del agua. Por ejemplo, en soluciones de NaCl-KCl es muy probable que se produzcan este tipo de enlaces bacteria- TiO_2 . Además, puesto que en la composición de la muestra NaCl no hay ninguna sustancia que compita por reaccionar con las ROS, es más probable la interacción de estas especies reactivas con las bacterias de estudio que en la muestra ARPF, en la que hay presentes sustancias orgánicas e inorgánicas, junto con otros microorganismos.

Cuanto más compleja sea la matriz, menor será la probabilidad de que las ROS fotogeneradas reaccionen con las bacterias estudiadas. Los compuestos orgánicos compiten con las bacterias por los sitios de adsorción en la superficie del TiO_2 y pueden incluso llegar a bloquearlos (Drosos et al., 2015), favoreciendo así las reacciones de las ROS con la materia orgánica en vez de con las bacterias. Durante la degradación orgánica se pueden formar algunos compuestos intermedios reactivos (R^\bullet), pero su poder de oxidación es inferior al del radical hidroxilo. Los iones inorgánicos, como ya se ha comentado anteriormente, afectan a la sensibilidad de las bacterias hacia el TiO_2 . Algunos de estos aniones, como SO_4^{2-} , HCO_3^- y HPO_4^{2-} , están presentes en la composición de la muestra ARPF y pueden tener un efecto negativo sobre la fotocátalisis con TiO_2 (Rincón y Pulgarin, 2004a). En cambio, otros aniones pueden producir la reacción opuesta. Por ejemplo, el anión Cl^- , que está en una concentración elevada en la muestra NaCl, puede reaccionar con los $^\bullet\text{OH}$ iniciando una cadena de reacciones que conlleva la formación de otros radicales como HOCl^\bullet (Saran et al., 1999, Diao et al., 2004). Por último, la presencia de otros microorganismos reduce la probabilidad de que la luz UVA-vis incida sobre el TiO_2 y de que las ROS ataquen las bacterias de estudio.

La Figura 6.16 representa las curvas de inactivación bacteriana para *E. coli* y *Enterococcus* sp. durante los tratamientos fotocatalíticos con 1 g TiO_2/L en las muestras NaCl y ARPF.

Se observa que, en todos los casos la desinfección aumentó con el tiempo de tratamiento (Figura 6.16). En la solución salina, se alcanzó la inactivación total (-7 unidades logarítmicas) tras 15 y 60 minutos de fotocátalisis para *E. coli* y *Enterococcus* sp., respectivamente. Sin embargo, en ARPF la inactivación fue menor, reduciéndose la población de *E. coli* en -4,5 log y la de *Enterococcus* sp. en -2,5 log después de 180 minutos de fotocátalisis. En comparación con la fotólisis (UVA-vis, Figura 6.8), la fotocátalisis (UVA-vis/ TiO_2 , Figura 6.16) produjo una inactivación mayor y más rápida.

Las Figura 6.16a y c muestran algunas diferencias entre la eficacia de inactivación de los dos tipos de TiO_2 empleados. En la solución salina, el TiO_2 Degussa P25 produjo una inactivación más rápida que el TiO_2 Levenger. Como ya se ha mencionado previamente, los aniones SO_4^{2-} y HCO_3^- introducidos por el TiO_2 Levenger tendrían un efecto perjudicial sobre la eficacia del catalizador, especialmente en la solución salina. Por el contrario, en ARPF los dos catalizadores mostraron la misma inactivación, probablemente debido a que la matriz ya presenta una elevada alcalinidad ($\sim 150 \text{ mg/L CaCO}_3$).

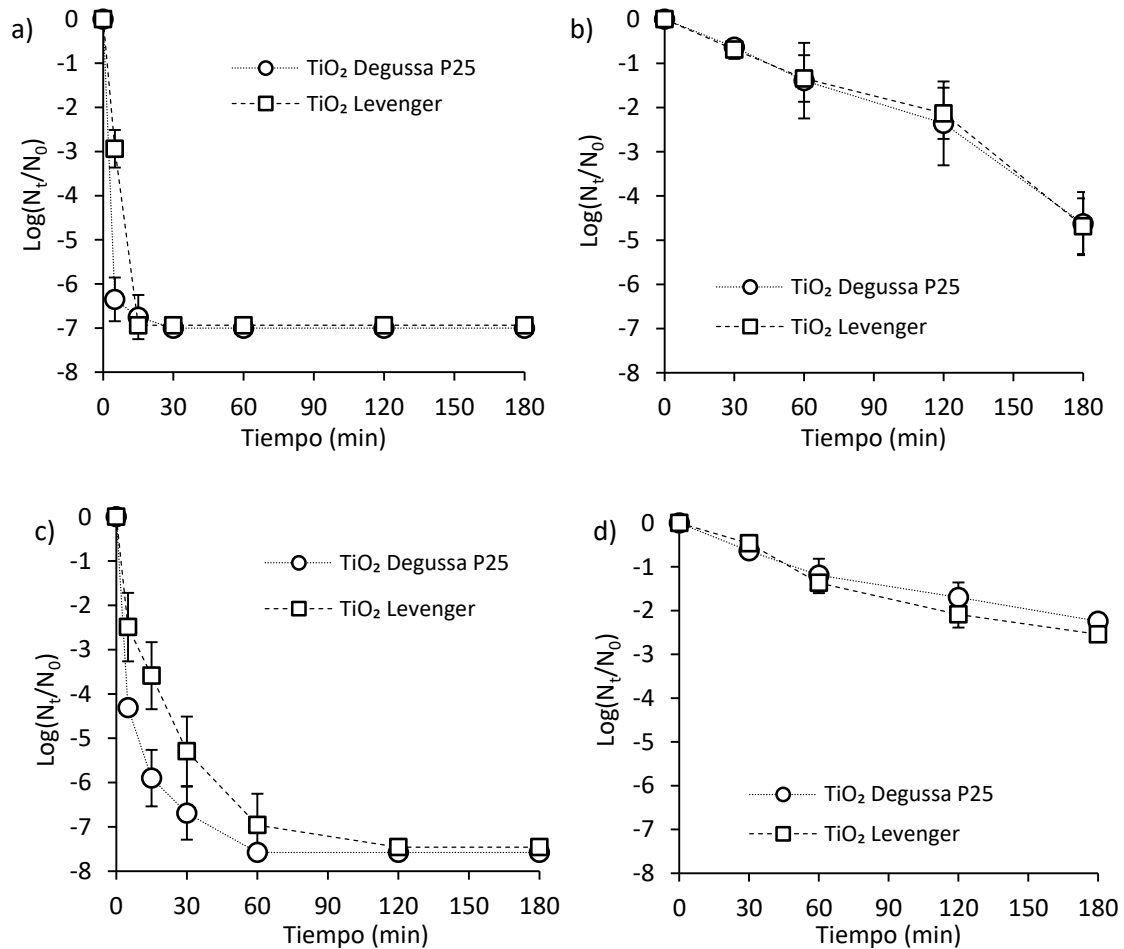


Figura 6.16. Inactivación bacteriana en presencia de irradiación UVA-vis y 1 g/L de TiO_2 Degussa P25 o Levenger: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus sp.* en NaCl y d) *Enterococcus sp.* en ARPF.

La eficacia de la desinfección mediante fotocatalisis difirió enormemente en cada tipo de muestra (Figura 6.16), al contrario de lo que ocurrió en la fotólisis (Figura 6.8), donde no se observó influencia de la matriz. Mientras que con irradiación UVA-vis sola el mecanismo de inactivación es principalmente interno a la célula, en presencia de TiO_2 el proceso está dominado por mecanismos extracelulares, como el ataque de ROS que produce peroxidación de lípidos en la membrana celular, inicia reacciones en cadena y causa estrés oxidativo y degradación del ADN, provocando finalmente la muerte de la célula (Maness et al., 1999). Por tanto, el ambiente que rodea la célula, es decir la matriz

acuosa, afecta más al rendimiento de los tratamientos de fotocátalisis que a los de fotólisis bajo las condiciones estudiadas.

Respecto al tipo de bacteria, en la Figura 6.16 se aprecia que *E. coli* muestra, en general, mayor sensibilidad hacia la fotocátalisis que *Enterococcus* sp. Este comportamiento también se observa para la exposición a irradiación UVA-vis en ausencia de TiO₂ (Figura 6.8). La diferente composición de la pared celular podría ser la causa de la diferente resistencia que presentan ambas bacterias (Willey et al., 2009). Las bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, tienen una membrana externa que se compone de lípidos y polisacáridos susceptibles de oxidarse por la acción de ROS. Sin embargo, la parte exterior de la membrana de *Enterococcus* sp., una bacteria Gram-positiva, consiste en una gruesa capa de peptidoglicano, un copolímero formado por polisacáridos enlazados, lo que imparte mayor resistencia a la célula (Dalrymple et al., 2010).

6.3.2.2. Reactivación bacteriana

La Figura 6.17 ilustra el recrecimiento o supervivencia de las bacterias *E. coli* y *Enterococcus* sp. en la oscuridad tras haber sido tratadas mediante fotocátalisis con 1 g TiO₂/L (TiO₂ Degussa P25 y TiO₂ Levenger) durante diferentes periodos de tiempo.

En general, las bacterias presentaron una supervivencia similar independientemente del tipo de TiO₂ aplicado; por tanto, el daño celular causado debe de ser muy parecido con ambos catalizadores (Figura 6.17).

La Figura 6.17a muestra la evolución de *E. coli* en NaCl tras el tratamiento UVA-vis/TiO₂. En esta matriz se alcanzó la inactivación total de *E. coli* tras aplicar, durante tan solo 15 minutos, el tratamiento fotocatalítico y posteriormente no se produjo reactivación de las células, incluso tras 48 horas en la oscuridad.

En la Figura 6.17c. se observa que, tras 15 minutos de exposición a UVA-vis/TiO₂, la inactivación de *Enterococcus* sp. en la solución salina fue muy elevada (-6 log) y que, una vez finalizado el tratamiento fotocatalítico, la población continuó disminuyendo en la oscuridad hasta alcanzar el límite de detección en menos de 4 horas.

En ARPF, la concentración de *E. coli* sometida a UVA-vis/TiO₂ durante 30 ó 60 minutos disminuyó tras 4 horas de almacenamiento en la oscuridad (Figura 6.17b). Posteriormente, tras 48 horas en la oscuridad, tuvo lugar un ligero recrecimiento de las bacterias previamente tratadas durante 30 minutos, mientras que para aquellas tratadas 60 minutos se produjo una pequeña reducción de la concentración.

La población de *Enterococcus* sp. en ARPF permaneció casi invariable tras 48 h en oscuridad después de 30 minutos de fotocátalisis (Figura 6.17d). Cuando la exposición al tratamiento UVA-vis/TiO₂ fue más prolongada (60 minutos) la población de *Enterococcus* sp. disminuyó ligeramente durante la etapa post-irradiación.

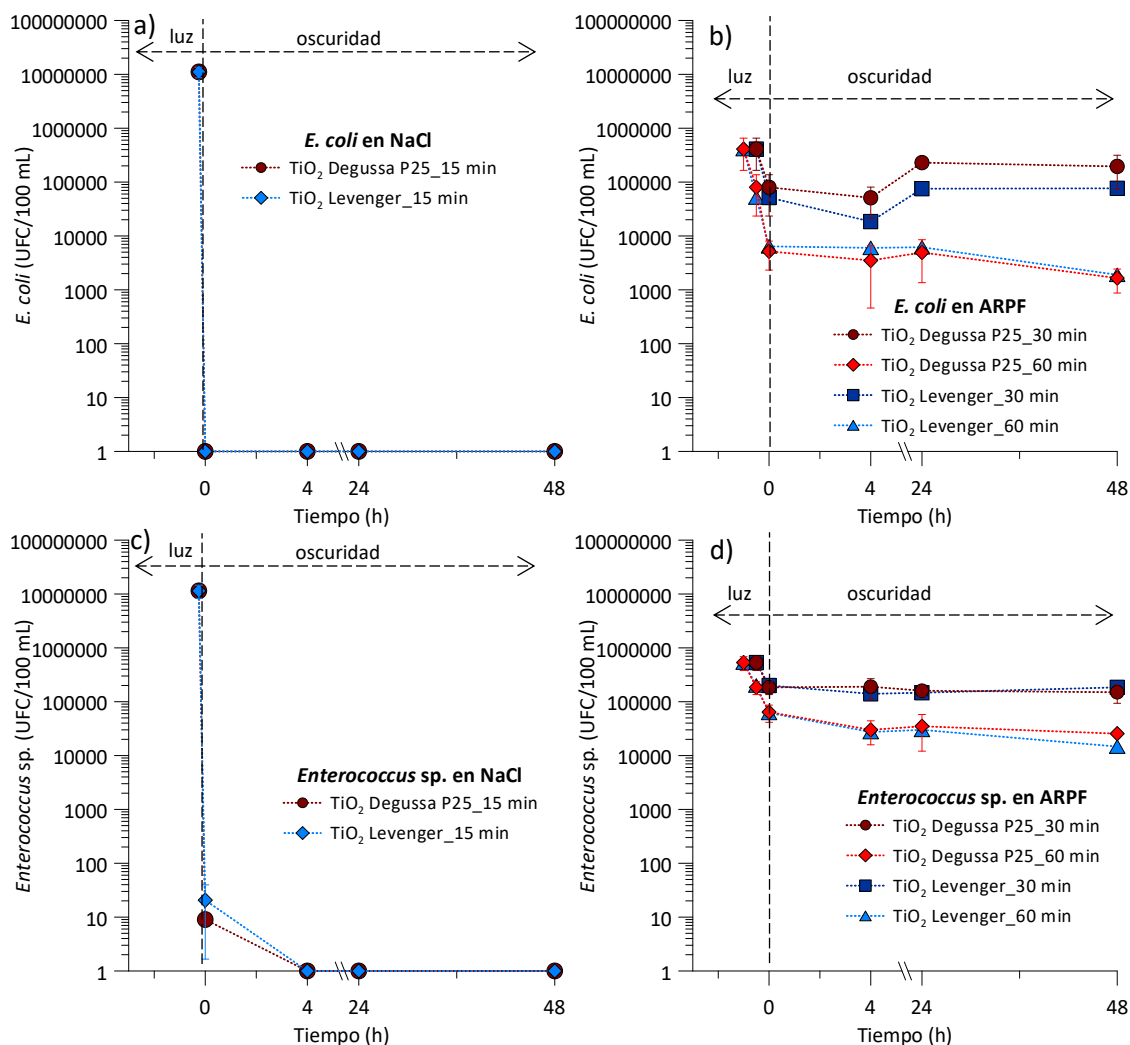


Figura 6.17. Reactivación bacteriana tras la exposición a UVA-vis/TiO₂ durante diferentes tiempos de tratamiento: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus* sp. en NaCl, d) *Enterococcus* sp. en ARPF. Las barras de error representan el error del análisis.

En la Figura 6.17 se observa también que la composición de la matriz tiene una gran influencia, no sólo en la eficiencia de la inactivación, sino también en la durabilidad post-irradiación de la desinfección, siendo más probable la supervivencia bacteriana en la matriz ARPF y no en NaCl. Pese a los múltiples mecanismos existentes de reparación de ADN (Sinha y Hader, 2002) y de protección frente al estrés oxidativo, como la defensa enzimática (Hoerter et al., 2005), la exposición a UVA-vis/TiO₂ en NaCl causó un ataque intensivo de ROS que produjo daños celulares irreparables. Sin embargo, en ARPF, la concentración bacteriana apenas cambió tras el tratamiento con TiO₂. Esta matriz es más compleja y contiene materia orgánica que puede reaccionar con las ROS generadas,

reduciendo así la probabilidad de interacción de los radicales $\cdot\text{OH}$ con las bacterias. Además, la disponibilidad de nutrientes en ARPF beneficia la supervivencia bacteriana, mientras que la salinidad de la solución de NaCl puede perjudicar la recuperación de células dañadas (Giannakis et al., 2014).

De la comparación de la reactivación bacteriana mediante UVA-vis (Figura 6.9) y mediante UVA-vis/TiO₂ (Figura 6.17) se pueden extraer varias conclusiones. En general, el poder desinfectante de la fotocátalisis es mayor que el de la fotólisis y el riesgo potencial de recrecimiento se reduce en presencia de TiO₂. Este riesgo también disminuye conforme se prolonga el tiempo de tratamiento, ya que, cuanto mayor es la exposición a UVA-vis o UVA-vis/TiO₂, mayor es la dosis de irradiación recibida por las células (Giannakis et al., 2015a) y, por tanto, la oxidación de los compuestos orgánicos que constituyen los microorganismos aumenta (Dalrymple et al., 2010).

Finalmente, la Figura 6.9 y la Figura 6.17 muestran que la bacteria *E. coli* es más sensible que *Enterococcus* sp. a los tratamientos UVA-vis y UVA-vis/TiO₂, pero la supervivencia es similar para ambas bacterias. La población bacteriana tratada durante periodos prolongados (>60 min) presenta una tendencia a continuar inactivándose una vez finalizada la exposición a la irradiación UVA-vis, tanto para *E. coli* como para *Enterococcus* sp. En cambio, tras exposiciones breves a los tratamientos se observa un ligero recrecimiento de la población bacteriana en la mayoría de los casos, excepto al aplicar el tratamiento UVA-vis/TiO₂ en NaCl, tras el cual ninguna de las dos bacterias presenta reactivación posterior. Por tanto, aunque la inactivación difiera como consecuencia de las diferencias en la composición de la pared celular, la supervivencia o el recrecimiento son similares ya que los mecanismos de reparación actúan probablemente de manera parecida en ambas bacterias.

6.3.3. Modelización cinética

Las curvas de inactivación obtenidas mediante UVA-vis/TiO₂ (Figura 6.16) se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Las Tablas 6.10-6.12 muestran los parámetros cinéticos y el ajuste de estos modelos a los resultados de inactivación observados.

Tabla 6.10. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en NaCl y en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis.

Bacteria	Matriz	TiO ₂	k* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	Degussa P25	6,256	0,02	0,11	1,00
		Levenger	3,865	0,13	0,99	0,92
	ARPF	Degussa P25	0,008	1,22	0,21	0,98
		Levenger	0,005	1,32	0,30	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	NaCl	Degussa P25	3,958	0,14	0,42	0,97
		Levenger	1,905	0,28	0,54	0,96
	ARPF	Degussa P25	0,078	0,65	0,05	1,00
		Levenger	0,061	0,73	0,16	0,97

Tabla 6.11. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis.

Bacteria	Matriz	TiO ₂	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	Degussa P25	0,99999980	3,081	0,005	0,12	1,00
		Levenger	0,99999988	1,352	3,2·10 ⁻¹¹	0,00	1,00
	ARPF	Degussa P25	1,00000000	0,055	0,055	0,27	0,97
		Levenger	1,00000000	0,054	0,054	0,37	0,95
<i>Enterococcus sp.</i>	NaCl	Degussa P25	0,99999959	1,988	0,019	0,38	0,98
		Levenger	0,99997013	1,144	0,046	0,74	0,92
	ARPF	Degussa P25	0,83430003	0,065	0,019	0,03	1,00
		Levenger	0,97968349	0,051	0,011	0,10	0,99

Tabla 6.12. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en solución salina y en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis.

Bacteria	Matriz	TiO ₂	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	NaCl	Degussa P25	0,02	1,0·10 ⁻⁴²	0,12	1,00
		Levenger	0,13	3,1·10 ⁻⁵	0,99	0,92
	ARPF	Degussa P25	1,22	53	0,21	0,99
		Levenger	1,32	58	0,30	0,98
<i>Enterococcus sp.</i>	NaCl	Degussa P25	0,14	4,5·10 ⁻⁵	0,42	0,99
		Levenger	0,28	1,0·10 ⁻³	0,54	0,98
	ARPF	Degussa P25	0,65	52	0,05	0,99
		Levenger	0,73	47	0,16	0,99

La Figura 6.18 y la Figura 6.19 representan gráficamente el ajuste de cada modelo propuesto a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* mediante fotocatalisis con TiO₂, respectivamente. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I.XXV-I.XXXII).

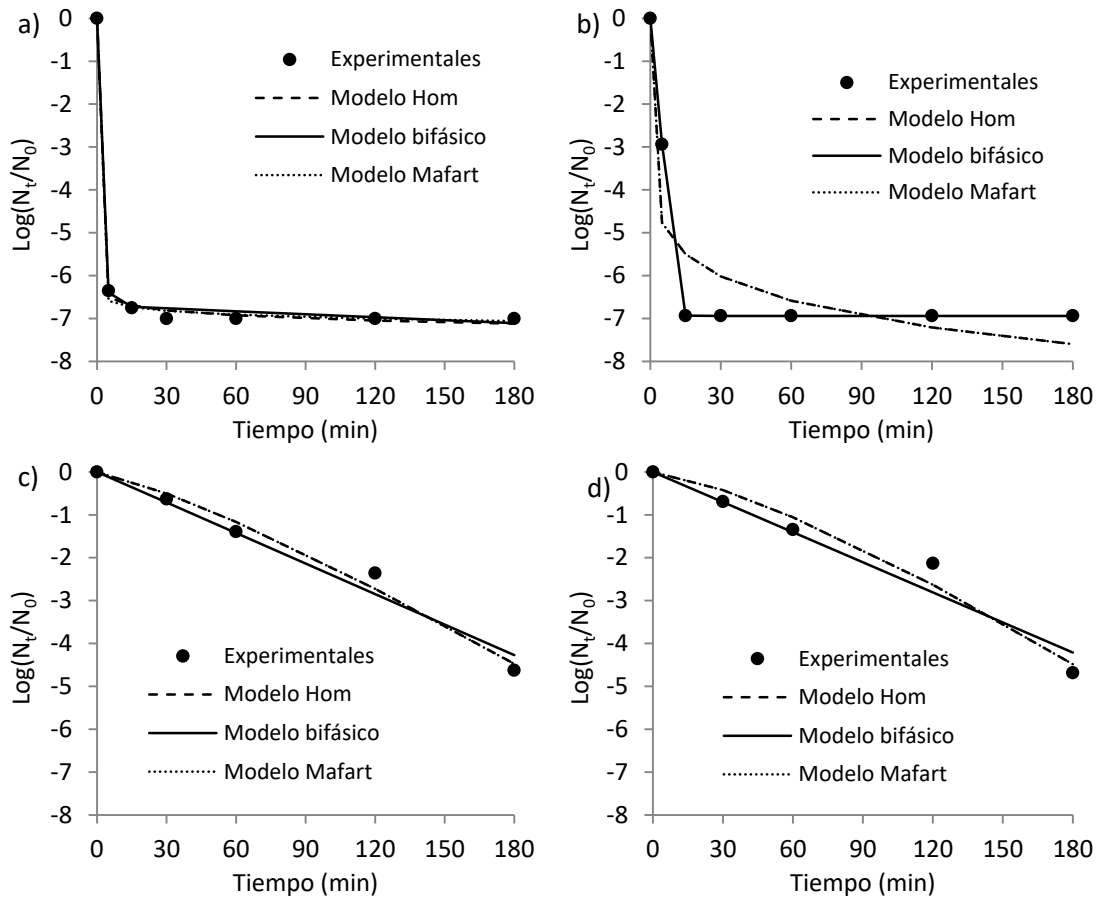


Figura 6.18. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *E. coli* obtenidas mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO_2/L : a) NaCl y TiO_2 Degussa P25, b) NaCl y TiO_2 Levenger, c) ARPF y TiO_2 Degussa P25, d) ARPF y TiO_2 Levenger.

Se observa que, en general, los modelos cinéticos se ajustan bien a los resultados experimentales obtenidos, tal y como sugieren los valores de ECM y r (Tablas 6.10-6.12) y las representaciones gráficas (Figuras 6.18 y 6.19).

Los valores que presentan los parámetros cinéticos estimados para los dos tipos de TiO_2 se encuentran dentro del mismo orden de magnitud en cada caso. Dichos parámetros indican velocidades de inactivación similares para ambos catalizadores o, en ciertas ocasiones, ligeramente superiores para el TiO_2 Degussa P25.

Tanto las constantes cinéticas de velocidad de inactivación de los modelos de Hom (k^*) y bifásico (k_1 y k_2), como el parámetro δ del modelo de Mafart, sugieren que la desinfección es más rápida en la matriz NaCl que en ARPF.

Respecto al tipo de bacteria, los modelos cinéticos indican, en general, una inactivación ligeramente más rápida de *E. coli* que de *Enterococcus* sp. en NaCl, mientras que en ARPF la velocidad de desaparición de ambas bacterias es similar.

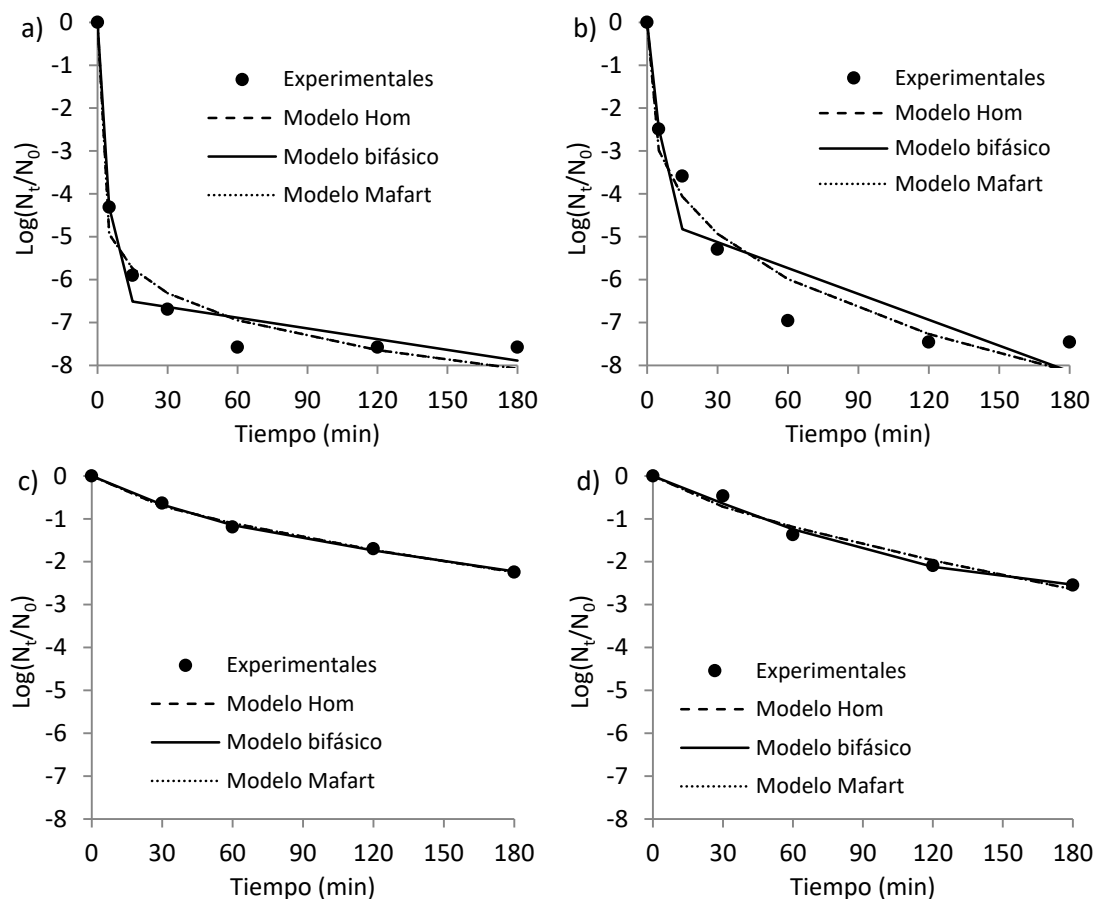


Figura 6.19. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. obtenidas mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO₂/L: a) NaCl y TiO₂ Degussa P25, b) NaCl y TiO₂ Levenger, c) ARPF y TiO₂ Degussa P25, d) ARPF y TiO₂ Levenger.

En comparación con los valores cinéticos estimados para el tratamiento UVA-vis (Tablas 6.3-6.5), la fotocatalisis (UVA-vis/TiO₂) presenta cinéticas de eliminación bacteriana más rápidas, excepto en el caso de *E. coli* en ARPF, donde la inactivación es similar en presencia o ausencia de catalizador.

Finalmente, en relación al tratamiento UVA-vis/H₂O₂ en ARPF (Tablas 6.6-6.8), la inactivación de *E. coli* resulta más rápida con esa técnica, mientras que la eliminación de *Enterococcus* sp. es más rápida mediante UVA-vis/TiO₂.

6.4. Ensayos de fotocátalisis con H₂O₂ (UVA-vis/TiO₂/H₂O₂)

6.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utiliza la muestra ARPF (apartado 4.2.1) con una concentración bacteriana de 10⁷-10⁸ UFC/100 mL (*Escherichia coli* o *Enterococcus* sp.).

Para los ensayos UVA-vis/TiO₂/H₂O₂ se colocan 100 mL de muestra en reactores de cuarzo de 250 mL y se añade 1 g/L de TiO₂ Degussa P25 y H₂O₂ en distintas dosis (20 – 680 mg H₂O₂/L). Los reactores se introducen en el interior de la cámara solar (apartado 6.2.2.1) y las muestras se mantienen con agitación constante para proporcionar un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. Se realizan ensayos de 30 minutos para todas las concentraciones de H₂O₂ y ensayos de distinta duración para la concentración de 680 mg H₂O₂/L. Los análisis microbiológicos se llevan a cabo de inmediato.

6.4.2. Resultados y discusión

La Figura 6.20 muestra la inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF tras 30 minutos de fotocátalisis con distintas concentraciones de H₂O₂.

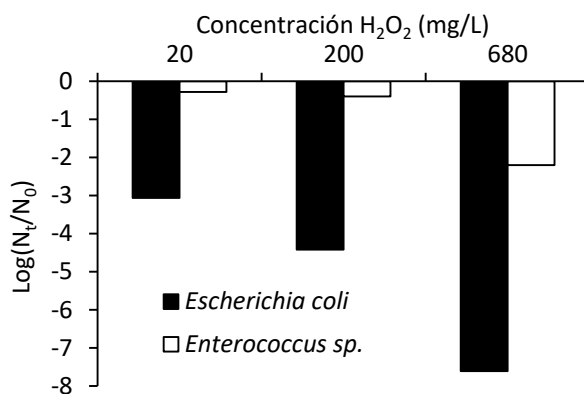


Figura 6.20. Inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/TiO₂/H₂O₂ con distintas concentraciones de H₂O₂.

Para ambas bacterias, se observa un aumento en la inactivación mediante fotocátalisis/H₂O₂ al aumentar la dosis de H₂O₂. La bacteria *E. coli* es más sensible al tratamiento, obteniéndose la inactivación casi completa con 680 mg H₂O₂/L tras 30 minutos y valores elevados de inactivación (-3 log y -4 log) incluso con las dosis de 20 y de 200 mg H₂O₂/L. En cambio, con esas dosis, la reducción de la población de *Enterococcus* sp. es inferior a 1 unidad logarítmica. Para esta bacteria Gram-positiva, la concentración de H₂O₂ da lugar a una inactivación de -2 log tras 30 minutos de tratamiento UVA-vis/TiO₂/H₂O₂.

En general, la eficacia de la fotocatalisis con H_2O_2 resulta superior a la de la irradiación UVA-vis con H_2O_2 (Figura 6.12) o a la de la fotocatalisis sola (Figura 6.16), ya que combina la acción simultánea de ambos procesos. El TiO_2 produce ROS que atacan la membrana desde el exterior, mientras que el H_2O_2 acelera la inactivación bacteriana a través de procesos fotoquímicos internos, además de actuar como aceptor de electrones mejorando así la actividad fotocatalítica del catalizador (Polo-López et al., 2017).

En la Figura 6.21 se representan las curvas de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus* sp. en ARPF mediante fotocatalisis con 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$.

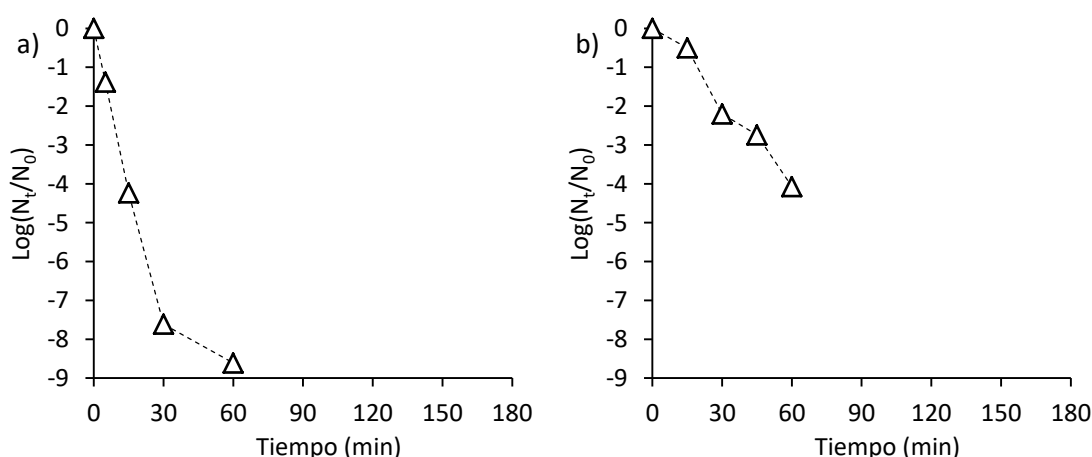


Figura 6.21. Inactivación bacteriana en ARPF mediante UVA-vis/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 y 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$. a) *E. coli* y b) *Enterococcus* sp.

Mediante UVA-vis/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ se alcanza la inactivación total de *E. coli* en 60 minutos (Figura 6.21a). Sin embargo, la inactivación de *Enterococcus* sp. es más lenta, llegándose a eliminar hasta -4 unidades logarítmicas tras 60 minutos de tratamiento (Figura 6.21b).

La eliminación de *E. coli* con fotocatalisis/ H_2O_2 (Figura 6.21) es similar a la observada mediante UVA-vis/ H_2O_2 (Figura 6.13). Por tanto, el efecto del H_2O_2 en concentraciones elevadas (680 mg/L) sobre esta bacteria es muy importante.

Por otra parte, la reducción de la población de *Enterococcus* sp. es muy superior en el tratamiento UVA-vis/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (Figura 6.21) que en ausencia de catalizador (Figura 6.13). Para esta bacteria se observa un efecto sinérgico entre el TiO_2 y el H_2O_2 , que da lugar a una inactivación mayor que la suma de las obtenidas mediante UVA-vis/ TiO_2 y UVA-vis/ H_2O_2 .

6.4.3. Modelización cinética

Las curvas de inactivación obtenidas mediante $\text{TiO}_2/\text{UVA-vis}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Figura 6.21) se analizan mediante los modelos matemáticos de Hom, bifásico y de Mafart.

Las Tablas 6.13 - 6.15 muestran los parámetros cinéticos y el ajuste de estos modelos a los resultados de inactivación observados.

Tabla 6.13. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis/H₂O₂.

Bacteria	Matriz	k* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,952	0,56	0,78	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	ARPF	0,035	1,16	0,23	0,98

Tabla 6.14. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis/H₂O₂.

Bacteria	Matriz	P	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,9999998	0,649	0,072	0,01	1,00
<i>Enterococcus sp.</i>	ARPF	1,0000000	0,151	0,151	0,26	0,97

Tabla 6.15. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a la inactivación bacteriana en ARPF mediante TiO₂/UVA-vis/H₂O₂.

Bacteria	Matriz	p	δ (min)	ECM	r
<i>Escherichia coli</i>	ARPF	0,56	1	0,78	0,97
<i>Enterococcus sp.</i>	ARPF	1,16	18	0,23	0,99

La Figura 6.22 representa gráficamente el ajuste de cada modelo propuesto a los datos experimentales de inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* mediante TiO₂/UVA-vis/H₂O₂. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I.XXXIII y I.XXXIV).

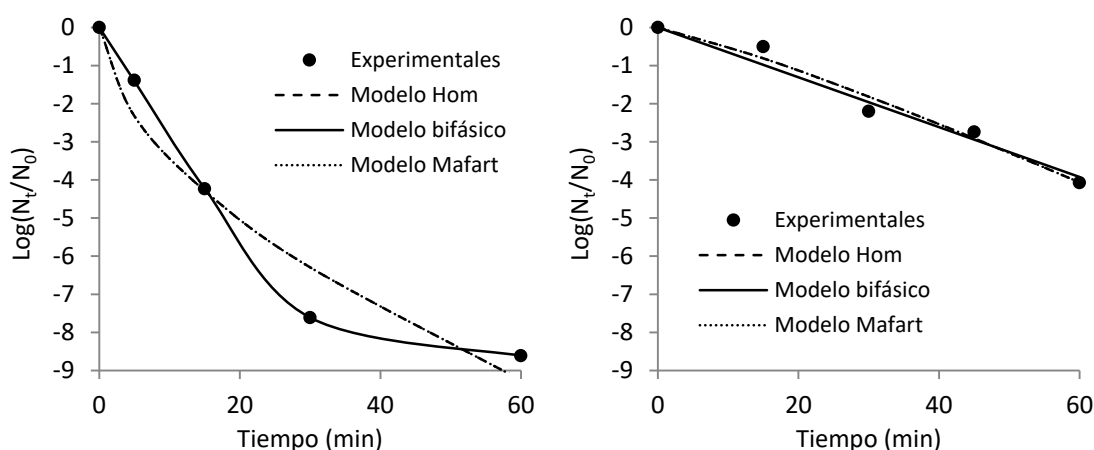


Figura 6.22. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación obtenidas en ARPF mediante irradiación UVA-vis con 1 g TiO₂/L y 680 mg H₂O₂/L: a) *E. coli* y b) *Enterococcus sp.*

Para *E. coli* (Figura 6.22a), el modelo bifásico es el que presenta mejor ajuste a los datos experimentales de inactivación mediante fotocatalisis con H₂O₂. Según este modelo (Tabla 6.14), existe una subpoblación 1 más sensible al tratamiento que presenta una constante

de inactivación k_1 y una subpoblación 2 que se elimina más lentamente, tal y como indica k_2 .

La inactivación de *Enterococcus* sp. presenta tendencia prácticamente lineal (Figura 6.22b) y así lo reflejan los parámetros m del modelo de Hom y p del modelo de Mafart, que presentan valores cercanos a 1. En este caso, según el modelo bifásico no existen dos subpoblaciones que presenten distinta resistencia al tratamiento aplicado, ya que P es igual a la unidad y las constantes k_1 y k_2 son iguales.

En conjunto, los valores de los parámetros de los distintos modelos cinéticos (Tablas 6.13 - 6.15) indican una velocidad de inactivación mayor para la bacteria *E. coli* que para *Enterococcus* sp.

6.5. Separación y reutilización del TiO₂

Mediante estos ensayos se pretende llevar a cabo una técnica simple que permita la clarificación del agua y la recuperación del TiO₂, con vistas a la posible reutilización posterior del catalizador.

6.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Se utilizan dos tipos de muestra: solución salina (NaCl, apartado 6.2.1) con una concentración bacteriana de 10⁶-10⁷ UFC/100 mL y ARPF, que contiene de forma natural las bacterias de estudio *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. (10⁵-10⁶ UFC/100 mL).

Para estudiar las posibilidades de separación del TiO₂ de la matriz acuosa se llevan a cabo ensayos de sedimentación. Para ello se vierten muestras con una concentración de 1 g TiO₂/L (Degussa P25 o Levenger) en probetas de 100 mL y se deja decantar el TiO₂. Se mide la evolución de la turbidez (apartado 2.1.2) en la fase superior clarificada.

Para los experimentos de reutilización de TiO₂ se emplean, en cada ensayo, 4 reactores de cuarzo con 100 mL de muestra y 1 g TiO₂/L (Degussa P25 o Levenger). Las muestras con TiO₂ se exponen a irradiación UVA-vis y agitación constante durante 30 minutos (muestras NaCl) o 60 minutos (muestras ARPF). A continuación, se realiza el análisis microbiológico con la muestra de uno de los reactores y las muestras restantes se vierten en probetas de 100 mL para dejar sedimentar el TiO₂. Una vez que las fases se han separado, se elimina el agua tratada clarificada y se añaden 100 mL de muestra sin tratar en cada probeta, que ya contiene el TiO₂ utilizado. La mezcla se transfiere a los reactores y el tratamiento fotocatalítico se realiza de nuevo. Estos pasos de fotocátalisis y separación se repiten hasta 4 ciclos. Además, para descartar la adsorción de las bacterias en el TiO₂ tras el tratamiento, en los casos que se alcanza la inactivación total, se ponen en contacto 0,5 g de TiO₂ reutilizado con 100 mL de agua peptonada y se mantiene a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 horas. Pasado ese tiempo se analiza la presencia de bacterias en el agua peptonada.

6.5.2. Resultados y discusión

La Figura 6.23 ilustra la evolución de la turbidez en función del tiempo en NaCl y en ARPF. La evolución de la turbidez es un parámetro representativo de la separación del TiO₂ y se utiliza en estos ensayos debido a la rapidez del método y a su importancia como parámetro de control del agua regenerada según la legislación española (RD 1620/2007).

Se observan pequeñas diferencias entre los dos tipos de TiO_2 (Figura 6.23). La sedimentación del TiO_2 Levenger fue algo más rápida que la del TiO_2 Degussa P25 en la solución salina (Figura 6.23a), mientras que en ARPF se observó la tendencia contraria (Figura 6.23b). La agregación de las nanopartículas se favorece conforme el potencial zeta se aproxima al punto de cero carga, el cual está relacionado con el pH de la solución (Hsiung et al., 2016). Considerando el pH de cada muestra (Tabla 6.9), el pH del punto cero de carga para los catalizadores estudiados debe de encontrarse en torno a pH 7; por tanto, cuanto más cerca esté el pH de este valor, la sedimentación es más rápida.

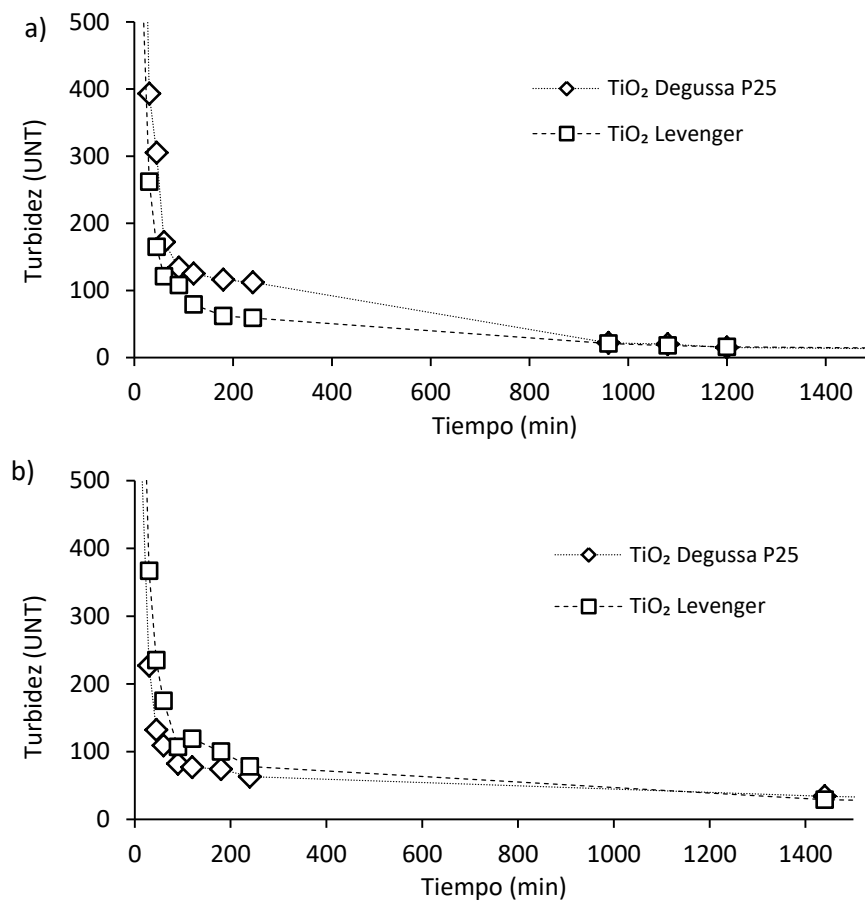


Figura 6.23. Evolución de la turbidez de la fase clarificada en: a) NaCl y b) ARPF.

Además la Figura 6.23 muestra dos etapas diferentes en todos los casos. Aproximadamente durante la primera hora, la sedimentación del TiO_2 fue más rápida, reduciéndose gran parte de la turbidez en este periodo, a una velocidad aproximada de ~ 15 UNT/min en ambas matrices. Tras este periodo inicial, las partículas de TiO_2 restantes sedimentaron más lentamente (< 1 UNT/min). Para lograr valores inferiores a 10 UNT, que es el valor máximo admisible para muchas aplicaciones de reutilización del agua (RD 1620/2007), se necesitaron 2 y 3 días de decantación para las matrices de NaCl y ARPF, respectivamente.

La Figura 6.24 representa la inactivación bacteriana por gramo de TiO_2 ($\text{Log}(N_t/N_0)/\text{g TiO}_2$) durante 4 ciclos de reutilización de TiO_2 .

En NaCl (Figura 6.24a y c) se alcanzó la máxima eficacia de eliminación (-7 log/g TiO_2) para ambas bacterias y con ambos catalizadores durante los cuatro ciclos. Además, no quedaron bacterias adsorbidas sobre la superficie del TiO_2 tras el tratamiento, evitando así el riesgo de transferencia de contaminación entre los diferentes ciclos.

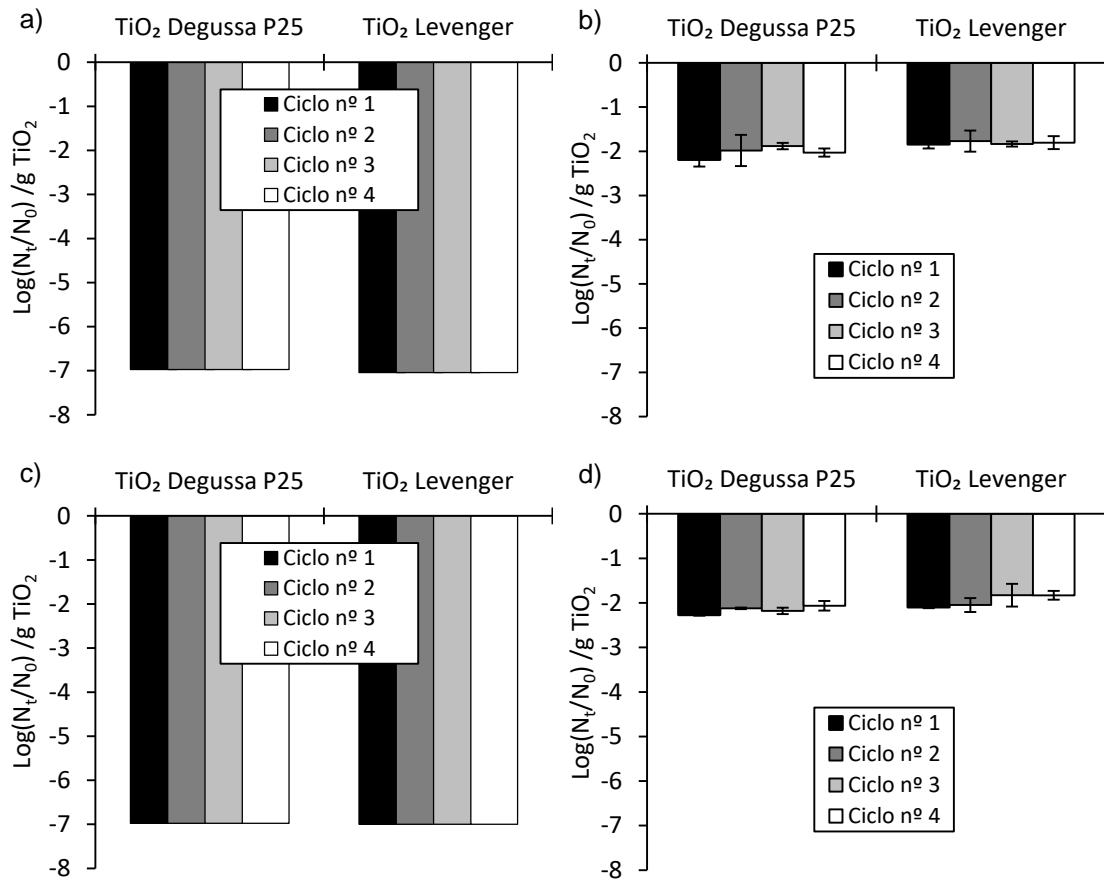


Figura 6.24. Inactivación bacteriana mediante $\text{TiO}_2/\text{UVA-vis}$ durante 4 ciclos de reutilización del catalizador: a) *E. coli* en NaCl, b) *E. coli* en ARPF, c) *Enterococcus sp.* en NaCl y d) *Enterococcus sp.* en ARPF.

En ARPF (Figura 6.24b y d), la inactivación se mantuvo casi invariable tras los 4 ciclos, aunque en algunos casos se produjo una pequeña pérdida de eficacia del catalizador. Cuando hay materia orgánica presente en el agua, ésta puede adsorberse sobre la superficie del TiO_2 , especialmente las fracciones de tamaño pequeño y medio (Drosos et al., 2015). Pese a que la materia orgánica puede degradarse mediante las ROS fotogeneradas (Wiszniewski et al., 2004, Yang y Lee, 2006), parte de ella puede acumularse durante los ciclos, reduciendo así la probabilidad de que las bacterias interaccionen con los electrones, los huecos o las ROS producidas.

Estudios recientes coinciden en que los catalizadores de TiO_2 pueden regenerarse eficazmente con H_2O_2 , en ausencia o presencia de luz UV, recuperando así su fotoactividad inicial. Esto se debe a que la adición de H_2O_2 favorece la formación de $\cdot\text{OH}$ y estos radicales destruyen las especies orgánicas adsorbidas sobre los sitios activos del TiO_2 (Gandhi et al., 2012, Miranda-García et al., 2014).

6.6. Costes de operación

En este apartado se exponen los costes de operación estimados para la desinfección de la matriz de agua residual depurada ARPF mediante los tratamientos UVA-vis, UVA-vis + 680 mg H₂O₂/L, UVA-vis + 1 g TiO₂/L (TiO₂ Degussa P25) y UVA-vis + 1 g TiO₂/L (TiO₂ Degussa) + 680 mg H₂O₂/L.

Para estimar el coste de estos tratamientos se tienen en cuenta los costes relativos a los agentes empleados, TiO₂ y H₂O₂. El precio del TiO₂ Degussa P25 es de 1,55 €/kg, según la empresa Degussa Ibérica S.A. [Lanao, 2012] y se considera que el TiO₂ se puede reutilizar durante al menos 4 ciclos sin perder eficacia. El precio del H₂O₂ es de 0,21€/kg H₂O₂ al 30% p/v, según la empresa suministradora FCM Foret Zaragoza [Lanao, 2012]. Puesto que a escala real el proceso se realizaría en presencia de luz solar natural, no se tiene en cuenta el coste asociado a la lámpara de xenón empleada ni su consumo eléctrico.

Las expresiones utilizadas para el cálculo del coste del dióxido de titanio y del peróxido de hidrógeno son las siguientes (ecuación [6.9] y [6.10]):

- Coste TiO₂ Degussa P25:

$$\text{Coste TiO}_2 \text{ Degussa P25} \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{1 \text{ g TiO}_2}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1,55 \text{ €}}{1000 \text{ g TiO}_2} \quad [6.9]$$

- Coste H₂O₂:

$$\text{Coste H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{€}}{\text{m}^3} \right) = \frac{680 \text{ mg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ L H}_2\text{O}_2}{300000 \text{ mg H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{1,1 \text{ kg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ L H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{0,21 \text{ € H}_2\text{O}_2}{1 \text{ kg H}_2\text{O}_2} \quad [6.10]$$

La Tabla 6.16 recoge el coste de operación de los distintos tratamientos. Se incluye también el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar cada nivel de inactivación de *Enterococcus* sp. Dichos valores se calculan a partir del modelo de Mafart, ya que se ajusta bien en todos los casos estudiados para *Enterococcus* sp. en ARPF. Se toma como referencia la bacteria *Enterococcus* sp. por ser la más resistente a los tratamientos.

Puesto que los reactivos se añaden al principio del tratamiento en una única dosis fija, el coste de los reactivos es independiente del grado de desinfección que se desea alcanzar. Sin embargo, el tiempo de tratamiento sí que aumenta conforme se requiere una inactivación mayor. A escala real, para un caudal determinado, el aumento del tiempo de

tratamiento se traduce en la necesidad de un reactor de mayor volumen y mayor necesidad de superficie disponible, lo que incrementa el precio de la instalación.

Tabla 6.16. Coste de operación y tiempo estimado para la inactivación de *Enterococcus* sp. con los distintos tratamientos basados en UVA-vis, TiO₂ y H₂O₂.

Tratamiento	Coste (€/m ³)	Tiempo (min)					
		-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
UVA-vis	0	268	497	714	923	1127	1326
UVA-vis + H ₂ O ₂	0,5236	94	179	260	339	417	494
UVA-vis + TiO ₂ Degussa	0,3875	52	151	282	441	622	826
UVA-vis + TiO ₂ Degussa + H ₂ O ₂	0,9111	18	33	46	59	72	84

En la Tabla 6.16 se observa que el tratamiento que presenta el menor coste de operación es la irradiación UVA-vis (considerando que se utiliza el sol como fuente de luz natural). El principal inconveniente de este tratamiento es el tiempo de residencia excesivamente prolongado. Por ejemplo, para inactivar -1 log de *Enterococcus* sp. en ARPF serían necesarias 4,5 horas de exposición.

La fotocatalisis con TiO₂ Degussa P25 presenta un coste inferior al resto de tratamientos en los que intervienen reactivos. Se ha tenido en cuenta que este catalizador se puede reutilizar durante 4 ciclos sin perder eficacia, aunque este valor podría ser mayor, lo que reduciría más el coste del tratamiento.

La irradiación UVA-vis con H₂O₂ tiene un coste superior al de la fotocatalisis, debido al precio del H₂O₂, que además es un reactivo que se consume durante el tratamiento.

Finalmente, el coste más elevado es el de la fotocatalisis con H₂O₂, aunque, por otra parte, esta técnica requiere tiempos de exposición mucho más cortos que el resto de tratamientos.

El coste de operación de los tratamientos UVA-vis/H₂O₂, UVA-vis/TiO₂ y UVA-vis/TiO₂/H₂O₂ es notablemente superior al de los tratamientos con ozono y al de la cloración, debido al elevado coste del TiO₂ y del H₂O₂. Aunque el TiO₂ puede reutilizarse, el coste del tratamiento sigue siendo elevado y el tiempo de tratamiento mucho más prolongado que en los otros procesos estudiados.

6.7. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante UVA-vis, UVA-vis/H₂O₂, UVA-vis/TiO₂ y UVA-vis/TiO₂/H₂O₂

- La irradiación UVA-vis (320-800 nm) por sí sola es capaz de inactivar la bacteria *E. coli* tanto en la solución salina como en agua residual depurada (-4 log, en 180 min). En cambio, dicha radiación no consigue inactivar la bacteria *Enterococcus* sp. en ninguno de los dos medios (-0,6 log. en 180 min).
- Cuando las muestras se someten a irradiación UVA-vis durante tiempos cortos de tratamiento (<30 min) se puede producir un recrecimiento posterior de la población bacteriana, independientemente de la matriz. La exposición a UVA-vis durante tiempos de tratamiento más prolongados (>60 min) crea un “efecto residual” sin detectarse recrecimiento e incluso observándose inactivación adicional durante las 48 horas siguientes en oscuridad.
- Sobre *E. coli*, la combinación de UVA-vis con dosis relativamente bajas de H₂O₂ (< 20 mg/L) produce una inactivación similar a la de la irradiación UVA-vis, mientras que la combinación de UVA-vis con dosis elevadas de H₂O₂ (> 200 mg/L) produce un efecto sinérgico, aumentando notablemente su inactivación (-7 log en 30 min). En cambio, sobre *Enterococcus* sp. no se aprecia un fenómeno de sinergia entre la irradiación UVA-vis y el H₂O₂. Incluso utilizando una dosis de H₂O₂ muy elevada (680 mg/L), la inactivación de esta bacteria Gram-positiva es inferior a -1 log tras 60 minutos de tratamiento.
- La irradiación UVA-vis activa el TiO₂, dando lugar a la generación de ROS capaces de inactivar las bacterias presentes en matrices acuosas.
- El poder desinfectante de la fotocátalisis es mucho mayor en la muestra de solución salina (-7 log. *E. coli* en 15 min) que en el agua residual depurada (-5 log. *E. coli* en 180 min) ya que, en general, la presencia de materia orgánica y de algunos iones inorgánicos reduce la probabilidad de interacción entre las bacterias y las ROS generadas.
- El aumento de la concentración del TiO₂ Levenger (0,25 – 1 g/L) aumenta la eficacia de inactivación bacteriana mediante fotocátalisis en los ensayos realizados en solución salina. En cambio, este efecto no se detecta cuando se usa TiO₂ Degussa P25, debido a la rapidez con la que tiene lugar la inactivación en esta matriz.

- La concentración de TiO_2 en el rango estudiado (0,25 – 2 g/L) no influye sobre la inactivación bacteriana mediante fotocátalisis en los ensayos realizados en agua residual depurada, para ninguno de los dos tipos de catalizador.
- Al aplicar la fotocátalisis en la solución salina, se observa que el TiO_2 Degussa P25 inactiva más rápidamente las bacterias que el TiO_2 Levenger, debido a que la adición de este último catalizador aumenta la concentración de iones como SO_4^{2-} y HCO_3^- que reducen la efectividad del proceso, bien sea debido al efecto “scavenger” de ROS que producen o a su adsorción en los sitios activos del fotocatalizador. El tipo de TiO_2 no influye sobre la inactivación bacteriana llevada a cabo en agua residual depurada, ya que en esta matriz ya hay una presencia elevada de esos iones.
- La bacteria *E. coli* es más sensible al tratamiento de fotocátalisis que *Enterococcus* sp.
- Tras la exposición a UVA-vis/ TiO_2 , en la solución salina no se produce recrecimiento bacteriano en la oscuridad en las 48 horas siguientes, incluso con tan solo 15 minutos de tratamiento.
- Tras un tratamiento fotocatalítico de corta duración (<30 min), en el agua residual depurada tiene lugar un pequeño recrecimiento de la población bacteriana en la oscuridad durante las 48 horas siguientes. La exposición a la fotocátalisis durante tiempos más prolongados genera una inactivación adicional en la oscuridad tras el tratamiento.
- En general, la eficacia de la fotocátalisis combinada con H_2O_2 resulta superior a la de la irradiación UVA-vis/ H_2O_2 o a la de la fotocátalisis/ H_2O_2 ya que combina simultáneamente los acción antibacteriana de ambos procesos.
- La bacteria *E. coli* es más sensible al tratamiento de fotocátalisis/ H_2O_2 que *Enterococcus* sp.
- Para ambos tipos de TiO_2 , la sedimentación permite separar la mayor parte del TiO_2 (~90%) de la matriz acuosa en tan solo 60 minutos, tanto en la solución salina como en el agua residual depurada. Sin embargo, para alcanzar valores de turbidez bajos (~10 UNT) se requieren tiempos de sedimentación muy prolongados, incluso de varios días, pudiendo ser necesario un sistema de nanofiltración con membranas para eliminar por completo las nanopartículas de catalizador presentes en el efluente.
- Tras cuatro ciclos, la reutilización de TiO_2 muestra un comportamiento similar para ambos tipos de TiO_2 , manteniendo su poder desinfectante intacto sobre la solución salina y presentando una ligera disminución de la eficacia de inactivación sobre el agua

residual depurada, posiblemente debido a la adsorción de materia orgánica presente sobre el catalizador.

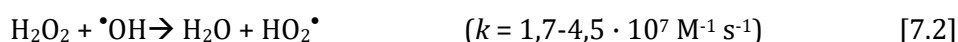
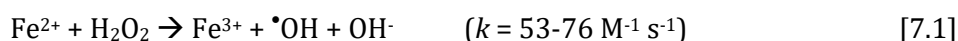
- Para ambos tipos de TiO_2 , la recuperación y reutilización del TiO_2 permite reducir costes de operación manteniendo una eficacia de inactivación similar.
- Sin embargo, aun considerando la reutilización del catalizador, la fotocátalisis con TiO_2 presenta un coste de operación elevado (0,39 €/m³). El tratamiento UVA-vis/ H_2O_2 y la fotocátalisis con $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ muestran un coste de operación mayor (0,52 y 0,91, €/m³, respectivamente), ya que la dosis de H_2O_2 empleada para mejorar la inactivación es muy elevada (680 mg/L).

**Capítulo 7. Inactivación bacteriana
mediante procesos
foto-electro-Fenton**

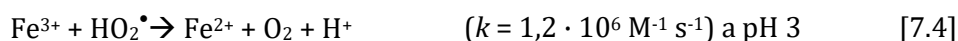
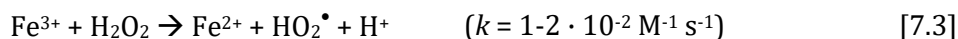
7.1. Antecedentes

7.1.1. Procesos Fenton y foto-Fenton

La reacción Fenton clásica fue descrita por primera vez por Henry J.H. Fenton en 1894 y consiste en la activación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante el ión ferroso (Fe^{2+}) para generar radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (ecuación [7.1]). Además, durante el proceso Fenton pueden generarse otras ROS, como el radical hidropéroxido (ecuación [7.2]) (Haber y Weiss, 1934).



La etapa limitante de este proceso es la regeneración del ión férrico (Fe^{3+}) en el ión ferroso (Fe^{2+}) (ecuaciones [7.3] y [7.4]) (Malato et al., 2009).



Cuando el proceso se lleva a cabo en presencia de luz ($h\nu$) recibe el nombre de foto-Fenton. El Fe^{3+} en disolución acuosa forma complejos $[\text{Fe}^{3+}\text{L}]$ (Zepp et al., 1992), como el hidróxido de hierro $[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$, que pueden reducirse de nuevo a Fe^{2+} al ser irradiados con luz en el rango UV-visible, produciendo a su vez radicales hidroxilo (ecuaciones [7.5] y [7.6])



Uno de los factores más importantes en los procesos Fenton y foto-Fenton es el pH, ya que influye enormemente en la formación de complejos de hierro. Comúnmente se ha postulado que el pH 2,8 es el óptimo para llevar a cabo el tratamiento Fenton clásico y el foto-Fenton debido a que, a este pH, no se produce precipitación del hierro y la especie predominante es $[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$, que es el complejo más foto-reactivo (Malato et al., 2009).

Además del pH, hay otros factores que afectan a la formación de ROS y, por tanto, a la eficacia de los tratamientos Fenton y foto-Fenton, como la concentración de H_2O_2 (Rodríguez-Chueca et al., 2012), la concentración y el tipo de hierro (Jiang et al., 2010,

Maezono et al., 2011), la temperatura (Ortega-Gómez et al., 2012), la presencia de compuestos orgánicos (Spuhler et al., 2010), etc.

Durante los últimos años se está poniendo gran atención al proceso foto-Fenton a pH casi neutro aplicado en la desinfección de aguas. Este tratamiento se ha aplicado con éxito en la inactivación de múltiples microorganismos como bacterias (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*...), hongos (*Fusarium solani*, *Saccharomyces cerevisiae*...) o virus (colífago MS2) (Moncayo-Lasso et al., 2012, Polo-López et al., 2012, Rodríguez-Chueca et al., 2012, Rodríguez-Chueca et al., 2014, Ruales-Lonfat et al., 2014, Ortega-Gómez et al., 2015, Rodríguez-Chueca et al., 2015b, Giannakis et al., 2016c, Giannakis et al., 2017).

Recientemente se han publicado varios artículos que intentan explicar el mecanismo de inactivación que tiene lugar durante el proceso foto-Fenton a pH casi neutro (Spuhler et al., 2010, Giannakis et al., 2016a, b). Dichos mecanismos incluyen tanto los propuestos para la radiación solar (apartado 6.1.2) y la radiación solar con H_2O_2 (apartado 6.1.3), como otros típicos del proceso Fenton. Se trata de un mecanismo complejo en el que se producen multitud de reacciones químicas y fotoquímicas que afectan a diversos componentes de la célula (Figura 7.1).

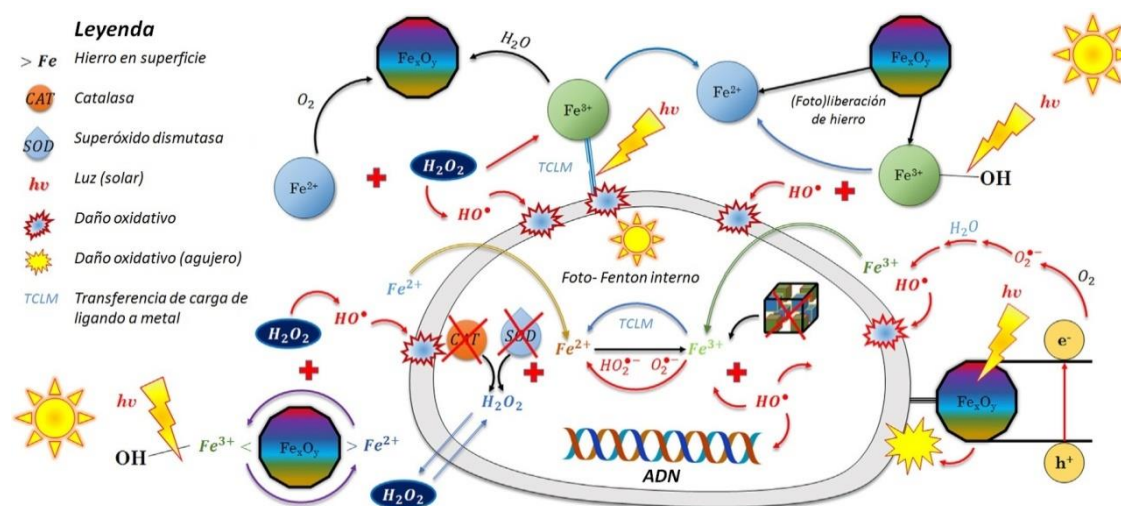


Figura 7.1. Mecanismo de inactivación celular en el proceso foto-Fenton a pH casi neutro (Giannakis et al., 2016a).

En resumen, en presencia de luz, H_2O_2 y Fe^{2+} se produce inicialmente un proceso foto-Fenton homogéneo, que da lugar a la generación de ROS en el agua que pueden degradar la membrana exterior celular. A pH cercano al neutro y en presencia de O_2 y/o H_2O_2 , el Fe^{2+} se oxida rápidamente a Fe^{3+} , el cual forma compuestos poco solubles. Mediante la acción de la luz se producen reacciones fotoquímicas capaces de regenerar el Fe^{3+} en Fe^{2+} y

producir $\cdot\text{OH}$, aumentando así la eficacia del proceso. Además, el H_2O_2 difunde al interior de la célula y neutraliza las enzimas encargadas de reducir el estrés oxidativo (catalasa y superóxido dismutasa) y aumenta la permeabilidad de la membrana. De esta forma, el Fe^{2+} puede difundir en el interior de la célula más fácilmente y contribuir a la formación interna de ROS mediante procesos (foto)-Fenton intracelulares.

El poder residual del proceso foto-Fenton es mayor que el de la radiación solar sola o combinada con H_2O_2 , ya que produce daños celulares más difíciles de reparar, lo que dificulta el crecimiento microbiológico (Spuhler et al., 2010, Valero et al., 2017).

7.1.2. Procesos electro-Fenton y foto-electro-Fenton

La tecnología electro-Fenton se basa en la electrogeneración continua *in-situ* de H_2O_2 junto con la adición de un catalizador de hierro para producir ROS mediante la reacción Fenton (ecuación [7.1]). Si el proceso se lleva a cabo en presencia de luz recibe el nombre de foto-electro-Fenton.

Ambos procesos electroquímicos de oxidación avanzada (electro-Fenton y foto-electro-Fenton) utilizan celdas electrolíticas formadas por un ánodo y un cátodo conectados a una fuente de alimentación. La producción de H_2O_2 tiene lugar mediante disolución de aire u oxígeno en la solución y su reducción en el cátodo o mediante inyección directa del gas mediante un electrodo de difusión de gas (GDE). El cátodo suele estar hecho de mercurio, grafito o fieltro de carbono, mientras que para el ánodo se utilizan materiales como el platino, los óxidos metálicos o el diamante dopado con boro (Brillas et al., 2009). De forma alternativa, pueden emplearse ánodos de sacrificio de hierro o acero para la electrogeneración de iones de hierro en lugar de su adición mediante sales.

Una de las principales ventajas del proceso electro-Fenton sobre el proceso Fenton convencional es que se evitan los problemas asociados con la producción y gestión del H_2O_2 . Por ejemplo, la fabricación de H_2O_2 a escala industrial se lleva a cabo mediante la oxidación de antraquinona, lo que requiere un gran consumo de energía y genera residuos. Además, el transporte, el almacenamiento y la manipulación de H_2O_2 conllevan importantes riesgos (Campos-Martin et al., 2006).

Hay múltiples investigaciones que demuestran la eficacia de los tratamientos electro-Fenton en la eliminación de diversos compuestos orgánicos y en la mineralización de materia orgánica en aguas residuales (Iglesias et al., 2015, Annabi et al., 2016, Ren et al., 2016). Sin embargo, existen pocos estudios en los que se utilice la técnica electro-Fenton para la desinfección de aguas. Da Pozzo et al. (2008) probaron la eficacia del H_2O_2 electro-

generado combinado con sulfato de hierro para la desinfección de agua del mar. Aziz et al. (2013) aplicaron por primera vez el tratamiento electro-Fenton para eliminar bacterias coliformes de lixiviados de vertedero. Recientemente, Cotillas et al. (2015) utilizaron ánodos de sacrificio de hierro y cátodos de fieltro de carbono para promover la reacción Fenton sobre la inactivación de *E. coli* presente en aguas de salida de depuradora.

7.2. Estudio del poder bactericida de agentes físicos y químicos en el proceso objeto de estudio: ensayos previos

7.2.1. Muestras

Se utiliza agua residual depurada sintética (ARDS, apartado 5.2.1) con 0,05 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como electrolito. La muestra se esteriliza y se fortifica con la bacteria de estudio *Staphylococcus aureus* (apartado 2.2.2), obteniéndose una concentración bacteriana de 10^6 - 10^7 UFC/100 mL.

7.2.2. Agentes desinfectantes

7.2.2.1. Sal de Fe^{2+}

Se utiliza sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de marca Merck. Se adiciona a la muestra en forma de disolución concentrada, preparada en agua milli-Q inmediatamente antes de realizar el experimento.

7.2.2.2. Sal de Fe^{3+}

Se utiliza sulfato de hierro (III) nonahidratado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de marca Merck. Se adiciona a la muestra en forma de disolución concentrada, preparada en agua milli-Q inmediatamente antes de realizar el experimento.

7.2.2.3. Irradiación UVA

Se utiliza una lámpara que emite a 368 nm (luz UVA) y 4 W. La lámpara tiene forma cilíndrica y mide 1,5 cm de diámetro por 10,5 cm de largo. La intensidad de radiación suministrada es de $\sim 800 \text{ W/m}^2$.

7.2.2.4. Celda electrolítica

La celda electrolítica utilizada se encuentra situada en el laboratorio del *Grupo de Investigación en Remediación Ambiental y Biocatálisis* de la Universidad de Antioquia. La Figura 7.2 muestra un esquema del equipo utilizado.

La celda se compone de un reactor de cristal cilíndrico de unos 350 mL de capacidad en cuyo interior se hallan un cátodo, un ánodo y una lámpara UVA (descrita en el apartado 7.2.2.3). El reactor se forra con papel de aluminio para evitar que la luz entre o salga del reactor.

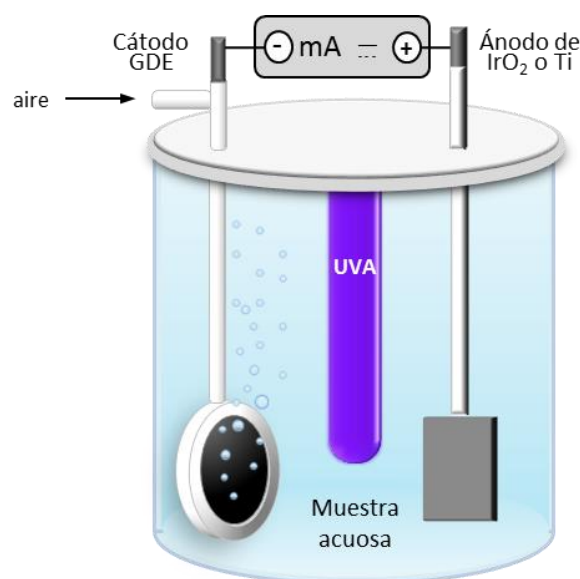


Figura 7.2. Esquema de la celda electrolítica utilizada en los ensayos electroquímicos.

El cátodo es un electrodo de difusión de gas (GDE) compuesto por una membrana circular de grafito de $\sim 4,9$ cm² a través de la cual se suministra una corriente de aire constante. De esta forma se proporciona oxígeno y agitación continua en el reactor.

Se utilizan dos tipos de ánodo: de óxido de iridio (IrO₂) o de titanio (Ti), cada uno con una superficie de trabajo de ~ 4 cm².

Los electrodos (cátodo y ánodo) están conectados a una fuente de alimentación que mantiene una intensidad de corriente constante (condiciones galvanostáticas) durante los experimentos y proporciona el valor del voltaje en cada momento.

7.2.3. Efecto del pH del medio

7.2.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para evaluar el efecto de la acidez del medio en la supervivencia de *S. aureus* se realizan ensayos a pH 3. Para ello, se colocan en un reactor de cristal 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añade H₂SO₄ (96%, Merck), diluido 1:10, hasta alcanzar pH 3. La muestra se mantiene con agitación constante y luz ambiental. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus* y el pH.

7.2.3.2. Resultados y discusión

La Figura 7.3a muestra la inactivación de *S. aureus* durante la exposición a pH 3. La Figura 7.3b ilustra la evolución del pH durante el ensayo.

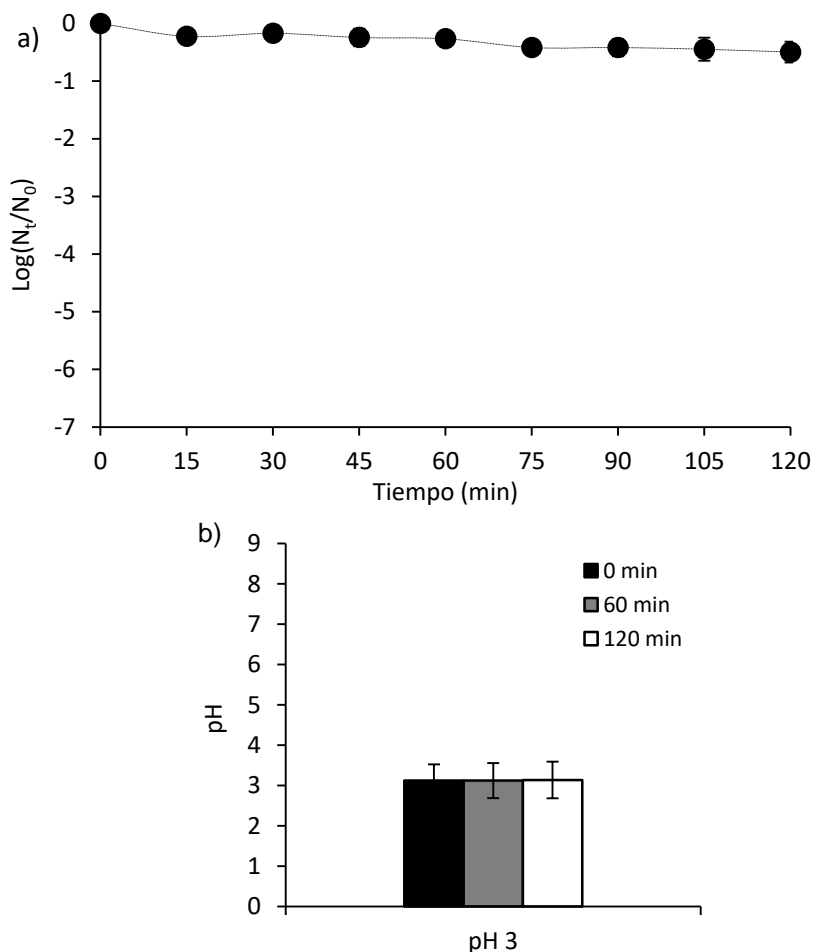


Figura 7.3. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y b) el pH durante el ensayo a pH 3.

La inactivación de *S. aureus* tras 120 minutos de tratamiento a pH 3 fue de -0,5 unidades logarítmicas. Por tanto, este resultado descarta un efecto importante del pH del medio sobre la inactivación de *S. aureus*.

7.2.4. Efecto de la irradiación UVA

7.2.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto de la irradiación UVA, se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1. Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se enciende la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). La celda electrolítica permanece apagada durante todo el experimento. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH y la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 . Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

En paralelo a cada ensayo, se realizan experimentos para controlar el estado de la cepa de *S. aureus*. Se colocan 250 mL de muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 en reactores de cristal con agitación constante y luz ambiental y se determina la concentración bacteriana al inicio y al final de los ensayos. Estos experimentos control se realizan para todos los ensayos descritos en el presente capítulo de la memoria (Capítulo 7). No se observa mortalidad de las bacterias en ninguno de los controles.

7.2.4.2. Resultados y discusión

La Figura 7.4a muestra los resultados de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante irradiación UVA, así como la concentración de oxidantes totales y H_2O_2 . La Figura 7.4b muestra la evolución del pH durante el tratamiento.

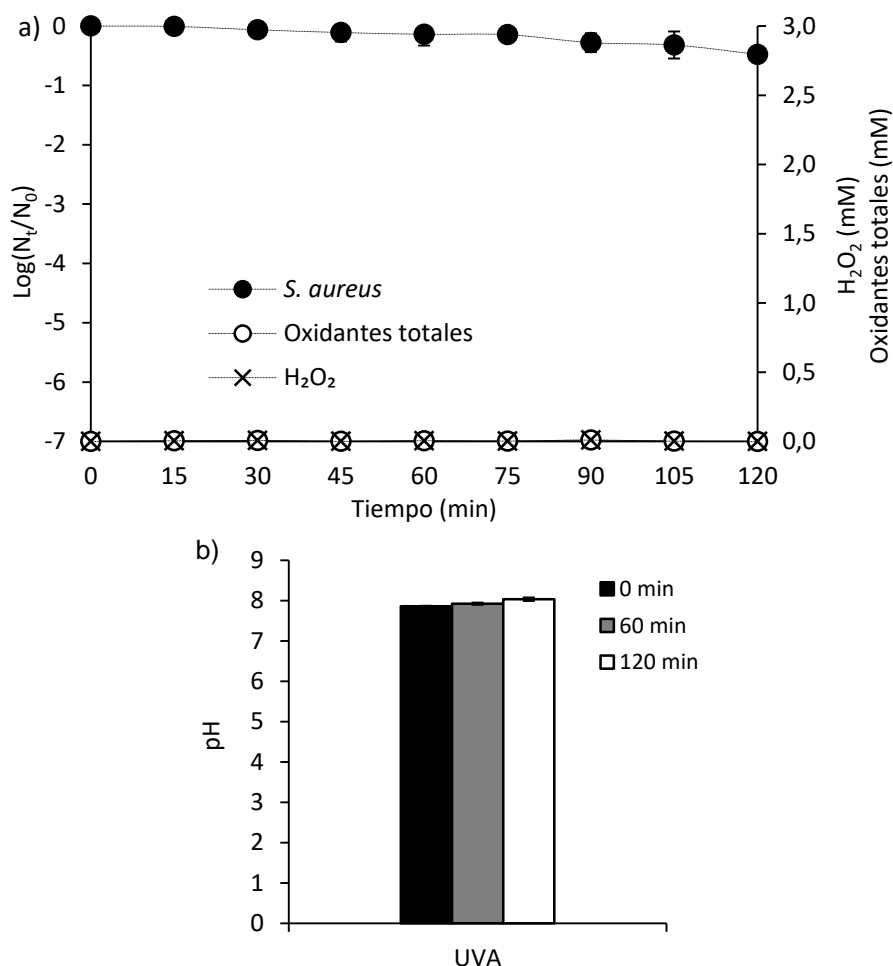


Figura 7.4. Evolución de a) la concentración de *S. aureus*, la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 y b) el pH, durante el tratamiento de irradiación UVA en ARDS.

En la Figura 7.4a se observa que mediante el tratamiento con irradiación UVA apenas se produjo inactivación de *S. aureus* (-0,5 log) tras 120 minutos. Además, no se detectaron H_2O_2 ni otro tipo de oxidantes. Respecto al pH, la Figura 7.4b muestra un ligero aumento,

que suele asociarse al aumento de la temperatura durante el tratamiento (Sousa et al., 2012).

La luz UVA (368 nm) utilizada en estos ensayos no es lo suficientemente energética como para causar directamente daños severos en el ADN celular. Sin embargo, en la Figura 7.4a se observa que una pequeña parte de la población de *S. aureus* se inactiva (-0,5 log). La irradiación UVA puede inducir la excitación de moléculas foto-sensibles presentes en la célula. Esto puede dar lugar a la foto-oxidación directa de las proteínas de la membrana y a la producción de ROS, las cuales pueden atacar el ADN y producir alteraciones de las funciones vitales, causando finalmente la inactivación bacteriana (Robertson et al., 2005, Ubomba-Jaswa et al., 2009, Giannakis et al., 2015b).

Entre las ROS que pueden generarse en el interior de la célula como consecuencia de la exposición a la irradiación UVA, puede haber pequeñas cantidades de H₂O₂ (Giannakis et al., 2016a). Puesto que este compuesto se forma dentro de la célula y en muy baja concentración no se detecta su presencia en la solución.

7.2.5. Efecto de la celda electrolítica (desinfección electroquímica)

7.2.5.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto de la celda electrolítica, es decir, si se produce desinfección electroquímica (DEQ), se utiliza la celda electrolítica (apartado 7.2.2.4) con el cátodo GDE y el ánodo de IrO₂. Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1. Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se enciende la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 20 mA, valor utilizado previamente por otros autores en tratamientos electroquímicos (Serna-Galvis et al., 2016, Serna-Galvis et al., 2017). Los ensayos se realizan en oscuridad. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH y la acumulación de oxidantes totales y H₂O₂. Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

Se realiza también un ensayo control de generación de oxidantes totales y de H₂O₂ (Control 20 mA). Para ello se aplica el tratamiento electroquímico con el ánodo IrO₂, el cátodo GDE y 20 mA de intensidad a una muestra ARDS que no contiene materia orgánica (urea, peptona y extracto de carne) ni bacterias. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar el pH y la acumulación de oxidantes totales y H₂O₂.

7.2.5.2. Resultados y discusión

En primer lugar, cabe destacar que en todos los experimentos electro-químicos la concentración de oxidantes totales fue muy similar a la de H₂O₂ para cada tiempo de tratamiento. Esto significa que, bajo las condiciones de trabajo empleadas, prácticamente la única especie oxidante generada fue H₂O₂ (ecuación [7.7]). Por tanto, para facilitar la interpretación de las figuras, sólo se incluye la concentración de H₂O₂. En el Anexo II se muestran las figuras en las que se representa la formación de oxidantes totales y de H₂O₂ a lo largo de cada tratamiento.



Además, hay que tener en cuenta que, al ser el H₂O₂ la especie mayoritaria, la formación de especies reactivas del oxígeno (H₂O₂, •OH, HO₂•...) predominará sobre la producción de especies reactivas del cloro (Cl₂, ClO⁻, HOCl...) y, por tanto, la formación de THMs será mínima (Huang et al., 2016).

La Figura 7.5a muestra la inactivación de *S. aureus* y la acumulación de H₂O₂ durante la desinfección electroquímica con el ánodo de IrO₂, el cátodo GDE y 20 mA de intensidad. En la Figura 7.5a se incluye también la acumulación de H₂O₂ que se produce durante el ensayo control realizado con la celda electrolítica (Control 20 mA) en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias. La Figura 7.5b ilustra la evolución del pH en ambos ensayos.

La aplicación de la celda electrolítica dio lugar a una ligera reducción de la población bacteriana (-0,4 log) tras 120 minutos (Figura 7.5a). Durante este tratamiento electroquímico se generó H₂O₂ en el cátodo, que se fue acumulando progresivamente, mostrando una concentración ligeramente inferior a la medida en el experimento control en ausencia de materia orgánica y bacterias. De la totalidad de H₂O₂ acumulado tras 120 minutos (1,6 mM ó 54 mg H₂O₂/L), tan solo se consumieron 0,07 mM H₂O₂ (2,4 mg H₂O₂/L), debido a su reacción con la materia orgánica (urea, peptona y extracto de carne) y/o las bacterias presentes en la muestra. El H₂O₂ es capaz de atacar directamente algunos compuestos presentes en la membrana celular, aumentando así su permeabilidad y reduciendo la viabilidad de la célula. Además, el H₂O₂ puede difundir al interior de las células y aumentar la probabilidad de reacciones Fenton intracelulares (Spuhler et al., 2010). Sin embargo, bajo las condiciones de trabajo aplicadas, el efecto del H₂O₂ en oscuridad sobre la inactivación bacteriana fue muy pequeño.

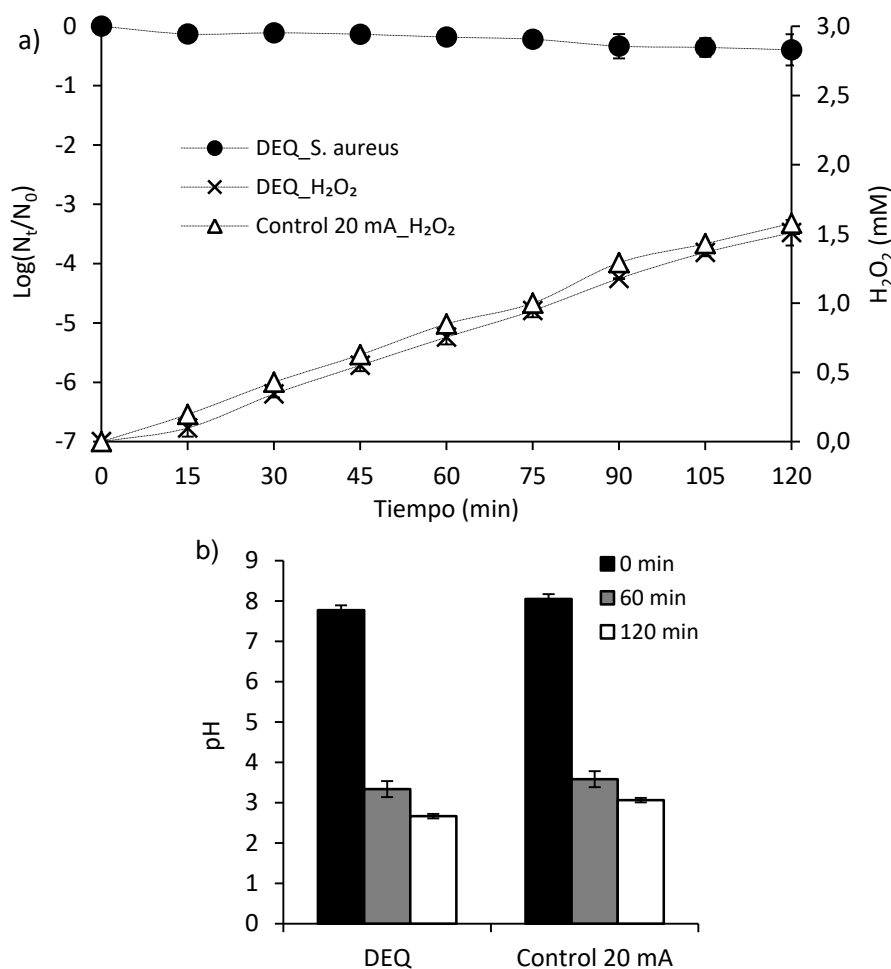


Figura 7.5. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H₂O₂ y b) el pH, durante el tratamiento de desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO₂_20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H₂O₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 20 mA.

Por otra parte, en la Figura 7.5b se observa que, en presencia de corriente eléctrica, el pH de la muestra disminuyó hasta pH~3 tras 60 minutos de tratamiento. En el ensayo realizado a pH 3 en ausencia de luz UVA y de corriente eléctrica (apartado 7.2.3), se comprueba que el bajo pH del medio no produce apenas inactivación bacteriana.

La acidificación de la muestra puede deberse a la oxidación anódica del agua (Panizza y Cerisola, 2009) o a la formación de ácidos carboxílicos durante la transformación de la materia orgánica presente (Dbira et al., 2015). En los experimentos control en ausencia de materia orgánica se observó la misma bajada de pH (Control 20 mA, Figura 7.5b). Por tanto, la reducción del pH se produjo principalmente por la oxidación del agua en la superficie del ánodo (S) (ecuación [7.8]).

Dicha reacción da lugar a la generación de radicales hidroxilo adsorbidos sobre la superficie del ánodo, S[*OH], los cuales pueden reaccionar con las moléculas de agua

(ecuación [7.9]), aumentando así la producción de H^+ y causando la consiguiente disminución de pH (Panizza y Cerisola, 2009).



7.2.6. Efecto de la combinación de la celda electrolítica con irradiación UVA (desinfección foto-electroquímica)

7.2.6.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto de la celda electrolítica combinada con irradiación UVA, es decir, de la desinfección foto-electroquímica (DFEQ), se utiliza la celda electrolítica (apartado 7.2.2.4) con el cátodo GDE y el ánodo de IrO_2 y la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1. Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se encienden la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 20 mA, y la lámpara UVA. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH y la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 . Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

7.2.6.2. Resultados y discusión

La Figura 7.6a representa la inactivación de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 durante el tratamiento de desinfección foto-electroquímica (DFEQ). La Figura 7.6b ilustra la evolución del pH en dicho tratamiento. En la Figura 7.6a se incluye también la acumulación de H_2O_2 que se produce durante el ensayo control realizado con la celda electrolítica (Control 20 mA) en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias (procedimiento descrito en el apartado 7.2.5.1).

Al combinar la celda electrolítica con irradiación UVA (GDE+ IrO_2 +UVA) la inactivación bacteriana aumentó notablemente, eliminando -3,7 unidades logarítmicas de *S. aureus* tras 120 minutos (Figura 7.6a).

En comparación con el tratamiento en ausencia de luz (DEQ, Figura 7.5a), la desinfección foto-electroquímica (DFEQ, Figura 7.6a) fue más eficaz. Inicialmente se produjo una

tendencia de inactivación de *S. aureus* similar en ambos tratamientos. Después, aproximadamente tras 60 minutos, la velocidad de inactivación y el consumo de H₂O₂ empezaron a aumentar en el proceso DFEQ, en relación a los valores observados en el sistema DEQ. De hecho, tras 120 minutos de tratamiento, el consumo de H₂O₂ fue mayor en el proceso DFEQ (0,32 mM H₂O₂ ≈ 11 mg H₂O₂/L) que en el sistema DEQ (0,07 mM H₂O₂ ≈ 2,4 mg H₂O₂/L). Por tanto, cuanto mayor es el consumo de H₂O₂, mayor inactivación bacteriana se produce.

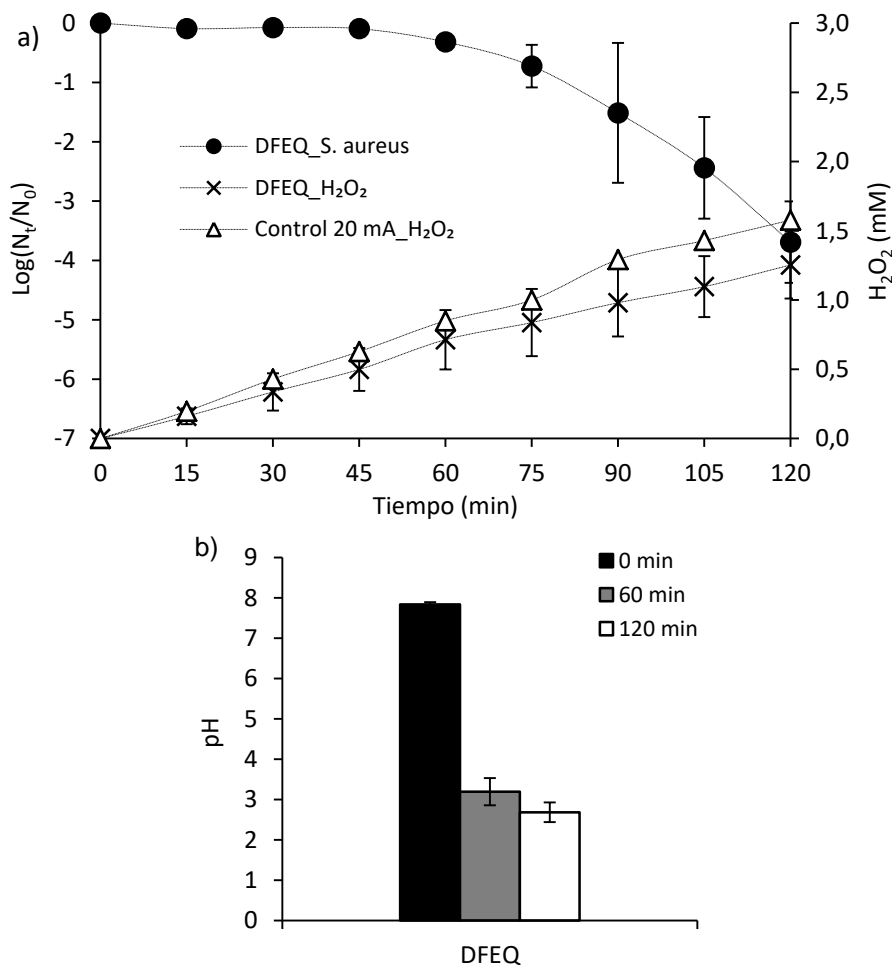


Figura 7.6. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H₂O₂ y b) el pH, durante el tratamiento de desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO₂ 20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H₂O₂ durante el ensayo Control 20 mA.

La inactivación observada se debe probablemente al efecto sinérgico que presenta la combinación de irradiación UVA con H₂O₂ (Hartman y Eisenstark, 1978). En el interior de las células existen proteínas y “clusters” de sulfuro de hierro de los cuales se puede liberar hierro. Al difundir el H₂O₂ electro-generado al interior de la célula, éste puede reaccionar con el hierro liberado, produciendo reacciones Fenton y foto-Fenton internas (Spuhler et al., 2010). Por otra parte, la luz UVA puede inactivar la catalasa y la superóxido dismutasa

intracelulares, unas enzimas que generan las bacterias para protegerse frente al estrés oxidativo. De esta forma aumenta el efecto letal del H_2O_2 , ya que disminuyen las defensas de la célula (Giannakis et al., 2016a).

En lo que se refiere al pH, durante el tratamiento realizado con la celda electrolítica y UVA (Figura 7.6b), se observa una bajada hasta pH ~ 3 . Esta evolución del pH fue muy similar a la observada en el tratamiento electroquímico en ausencia de luz (DEQ, Figura 7.5b). Esto confirma que durante la aplicación de los tratamientos electroquímicos en los que interviene la celda electrolítica se produce la acidificación de la muestra.

7.2.7. Efecto de la combinación de la celda electrolítica y Fe^{2+} (proceso electro-Fenton)

7.2.7.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto del sistema electro-Fenton (EF) se utiliza la celda electrolítica (apartado 7.2.2.4) con el cátodo GDE y el ánodo IrO_2 . Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añaden 5 mg Fe^{2+}/L (apartado 7.2.2.1). Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se enciende la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 20 mA. Los ensayos se realizan en oscuridad. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH, el COD y la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 . Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

7.2.7.2. Resultados y discusión

La Figura 7.7 muestra la inactivación de *S. aureus* y la concentración de H_2O_2 (Figura 7.7a), la evolución del pH (Figura 7.7b) y la eliminación de COD (Figura 7.7c) durante el tratamiento electro-Fenton (EF). En la Figura 7.7a se incluye también la acumulación de H_2O_2 que se produce durante el ensayo control realizado con la celda electrolítica (Control 20 mA) en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias (procedimiento descrito en el apartado 7.2.5.1).

Se observa que el proceso electro-Fenton produjo una ligera reducción de la población bacteriana ($-0,9$ log) tras 120 minutos de tratamiento (Figura 7.7a). Aunque no se trata de un valor de desinfección muy elevado, sí que es superior (casi el doble) al de la inactivación alcanzada en ausencia de hierro (DEQ, Figura 7.5a). En el sistema electro-Fenton, el H_2O_2 electro-generado reacciona con el Fe^{2+} añadido iniciando una cadena de

reacciones que conlleva la producción de ROS en la muestra acuosa (ecuaciones [7.1] y [7.2]) (Fenton, 1894, Haber y Weiss, 1934). Las ROS producidas, como el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ o el hidropéroxido $\text{HO}_2\cdot$, son capaces de atacar las células bacterianas desde el exterior. Durante el proceso electro-Fenton, el consumo de H_2O_2 calculado respecto al control es de 0,27 mM (9,2 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$), lo que confirma la reacción entre el H_2O_2 y el Fe^{2+} , ya que en ausencia de hierro (DEQ, Figura 7.5a) el consumo fue mucho menor (0,07 mM H_2O_2).

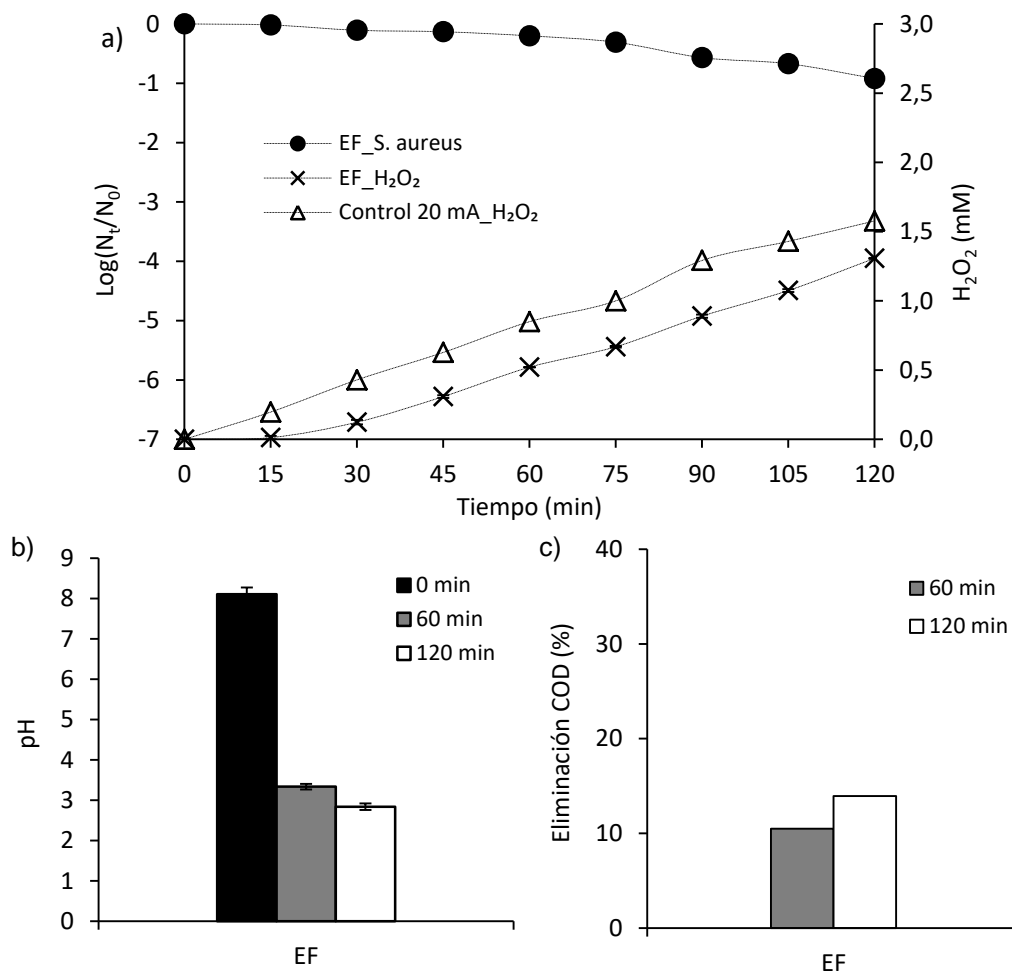
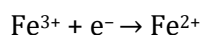


Figura 7.7. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento electro-Fenton (EF, GDE+ IrO_2 +5mg Fe^{2+}/L , 20 mA) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H_2O_2 durante el ensayo Control 20 mA.

Durante el proceso electro-Fenton se pueden producir continuamente radicales $\cdot\text{OH}$ como consecuencia de la electro-regeneración catódica del Fe^{3+} en Fe^{2+} (ecuación [7.10]).



[7.10]

Sin embargo, esta reacción es lenta en los cátodos GDE (Petrucci et al., 2009, Qiu et al., 2015). Además, la regeneración del Fe^{2+} como resultado de la reducción del Fe^{3+} en presencia de H_2O_2 (ecuación [7.3]) es limitada. Por tanto, la inactivación bacteriana alcanzada mediante el proceso electro-Fenton es también limitada.

La evolución del pH durante el proceso electro-Fenton (Figura 7.7b) es similar a la observada para los tratamientos DEQ y DFEQ, alcanzando valores cercanos a $\text{pH} \sim 3$ tras 120 minutos de aplicación.

Por último, en la Figura 7.7c se observa que tras 120 minutos de tratamiento EF se alcanza una reducción de COD del 14%, produciéndose la mayor eliminación de COD durante los primeros 60 minutos (11 % de mineralización). Este resultado demuestra que las ROS producidas no sólo fueron capaces de eliminar la bacteria *S. aureus* sino también de degradar parte de la materia orgánica presente en la muestra.

7.2.8. Modelización cinética

Las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas en los ensayos de irradiación UVA, DEQ, DFEQ y EF (Figura 7.4-7.7) se analizan mediante cuatro modelos cinéticos: el modelo de Hom, el modelo bifásico, el modelo de Mafart y el modelo de Geeraerd.

Las Tabla 7.1-7.4 recogen los parámetros cinéticos calculados y el ajuste de los modelos a los resultados de inactivación observados, expresado mediante *ECM* y *r*.

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).

Bacteria	Tratamiento	k^* (min^{-1})	m	ECM	r
<i>S. aureus</i>	UVA	$1,0 \cdot 10^{-4}$	1,75	0,03	0,98
	DEQ (GDE + IrO_2 _20 mA)	$5,0 \cdot 10^{-3}$	0,91	0,03	0,97
	DFEQ (GDE + IrO_2 + UVA _20 mA)	$1,8 \cdot 10^{-6}$	3,04	0,08	1,00
	EF (GDE + IrO_2 + Fe^{2+} _20 mA)	$5,9 \cdot 10^{-5}$	2,01	0,03	0,99

Tabla 7.2. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).

Bacteria	Tratamiento	P	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	ECM	r
<i>S. aureus</i>	UVA	1,00000	0,007	0,007	0,05	0,91
	DEQ (GDE + IrO_2 _20 mA)	1,00000	0,007	0,007	0,04	0,94
	DFEQ (GDE + IrO_2 + UVA _20 mA)	1,00000	0,046	0,046	0,68	0,78
	EF (GDE + IrO_2 + Fe^{2+} _20 mA)	1,00000	0,014	0,014	0,11	0,91

Tabla 7.3. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).

Bacteria	Tratamiento	p	δ (min)	ECM	r
<i>S. aureus</i>	UVA	1,81	186	0,03	0,98
	DEQ (GDE + IrO ₂ _ 20 mA)	0,91	332	0,03	0,97
	DFEQ (GDE + IrO ₂ + UVA _ 20 mA)	3,30	81	0,06	1,00
	EF (GDE + IrO ₂ + Fe ²⁺ _ 20 mA)	2,02	126	0,03	0,99

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a las curvas de inactivación bacteriana en ARDS mediante UVA, desinfección electroquímica (DEQ), desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y electro-Fenton (EF).

Bacteria	Tratamiento	SI (min)	k _{máx} (min ⁻¹)	ECM	r
<i>S. aureus</i>	UVA	98,07	0,03	0,03	0,97
	DEQ (GDE + IrO ₂ _ 20 mA)	80,10	0,01	0,05	0,91
	DFEQ (GDE + IrO ₂ + UVA _ 20 mA)	75,47	0,16	0,19	0,98
	EF (GDE + IrO ₂ + Fe ²⁺ _ 20 mA)	69,79	0,04	0,04	0,99

La Figura 7.8, la Figura 7.9, la Figura 7.10 y la Figura 7.11 representan gráficamente el ajuste de cada modelo propuesto a los datos experimentales de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante irradiación UVA, DEQ, DFEQ y EF, respectivamente. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I.XXXV-I.XXXVIII).

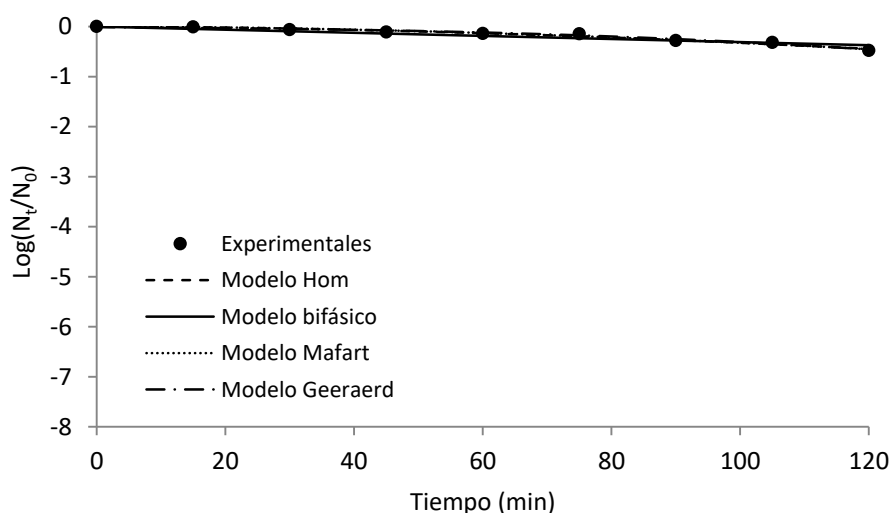


Figura 7.8. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenida mediante irradiación UVA.

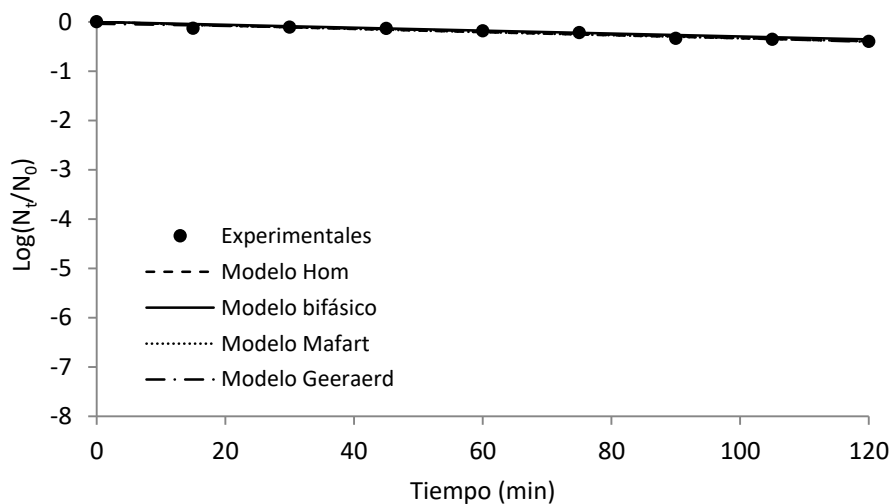


Figura 7.9. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenida mediante desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO₂_20 mA).

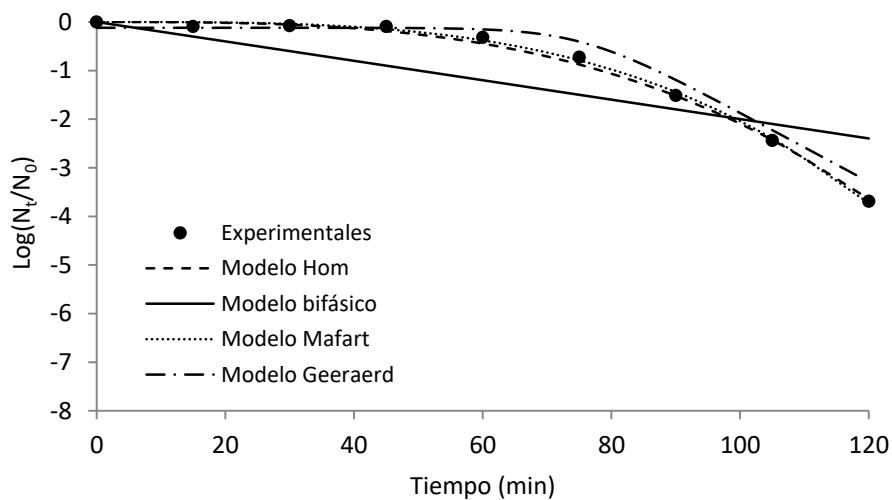


Figura 7.10. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenida mediante desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO₂+UVA_20 mA).

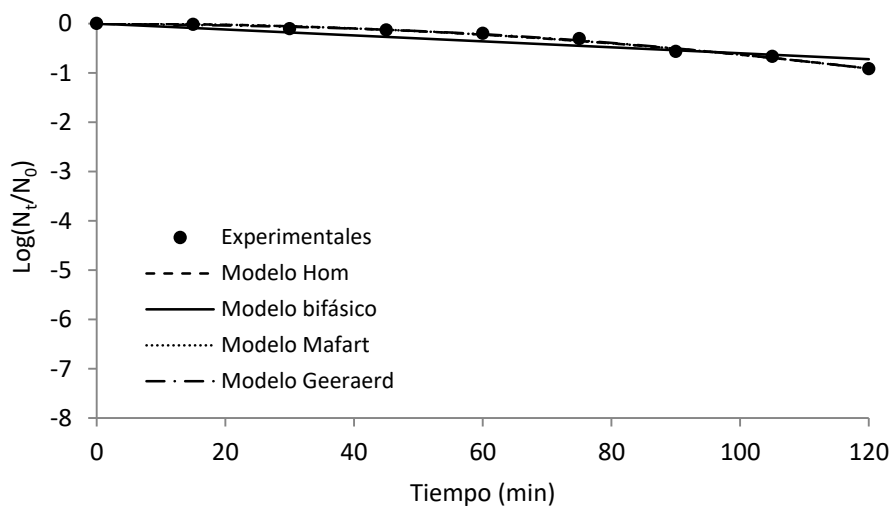


Figura 7.11. Ajuste de los modelos matemáticos a la curva de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenida mediante electro-Fenton (EF, GDE+IrO₂+5mg Fe²⁺/L_20 mA).

En general, los modelos de Hom, Mafart y Geeraerd presentan un buen ajuste a los datos experimentales, tal y como indican los valores ECM y r (Tabla 7.1, 7.3 y 7.4) y las representaciones gráficas (Figura 7.8, 7.10 y 7.11). En cambio, el modelo bifásico (Tabla 7.2 y Figura 7.9) no sirve para describir los datos experimentales obtenidos, ya que el valor estimado para el parámetro k_1 es exactamente igual al estimado para k_2 .

Los parámetros m del modelo de Hom y p del modelo de Mafart (Tabla 7.1 y 7.3) muestran valores superiores a 1 (excepto mediante desinfección electro-química), indicando que las curvas de inactivación tienen forma convexa y que existe probabilidad de que se produzca efecto de hombro pero no de cola. Además, el parámetro δ del modelo de Mafart indica que la desinfección más rápida se produce mediante DFEQ, seguida de EF, UVA y finalmente DEQ. Los valores estimados para el parámetro $k_{m\acute{a}x}$ del modelo de Geeraerd (Tabla 7.4) muestran esta misma tendencia respecto a la efectividad de los tratamientos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en los cuatro casos estudiados (UVA, DEQ, DFEQ y EF) se podría aplicar el modelo de Geeraerd pero considerando que no existe fenómeno de cola, por lo que el valor correspondiente a la concentración de bacterias supervivientes (N_{res} , ecuación [2.21]) toma el valor de 0.

7.3. Estudio del poder bactericida del proceso foto-electro-Fenton

7.3.1. Proceso foto-electro-Fenton

7.3.1.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar la eficacia del sistema foto-electro-Fenton (FEF) se utilizan la celda electrolítica con el cátodo GDE y el ánodo de IrO_2 (apartado 7.2.2.4) y la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añaden 5 mg Fe^{2+}/L (apartado 7.2.2.1). Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se encienden la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 20 mA, y la lámpara UVA. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH, el COD y la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 . Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

7.3.1.2. Resultados y discusión

La Figura 7.12 muestra la inactivación de *S. aureus* y la concentración de H_2O_2 (Figura 7.12a), la evolución del pH (Figura 7.12b) y la eliminación de COD (Figura 7.12c) durante el tratamiento foto-electro-Fenton (FEF). En la Figura 7.12a se incluye también la acumulación de H_2O_2 que se produce durante el ensayo control realizado con la celda electrolítica (Control 20 mA) en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias (procedimiento descrito en el apartado 7.2.5.1).

La aplicación del proceso foto-electro-Fenton produjo una inactivación bacteriana importante, obteniéndose -5,2 unidades logarítmicas de desinfección tras 120 minutos de tratamiento (Figura 7.12a). La combinación de irradiación UVA, H_2O_2 y Fe^{2+} tiene un efecto sinérgico, ya que la eficacia que presenta el proceso FEF es muy superior a la del sistema DFEQ, a la del proceso EF o a la suma de ambos. Cuando el proceso Fenton se lleva a cabo en presencia de luz, el Fe^{3+} generado durante la reacción del H_2O_2 con Fe^{2+} (ecuación [7.1]), se puede reducir de nuevo a Fe^{2+} (ecuaciones [7.5] y [7.6]), aumentando así la producción de $\cdot\text{OH}$ y acelerando la reacción Fenton (Zepp et al., 1992, Lopez-Alvarez et al., 2012).

Esta hipótesis queda confirmada por el elevado consumo de H_2O_2 que tuvo lugar durante el proceso foto-electro-Fenton (Figura 7.12a). Tras 120 minutos de tratamiento se consumieron 1,07 mM H_2O_2 (36 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$), valor mucho mayor que el observado en los

sistemas descritos anteriormente (apartado 7.2). La desaparición de H_2O_2 está relacionada con su intervención en reacciones de formación de ROS, por tanto, el elevado consumo de H_2O_2 indica una generación de ROS significativa en la solución. Los radicales generados pueden inducir la peroxidación de los lípidos que forman la membrana celular, modificar la permeabilidad de la célula y reducir la actividad enzimática, facilitando así que el H_2O_2 y/o el hierro externos difundan al interior de la célula (Cabisco et al., 2000). De esta forma la inactivación bacteriana durante el tratamiento foto-Fenton está controlada por mecanismos internos y externos de formación de ROS (Ruales-Lonfat et al., 2014).

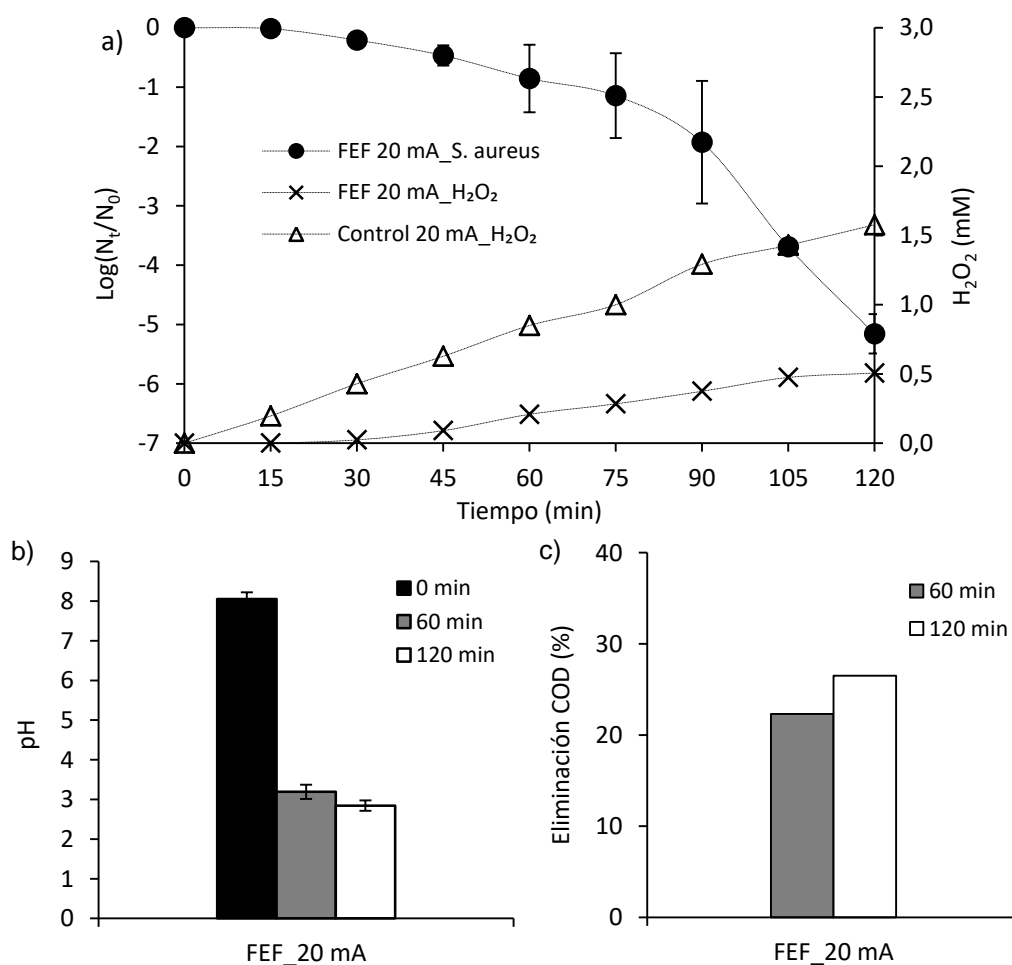


Figura 7.12. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 20 mA (FEF_20 mA, GDE+IrO₂+UVA+5mg Fe²⁺/L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H_2O_2 durante el ensayo Control 20 mA.

La evolución del pH durante el tratamiento foto-electro-Fenton (Figura 7.12b) es similar a la observada en el resto de tratamientos en los que interviene la celda electrolítica (DEQ, DFEQ y EF), alcanzando un pH final cercano a 3, debido a la oxidación anódica del agua.

La Figura 7.12c muestra que el proceso FEF produjo una mineralización del 26% del COD tras 120 minutos. Este valor es superior al observado mediante EF (Figura 7.7c), aunque en ambos procesos la mayor parte de la degradación del COD se produjo durante los

primeros 60 minutos. Estos resultados confirman que la baja velocidad de inactivación de *S. aureus* observada al principio del tratamiento FEF se debe a que gran parte de las ROS generadas está reaccionando con la materia orgánica en lugar de con las bacterias.

7.3.2. Efecto de la intensidad de corriente

7.3.2.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto de la intensidad de corriente en el sistema foto-electro-Fenton se llevan a cabo ensayos con 30 y 40 mA, además de los realizados con 20 mA (apartado 7.3.1). Para ello se utilizan la celda electrolítica con el cátodo GDE y el ánodo de IrO₂ (apartado 7.2.2.4) y la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añaden 5 mg Fe²⁺/L (apartado 7.2.2.1). Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se encienden la fuente de alimentación de la celda electrolítica y la lámpara UVA. Se realizan ensayos con una intensidad de corriente de 30 mA y de 40 mA. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH, el COD y la acumulación de oxidantes totales y H₂O₂. Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

Se realizan también ensayos control de generación de oxidantes totales y de H₂O₂, similares al descrito en el apartado 7.2.5.1. Para ello se aplica el tratamiento electroquímico con el ánodo IrO₂ y el cátodo GDE a una muestra ARDS que no contiene materia orgánica (urea, peptona y extracto de carne) ni bacterias. Se realizan ensayos con una intensidad de corriente de 30 mA (Control 30 mA) y de 40 mA (Control 40 mA). Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar el pH y la acumulación de oxidantes totales y H₂O₂.

7.3.2.2. Resultados y discusión

La Figura 7.13 y la Figura 7.14 muestran la inactivación de *S. aureus*, la acumulación de H₂O₂, la evolución del pH y la eliminación de COD que tienen lugar mediante el proceso foto-electro-Fenton (GDE+IrO₂+UVA+5mg Fe²⁺/L) trabajando con una intensidad de corriente de 30 mA y de 40 mA, respectivamente. Se incluyen también los resultados de producción de H₂O₂ y evolución de pH obtenidos durante los ensayos control en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias con la celda electrolítica a una intensidad de 30 mA (Control 30 mA) y 40 mA (Control 40 mA).

En los ensayos control con 20 mA, 30 mA y 40 mA (Figuras 7.12a, 7.13a y 7.14a, respectivamente) se observa que la producción de H₂O₂ es casi lineal con el tiempo. Además, cuanto mayor es la intensidad de corriente, mayor cantidad de H₂O₂ se produce, aunque este aumento no es directamente proporcional. Por ejemplo, con la intensidad de 40 mA, la concentración de H₂O₂ debería de ser el doble que la obtenida con 20 mA. Sin embargo, en el control con 40 mA (Figura 7.14 a) se obtiene una producción al final del tratamiento (120 minutos) de 2,8 mM H₂O₂, valor algo menor del esperado (3,2 mM H₂O₂ = 2 x 1,6 mM H₂O₂, Figura 7.12a). Esto se debe a que, al aumentar la corriente, las probabilidades de que el electrodo se polarice son mayores, lo que favorece la descomposición catódica del H₂O₂ en H₂O (ecuación [7.11]) y, por tanto, reduce la disponibilidad de H₂O₂ y la eficiencia del sistema (Xu et al., 2010, Petrucci et al., 2016).

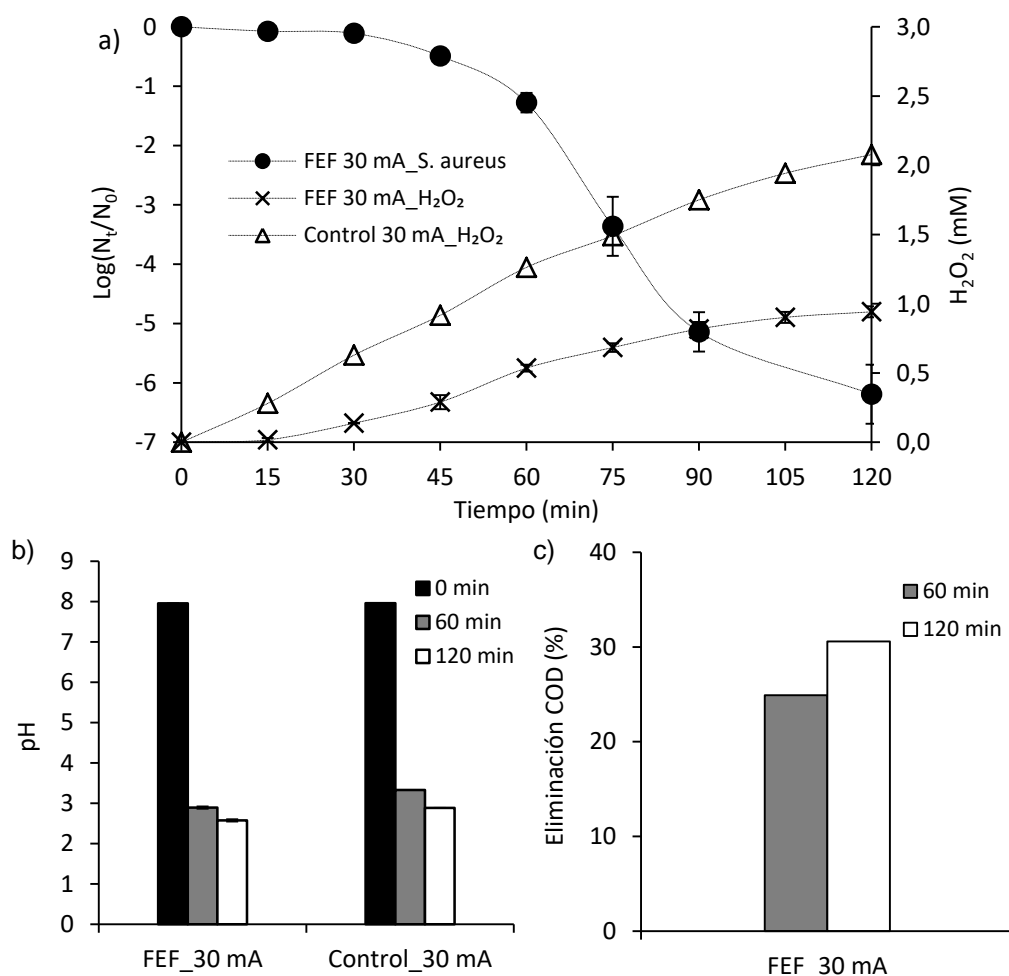
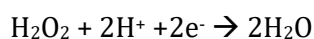


Figura 7.13. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H₂O₂, b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 30 mA (FEF_30 mA, GDE+IrO₂+UVA+5mg Fe²⁺/L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H₂O₂ y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 30 mA.

Las Figuras 7.12a, 7.13a y 7.14a muestran que la velocidad de inactivación de *S. aureus* aumentó al aumentar la intensidad de la corriente. Tras 120 minutos de tratamiento se alcanzaron reducciones de la población bacteriana de -5,2 log, -6,2 log y -6,5 log, con 20 mA, 30 mA y 40 mA, respectivamente. En los tres casos se observó un periodo de retraso inicial en la inactivación, seguido de una fase de desinfección lineal. En general, la fase de retraso inicial u hombro se redujo al aumentar la intensidad de corriente, presentando valores aproximados de 80 min, 55 min y 50 min para las corrientes de 20 mA, 30 mA y 40 mA, respectivamente.

La fase inicial de la curva en la que la inactivación es muy lenta puede deberse a varios factores, como la presencia de agrupaciones de bacterias, la actuación de los mecanismos de reparación celulares (Geeraerd et al., 2000) o la presencia de compuestos atrapadores de radicales o "scavengers". Puesto que, en todos los casos, la principal eliminación de COD tuvo lugar durante los primeros 60 minutos de tratamiento FEF (Figuras 7.12c, 7.13c y 7.14c), es posible que las ROS producidas como consecuencia del proceso Fenton reaccionasen primero con la materia orgánica y más tarde atacasen a las bacterias.

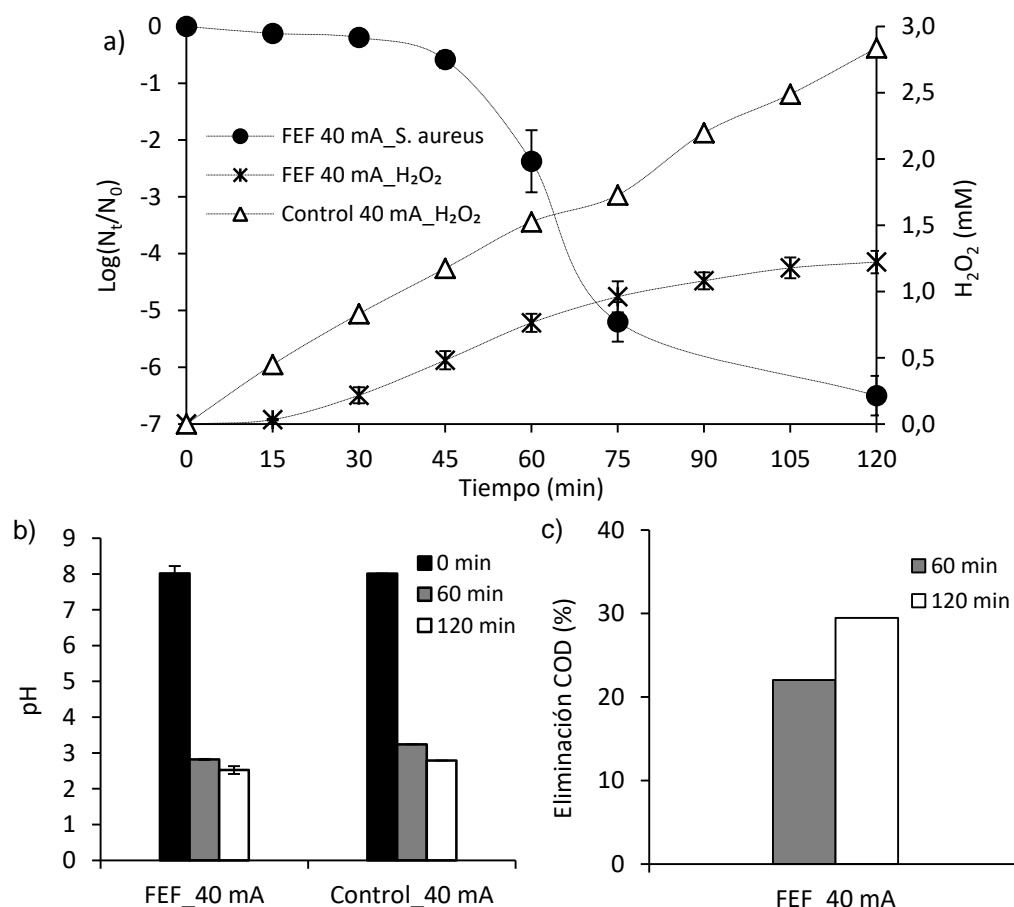


Figura 7.14. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 40 mA (FEF_40 mA, GDE+ IrO_2 +UVA+5mg Fe^{2+} /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H_2O_2 y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 40 mA.

En las Figuras 7.12c y 7.13c se observa que la eliminación de COD aumentó al aumentar la intensidad de corriente de 20 mA a 30 mA. En cambio, con 40 mA (Figura 7.14c), la reducción de COD obtenida fue casi la misma que con 30 mA, mientras que la inactivación de *S. aureus* sí que fue más eficiente con la corriente más alta (Figura 7.14a). Las Figuras 7.12a, 7.13a y 7.14a muestran que al emplear intensidades más elevadas se produjo un aumento del consumo de H₂O₂ (1,07, 1,14 y 1,62 mM H₂O₂ para 20, 30 y 40 mA, respectivamente). Este hecho puede indicar un aumento en la generación de ROS; sin embargo, puede haber varias razones por las que la eliminación de COD no mejoró: i) el H₂O₂ en exceso pudo actuar como “scavenger” de los radicales •OH (Mosteo et al., 2009) (ecuación [7.2]) y ii) se produjo la descomposición catódica del H₂O₂ debido a la polarización de los electrodos (ecuación [7.11]).

Por otra parte, la desinfección fue más eficaz y más rápida al aumentar la intensidad ya que, al haber mayor disponibilidad de H₂O₂ externo, se produjo mayor difusión y acumulación de este compuesto en el interior de las células, lo que favoreció las reacciones Fenton intracelulares y la consiguiente inactivación bacteriana. Por último, la evolución del pH fue similar independientemente de la intensidad de corriente aplicada (Figuras 7.12b, 7.13b y 7.14b).

7.3.3. Efecto del tipo de hierro

7.3.3.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto del tipo de hierro en el sistema foto-electro-Fenton se llevan a cabo ensayos con Fe³⁺, además de los realizados con Fe²⁺ (apartado 7.3.2). Para ello se utilizan la celda electrolítica con el cátodo GDE y el ánodo de IrO₂ (apartado 7.2.2.4) y la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añaden 5 mg Fe³⁺/L (apartado 7.2.2.2). Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se encienden la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 30 mA, y la lámpara UVA. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH, el COD y la acumulación de oxidantes totales y H₂O₂. Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

7.3.3.2. Resultados y discusión

La Figura 7.15 ilustra la inactivación de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 (Figura 7.15a), la evolución del pH (Figura 7.15b) y la eliminación de COD (Figura 7.15c) durante el tratamiento foto-electro-Fenton con Fe^{3+} y 30 mA (FEF Fe^{3+} 30 mA). En la Figura 7.15a se incluye también la acumulación de H_2O_2 que se produce durante el ensayo control realizado con la celda electrolítica (Control 30 mA) en la muestra ARDS en ausencia de materia orgánica y bacterias (procedimiento descrito en el apartado 7.3.2.1).

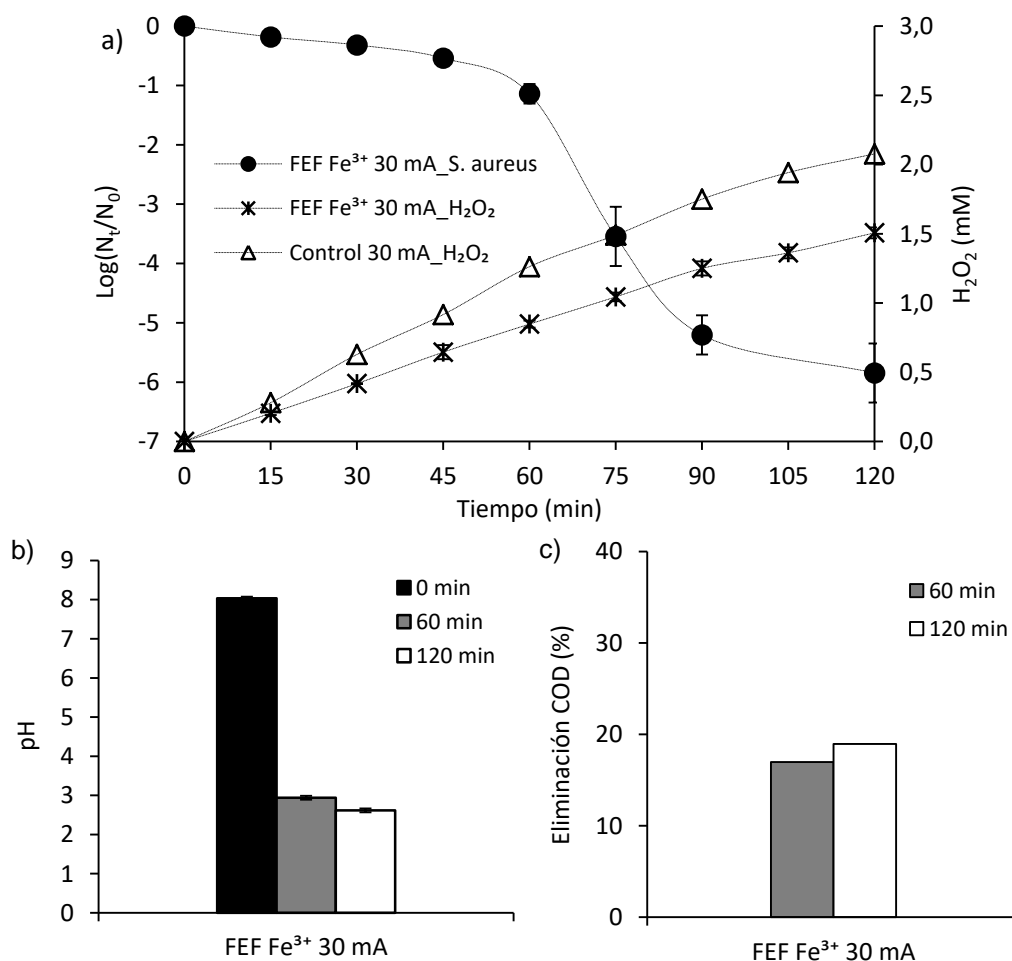


Figura 7.15. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento foto-electro-Fenton con una intensidad de 30 mA (FEF_ Fe^{3+} _30 mA, GDE+ IrO_2 +UVA+5mg Fe^{3+} /L) de la muestra ARDS. Se incluye también en a) la generación de H_2O_2 y en b) la evolución del pH durante el ensayo Control 30 mA.

La inactivación bacteriana obtenida mediante foto-electro-Fenton con Fe^{2+} (Figura 7.13a) o con Fe^{3+} (Figura 7.15a) fue muy similar, alcanzando en ambos casos alrededor de -6 unidades logarítmicas de desinfección en 120 minutos de tratamiento. Pese a que en ambos procesos se observan curvas de inactivación muy similares, las reacciones de producción de ROS y los mecanismos de inactivación pueden haber diferido dependiendo del tipo de hierro inicial añadido al sistema. El Fe^{2+} puede difundir al interior de las células

a través de la membrana, aumentando así los procesos Fenton intracelulares. En cambio, el Fe^{3+} se adsorbe en la membrana bacteriana, contribuyendo a su foto-sensibilización mediante la radiación UVA (Ruales-Lonfat et al., 2014). Además, cuando se utiliza Fe^{2+} , se favorece la formación de $\cdot\text{OH}$ en la solución mediante la reacción Fenton (ecuación [7.1]), lo que aumenta el consumo de H_2O_2 (Figura 7.13a). Por otra parte, las sales de Fe^{3+} en disolución acuosa forman distintos compuestos, como complejos de hierro (ej. $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$), polímeros, óxidos e hidróxidos, los cuales pueden experimentar reducción foto-química a Fe^{2+} y generar $\cdot\text{OH}$ al ser expuestos a radiación UVA (Feng y Nansheng, 2000).

Respecto a la degradación de materia orgánica, Figura 7.13c y la Figura 7.15c muestran que la eliminación de COD fue más eficaz al añadir Fe^{2+} que Fe^{3+} , alcanzado una mineralización del 31% y del 19% tras 120 minutos de FEF, respectivamente. Además, el consumo total de H_2O_2 fue notablemente mayor en presencia de Fe^{2+} que de Fe^{3+} (1,14 y 0,57 mM H_2O_2 , respectivamente). Esto indica que, probablemente, con Fe^{2+} se favoreció la reacción Fenton (ecuación [7.1]) y se formaron más ROS en la solución, capaces de degradar mayor cantidad de COD que al utilizar Fe^{3+} .

Pese a los diferentes rendimientos de degradación de COD obtenidos, la evolución del pH fue similar con ambos tipos de hierro (Figura 7.13b y Figura 7.15b). Este resultado confirma que la reducción del pH, hasta pH 3, durante la aplicación del proceso FEF se debe principalmente a la oxidación del agua en la superficie del ánodo y no a la formación de ácidos orgánicos mediante la degradación del COD.

7.3.4. Efecto del tipo de ánodo

7.3.4.1. Procedimiento experimental y condiciones de operación

Para estudiar el efecto del tipo de ánodo en el sistema foto-electro-Fenton se llevan a cabo ensayos con un ánodo de titanio (Ti), además de los realizados con el ánodo de IrO_2 (apartado 7.3.3). Para ello se utilizan la celda electrolítica con el cátodo GDE y el ánodo de Ti (apartado 7.2.2.4) y la lámpara UVA (apartado 7.2.2.3). Se colocan en el reactor 250 mL de la muestra ARDS descrita en el apartado 7.2.1 y se añaden 5 mg Fe^{3+}/L (apartado 7.2.2.2). Mediante el cátodo GDE, se introduce aire de forma continua, lo que proporciona agitación y oxígeno durante todo el proceso. A continuación, se encienden la fuente de alimentación de la celda electrolítica, fijando la intensidad de corriente en 30 mA, y la lámpara UVA. Se toman alícuotas a distintos tiempos, hasta un máximo de 120 minutos, para determinar la concentración de *S. aureus*, el pH, el COD y la acumulación de oxidantes totales y H_2O_2 . Todos los ensayos se realizan al menos por duplicado.

7.3.4.2. Resultados y discusión

La Figura 7.16a representa la inactivación de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 durante el proceso foto-electro-Fenton utilizando un ánodo de titanio, 5 mg Fe^{3+}/L y 30 mA de intensidad (FEF Fe^{3+} Ti 30 mA). La Figura 7.16b y c muestran, respectivamente, la evolución del pH y la eliminación del COD durante el tratamiento.

Se observa que la eficiencia en la desinfección de *S. aureus*, así como la eliminación de COD y la evolución del pH fueron muy similares tanto con el ánodo de Ti (Figura 7.16) como con el de IrO_2 (Figura 7.15). Además, la acumulación de H_2O_2 fue comparable en ambos casos.

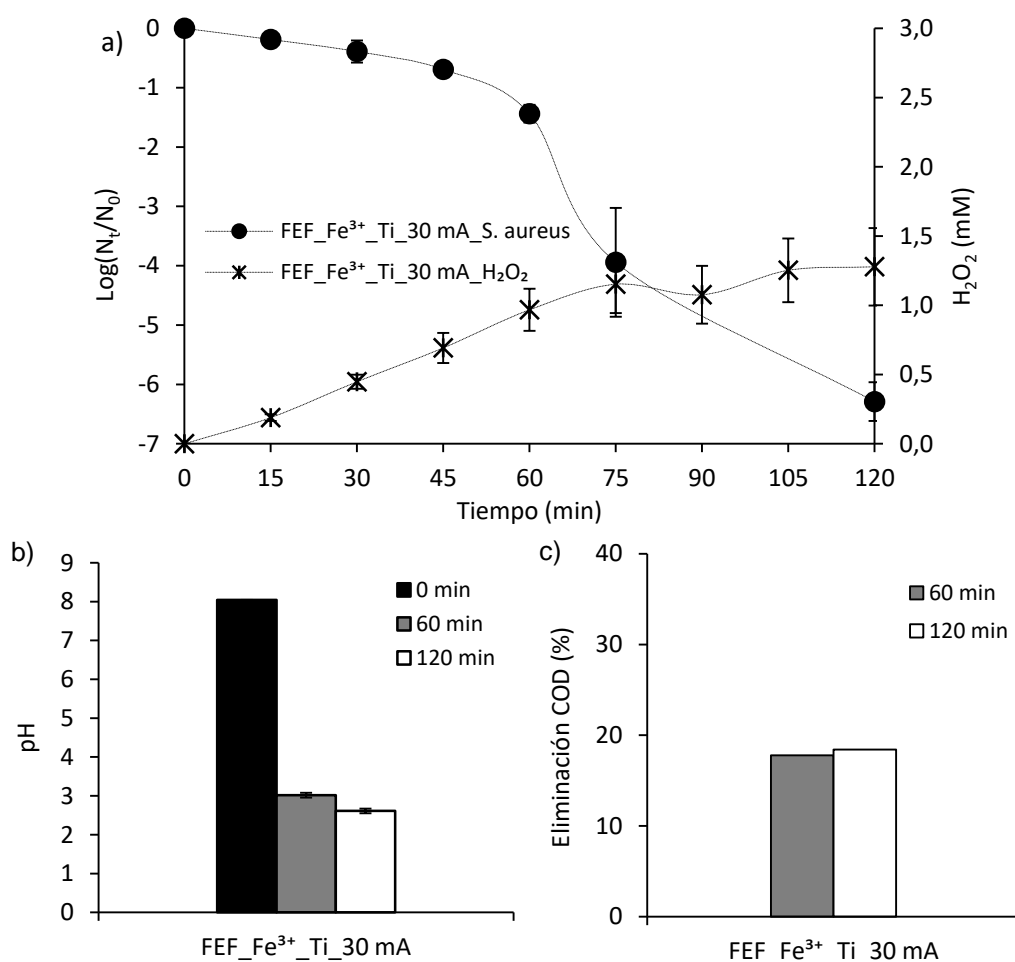


Figura 7.16. Evolución de a) la concentración de *S. aureus* y la acumulación de H_2O_2 , b) el pH y c) el COD, durante el tratamiento de la muestra ARDS mediante foto-electro-Fenton con ánodo de titanio, Fe^{3+} y una intensidad de 30 mA (FEF Fe^{3+} Ti 30 mA, GDE+Ti+UVA+5 mg Fe^{3+}/L).

El ensayo con el ánodo de titanio permite evaluar la contribución del ánodo de IrO_2 , es decir, la contribución de la oxidación anódica al sistema foto-electro-Fenton. Cuando se usan ánodos de IrO_2 en los tratamientos electroquímicos, el ánodo puede participar de dos formas distintas: vía oxidación directa o indirecta (Guzmán-Duque et al., 2014). En la ruta

mediante oxidación directa, los contaminantes intercambian electrones directamente con el ánodo, mientras que en la ruta indirecta los contaminantes se eliminan mediante especies electro-activas intermedias que se forman en el ánodo. Por ejemplo, los ánodos de IrO₂ son buenos catalizadores para generar *in situ* especies reactivas del cloro (Panizza y Cerisola, 2009). Sin embargo, cuando se utiliza SO₄²⁻ como electrolito, como es el caso del presente trabajo de investigación, sólo se pueden producir concentraciones muy bajas de especies reactivas del cloro (Guzmán-Duque et al., 2014). Teniendo en cuenta este hecho y la similitud entre los resultados obtenidos con los ánodos de IrO₂ y Ti, podría asumirse que, para el sistema estudiado, el ánodo de IrO₂ no juega un papel importante en la desinfección bacteriana, ni por vía directa ni por vía indirecta.

Los resultados arriba expuestos indican que, bajo las condiciones de trabajo aplicadas, el papel del ánodo es completar el circuito mediante la descomposición del agua (ecuaciones [7.8] y [7.9]). Como resultado, baja el pH (Figura 7.15b y Figura 7.16b) y aumenta la disponibilidad de iones de hierro en disolución para generar ROS (ecuaciones [7.1]-[7.6]).

La principal diferencia observada entre los dos ánodos estudiados es el voltaje generado. Mientras que con el ánodo de Ti se produjo un aumento excesivo del voltaje (>19 V), con el ánodo de IrO₂ este valor no superó los 6 V. Este resultado muestra que la oxidación del agua es más favorable en la superficie del ánodo de IrO₂ que en la del de Ti. Por tanto, considerando el consumo de energía, el ánodo de IrO₂ resulta más eficaz. El consumo de energía en los diferentes sistemas foto-electro-Fenton estudiados se describe con más detalle en el apartado 7.4.

7.3.5. Modelización cinética

Las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación (Figura 7.12-7.16) se analizan mediante los modelos cinéticos de Hom, bifásico, Mafart y Geeraerd. Las Tablas 7.5-7.8 recogen los parámetros cinéticos calculados y el ajuste de los modelos a los resultados de inactivación observados, expresado mediante *ECM* y *r*.

Tabla 7.5. Parámetros cinéticos del modelo de Hom aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.

Bacteria	Tratamiento	k* (min ⁻¹)	m	ECM	r
<i>S. aureus</i>	FEF_20 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	3,3·10 ⁶	2,98	0,16	1,00
	FEF_30 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,2·10 ³	1,81	0,60	0,97
	FEF_40 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	5,6·10 ³	1,49	0,83	0,94
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	1,9·10 ³	1,69	0,67	0,96
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _Ti	1,6·10 ³	1,73	0,50	0,97

Tabla 7.6. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.

Bacteria	Tratamiento	P	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	ECM	r
<i>S. aureus</i>	FEF_20 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,000000	0,067	0,067	0,87	0,82
	FEF_30 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,000000	0,103	0,103	1,00	0,88
	FEF_40 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,000000	0,116	0,116	1,04	0,87
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	1,000000	0,102	0,102	0,97	0,87
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _Ti	1,000000	0,102	0,102	0,90	0,90

Tabla 7.7. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.

Bacteria	Tratamiento	p	δ (min)	ECM	r
<i>S. aureus</i>	FEF_20 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	2,98	69	0,16	1,00
	FEF_30 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,81	42	0,60	0,97
	FEF_40 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	1,49	33	0,83	0,94
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	1,69	40	0,67	0,96
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _Ti	1,73	41	0,50	0,97

Tabla 7.8. Parámetros cinéticos del modelo de Geeraerd aplicado a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante foto-electro-Fenton (FEF) empleando distintas condiciones de operación.

Bacteria	Tratamiento	SI (min)	$k_{m\acute{a}x}$ (min ⁻¹)	ECM	r
<i>S. aureus</i>	FEF_20 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	79	0,28	0,34	0,98
	FEF_30 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	51	0,30	0,18	1,00
	FEF_40 mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	49	0,44	0,19	1,00
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	53	0,33	0,29	0,99
	FEF_30 mA_Fe ³⁺ _Ti	51	0,31	0,26	0,99

Las Figuras 17-21 representan gráficamente el ajuste de cada modelo propuesto a los datos experimentales de inactivación de *S. aureus* en ARDS mediante foto-electro-Fenton trabajando con distintas condiciones de operación. En el Anexo I se incluyen las figuras que muestran gráficamente el error de cada modelo (Figuras I. XXXIX-I.XLIII).

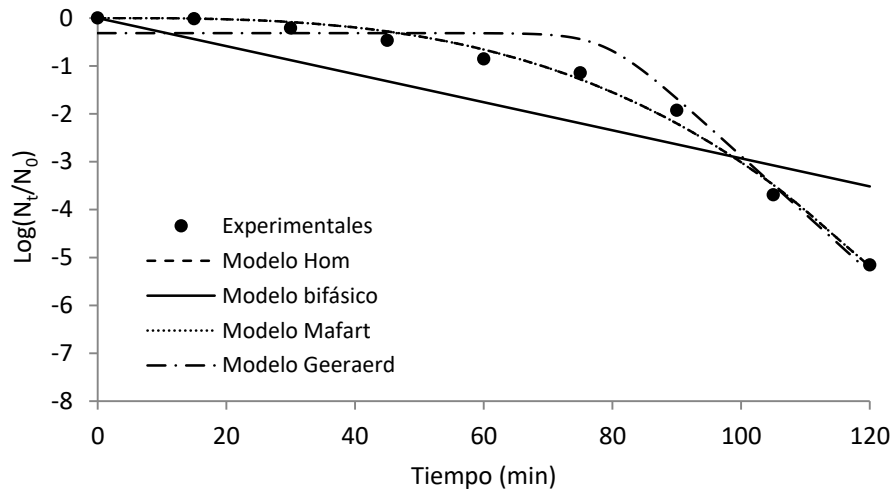


Figura 7.17. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 20 mA (FEF 20 mA, GDE+IrO₂+Fe²⁺+UVA).

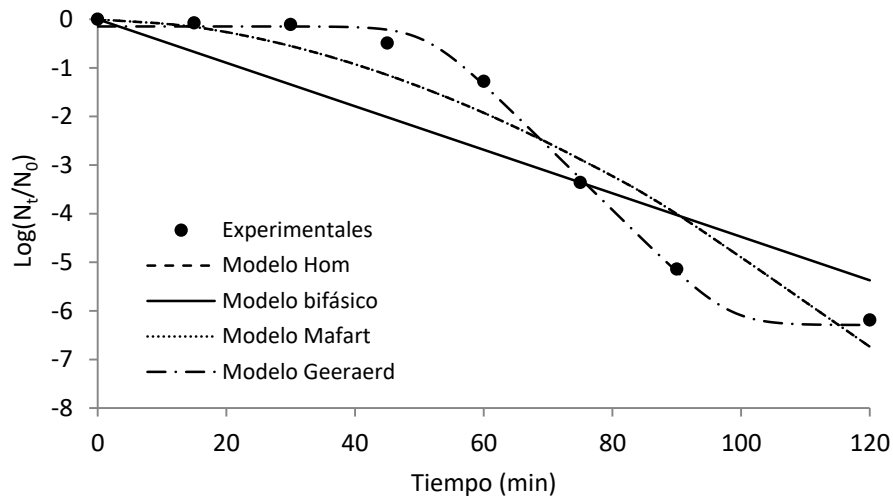


Figura 7.18. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 30 mA (FEF 30 mA, GDE+IrO₂+Fe²⁺+UVA).

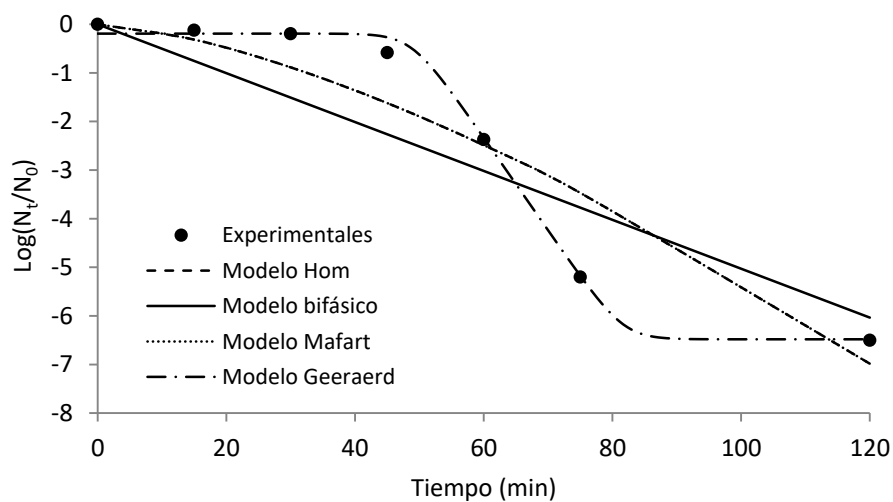


Figura 7.19. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con 40 mA (FEF 40 mA, GDE+IrO₂+Fe²⁺+UVA).

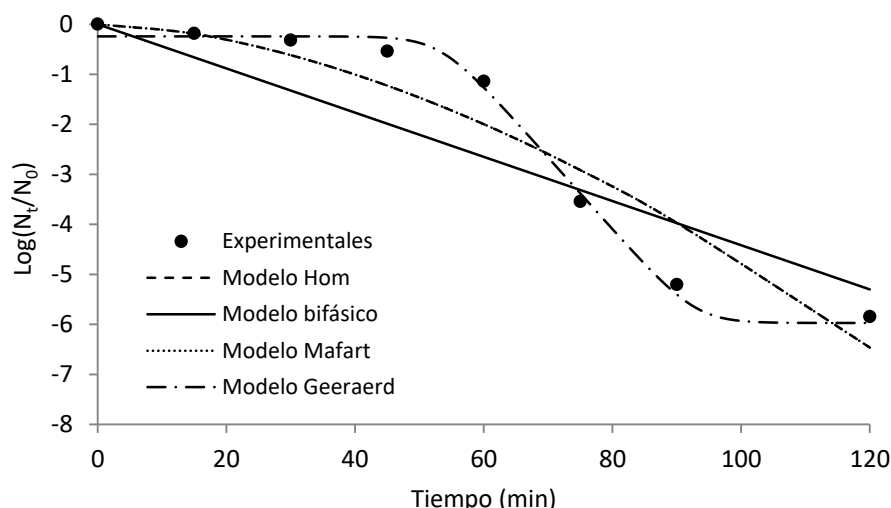


Figura 7.20. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con Fe^{3+} (FEF Fe^{3+} 30 mA, GDE+ IrO_2 +5 mg Fe^{3+} /L+UVA).

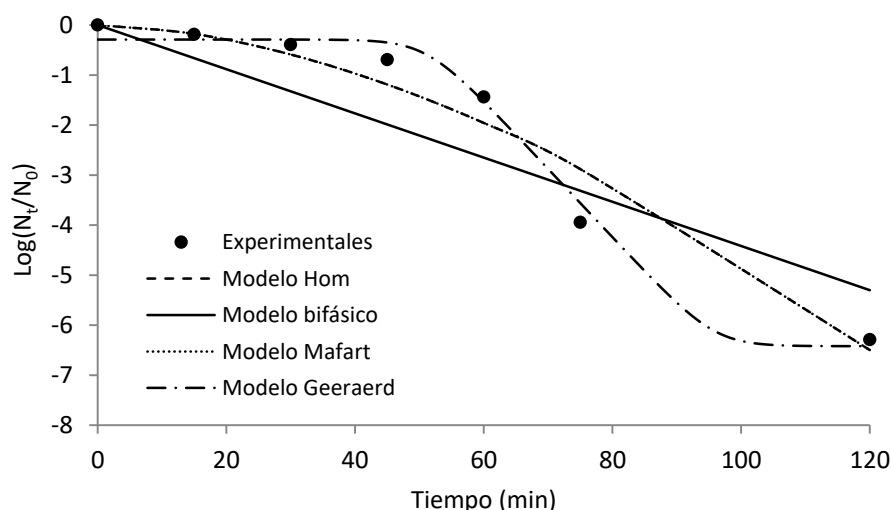


Figura 7.21. Ajuste de los modelos matemáticos a las curvas de inactivación de *S. aureus* en ARDS obtenidas mediante foto-electro-Fenton con ánodo de Ti (FEF Fe^{3+} _Ti_30 mA, GDE+Ti+5 mg Fe^{3+} /L+UVA).

El modelo bifásico (Tabla 7.6 y Figura 7.18) no sirve para describir los datos experimentales obtenidos en ninguno de los casos, ya que el valor estimado para el parámetro k_1 es exactamente igual al estimado para k_2 . Al ser iguales ambas constantes de inactivación el modelo describe una tendencia lineal, que no coincide con la desinfección observada durante los tratamientos FEF.

Los modelos de Hom y Mafart tan solo presentan un buen ajuste a los datos experimentales obtenidos mediante el tratamiento foto-electro-Fenton con 20 mA, tal y como indican los valores ECM y R (Tablas 7.5 y 7.7) y la representación gráfica (Figura 7.17). Bajo estas condiciones de operación, los parámetros m del modelo de Hom y p del modelo de Mafart muestran valores cercanos a 3 indicando que la curva de inactivación

tienen forma convexa y hay probabilidad de que se produzca efecto de hombro pero no de cola.

Finalmente, el modelo de Geeraerd (Tabla 7.8) se ajusta adecuadamente en todos los casos, ya que, en general, las curvas obtenidas mediante foto-electro-Fenton presentan un hombro inicial y un pequeño efecto de cola, excepto en FEF con 20 mA (Figura 7.17), en el que no se llega a observar este fenómeno, probablemente debido a que la inactivación es algo más lenta. Tanto el parámetro SI como $k_{máx}$ del modelo de Geeraerd muestran que la desinfección es más rápida al aumentar la intensidad de la corriente. En cambio, estos parámetros indican que la velocidad de inactivación de *S. aureus* es prácticamente la misma independientemente del tipo de hierro utilizado (Fe^{2+} o Fe^{3+}) o del tipo de ánodo empleado (IrO_2 o Ti).

7.4. Costes de operación

En este apartado se presentan los costes de operación para los tratamientos de desinfección foto-electroquímica (DFEQ, apartado 7.2.6) y foto-electro-Fenton (apartado 7.3).

Para calcular el coste de operación de la desinfección foto-electroquímica se tiene en cuenta el consumo de energía de la celda electrolítica. Para calcular el coste de operación de los distintos sistemas foto-electro-Fenton aplicados se tiene en cuenta el coste de las sales de hierro añadidas y el consumo de energía de la celda electrolítica. En una aplicación real, se utilizaría luz solar natural en lugar de la lámpara artificial, por tanto, el coste de la energía consumida por la lámpara no se tiene en consideración en ninguno de los tratamientos.

El consumo específico de energía por unidad de volumen (EC) se determina según la ecuación [7.12] (Brillas y Martínez-Huitle, 2015):

$$EC \text{ (kWh m}^{-3}\text{)} = \frac{E_{\text{celda}} \cdot I \cdot t}{V_m} \quad [7.12]$$

donde E_{celda} es la diferencia de potencial promedio de la celda (en V), I es la intensidad de corriente aplicada (en A), t es el tiempo de tratamiento (en h) y V_m es el volumen de muestra (en L).

La Tabla 7.9 recoge el valor del voltaje observado a lo largo de los tratamientos de desinfección electroquímica y foto-electro-Fenton con distintas condiciones de operación.

Tabla 7.9. Voltaje observado durante la desinfección foto-electroquímica y los ensayos foto-electro-Fenton bajo las distintas condiciones de operación.

Tiempo (min)	Voltaje (V)					
	DFEQ	FEF 20 mA	FEF 30 mA	FEF 40 mA	FEF Fe ³⁺	FEF Ti
0	2,62	2,70	2,94	3,64	3,01	5,75
15	3,03	3,01	3,66	4,44	3,51	10,37
30	3,11	3,37	4,44	5,40	4,30	13,78
45	3,24	3,69	4,67	5,88	5,09	16,28
60	3,47	3,87	4,86	6,19	5,50	14,58
75	3,72	3,97	4,53	6,07	5,75	17,36
90	3,97	3,93	4,25	5,61	5,57	16,33
105	4,20	3,89	4,03	5,37	5,29	16,94
120	4,45	3,77	4,06	5,38	5,08	17,86

Los tiempos de operación necesarios para alcanzar cada nivel de desinfección se calculan mediante el modelo cinético que mejor se ajusta en cada caso. Para los ensayos DFEQ y FEF 20 mA se utiliza el modelo de Mafart, mientras que para el resto de tratamientos FEF se emplea el modelo de Geeraerd. La Tabla 7.10 muestra los tiempos de tratamiento necesarios para lograr distintos grados de desinfección mediante DFEQ y FEF bajo distintas condiciones de operación.

Tabla 7.10. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación mediante desinfección foto-electroquímica y mediante foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación.

Tratamiento	Tiempo (min)					
	-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
DFEQ_20mA_IrO ₂	81	100	113	123	131	139
FEF_20mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	69	87	100	110	119	126
FEF_30mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	57	65	73	81	89	99
FEF_40mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	53	58	63	69	74	80
FEF_30mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	58	65	73	80	86	103
FEF_30mA_Fe ³⁺ _Ti	56	63	71	78	86	95

El consumo específico de energía por unidad de volumen (EC), calculado según la ecuación [7.12], se muestra en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11. Consumos específicos de energía por unidad de volumen (EC) necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación mediante desinfección foto-electroquímica y mediante foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación.

Tratamiento	EC (kWh/m ³)					
	-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log	-5 Log	-6 Log
DFEQ_20mA_IrO ₂	0,350	0,451	0,524	0,576	0,632	0,682
FEF_20mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	0,296	0,385	0,448	0,496	0,539	0,572
FEF_30mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	0,462	0,536	0,608	0,678	0,747	0,824
FEF_40mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	0,699	0,785	0,871	0,955	1,042	1,122
FEF_30mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	0,492	0,565	0,655	0,728	0,801	0,972
FEF_30mA_Fe ³⁺ _Ti	1,329	1,553	1,799	2,046	2,283	2,575

El Fe²⁺ se añade como FeSO₄·7H₂O. El precio de esta sal de hierro es de 10,65 €/25 kg, con un contenido en hierro total del 18%, según la empresa Agrotterra (Agrotterra, 2017). El Fe³⁺ se añade como Fe₂(SO₄)₃·9H₂O. Se considera que el precio de esta sal de hierro es el mismo que el de FeSO₄·7H₂O, es decir, 10,65 €/25 kg. El coste de las sales de hierro Fe²⁺ o Fe³⁺ empleadas se calcula de acuerdo a la ecuación [7.13] y [7.14], respectivamente.

- Coste del Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$):

$$\frac{5 \text{ mg Fe}}{\text{L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{100 \text{ mg FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{18 \text{ mg Fe}} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000000 \text{ mg}} \cdot \frac{10,65 \text{ €}}{25 \text{ kg}} = \frac{0,0118\text{€}}{1 \text{ m}^3} \quad [7.13]$$

- Coste del Fe^{3+} ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$):

$$\frac{5 \text{ mg Fe}}{\text{L}} \cdot \frac{1000 \text{ L}}{1 \text{ m}^3} \cdot \frac{1 \text{ mmol Fe}}{56 \text{ mg Fe}} \cdot \frac{1 \text{ mmol sal}}{2 \text{ mmol Fe}} \cdot \frac{562 \text{ mg sal}}{1 \text{ mmol sal}} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000000 \text{ mg}} \cdot \frac{10,65 \text{ €}}{25 \text{ kg}} = \frac{0,0107\text{€}}{1 \text{ m}^3} \quad [7.14]$$

La Figura 7.22 muestra los costes de operación calculados para alcanzar distintos niveles de desinfección mediante DFEQ y FEF.

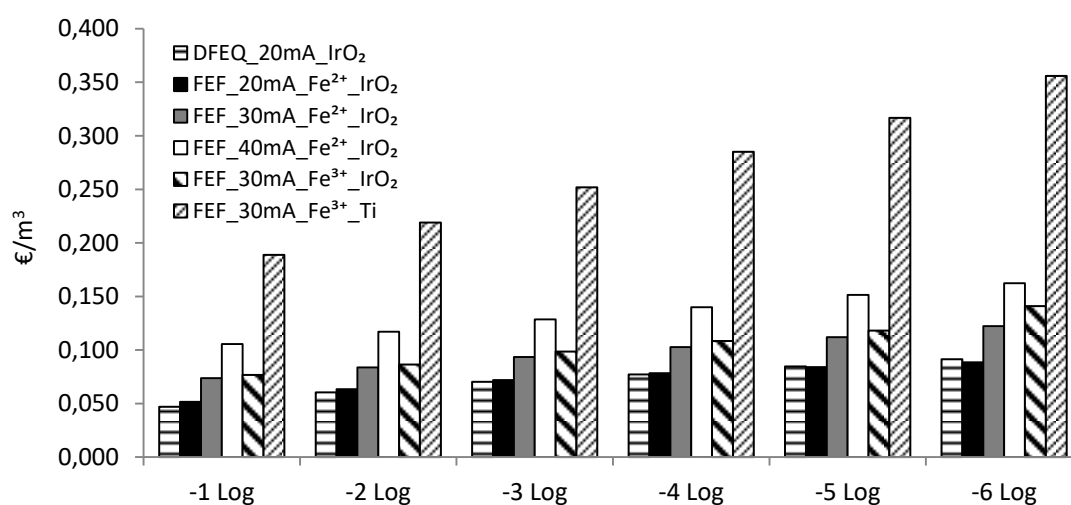


Figura 7.22. Costes de operación para alcanzar distintos niveles de inactivación de *S. aureus* mediante desinfección foto-electroquímica (DFEQ) y foto-electro-Fenton (FEF) bajo distintas condiciones de operación.

Los costes de operación son muy similares para el tratamiento DFEQ (20 mA) y FEF con 20 mA (Figura 7.22). Sin embargo, la energía consumida y el tiempo de operación son inferiores en el caso del FEF 20 mA, por lo que este tratamiento sería más eficaz.

En los ensayos foto-electro-Fenton con Fe^{2+} y distintas intensidades (20 mA, 30 mA y 40 mA) se observa que para eliminar una cantidad determinada de *S. aureus* el coste del tratamiento aumenta al aumentar la intensidad (Figura 7.22). Esto se debe a que el consumo de energía se incrementa como consecuencia de la descomposición catódica del H_2O_2 (ecuación [7.11]) y el efecto scavenger producido por el exceso de H_2O_2 .

El tipo de hierro empleado tiene un ligero efecto sobre el consumo de energía. El tratamiento FEF con Fe^{3+} (30 mA) presenta un consumo de energía ligeramente superior al observado con Fe^{2+} (30 mA). Esta pequeña diferencia puede deberse a la formación de

especies de Fe^{3+} insolubles que reducen la concentración de iones y por tanto disminuyen la conductividad eléctrica y aumentan el voltaje.

Respecto al tipo de ánodo, bajo las mismas condiciones (30 mA y Fe^{3+}), el coste de operación es notablemente superior con el ánodo de Ti que con el de IrO_2 , ya que la diferencia de potencial observada con el ánodo de Ti es mucho mayor que con el de IrO_2 (Tabla 7.9).

Desde el punto de vista energético y económico, las condiciones más eficientes para la eliminación de *S. aureus* consisten en aplicar el proceso foto-electro-Fenton utilizando un ánodo de IrO_2 , 20 mA de intensidad y sal de Fe^{2+} . Bajo estas condiciones de operación, tan solo se necesitan 0,572 kWh/m³ de energía para eliminar 6 unidades logarítmicas de *S. aureus* en ARDS, lo que supone un coste de 0,089 €/m³.

En comparación con los restantes tratamientos estudiados en la presente memoria, el proceso foto-electro-Fenton muestra, en general, costes de operación y tiempos de tratamiento mayores que la cloración y la ozonización para alcanzar rendimientos de inactivación similares. Sin embargo, el proceso foto-electro-Fenton resulta más rápido y tiene un coste de operación menor que los tratamientos fotocatalíticos con TiO_2 .

7.5. Estudio comparativo de la eficacia de procesos foto-Fenton y foto-electro-Fenton

En este apartado se comparan los resultados de inactivación bacteriana obtenidos en la presente memoria mediante foto-electro-Fenton (FEF) con los resultados obtenidos por Rodríguez-Chueca (2013) mediante foto-Fenton (FF). La Figura 7.23 ilustra los resultados de inactivación bacteriana obtenidos mediante los dos tipos de tratamiento, ambos realizados en la misma matriz, ARDS. En el caso del tratamiento foto-Fenton se toma como referencia la bacteria *Enterococcus* sp. por tratarse de una bacteria Gram-positiva, al igual que *Staphylococcus aureus*.

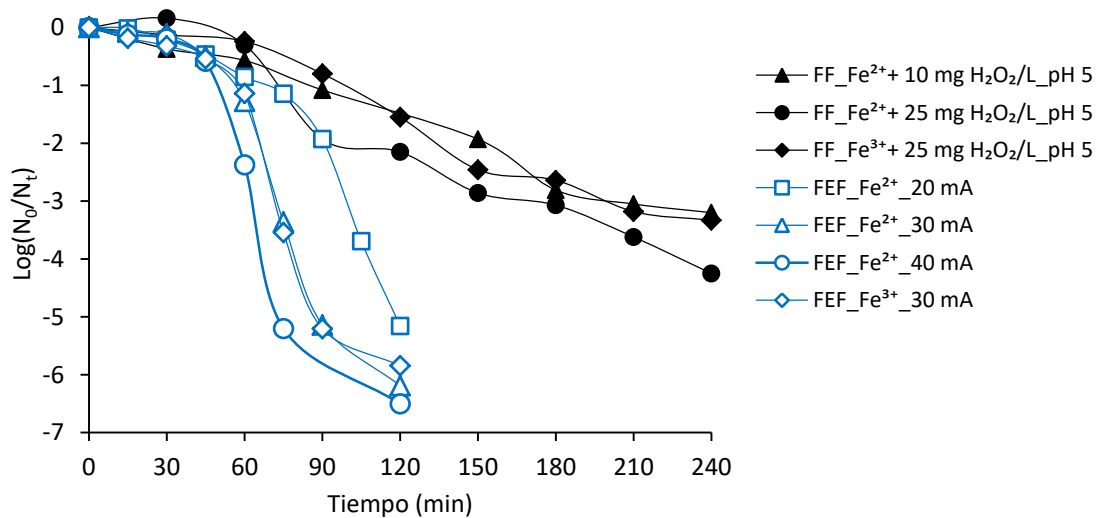


Figura 7.23. Inactivación de *Enterococcus* sp. mediante foto-Fenton (FF) e inactivación de *S. aureus* mediante foto-electro-Fenton (FEF) en ARDS. $[Fe^{n+}] = 5 \text{ mg/L}$.

En la Tabla 7.12 se recogen, a modo de resumen, los tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación bacteriana en ARDS mediante los tratamientos foto-Fenton y foto-electro-Fenton empleando distintas condiciones de operación.

Tabla 7.12. Tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar distintos grados de inactivación bacteriana en ARDS mediante foto-Fenton y foto-electro-Fenton bajo distintas condiciones de operación. $[Fe^{n+}] = 5 \text{ mg/L}$.

Tratamiento	Tiempo (min)			
	-1 Log	-2 Log	-3 Log	-4 Log
FF_Fe ²⁺ + 10 mg H ₂ O ₂ /L_pH 5	85	150	200	>240
FF_Fe ²⁺ + 25 mg H ₂ O ₂ /L_pH 5	75	90	170	230
FF_Fe ³⁺ + 25 mg H ₂ O ₂ /L_pH 5	100	135	200	>240
FEF_20mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	69	87	100	110
FEF_30mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	57	65	73	81
FEF_30mA_Fe ³⁺ _IrO ₂	58	65	73	80
FEF_40mA_Fe ²⁺ _IrO ₂	53	58	63	69

Se observa que, en general, la inactivación es más rápida al utilizar el sistema foto-electro-Fenton que el proceso foto-Fenton (Figura 7.23 y Tabla 7.12). En el tratamiento FEF se utiliza una celda electrolítica para generar continuamente H_2O_2 , mientras que en el FF se añade una cantidad determinada de este compuesto. La concentración de H_2O_2 utilizada en FF (10 y 25 mg H_2O_2/L) es menor que la producida en los ensayos FEF (54, 71 y 95 mg H_2O_2/L tras 120 min con 20 mA, 30 mA y 40 mA, respectivamente).

Inicialmente (45-60 min), la inactivación bacteriana mediante FEF es similar a la observada mediante FF (Figura 7.23), ya que las concentraciones de H_2O_2 son parecidas. Conforme avanza el tiempo de tratamiento, la acumulación de H_2O_2 en el sistema FEF sobrepasa la concentración de H_2O_2 utilizada en FF. Además, en el sistema foto-electro-Fenton, la muestra (cuyo pH inicial está cercano a 8) se va acidificando progresivamente como consecuencia del uso de la celda electrolítica, lo que favorece la disolución del hierro. Este hecho junto con el aumento de la concentración de H_2O_2 , favorece la reacción Fenton en el sistema FEF, aumentando la generación de ROS y por tanto, produciendo una inactivación más rápida. Cabe resaltar que, conforme a los resultados obtenidos a pH 3 (apartado 7.2.3), la inactivación bacteriana mediante FEF no se produce por la acidez del medio sino por los procesos Fenton y foto-Fenton que tienen lugar.

Por otra parte, la Figura 7.23 muestra que el aumento de la concentración de H_2O_2 , que en el sistema FEF aumenta con la intensidad de corriente, favorece la inactivación bacteriana en los procesos FF y FEF.

Si se evalúa el efecto del tipo de sal de hierro, se observa que el uso de Fe^{2+} proporciona mayor eficacia en ambos tratamientos (Figura 7.23). En el sistema FF se observa una ligera mejora en la inactivación bacteriana con Fe^{2+} , mientras que en el FEF la inactivación bacteriana es muy similar con ambos tipos de hierro pero la eliminación del COD aumenta con Fe^{2+} .

Respecto a los costes de operación, se compara el tratamiento FEF que presenta el menor coste (FEF_ Fe^{2+} _20 mA), con los tratamientos FF bajo distintas condiciones de operación. En el proceso FF el coste de operación se calcula teniendo en cuenta el precio de las sales de hierro Fe^{2+} o de Fe^{3+} aplicadas (ecuaciones [7.13] y [7.14]) y el precio del H_2O_2 añadido (ecuación [5.22]). En el tratamiento FEF el coste de operación se calcula teniendo en cuenta el precio de la sal de hierro Fe^{2+} aplicada (ecuación [7.13]) y el precio de la electricidad consumida por la celda electrolítica, tal y como se explica en el apartado 7.4.

La Figura 7.24 muestra los costes de operación calculados para alcanzar distintos niveles de desinfección mediante FF y FEF.

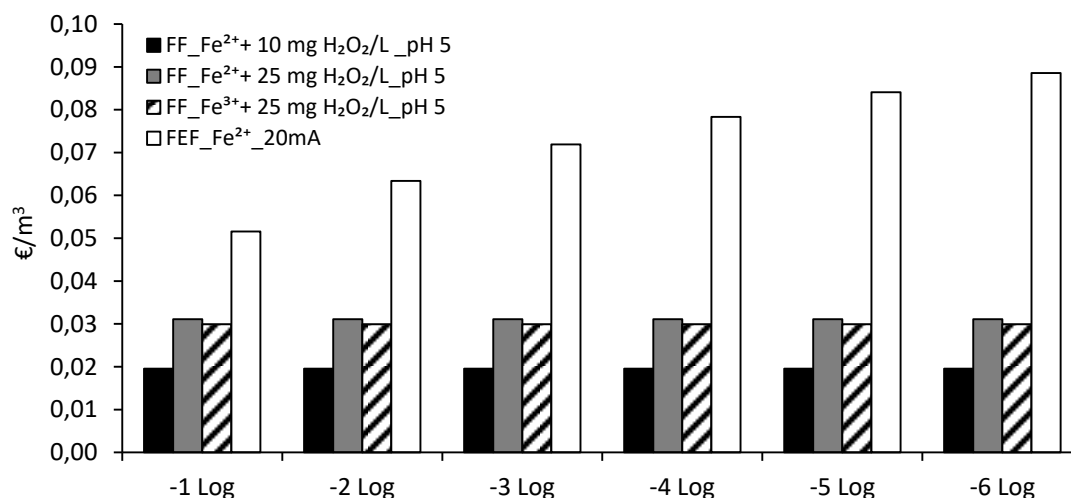


Figura 7.24. Costes de operación para alcanzar distintos niveles de inactivación bacteriana en ARDS mediante foto-Fenton (FF) y foto-electro-Fenton (FEF) bajo distintas condiciones de operación. [Feⁿ⁺]= 5 mg/L.

El coste de operación del tratamiento foto-electro-Fenton es mayor que el del tratamiento foto-Fenton. Esta diferencia en el coste de estos dos tratamientos se debe principalmente a que en el proceso foto-Fenton se utiliza H₂O₂ comercial, mientras que en el foto-electro-Fenton el H₂O₂ se genera continuamente en la celda electrolítica.

La Figura 7.25 muestra los costes de operación en función de la concentración a aplicar asociados a cada tipo de H₂O₂. El coste del H₂O₂ comercial se calcula tal y como se explica en el apartado 5.2.6, mientras que el coste del H₂O₂ electro-generado se calcula según lo expuesto en el apartado 7.4.

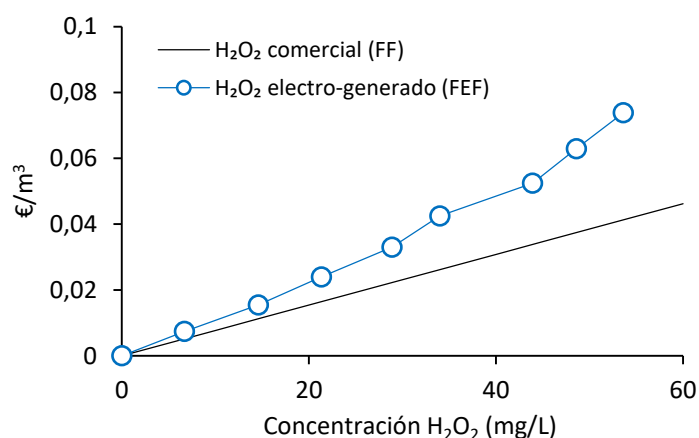


Figura 7.25. Costes de operación estimados para el H₂O₂ comercial y el H₂O₂ electro-generado.

Se observa que el coste del H₂O₂ electro-generado es mayor que el del H₂O₂ comercial. Además, la diferencia entre el coste de ambos tipos de H₂O₂ aumenta al aumentar la

concentración requerida. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el H_2O_2 electrogenerado, a diferencia del comercial, se produce “in situ” y no requiere transporte ni almacenamiento, por lo que disminuye el riesgo durante su manipulación.

En resumen, el tratamiento foto-electro-Fenton genera una inactivación bacteriana más rápida que el proceso foto-Fenton. Sin embargo, el coste de operación del proceso FEF es mayor que en FF debido a la distinta procedencia del H_2O_2 empleado.

7.6. Conclusiones relativas a la inactivación bacteriana mediante procesos foto-electro-Fenton

- El pH ácido (pH 3), la irradiación UVA o la aplicación de la celda electrolítica no producen por sí solas un efecto desinfectante importante sobre *Staphylococcus aureus* en agua residual depurada (-0,5 log. en 120 min).
- La combinación de irradiación UVA y la celda electrolítica produce un efecto sinérgico sobre la inactivación bacteriana al potenciarse los mecanismos desinfectantes del H₂O₂ electro-generado con los de la luz UVA (-4 log en 120 min).
- Si se comparan los diferentes procesos electroquímicos (DEQ, DFEQ, EF y FEF), aquellos que presentan un consumo de H₂O₂ más elevado generan una inactivación mayor, debido a la mayor formación de ROS que se produce.
- El proceso electro-Fenton alcanza valores de inactivación bacteriana y de mineralización de materia orgánica reducidos (-0,9 log. y -14% COD en 120 min), debido a las limitaciones en la regeneración del Fe³⁺ a Fe²⁺.
- El proceso foto-electro-Fenton consigue inactivar eficazmente la bacteria *S. aureus* en agua residual depurada y mineralizar parte de la materia orgánica presente en la muestra (-5 log. y -26% COD en 120 min), como consecuencia de la sinergia entre los mecanismos de inactivación de la luz UVA, el H₂O₂ y el Fe²⁺, que se regenera continuamente en presencia de la luz UVA.
- La materia orgánica presente en la matriz compite con las bacterias objeto de estudio en la reacción con las ROS generadas, disminuyendo así la eficacia de desinfección del proceso foto-electro-Fenton, especialmente al inicio del tratamiento.
- El aumento de la intensidad de corriente en el sistema foto-electro-Fenton aumenta la generación de H₂O₂ y, por tanto, la velocidad de inactivación bacteriana, mientras que el rendimiento de eliminación de materia orgánica es similar independientemente de la intensidad aplicada.
- El tipo de hierro utilizado (Fe²⁺ o Fe³⁺) no influye sobre la eficacia de inactivación bacteriana del proceso foto-electro-Fenton, aunque probablemente los mecanismos de inactivación difieren en cada caso, tal y como sugiere el mayor consumo de H₂O₂, el aumento de la mineralización y el menor voltaje observados con Fe²⁺.
- El tipo de ánodo utilizado (IrO₂ o Ti) no influye sobre la eficacia de inactivación bacteriana o de mineralización del proceso foto-electro-Fenton pero sí influye sobre el consumo de energía. En el sistema estudiado la contribución de la oxidación anódica es

despreciable frente a las reacciones Fenton y foto-Fenton que se producen. El único papel del ánodo de IrO_2 es completar el circuito eléctrico.

- El coste de operación del proceso foto-electro-Fenton se asocia fundamentalmente al consumo de energía por parte de la celda electrolítica. De las distintas condiciones de operación estudiadas, el tratamiento que presenta el menor coste de operación es el foto-electro-Fenton con 20 mA Fe^{2+} y ánodo de IrO_2 , con un consumo de 0,57 kWh/m³ y 0,09€/m³ para eliminar -6 log.
- Comparando los tratamientos realizados sobre la misma matriz y con la misma concentración de hierro utilizada (5 mg Fe/L), se observa que el proceso foto-electro-Fenton consigue la inactivación de las bacterias mucho más rápidamente que el proceso foto-Fenton, aunque este último presenta unos menores costes asociados. El H_2O_2 electro-generado resulta más caro que el H_2O_2 comercial pero su generación “in situ” disminuye los riesgos asociados a la gestión de este reactivo.

Capítulo 8. Conclusiones

En este capítulo se presentan las principales conclusiones generales extraídas de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de investigación, como complemento a las específicas mencionadas al final de los capítulos anteriores. En concreto se relacionan las siguientes:

- La elevada carga microbiana de origen fecal que presentan las aguas residuales urbanas se consigue reducir en cierto grado a lo largo de los diferentes procesos que tienen lugar en una EDAR convencional, especialmente durante la etapa de tratamiento biológico. Sin embargo, el agua residual depurada todavía contiene concentraciones relativamente elevadas de bacterias indicadoras, como *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., que señalan la posible presencia de microorganismos patógenos. Por tanto, para obtener un agua de una calidad adecuada que permita su reutilización libre de riesgos sanitarios, es necesario aplicar tratamientos de desinfección adicionales que reduzcan la carga microbiológica del efluente de manera que se cumplan los criterios de calidad establecidos en la legislación (RD 1620/2007).
- En general, tras la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección investigados a las aguas de salida de depuradora, se observa una menor eficiencia en la eliminación de la bacteria *Enterococcus* sp. (Gram-positiva) que de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (Gram-negativa), probablemente debido a las diferencias estructurales existentes entre ambas bacterias; en concreto, la pared celular de *Enterococcus* sp. está formada por una capa de peptidoglicano más gruesa que la de *E. coli*, que la haría más resistente. En cambio, los mecanismos de reparación celulares de ambas bacterias parecen ser similares, ya que, tras la aplicación de los tratamientos, se observan tendencias de supervivencia y/o recrecimiento muy parecidas en ambos casos. La mayor resistencia de *Enterococcus* spp. a los tratamientos de desinfección hace de esta bacteria un parámetro de control más fiable que el indicador comúnmente utilizado *Escherichia coli*.
- Teniendo en cuenta el tiempo de tratamiento necesario para alcanzar un nivel determinado de inactivación bacteriana en agua residual depurada, partiendo de una concentración inicial de $\sim 10^6$ - 10^8 UFC/100 mL, la cloración y la ozonización son los procesos más eficaces, logrando una inactivación elevada (-6 log) en pocos minutos ($\sim 0,2$ h). A continuación, los tratamientos UVA-vis/TiO₂/H₂O₂, foto-electro-Fenton (UVA/Fe^{2+/3+}/H₂O₂) y la desinfección foto-electroquímica presentan una velocidad de inactivación intermedia (aproximadamente 10 veces más lenta que la cloración o la ozonización), pudiendo lograr -6 unidades logarítmicas de desinfección en ~ 2 horas. Les siguen la fotocatalisis con TiO₂ (UVA-vis/TiO₂) y la irradiación con H₂O₂ (UVA-

vis/H₂O₂), que requieren más de 8 horas de tratamiento para eliminar -6 log. Por último, la irradiación UVA-vis, utilizando una $\lambda = 320-800$ nm, es el agente desinfectante menos eficaz, ya que produce cierta inactivación pero muy lentamente, estimándose en más de 20 horas el tiempo necesario para reducir la población bacteriana -6 log.

- La luz UVA-vis utilizada en la experimentación ($\lambda = 320-800$ nm) por sí sola no produce niveles elevados de inactivación bacteriana en aguas de salida de depuradora. Sin embargo, es capaz de activar otros agentes desinfectantes como TiO₂, H₂O₂ o sales de hierro, por lo que estos tratamientos podrían realizarse en presencia de luz solar natural, con cierto grado de efectividad.
- El H₂O₂ potencia el limitado poder desinfectante de la radiación UVA, mejora la actividad fotocatalítica del TiO₂ y aumenta la eficacia de los procesos foto-electro-Fenton. Sin embargo, el H₂O₂ en concentraciones relativamente elevadas (20 mg H₂O₂/L) actúa de scavenger de ROS cuando se combina con O₃.
- La desinfección de aguas de salida de depuradora presenta habitualmente una inactivación bacteriana lenta al inicio de la aplicación de los tratamientos debido al efecto que ejercen las características físico-químicas de la matriz, como la presencia de materia orgánica e inorgánica, la cual compite con las bacterias por reaccionar con los agentes oxidantes aplicados y/o las ROS generadas.
- Los diversos modelos matemáticos aplicados (Hom, bifásico, Mafart y Geeraerd) permiten describir, comparar y predecir las cinéticas de inactivación obtenidas mediante los distintos tratamientos y condiciones de operación aplicadas. Dichos modelos cinéticos proporcionan una estimación del tiempo de tratamiento necesario para un nivel de desinfección dado y, por tanto, pueden emplearse, por ejemplo, como herramienta para la estimación de costes de operación o el diseño de reactores. En general, el modelo de Hom modificado describe adecuadamente las curvas de inactivación obtenidas mediante cloración. El modelo de Geeraerd se ajusta bien a los datos obtenidos mediante ozonización y foto-electro-Fenton, procesos en los que se observan fenómenos conjuntos de hombro y cola. El modelo de Hom y el de Mafart describen apropiadamente la inactivación alcanzada mediante irradiación UVA, H₂O₂, TiO₂ y las combinaciones entre estos agentes desinfectantes.
- Considerando los costes de operación estimados, calculados únicamente en base al consumo de reactivos y/o de energía necesaria para generarlos, la cloración resulta el tratamiento más económico, seguido de cerca por la ozonización. Los procesos foto-

electro-Fenton presentan un coste algo mayor, que aumenta según el grado de inactivación requerido. Por último, los procesos en los que interviene el dióxido de titanio son los de mayor coste de operación, incluso teniendo en cuenta la reutilización de este catalizador. Aunque no se han cuantificado, si se tuvieran en cuenta los costes de inversión y mantenimiento, el tratamiento de cloración así como aquellos en los que podría utilizarse luz solar, resultarían con diferencia los más económicos, muy lejos de la ozonización.

- Como conclusión final, la cloración y la ozonización presentan un elevado poder desinfectante en las aguas de salida de depuradora, aunque la posible generación de compuestos organoclorados durante la cloración podría suponer un problema para su reutilización. La ozonización evita el problema de la formación excesiva de trihalometanos sin perder eficacia de inactivación y con un coste de operación equiparable a la cloración, siendo su principal inconveniente la necesidad de infraestructuras más complejas con un coste de inversión considerable. Los tratamientos foto-electro-Fenton suponen una alternativa eficaz, con tiempos de exposición relativamente prolongados y costes de operación algo mayores que la ozonización pero sin la necesidad de equipación tan compleja. Finalmente, la fotocatalisis con TiO_2 resulta un tratamiento de acción desinfectante muy lenta y con un coste de operación elevado, relacionado sobre todo con el elevado coste de dióxido de titanio, al cual habría que añadir el coste de un proceso adicional de nanofiltración, al que habría que someter al efluente tratado, con el fin de eliminar las nanopartículas presentes y minimizar de esta forma el impacto ambiental sobre medio receptor.

Conclusions

This chapter presents the main general conclusions that are extracted from the experimental results obtained in this research work. Additionally, specific conclusions are included at the end of the previous chapters (Chapters 3-7). The general conclusions are:

- The high microbial load of fecal origin which is found in urban wastewaters can be reduced to some extent through the different processes of a conventional wastewater treatment plant (WWTP), especially during the biological treatment process. However, treated wastewaters still contain relatively high concentrations of indicator bacteria, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp., pointing out the possible presence of pathogenic microorganisms. Therefore, in order to obtain water of an appropriate quality which allows its safe reuse, it is necessary to apply additional treatments capable of diminish the microbiological load of the effluent, thus meeting the specific water quality criteria established by RD 1620/2007.
- In general, after the application of the different disinfection treatments in WWTP effluents studied in this work, a lower inactivation efficiency is observed on the bacterium *Enterococcus* sp. (Gram-positive) than on the bacterium *Escherichia coli* (Gram-negative), probably due to the differences on the structure of these bacteria; specifically, the cell wall of *Enterococcus* sp. is formed by a thicker layer of peptidoglycan than *E. coli*'s, which would increase the resistance of the former bacterium. On the contrary, the cellular mechanisms of repair seem to be similar in both bacteria, since the treated cells show survival and/or regrowth tendencies very alike for both bacteria. Due to the higher resistance of *Enterococcus* spp. to the disinfection treatments, this bacterium should be considered as a most reliable parameter for microbial control than the commonly used indicator *E. coli*.
- If the reference parameter used to evaluate the disinfection power is the treatment time needed to achieve a specific level of bacterial inactivation in WWTP effluents, with an initial concentration of $\sim 10^6$ - 10^8 CFU/100 mL, it can be said that the chlorination and the ozonation are the most efficient processes, producing a high inactivation (-6 log) within a few minutes (~ 0.2 h). Next, UVA-vis/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, photo-electro-Fenton (UVA/ $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) and photo-electro-chemical disinfection treatments present an intermediate inactivation rate (approximately 10 times slower than chlorination or ozonation), achieving -6 log of disinfection in ~ 2 hours. Afterwards, TiO_2 photocatalysis (UVA-vis/ TiO_2) and irradiation with H_2O_2 (UVA-vis/ H_2O_2) require more than 8 hours of treatment to remove -6 log. Finally, UVA-vis irradiation ($\lambda = 320$ -

800 nm) is the less efficient disinfectant agent, which leads to very slow inactivation, with an estimation of more than 20 hours needed to remove -6 log of bacteria.

- UVA-vis light ($\lambda = 320\text{-}800\text{ nm}$) alone does not lead to high bacterial inactivation levels in WWTP effluents. However, its presence is essential for the activation of other disinfectant agents, such as TiO_2 , H_2O_2 or iron salts; therefore, these treatments can be conducted under natural sun light, achieving inactivation to a certain degree of efficiency.
- H_2O_2 improves the limited disinfectant power of the UVA-vis radiation, enhances the photocatalytic activity of TiO_2 and increases the efficiency of the photo-Fenton processes. However, H_2O_2 in relatively high concentrations (20 mg/L H_2O_2) acts as ROS scavenger when combined with O_3 .
- The disinfection of WWTPs effluents commonly presents a slow inactivation rate in the beginning of the treatment application, due to the effect of the physical-chemical characteristics of the water matrix, such as the presence of organic and inorganic matter, which competes with the bacteria for reacting with the applied oxidant agents and/or the generated ROS.
- The mathematical models applied in this work (Hom, biphasic, Mafart and Geeraerd) allow to describe, compare and predict the inactivation kinetics obtained with the different treatments and under the applied operational conditions. These kinetic models provide an estimation of the treatment time needed to achieve a specific level of inactivation and, therefore, they can be used, for instance, as a tool for the operational cost estimation and the reactors design. In general, the modified Hom model properly describes the inactivation curves obtained by chlorination. The Geeraerd model fits to the experimental data obtained with ozonation and photo-electro-Fenton, processes in which shoulder and tail phenomena are simultaneous observed. The Hom and the Mafart models appropriately describe the inactivation reached by UVA irradiation, H_2O_2 , TiO_2 and the combination of these disinfectant agents.
- The estimated operational costs, which are calculated taking into account only the reagents and/or the energy consumption, show that the chlorination is the most economic treatment, closely followed by the ozonation. The photo-electro-Fenton processes present a bit higher cost, which increases with increasing inactivation level required. Finally, the treatments including TiO_2 have the highest operational cost, even taking into account the reuse of the catalyst. Despite the fact that they have not been

quantified, if the investment and the maintenance costs were to be considered, the chlorination treatment as well as those treatments using solar light would be more economic than the ozonation.

- As a final conclusion, the chlorination and the ozonation show a high disinfectant power in WWTP effluents, although the possible generation of organochlorinated compounds during the chlorination might be a problem for their reuse. The ozonation avoids the issue of excessive trihalomethanes formation without losing inactivation efficiency and with an operational cost comparable to chlorination, being its main disadvantage the need of more complex infrastructures with a considerable investment cost. The photo-electro-Fenton treatments are an efficient alternative, with relatively long exposure times and operational costs higher than ozonation but without the need of very complex equipment. Finally, the TiO_2 photocatalysis not only shows slow inactivation rates in WWTP effluents and high operational costs, mainly related to TiO_2 cost, but also has to address the issue of the nanoparticles presence and their removal from the water through nanofiltration, thus reducing the impact on the receiving environment.

Capítulo 9. Referencias

- Abeledo-Lameiro M. J., Reboredo-Fernández A., Polo-López M. I., Fernández-Ibáñez P., Ares-Mazás E., Gómez-Couso H. 2017. Photocatalytic inactivation of the waterborne protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* using TiO₂/H₂O₂ under simulated and natural solar conditions. *Catalysis Today*, 280, Part 1, 132-138.
- AENOR. 1994. UNE-EN 27888:1994. Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica.
- AENOR. 2001a. UNE-EN ISO 7027:2001. Calidad del agua. Determinación de la turbiedad.
- AENOR. 2001b. UNE-EN ISO 7899-2. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales.
- AENOR. 2001c. UNE-EN ISO 9308-1. Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes.
- AENOR. 2007. UNE-EN ISO 5667-1:2007. Calidad del agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- Agrotterra. 2017. Agrotterra Sulfato de Hierro [Online]. Disponible en: <http://www.agrotterra.com/p/sulfato-de-hierro-25-kg-fino-3073437/3073437>. Último acceso 23/01/2017.
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R. 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53, 51-59.
- Andronic L., Isac L., Miralles-Cuevas S., Visa M., Oller I., Duta A., Malato S. 2016. Pilot-plant evaluation of TiO₂ and TiO₂-based hybrid photocatalysts for solar treatment of polluted water. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 469-478.
- Annabi C., Fourcade F., Soutrel I., Geneste F., Floner D., Bellakhal N., Amrane A. 2016. Degradation of enoxacin antibiotic by the electro-Fenton process: Optimization, biodegradability improvement and degradation mechanism. *Journal of Environmental Management*, 165, 96-105.
- ASTM 2008. ASTM D1426: Standar Test Methods for Ammonia Nitrogen In Water.
- Augugliaro V., Litter M., Palmisano L., Soria J. 2006. The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photoprocess performance. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 7, 127-144.
- AWWA,ASCE 2012. Ultraviolet Disinfection. *Water Treatment Plant Design*, Fifth Edition. McGraw Hill Professional, Access Engineering.
- Azbar N., Yonar T., Kestioglu K. 2004. Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent. *Chemosphere*, 55, 35-43.

- Aziz H. A., Othman O. M., Abu Amr S. S. 2013. The performance of electro-Fenton oxidation in the removal of coliform bacteria from landfill leachate. *Waste Management*, 33, 396-400.
- Barbeau B., Boulos L., Desjardins R., Coallier J., Prévost M. 1999. Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Water Research*, 33, 2941-2948.
- Barrado-Moreno M. M., Beltrán-Heredia J., Martín-Gallardo J. Degradation of microalgae from freshwater by UV radiation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
- Barrett M., Fitzhenry K., O'Flaherty V., Dore W., Keaveney S., Cormican M., Rowan N., Clifford E. 2016. Detection, fate and inactivation of pathogenic norovirus employing settlement and UV treatment in wastewater treatment facilities. *Science of The Total Environment*, 568, 1026-1036.
- Becerra-Castro C., Macedo G., Silva A. M. T., Manaia C. M., Nunes O. C. 2016. Proteobacteria become predominant during regrowth after water disinfection. *Science of The Total Environment*, 573, 313-323.
- Bellamy W. D., Hickman G. T., Mueller P. A., Ziemba N. 1991. Treatment of VOC-contaminated groundwater by hydrogen peroxide and ozone oxidation. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 63, 120-128.
- Bilotta P., Steinmetz R. L. R., Kunz A., Mores R. 2017. Swine effluent post-treatment by alkaline control and UV radiation combined for water reuse. *Journal of Cleaner Production*, 140, Part 3, 1247-1254.
- Biswas K., Craik S., Smith D. W., Belosevic M. 2003. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by free chlorine in natural water. *Water Research*, 37, 4737-4747.
- Black & Veatch Corporation. 2011. *White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, Wiley.
- Borrego J. J., Córnaux R., Moriñigo M. A., Martínez-Manzanares E., Romero P. 1990. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Research*, 24, 111-116.
- Boyle M., Sichel C., Fernández-Ibáñez P., Arias-Quiroz G. B., Iriarte-Puña M., Mercado A., Ubomba-Jaswa E., McGuigan K. G. 2008. Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2997-3001.
- Brahmi M., Belhadi N. H., Hamdi H., Hassen A. 2010. Modeling of secondary treated wastewater disinfection by UV irradiation: effects of suspended solids content. *Journal of environmental sciences (China)*, 22, 1218-24.

- Brillas E., Sirés I., Oturan M. A. 2009. Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry. *Chemical Reviews*, 109, 6570-6631.
- Brillas E., Martínez-Huitle C. A. 2015. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166-167, 603-643.
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3, 3-8.
- Campos-Martin J. M., Blanco-Brieva G., Fierro J. L. 2006. Hydrogen peroxide synthesis: an outlook beyond the anthraquinone process. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45, 6962-84.
- Castro-Alferez M., Polo-Lopez M. I., Marugán J., Fernández-Ibáñez P. 2017. Mechanistic modeling of UV and mild-heat synergistic effect on solar water disinfection. *Chemical Engineering Journal*, 316, 111-120.
- Castro G. A. 1996. *Medical Microbiology*. Chapter 86. Helminths: structure, classification, growth, and development. 4^a edición. Ed. Galveston (TX). University of Texas.
- Clingen P. H., Arlett C. F., Roza L., Mori T., Nikaido O., Green M. H. 1995. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. *Cancer research*, 55, 2245-8.
- Corona-Vasquez B., Rennecker J. L., Driedger A. M., Mariñas B. J. 2002. Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide followed by free chlorine or monochloramine. *Water Research*, 36, 178-188.
- Cotillas S., Llanos J., Rodrigo M. A., Cañizares P. 2015. Use of carbon felt cathodes for the electrochemical reclamation of urban treated wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental*, 162, 252-259.
- Cushnie T. P. T., Robertson P. K. J., Officer S., Pollard P. M., McCullagh C., Robertson J. M. C. 2009. Variables to be considered when assessing the photocatalytic destruction of bacterial pathogens. *Chemosphere*, 74, 1374-1378.
- Chen J., Wang P. 2005. Effect of relative humidity on electron distribution and ozone production by DC coronas in air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 33, 808-812.
- Cheng H.-W. A., Lucy F. E., Graczyk T. K., Broaders M. A., Tamang L., Connolly M. 2009. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitology Research*, 105, 689.

- Chick H. 1908. An Investigation of the Laws of Disinfection. *The Journal of Hygiene*, 8, 92-158.
- Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2284-2291.
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research*, 38, 1069-1077.
- Cho M., Yoon J. 2006. Enhanced bactericidal effect of O₃/H₂O₂ followed by Cl₂. *Ozone: Science & Engineering*, 28, 335-340.
- Cho M., Kim J., Kim J. Y., Yoon J., Kim J. H. 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44, 3410-8.
- Chong M. N., Jin B., Chow C. W. K., Saint C. 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*, 44, 2997-3027.
- Chong M. N., Jin B., Saint C. P. 2011. Bacterial inactivation kinetics of a photo-disinfection system using novel titania-impregnated kaolinite photocatalyst. *Chemical Engineering Journal*, 171, 16-23.
- Chung C.-J., Lin H.-I., Chou C.-M., Hsieh P.-Y., Hsiao C.-H., Shi Z.-Y., He J.-L. 2009. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surface and Coatings Technology*, 203, 1081-1085.
- Da Pozzo A., Petrucci E., Merli C. 2008. Electrogeneration of hydrogen peroxide in seawater and application to disinfection. *Journal of Applied Electrochemistry*, 38, 997-1003.
- Dalrymple O. K., Stefanakos E., Trotz M. A., Goswami D. Y. 2010. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98, 27-38.
- Davies-Colley R. J., Craggs R. J., Park J., Sukias J. P., Nagels J. W., Stott R. 2005. Virus removal in a pilot-scale 'advanced' pond system as indicated by somatic and F-RNA bacteriophages. *Water science and technology*, 51, 107-10.
- Dbira S., Bensalah N., Cañizares P., Rodrigo M. A., Bedoui A. 2015. The electrolytic treatment of synthetic urine using DSA electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 744, 62-68.
- Deborde M., von Gunten U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*, 42, 13-51.

- Diao H. F., Li X. Y., Gu J. D., Shi H. C., Xie Z. M. 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochemistry*, 39, 1421-1426.
- Dietrich J. P., Loge F. J., Ginn T. R., Başağaoğlu H. 2007. Inactivation of particle-associated microorganisms in wastewater disinfection: Modeling of ozone and chlorine reactive diffusive transport in polydispersed suspensions. *Water Research*, 41, 2189-2201.
- Directiva 82/243/CEE. 1982. Directiva 82/243/CEE del Consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos.
- Directiva 91/271/CEE. 1991. Directiva del Consejo de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas
- Dou L., Gao L., Yang X., Song X. 2012. Hierarchical architectures TiO₂: Pollen-induced synthesis, remarkable crystalline-phase stability, tunable size, and reused photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204, 363-369.
- Draft_V.3.2. 2016. Development of minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge.
- Drosos M., Ren M., Frimmel F. H. 2015. The effect of NOM to TiO₂: interactions and photocatalytic behavior. *Applied Catalysis B: Environmental*, 165, 328-334.
- Dupuy M., Berne F., Herbelin P., Binet M., Berthelot N., Rodier M.-H., Soreau S., Héchard Y. 2014. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217, 335-339.
- Eaton A. D., Clesceri L. S., Rice E. W., Grennberg A. E. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, Washington, United States, American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Fagan R., McCormack D. E., Dionysiou D. D., Pillai S. C. 2016. A review of solar and visible light active TiO₂ photocatalysis for treating bacteria, cyanotoxins and contaminants of emerging concern. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 42, Part 1, 2-14.
- Feng W., Nansheng D. 2000. Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere*, 41, 1137-1147.
- Fenton H. J. H. 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899-910.
- Fiorentino A., Ferro G., Alferez M. C., Polo-López M. I., Fernández-Ibañez P., Rizzo L. 2015. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after

- disinfection by solar-driven and chlorination processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 43-50.
- Fisher M. B., Iriarte M., Nelson K. L. 2012. Solar water disinfection (SODIS) of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and MS2 coliphage: Effects of additives and alternative container materials. *Water Research*, 46, 1745-1754.
- Fujishima A., Rao T. N., Tryk D. A. 2000. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1, 1-21.
- Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. 2005. *Manual práctico de microbiología*, Masson.
- Gandhi V. G., Mishra M. K., Joshi P. A. 2012. A study on deactivation and regeneration of titanium dioxide during photocatalytic degradation of phthalic acid. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18, 1902-1907.
- Geeraerd A. H., Herremans C. H., Van Impe J. F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185-209.
- Geeraerd A. H., Valdramidis V. P., Van Impe J. F. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International journal of food microbiology*, 102, 95-105.
- Gehr R., Wagner M., Veerasubramanian P., Payment P. 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 37, 4573-4586.
- Gerrity D., Gamage S., Holady J. C., Mawhinney D. B., Quiñones O., Trenholm R. A., Snyder S. A. 2011. Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection. *Water Research*, 45, 2155-2165.
- Giannakis S., Merino Gamo A. I., Darakas E., Escalas-Cañellas A., Pulgarin C. 2014. Monitoring the post-irradiation *E. coli* survival patterns in environmental water matrices: Implications in handling solar disinfected wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 253, 366-376.
- Giannakis S., Darakas E., Escalas-Cañellas A., Pulgarin C. 2015a. Solar disinfection modeling and post-irradiation response of *Escherichia coli* in wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 281, 588-598.
- Giannakis S., Rtimi S., Darakas E., Escalas-Cañellas A., Pulgarin C. 2015b. Light wavelength-dependent *E. coli* survival changes after simulated solar disinfection of secondary effluent. *Photochemical & photobiological sciences* 14, 2238-50.
- Giannakis S., Polo-López M. I., Spuhler D., Sánchez Pérez J. A., Fernández Ibáñez P., Pulgarin C. 2016a. Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process. *Applied Catalysis B: Environmental*, 199, 199-223.

- Giannakis S., Polo-López M. I., Spuhler D., Sánchez Pérez J. A., Fernández Ibáñez P., Pulgarin C. 2016b. Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 2: A review of the applications for drinking water and wastewater disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 198, 431-446.
- Giannakis S., Ruales-Lonfat C., Rtimi S., Thabet S., Cotton P., Pulgarin C. 2016c. Castles fall from inside: Evidence for dominant internal photo-catalytic mechanisms during treatment of *Saccharomyces cerevisiae* by photo-Fenton at near-neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 185, 150-162.
- Giannakis S., Liu S., Carratalà A., Rtimi S., Bensimon M., Pulgarin C. 2017. Effect of Fe(II)/Fe(III) species, pH, irradiance and bacterial presence on viral inactivation in wastewater by the photo-Fenton process: Kinetic modeling and mechanistic interpretation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 204, 156-166.
- Glaze W. H. 1987. Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science & Technology*, 21, 224-230.
- Gogniat G., Thyssen M., Denis M., Pulgarin C., Dukan S. 2006. The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiology Letters*, 258, 18-24.
- Goñi M. P. 2011. Bacterias y parásitos en las aguas residuales urbanas. *Gestión y Tratamiento de Aguas Residuales*. Universidad de Zaragoza: Cátedra Mariano López Navarro.
- Guentzel M. N. 1996. Medical microbiology. Chapter 26. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. . In: BARON, S. (ed.). Galveston (TX): University of Texas
- Guerrero-Latorre L., Gonzales-Gustavson E., Hundesa A., Sommer R., Rosina G. 2016. UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 405-411.
- Gumy D., Rincon A. G., Hajdu R., Pulgarin C. 2006. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: Different types of suspended and fixed TiO₂ catalysts study. *Solar Energy*, 80, 1376-1381.
- Guzmán-Duque F. L., Palma-Goyes R. E., González I., Peñuela G., Torres-Palma R. A. 2014. Relationship between anode material, supporting electrolyte and current density during electrochemical degradation of organic compounds in water. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 221-226.
- Gyürék L. L., Finch G. R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124, 783-793.
- Haas C. N., Joffe J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: Modification of Hom's model for decay. *Environmental Science & Technology*, 28, 1367-9.

- Haber F., Weiss J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 147, 332-351.
- Hartman P. S., Eisenstark A. 1978. Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiation and hydrogen peroxide: distinction between recA-repairable and recA-nonrepairable damage. Journal of bacteriology, 133, 769-74.
- Hartman P. S., Eisenstark A., Pauw P. G. 1979. Inactivation of phage T7 by near-ultraviolet radiation plus hydrogen peroxide: DNA-protein crosslinks prevent DNA injection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76, 3228-3232.
- Heaselgrave W., Kilvington S. 2011. The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against *Ascaris*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Entamoeba* and *Cryptosporidium*. Acta tropica, 119, 138-43.
- Heaselgrave W., Patel N., Kilvington S., Kehoe S. C., McGuigan K. G. 2006. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water - a laboratory study using simulated sunlight. Letters in Applied Microbiology, 43, 125-30.
- Hijnen W. A. M., Beerendonk E. F., Medema G. J. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. Water Research, 40, 3-22.
- Hockberger P. E., Skimina T. A., Centonze V. E., Lavin C., Chu S., Dadras S., Reddy J. K., White J. G. 1999. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 6255-6260.
- Hoerter J., Pierce A., Troupe C., Epperson J., Eisenstark A. 1996. Role of enterobactin and intracellular iron in cell lethality during near-UV irradiation in *Escherichia coli*. Photochemistry and Photobiology, 64, 537-541.
- Hoerter J. D., Arnold A. A., Kuczynska D. A., Shibuya A., Ward C. S., Sauer M. G., Gizachew A., Hotchkiss T. M., Fleming T. J., Johnson S. 2005. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 81, 171-180.
- Hoigné J., Bader H. 1976. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. Water Research, 10, 377-386.
- Hoigné J., Bader H. 1978. Ozone initiated oxidation of solutes in wastewater: a reaction kinetic approach. Progress in Water Technology, 10, 657-671.
- Hoigné J., Bader H. 1983. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—I. Water Research, 17, 173-183.

- Hom L. W. 1972. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 98, 183-194.
- Hsiung C.-E., Lien H.-L., Galliano A. E., Yeh C.-S., Shih Y.-h. 2016. Effects of water chemistry on the destabilization and sedimentation of commercial TiO₂ nanoparticles: Role of double-layer compression and charge neutralization. *Chemosphere*, 151, 145-151.
- Huang H., Wu Q. Y., Tang X., Jiang R., Hu H. Y. 2013a. Formation of haloacetonitriles and haloacetamides during chlorination of pure culture bacteria. *Chemosphere*, 92, 375-81.
- Huang J.-J., Hu H.-Y., Wu Y.-H., Wei B., Lu Y. 2013b. Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on tetA-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *Chemosphere*, 90, 2247-2253.
- Huang X., Qu Y., Cid C. A., Finke C., Hoffmann M. R., Lim K., Jiang S. C. 2016. Electrochemical disinfection of toilet wastewater using wastewater electrolysis cell. *Water Research*, 92, 164-172.
- Huber M. M., Göbel A., Joss A., Hermann N., Löffler D., McArdell C. S., Ried A., Siegrist H., Ternes T. A., von Gunten U. 2005. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study. *Environmental Science & Technology*, 39, 4290-4299.
- Hunt N. K., Mariñas B. J. 1997. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Water Research*, 31, 1355-1362.
- Hunt N. K., Mariñas B. J. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Research*, 33, 2633-2641.
- Ibarz C. 2008. Desactivación de enterococos en agua natural mediante fotocatalisis con dióxido de titanio y radiación solar. Tesis Doctoral. , Universidad de Zaragoza.
- Iberdrola. 2017. Iberdrola Ofertas y Servicios [Online]. Disponible en: <https://www.iberdrola.es/> [Último acceso 24/01/2017].
- Iglesias O., Dios M. A. F. d., Tavares T., Sanromán M. A., Pazos M. 2015. Heterogeneous electro-Fenton treatment: preparation, characterization and performance in groundwater pesticide removal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 27, 276-282.
- Imlay J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395-418.
- INSHT. 2008. Nota Técnica de Prevención 797. Riesgos asociados a la nanotecnología. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

- Ireland J. C., Klostermann P., Rice E. W., Clark R. M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1668-70.
- Izquierdo F., Castro Hermida J. A., Fenoy S., Mezo M., González-Warleta M., Aguila C. 2011. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Research*, 45, 4837-4843.
- Jefferson B., Jarvis P., Bhagianathan G. K., Smith H., Autin O., Goslan E. H., MacAdam J., Carra I. 2016. Effect of elevated UV dose and alkalinity on metaldehyde removal and THM formation with UV/TiO₂ and UV/H₂O₂. *Chemical Engineering Journal*, 288, 359-367.
- Jiang C., Pang S., Ouyang F., Ma J., Jiang J. 2010. A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 174, 813-817.
- Keller A. A., Wang H., Zhou D., Lenihan H. S., Cherr G., Cardinale B. J., Miller R., Ji Z. 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science & Technology*, 44, 1962-7.
- Keogh M. B., Castro-Alfárez M., Polo-López M. I., Fernández Calderero I., Al-Eryani Y. A., Joseph-Titus C., Sawant B., Dhodapkar R., Mathur C., McGuigan K. G., Fernández-Ibáñez P. 2015. Capability of 19-L polycarbonate plastic water cooler containers for efficient solar water disinfection (SODIS): Field case studies in India, Bahrain and Spain. *Solar Energy*, 116, 1-11.
- Kim J.-H., Elovitz M. S., von Gunten U., Shukairy H. M., Mariñas B. J. 2007. Modeling *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation and bromate in a flow-through ozone contactor treating natural water. *Water Research*, 41, 467-475.
- Kogelschatz U., Eliasson B., Hirth M. 1988. Ozone Generation from Oxygen and Air: Discharge Physics and Reaction Mechanisms. *Ozone: Science & Engineering*, 10, 367-377.
- Lanao M., Ormad M. P., Ibarz C., Miguel N., Ovelleiro J. L. 2008. Bactericidal effectiveness of O₃, O₃/H₂O₂ and O₃/TiO₂ on *Clostridium perfringens*. *Ozone: Science & Engineering*, 30, 431-438.
- Lanao M., Ormad M. P., Goñi P., Miguel N., Mosteo R., Ovelleiro J. L. 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂. *Solar Energy*, 84, 703-709.
- Lanao M. 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral., Universidad de Zaragoza.
- Lanao M., Ormad M. P., Mosteo R., Ovelleiro J. L. 2012. Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water. *Solar Energy*, 86, 619-625.

- Lawrie K., Mills A., Figueredo-Fernández M., Gutiérrez-Alfaro S., Manzano M., Saladin M. 2015. UV dosimetry for solar water disinfection (SODIS) carried out in different plastic bottles and bags. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 208, 608-615.
- Lazarova V., Liechti P.-A., Savoye P., Hausler R. 2013. Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 3, 337-345.
- Lee E. S., Lee M. H., Kim B. S. 2015a. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 143-8.
- Lee H., Lee E., Lee C.-H., Lee K. 2011. Degradation of chlorotetracycline and bacterial disinfection in livestock wastewater by ozone-based advanced oxidation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 17, 468-473.
- Lee O. M., Kim H. Y., Park W., Kim T.-H., Yu S. 2015b. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. *Journal of Hazardous Materials*, 295, 201-208.
- Lee Y., Imminger S., Czekalski N., von Gunten U., Hammes F. 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.
- Levantesi C., La Mantia R., Masciopinto C., Böckelmann U., Ayuso-Gabella M. N., Salgot M., Tandoi V., Van Houtte E., Wintgens T., Grohmann E. 2010. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of The Total Environment*, 408, 4923-4930.
- Li D., Gu A. Z., Zeng S., Yang W., He M., Shi H. 2011. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 1691-1698.
- Li D., Zeng S., Gu A. Z., He M., Shi H. 2013. Inactivation, reactivation and regrowth of indigenous bacteria in reclaimed water after chlorine disinfection of a municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*, 25, 1319-1325.
- Li Y., Zhang X., Yang M., Liu J., Li W., Graham N. J. D., Li X., Yang B. 2017a. Three-step effluent chlorination increases disinfection efficiency and reduces DBP formation and toxicity. *Chemosphere*, 168, 1302-1308.
- Li Y., Li K., Zhou Y., Li X., Tao T. 2017b. Kinetic analysis of *Legionella* inactivation using ozone in wastewater. *Chemosphere*, 168, 630-637.

- Lonnen J., Kilvington S., Kehoe S. C., Al-Touati F., McGuigan K. G. 2005. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research*, 39, 877-883.
- Lopez-Alvarez B., Torres-Palma R. A., Ferraro F., Penuela G. 2012. Solar photo-Fenton treatment of carbofuran: analysis of mineralization, toxicity, and organic by-products. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 47, 2141-50.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*, Ed. Pearson Educación S.A.
- Maezono T., Tokumura M., Sekine M., Kawase Y. 2011. Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere*, 82, 1422-1430.
- Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.
- MAGRAMA. 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Innovación e Investigación en el sector del Agua. Líneas Estratégicas. Gobierno de España
- MAGRAMA 2016. Nota de Prensa del Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente.
- Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M. I., Blanco J., Gernjak W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147, 1-59.
- Mandal S. M., Ghosh A. K., Pati B. R. 2015. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents. *American Journal of Infection Control*, 43, e87-8.
- Maness P.-C., Smolinski S., Blake D. M., Huang Z., Wolfrum E. J., Jacoby W. A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4094-4098.
- Mangayayam M., Kiwi J., Giannakis S., Pulgarin C., Zivkovic I., Magrez A., Rtimi S. 2017. FeOx magnetization enhancing *E. coli* inactivation by orders of magnitude on Ag-TiO₂ nanotubes under sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 202, 438-445.
- Marín I., Goñi P., Lasheras A. M., Ormad M. P. 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecological Engineering*, 74, 28-32.
- Matilainen A., Sillanpää M. 2010. Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes. *Chemosphere*, 80, 351-365.

- McGuigan K. G., Conroy R. M., Mosler H.-J., Preez M. d., 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.
- McGuigan K. G., Joyce T. M., Conroy R. M., Gillespie J. B., Elmore-Meegan M. 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1138-48.
- McGuigan K. G., Mendez-Hermida F., Castro-Hermida J. A., Ares-Mazas E., Kehoe S. C., Boyle M., Sichel C., Fernandez-Ibanez P., Meyer B. P., Ramalingham S., Meyer E. A. 2006. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 453-63.
- Méndez-Hermida F., Ares-Mazás E., McGuigan K. G., Boyle M., Sichel C., Fernández-Ibáñez P. 2007. Disinfection of drinking water contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under natural sunlight and using the photocatalyst TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88, 105-111.
- Metcalf & Eddy 2002. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, Nueva York, McGraw-Hill Education.
- Miguel N. 2010. Estudio de la eliminación de plaguicidas presentes habitualmente en aguas de la cuenca del Ebro mediante procesos de oxidación avanzada. Tesis Doctoral., Universidad de Zaragoza.
- Miguel N., Lanao M., Valero P., Mosteo R., Ormad M. P. 2016. *Enterococcus* sp. inactivation by ozonation in natural water: Influence of H₂O₂ and TiO₂ and inactivation kinetics modeling. *Ozone: Science & Engineering*, 38, 443-451.
- Miller H. C., Morgan M. J., Wylie J. T., Kaksonen A. H., Sutton D., Braun K., Puzon G. J. 2017. Elimination of *Naegleria fowleri* from bulk water and biofilm in an operational drinking water distribution system. *Water Research*, 110, 15-26.
- Miranda-García N., Suárez S., Maldonado M. I., Malato S., Sánchez B. 2014. Regeneration approaches for TiO₂ immobilized photocatalyst used in the elimination of emerging contaminants in water. *Catalysis Today*, 230, 27-34.
- Moncayo-Lasso A., Mora-Arismendi L. E., Rengifo-Herrera J. A., Sanabria J., Benitez N., Pulgarin C. 2012. The detrimental influence of bacteria (*E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*) on the degradation of organic compounds (and vice versa) in TiO₂ photocatalysis and near-neutral photo-Fenton processes under simulated solar light. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11, 821-827.
- Moreno-Andrés J., Romero-Martínez L., Acevedo-Merino A., Nebot E. UV-based technologies for marine water disinfection and the application to ballast water: Does salinity interfere with disinfection processes? *Science of The Total Environment*.

- Mosteo R., Miguel N., Martín-Muniesa S., Ormad M. P., Ovelleiro J. L. 2009. Evaluation of trihalomethane formation potential in function of oxidation processes used during the drinking water production process. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 661-666.
- Mosteo R., Ormad M. P., Goni P., Rodríguez-Chueca J., García A., Clavel A. 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Science and Technology* 68, 575-83.
- Muela A., Orruño M., Alonso M. L., Pazos M., Arana I., Alonso R. M., Jiménez R. M., Garaizabal I., Maguregui M. I., Barcina I. 2011. Microbiological parameters as an additional tool to improve wastewater treatment plant monitoring. *Ecological Indicators*, 11, 431-437.
- Murillo R., Sarasa J., Lanao M., Ovelleiro J. L. 2010. Degradation of chlorpyrifos in water by advanced oxidation processes. *Water Science and Technology: Water Supply-WSTWS*, 10, 1-6.
- NILSA. 2016. NILSA Depuradoras [Online]. Disponible en: http://www.nilsa.com/depuracion/depuracion_ficha.asp?idd=193 [Último acceso 25/11/2016].
- Nogueira R. F. P., Oliveira M. C., Paterlini W. C. 2005. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta*, 66, 86-91.
- Ono R., Nakagawa Y., Tokumitsu Y., Matsumoto H., Oda T. 2014. Effect of humidity on the production of ozone and other radicals by low-pressure mercury lamps. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 274, 13-19.
- Ormad M. P., Cortes S., Puig A., Ovelleiro J. L. 1997. Degradation of organochloride compounds by O₃ and O₃/H₂O₂. *Water Research*, 31, 2387-2391.
- Ormad M. P. 2011. Reutilización de aguas residuales urbanas. *Gestión y Tratamiento de Aguas Residuales*. Universidad de Zaragoza: Cátedra Mariano López Navarro.
- Ortega-Gómez E., Fernández-Ibáñez P., Ballesteros Martín M. M., Polo-López M. I., Esteban García B., Sánchez Pérez J. A. 2012. Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival. *Water Research*, 46, 6154-6162.
- Ortega-Gómez E., Esteban García B., Ballesteros Martín M. M., Fernández Ibáñez P., Sánchez Pérez J. A. 2014. Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH. *Water Research*, 63, 316-324.
- Ortega-Gómez E., Ballesteros Martín M. M., Carratalà A., Fernández Ibáñez P., Sánchez Pérez J. A., Pulgarín C. 2015. Principal parameters affecting virus inactivation by the solar photo-Fenton process at neutral pH and μM concentrations of H₂O₂ and Fe²⁺/³⁺. *Applied Catalysis B: Environmental*, 174-175, 395-402.

- Pablos C., van Grieken R., Marugán J., Chowdhury I., Walker S. L. 2013. Study of bacterial adhesion onto immobilized TiO₂: Effect on the photocatalytic activity for disinfection applications. *Catalysis Today*, 209, 140-146.
- Pablos C., Van Grieken R., Marugán J., Muñoz A. 2012. Simultaneous photocatalytic oxidation of pharmaceuticals and inactivation of *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents with suspended and immobilised TiO₂. *Water Science and Technology*, 65, 2016-2023.
- Panizza M., Cerisola G. 2009. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chemical Reviews*, 109, 6541-69.
- Parsons S. 2004. *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*, IWA Publishing.
- Pernitsky D. J., Finch G. R., Huck P. M. 1995. Disinfection kinetics of heterotrophic plate count bacteria in biologically treated potable water. *Water Research*, 29, 1235-1241.
- Petrucci E., Montanaro D., Le Donne S. 2009. Effect of carbon material on the performance of a Gas Diffusion Electrode in electro-Fenton process. *Journal of Environmental Management*, 19, 299-305.
- Petrucci E., Da Pozzo A., Di Palma L. 2016. On the ability to electrogenerate hydrogen peroxide and to regenerate ferrous ions of three selected carbon-based cathodes for electro-Fenton processes. *Chemical Engineering Journal*, 283, 750-758.
- Pfeifer G. P., You Y.-H., Besaratinia A. 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571, 19-31.
- Plan Nacional de Reutilización de Aguas. 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España.
- Polo-López M. I., García-Fernández I., Velegraki T., Katsoni A., Oller I., Mantzavinos D., Fernández-Ibáñez P. 2012. Mild solar photo-Fenton: An effective tool for the removal of *Fusarium* from simulated municipal effluents. *Applied Catalysis B: Environmental*, 111-112, 545-554.
- Polo-López M. I., Castro-Alfárez M., Nahim-Granados S., Malato S., Fernández-Ibáñez P. 2017. *Legionella jordanis* inactivation in water by solar driven processes: EMA-qPCR versus culture-based analyses for new mechanistic insights. *Catalysis Today*, *In Press*.
- Pourzand C., Watkin R. D., Brown J. E., Tyrrell R. M. 1999. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: The role of ferritin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 6751-6756.

- Pruitt K. M., Kamau D. N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221-231.
- Qiu S., He D., Ma J., Liu T., Waite T. D. 2015. Kinetic modeling of the electro-Fenton process: quantification of Reactive Oxygen Species generation. *Electrochimica Acta*, 176, 51-58.
- Quero-Pastor M., Valenzuela A., Quiroga J. M., Acevedo A. 2014a. Degradation of drugs in water with advanced oxidation processes and ozone. *Journal of Environmental Management*, 137, 197-203.
- Quero-Pastor M. J., Garrido-Perez M. C., Acevedo A., Quiroga J. M. 2014b. Ozonation of ibuprofen: a degradation and toxicity study. *Science of the Total Environment*, 466-467, 957-64.
- Ramseier M. K., von Gunten U., Freihofer P., Hammes F. 2011. Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. *Water Research*, 45, 1490-1500.
- Ran Z., Li S., Huang J., Yuan Y., Cui C., Williams C. D. 2010. Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 22, 1954-9.
- Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63, 88-102.
- RD 817/2015. 2015. Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental.
- RD 1620/2007. 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas
- Reinthal F. F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckebauer G., Mascher F., Marth E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37, 1685-1690.
- Ren G., Zhou M., Liu M., Ma L., Yang H. 2016. A novel vertical-flow electro-Fenton reactor for organic wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 298, 55-67.
- Rincón A. G., Pulgarin C., Adler N., Peringer P. 2001. Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors — dihydroxybenzene isomers — in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 139, 233-241.

- Rincón A.-G., Pulgarin C. 2004a. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 51, 283-302.
- Rincón A.-G., Pulgarin C. 2004b. Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO₂: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection? *Solar Energy*, 77, 635-648.
- Rincón A.-G., Pulgarin C. 2004c. Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental*, 49, 99-112.
- Rincón A.-G., Pulgarin C. 2006. Comparative evaluation of Fe³⁺ and TiO₂ photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 63, 222-231.
- Rizzo L. 2009. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO₂ photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 48-51.
- Robertson J. M. C., J. Robertson P. K., Lawton L. A. 2005. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 175, 51-56.
- Rodríguez-Chueca J., Mosteo R., Ormad M. P., Ovelleiro J. L. 2012. Factorial experimental design applied to *Escherichia coli* disinfection by Fenton and photo-Fenton processes. *Solar Energy*, 86, 3260-3267.
- Rodríguez-Chueca J. 2013. Aplicación de Procesos Fenton y Pseudo-Fenton en la Regeneración de Aguas Residuales Urbanas. Tesis Doctoral. , Universidad de Zaragoza.
- Rodríguez-Chueca J., Polo-López M. I., Mosteo R., Ormad M. P., Fernández-Ibáñez P. 2014. Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using a mild solar photo-Fenton. *Applied Catalysis B: Environmental*, 150-151, 619-629.
- Rodríguez-Chueca J., Ormad Melero M. P., Mosteo Abad R., Esteban Finol J., Ovelleiro Narvion J. L. 2015a. Inactivation of *Escherichia coli* in fresh water with advanced oxidation processes based on the combination of O₃, H₂O₂, and TiO₂. *Kinetic modeling. Environmental Science and Pollution Research* 22, 10280-90.
- Rodríguez-Chueca J., Ormad M. P., Mosteo R., Ovelleiro J. L. 2015b. Kinetic modeling of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. inactivation in wastewater treatment by photo-Fenton and H₂O₂/UV-vis processes. *Chemical Engineering Science*, 138, 730-740.
- Ruales-Lonfat C., Benítez N., Sienkiewicz A., Pulgarín C. 2014. Deleterious effect of homogeneous and heterogeneous near-neutral photo-Fenton system on *Escherichia*

- coli*. Comparison with photo-catalytic action of TiO₂ during cell envelope disruption. *Applied Catalysis B: Environmental*, 160–161, 286-297.
- Salaeh S., Kovacic M., Kosir D., Kusic H., Lavrencic Stangar U., Dionysiou D. D., Loncaric Bozic A. 2017. Reuse of TiO₂-based catalyst for solar driven water treatment; thermal and chemical reactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 333, 117-129.
- Saqer A. S., Seham H., Ragaa G., Yehia Ael W., Wafaa S. 2007. Optimum methods of inactivation of *Strongyloides stercoralis* larvae from reclaimed wastewater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 130, 341-6.
- Saran M., Beck-Speier I., Fellerhoff B., Bauer G. 1999. Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 482-490.
- Seeger E. M., Braeckevelt M., Reiche N., Müller J. A., Kästner M. 2016. Removal of pathogen indicators from secondary effluent using slow sand filtration: Optimization approaches. *Ecological Engineering*, 95, 635-644.
- Serna-Galvis E. A., Silva-Agredo J., Giraldo A. L., Flórez O. A., Torres-Palma R. A. 2016. Comparison of route, mechanism and extent of treatment for the degradation of a β -lactam antibiotic by TiO₂ photocatalysis, sonochemistry, electrochemistry and the photo-Fenton system. *Chemical Engineering Journal*, 284, 953-962.
- Serna-Galvis E. A., Jojoa-Sierra S. D., Berrio-Perlaza K. E., Ferraro F., Torres-Palma R. A. 2017. Structure-reactivity relationship in the degradation of three representative fluoroquinolone antibiotics in water by electrogenerated active chlorine. *Chemical Engineering Journal*, 315, 552-561.
- Sichel C., de Cara M., Tello J., Blanco J., Fernández-Ibáñez P. 2007. Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi: *Fusarium* species. *Applied Catalysis B: Environmental*, 74, 152-160.
- Sichel C., Fernández-Ibáñez P., de Cara M., Tello J. 2009. Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water. *Water Research*, 43, 1841-1850.
- Sinha R. P., Hader D. P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1, 225-36.
- Smeets P. W. M. H., van der Helm A. W. C., Dullemont Y. J., Rietveld L. C., van Dijk J. C., Medema G. J. 2006. Inactivation of *Escherichia coli* by ozone under bench-scale plug flow and full-scale hydraulic conditions. *Water Research*, 40, 3239-3248.
- Snider K. E., Darby J. L., Tchobanoglous G. 1991. Evaluation of Ultraviolet Disinfection for Wastewater Reuse Applications in California, University of California.

- Sommer R., Pribil W., Pflieger S., Haider T., Werderitsch M., Gehringer P. 2004. Microbicidal efficacy of an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment. *Water Science and Technology*, 50, 159-64.
- Sousa M. A., Gonçalves C., Vilar V. J. P., Boaventura R. A. R., Alpendurada M. F. 2012. Suspended TiO₂-assisted photocatalytic degradation of emerging contaminants in a municipal WWTP effluent using a solar pilot plant with CPCs. *Chemical Engineering Journal*, 198-199, 301-309.
- Spuhler D., Andrés Rengifo-Herrera J., Pulgarin C. 2010. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Applied Catalysis B: Environmental*, 96, 126-141.
- Srinivasan S., Aslan A., Xagorarakis I., Alocilja E., Rose J. B. 2011. *Escherichia coli*, enterococci, and *Bacteroides thetaiotaomicron* qPCR signals through wastewater and septage treatment. *Water Research*, 45, 2561-72.
- Sun Y. X., Wu Q. Y., Hu H. Y., Tian J. 2009. Effects of operating conditions on THMs and HAAs formation during wastewater chlorination. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 1290-5.
- Suryaman D., Hasegawa K., Kagaya S., Yoshimura T. 2009. Continuous mineralization of concentrated phenol dissolved in an electrolyte-containing tap water by integrating biological-photocatalytic treatment with TiO₂ separation: Utilization of sunlight and reuse of TiO₂. *Environmental Technology*, 30, 215-224.
- Tachikawa M., Yamanaka K. 2014. Synergistic disinfection and removal of biofilms by a sequential two-step treatment with ozone followed by hydrogen peroxide. *Water Research*, 64, 94-101.
- Templeton M. R., Oddy F., Leung W.-k., Rogers M. 2009. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 36, 889-894.
- Tomiyasu H., Fukutomi H., Gordon G. 1985. Kinetics and mechanism of ozone decomposition in basic aqueous solution. *Inorganic Chemistry*, 24, 2962-2966.
- Tonani K. A. A., Julião F. C., Trevilato T. M. B., Takayanagui A. M. M., Bocio A., Domingo J. L., Segura-Muñoz S. I. 2011. Behavior of metals, pathogen parasites, and indicator bacteria in sewage effluents during biological treatment by activated sludge. *Biological Trace Element Research*, 143, 1193-1201.
- Tree J. A., Adams M. R., Lees D. N. 2003. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2038-2043.
- Tyrrell S. A., Rippey S. R., Watkins W. D. 1995. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Research*, 29, 2483-2490.

- Ubomba-Jaswa E., Navntoft C., Polo-Lopez M. I., Fernandez-Ibanez P., McGuigan K. G. 2009. Solar disinfection of drinking water (SODIS): an investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8, 587-95.
- USEPA. 1983. Chlorine, Total Residual (Spectrophotometric, DPD). *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. U.S. Environmental Protection Agency
- USEPA. 1993. Method 410.4, Revision 2.0: The Determination of Chemical Oxygen Demand by Semi-Automated Colorimetry. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)
- USEPA. 1999. *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)
- USEPA. 2012. *Guidelines for Water Reuse*. United States Environmental Protection Agency (USEPA)
- Valero P. 2008. *Regeneración de aguas depuradas mediante procesos físico-químicos y desinfección convencional*. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza.
- Valero P., Mosteo R., Ormad M. P., Guzmán J., Ovelleiro J. L. 2013. Application of AOPs for the inactivation of *Enterococcus* sp. in a WWTP effluent: kinetic modelling. 3rd European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes. Almería, España, 2013. ISBN: 978-84-15487-99-9
- Valero P., Torres J., Guzman J., Mosteo R., Ormad M. P., Ovelleiro J. L. 2014. Evaluación de la capacidad de inactivación bacteriana en aguas de un nuevo nano-TiO₂ comercial en suspensión. XI Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas. Alicante, España, 2014. ISBN: 978-84-616-9173-9
- Valero P., Mosteo R., De Castro R. M., Quero-Pastor M. J., Hinojosa M., Acevedo A., Ormad M. P. 2015a. Disinfection of simulated municipal wastewater effluent by ozonation at laboratory and pilot scale. IOA 2015 World Congress & Exhibition. Barcelona, España 2015a. ISBN: 979-10-92607-02-4
- Valero P., Mosteo R., Ormad M. P., Lázaro L., Ovelleiro J. L. 2015b. Inactivation of *Enterococcus* sp. by conventional and advanced oxidation processes in synthetic treated urban wastewater. *Ozone: Science & Engineering*, 37, 467-475.
- Valero P., Giannakis S., Mosteo R., Ormad M. P., Pulgarin C. 2017. Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal*, 313, 109-120.
- Van Grieken R., Marugán J., Sordo C., Pablos C. 2009. Comparison of the photocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors. *Catalysis Today*, 144, 48-54.
- Van Grieken R., Marugán J., Pablos C., Furones L., López A. 2010. Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram-negative *E. coli*

- faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis B: Environmental*, 100, 212-220.
- Varghese S., Wu A., Park S., Imlay K. R., Imlay J. A. 2007. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 64, 822-30.
- Verma K., Gupta D., Gupta A. B. 2016. Optimization of ozone disinfection and its effect on trihalomethanes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 3021-3032.
- Villegas-Guzman P., Giannakis S., Torres-Palma R. A., Pulgarin C. 2017. Remarkable enhancement of bacterial inactivation in wastewater through promotion of solar photo-Fenton at near-neutral pH by natural organic acids. *Applied Catalysis B: Environmental*, 205, 219-227.
- Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S., Raso J. 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5022-8.
- Von Gunten U. 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*, 37, 1443-1467.
- Wan M. T., Chou C. C. 2014. Spreading of beta-lactam resistance gene (*mecA*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through municipal and swine slaughterhouse wastewaters. *Water Research*, 64, 288-95.
- Wang J. J., Liu X., Ng T. W., Xiao J. W., Chow A. T., Wong P. K. 2013. Disinfection byproduct formation from chlorination of pure bacterial cells and pipeline biofilms. *Water Research*, 47, 2701-9.
- Watson H. E. 1908. A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *The Journal of Hygiene*, 8, 536-42.
- Wen Q., Tutuka C., Keegan A., Jin B. 2009. Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 90, 1442-1447.
- WHO. 2004. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. Volume 1: Recommendations, Ginebra.
- WHO. 2006. World Health Organization. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater
- WHO. 2016. World Health Organization: Resistencia a los antimicrobianos [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> [Último acceso 02/11/2016 2016].
- Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. 2009. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*.

- Wiszniewski J., Robert D., Surmacz-Gorska J., Miksch K., Malato S., Weber J.-V. 2004. Solar photocatalytic degradation of humic acids as a model of organic compounds of landfill leachate in pilot-plant experiments: influence of inorganic salts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 53, 127-137.
- Wolfe R. L. 1990. Ultraviolet disinfection of potable water. *Environmental Science & Technology*, 24, 768-773.
- Xu P., Janex M.-L., Savoye P., Cockx A., Lazarova V. 2002. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. *Water Research*, 36, 1043-1055.
- Xu W., Li P., Dong B. 2010. Electrochemical disinfection using the gas diffusion electrode system. *Journal of Environmental Sciences* 22, 204-10.
- Yang J.-K., Lee S.-M. 2006. Removal of Cr(VI) and humic acid by using TiO₂ photocatalysis. *Chemosphere*, 63, 1677-1684.
- Yaya-Beas R.-E., Cadillo-La-Torre E.-A., Kujawa-Roeleveld K., van Lier J. B., Zeeman G. 2016. Presence of helminth eggs in domestic wastewater and its removal at low temperature UASB reactors in Peruvian highlands. *Water Research*, 90, 286-293.
- Yoon J.-H., Lee C.-S., O'Connor T. R., Yasui A., Pfeifer G. P. 2000. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *Journal of Molecular Biology*, 299, 681-693.
- Yu H., Song L., Hao Y., Lu N., Quan X., Chen S., Zhang Y., Feng Y. 2016. Fabrication of pilot-scale photocatalytic disinfection device by installing TiO₂ coated helical support into UV annular reactor for strengthening sterilization. *Chemical Engineering Journal*, 283, 1506-1513.
- Yuranova T., Enea O., Mielczarski E., Mielczarski J., Albers P., Kiwi J. 2004. Fenton immobilized photo-assisted catalysis through a Fe/C structured fabric. *Applied Catalysis B: Environmental*, 49, 39-50.
- Zepp R. G., Faust B. C., Hoigne J. 1992. Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. *Environmental Science & Technology*, 26, 313-319.
- Zhou X., Zhao J., Li Z., Song J., Li X., Yang X., Wang D. 2016. Enhancement effects of ultrasound on secondary wastewater effluent disinfection by sodium hypochlorite and disinfection by-products analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 60-66.
- Zimmermann S. G., Wittenwiler M., Hollender J., Krauss M., Ort C., Siegrist H., von Gunten U. 2011. Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: Micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. *Water Research*, 45, 605-617.

**ANEXO I. Gráficas de error de los modelos cinéticos
aplicados en inactivación**

Las figuras que se recogen en el presente anexo muestran gráficamente el error cometido en el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales de inactivación bacteriana mediante los distintos tratamientos de desinfección aplicados. Para ello se representan los valores experimentales observados frente a los valores estimados por los modelos.

Las Figuras I.I-I.VII muestran el error cometido en el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales de inactivación bacteriana mediante cloración.

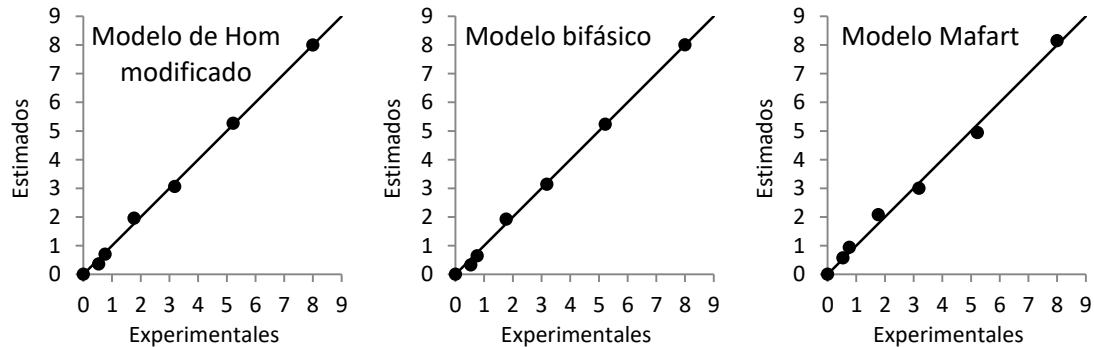


Figura I. I. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 4 mg Cl₂/L.

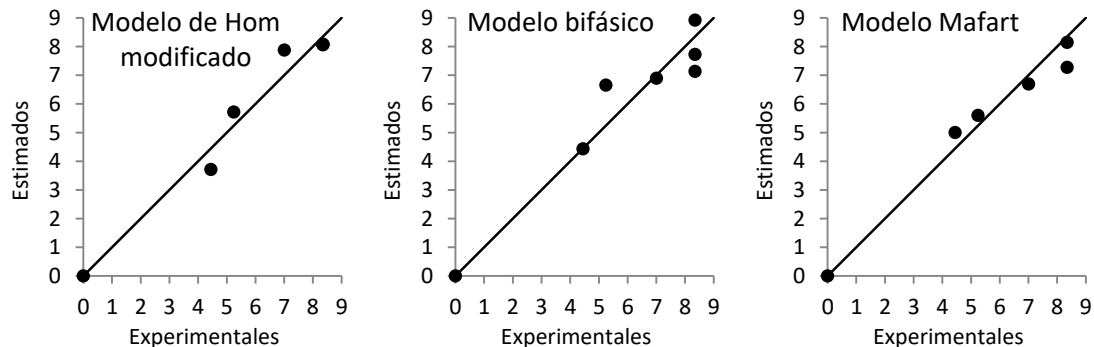


Figura I. II. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 15 mg Cl₂/L.

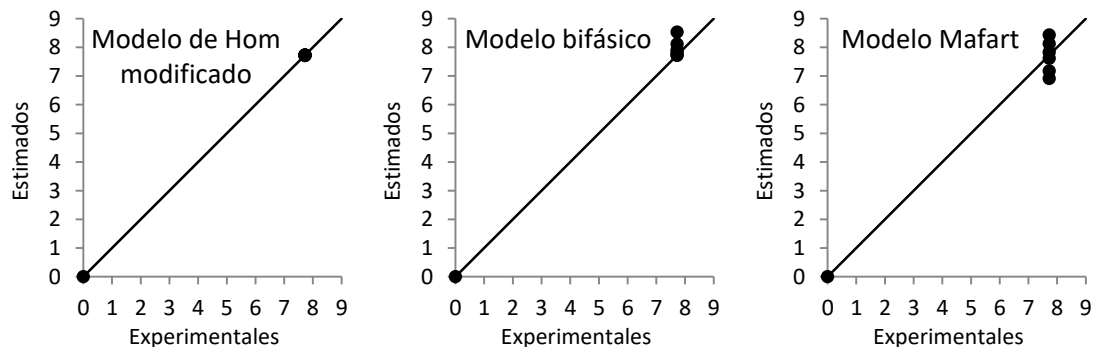


Figura I. III. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Escherichia coli* con 30 mg Cl₂/L.

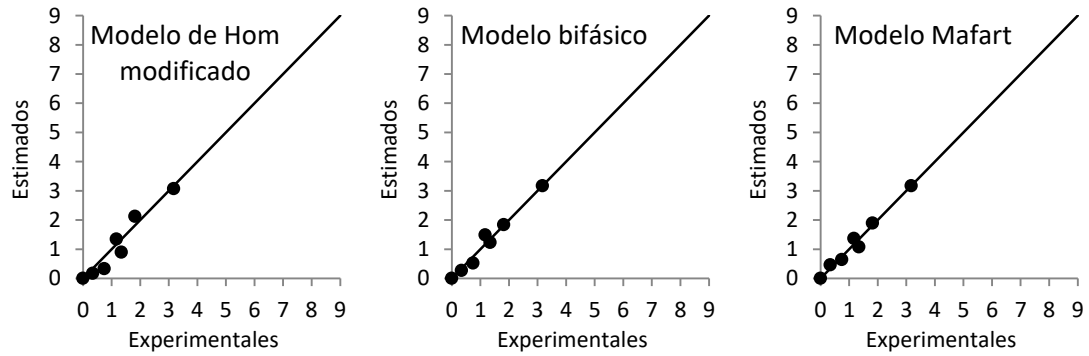


Figura I. IV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 4 mg Cl₂/L.

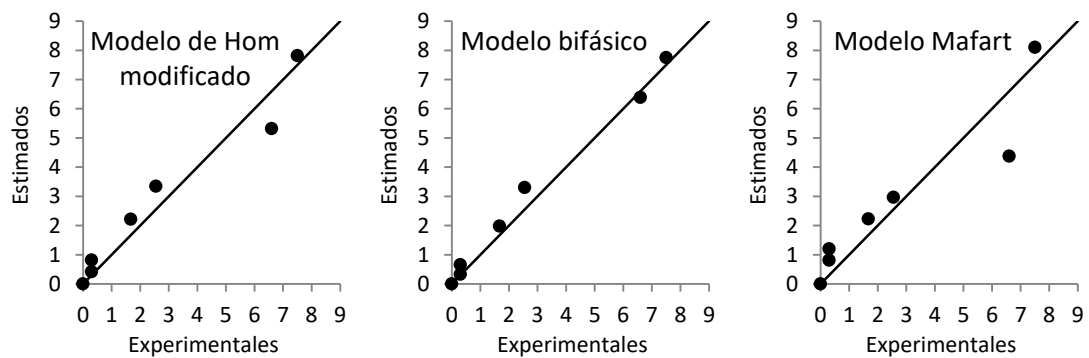


Figura I. V. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 15 mg Cl₂/L.

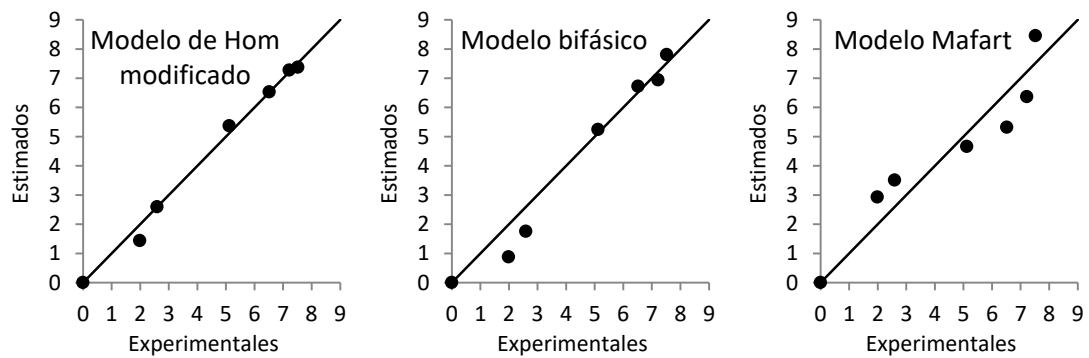


Figura I. VI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 30 mg Cl₂/L.

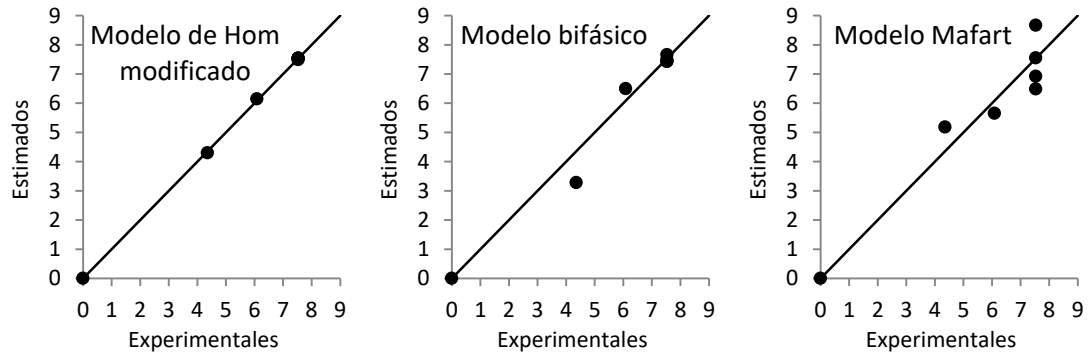


Figura I. VII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada sobre *Enterococcus* sp. con 65 mg Cl₂/L.

Las Figuras I.VIII-I.XVIII muestran el error cometido en el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales de inactivación bacteriana mediante ozonización.

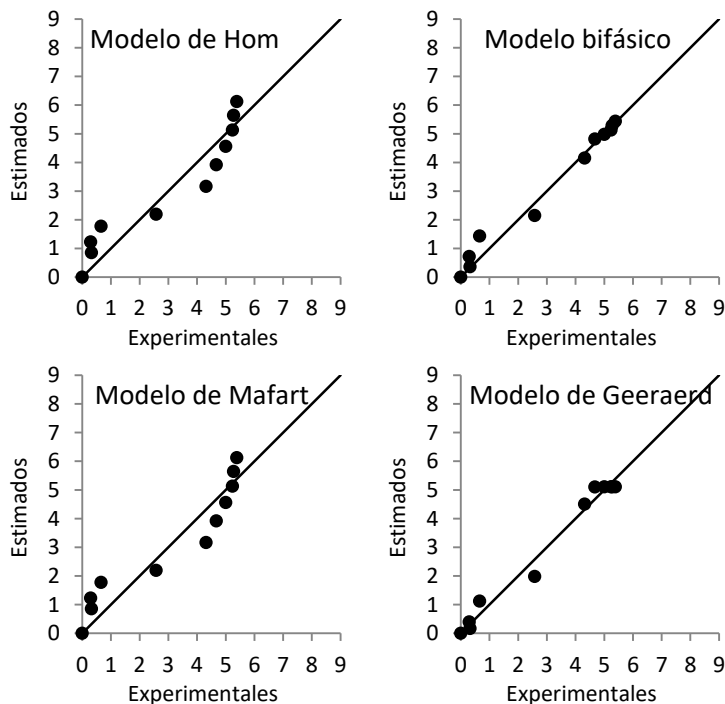


Figura I. VIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Escherichia coli* en agua residual depurada sintética. (ARDS)

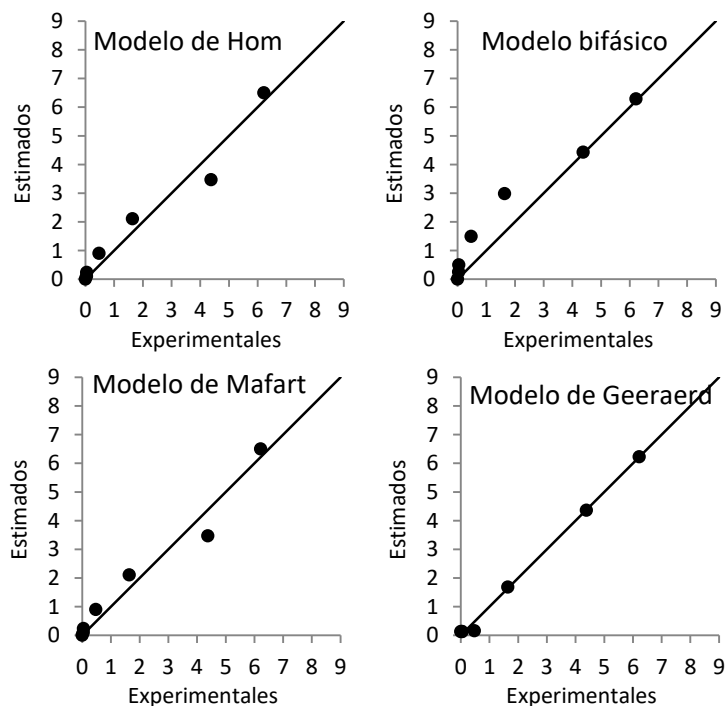


Figura I. IX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Escherichia coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

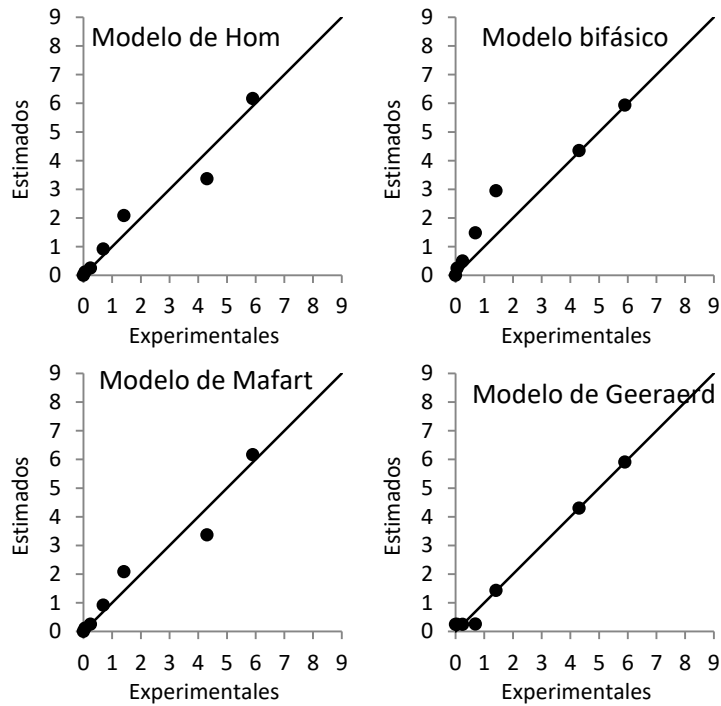


Figura I. X. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala de laboratorio sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

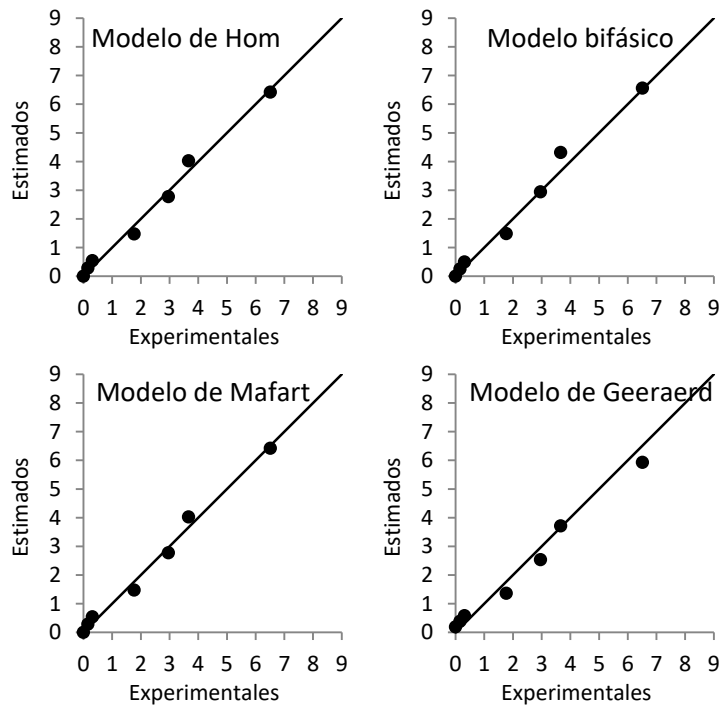


Figura I. XI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

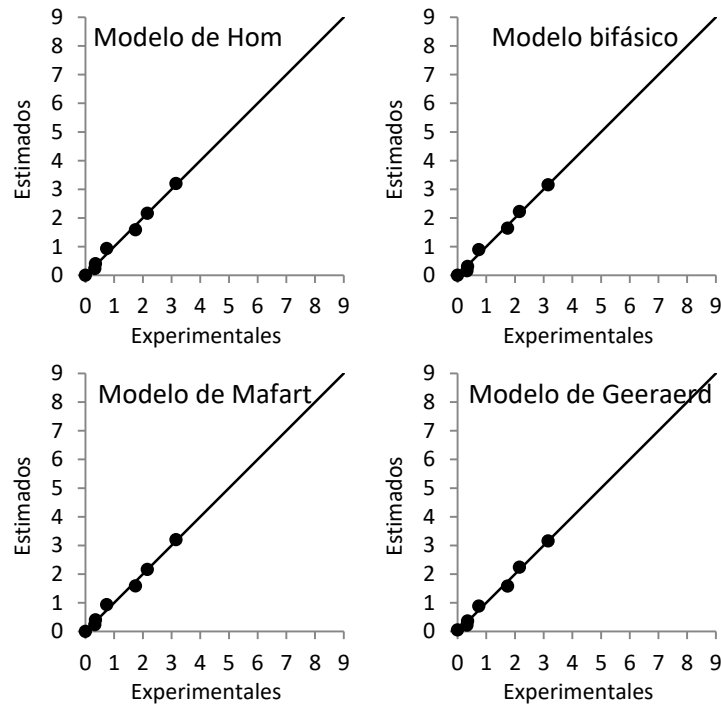


Figura I. XII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 20 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

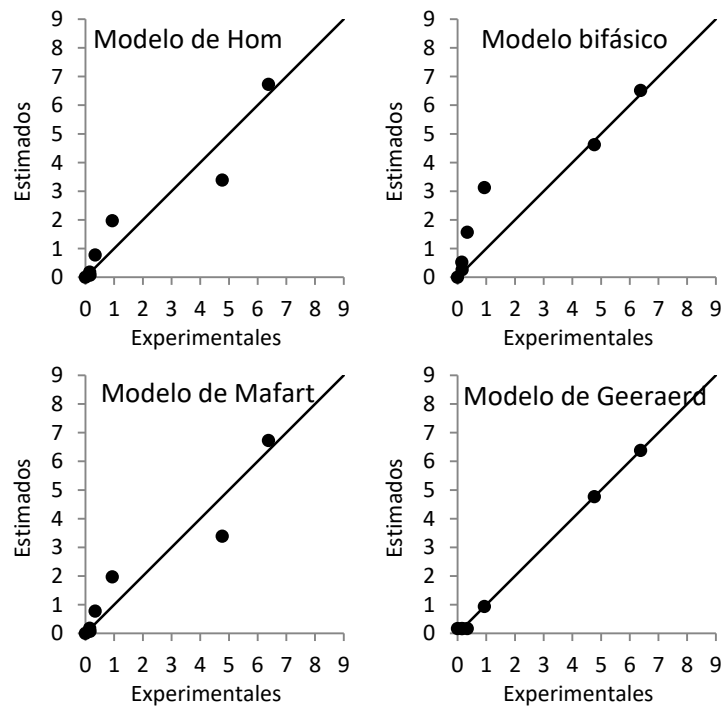


Figura I. XIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 1,4 mg H₂O₂/L sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

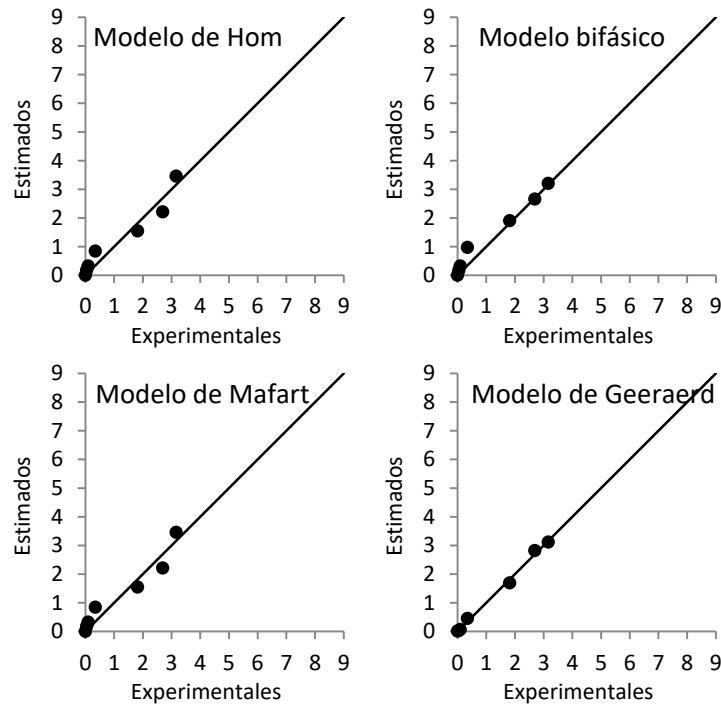


Figura I. XIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento peroxona con 20 mg H₂O₂/L sobre *Enterococcus* sp. en agua de salida de la planta de fangos (ARPF).

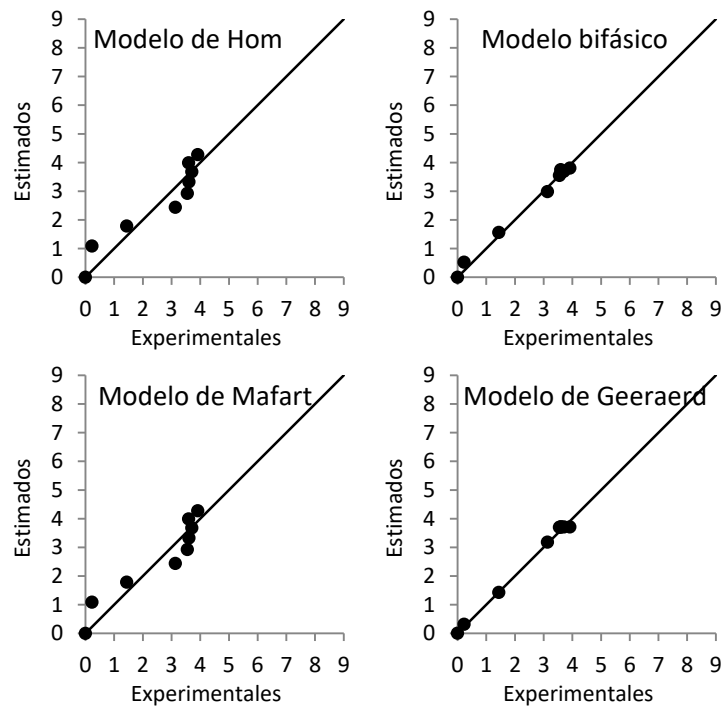


Figura I. XV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con aire y 5 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).

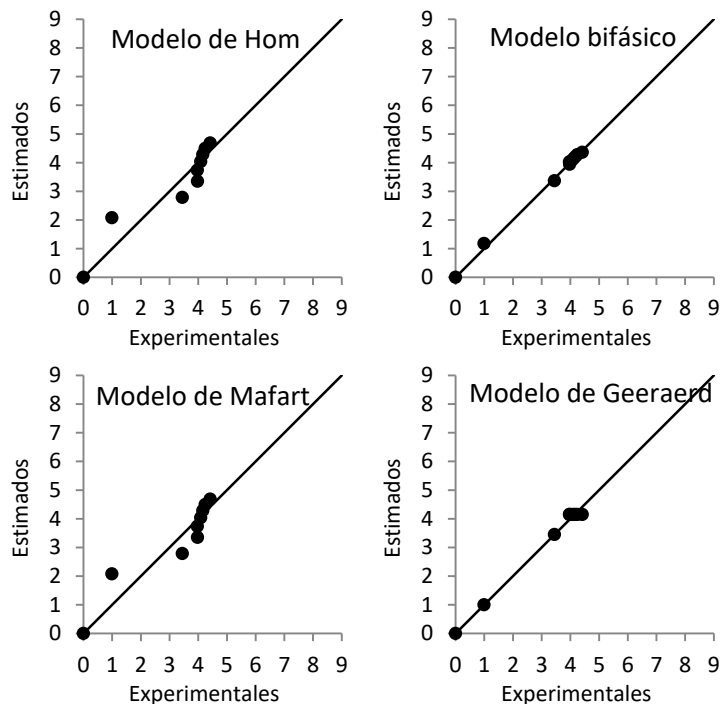


Figura I. XVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con aire y 11 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética. (ARDS)

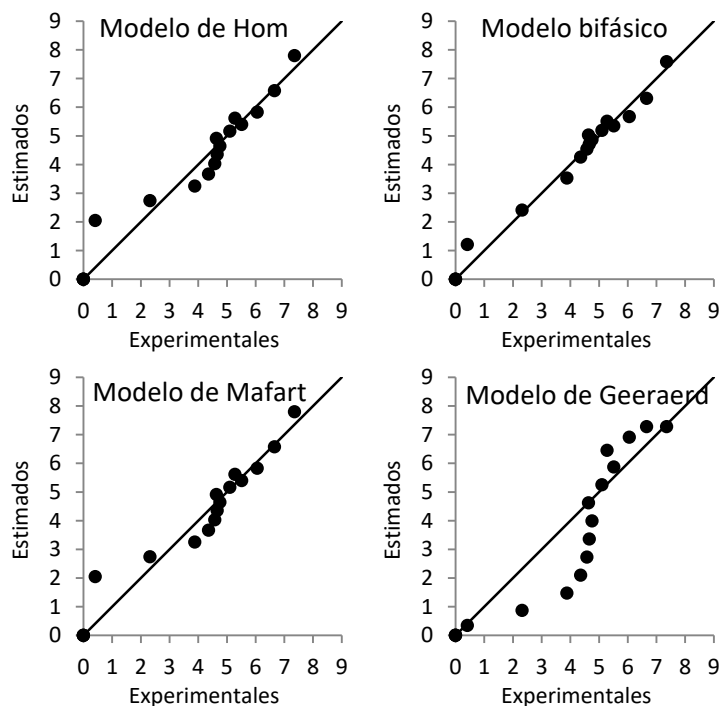


Figura I. XVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con O₂ y 39 g O₃/h sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).

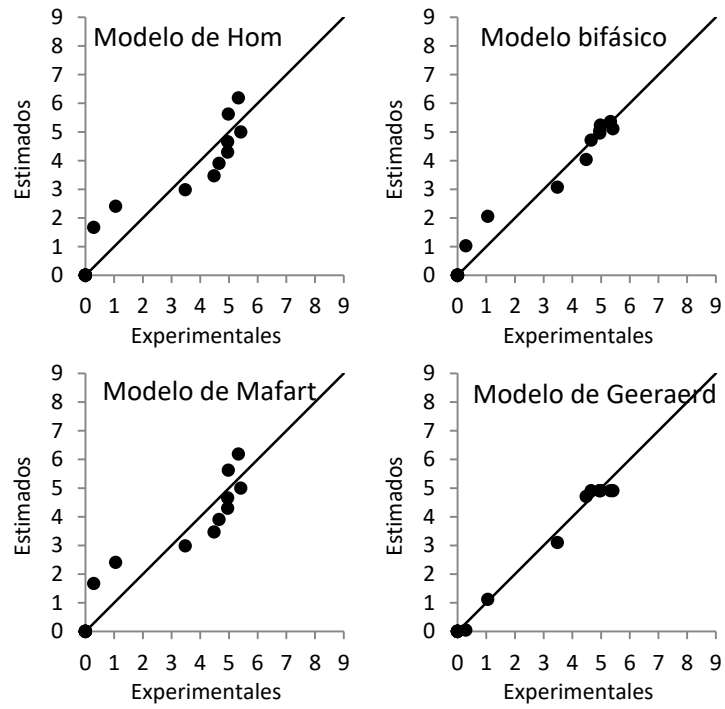


Figura I. XVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante la ozonización a escala piloto con O_2 y $41 \text{ g } O_3/h$ sobre *E. coli* en agua residual depurada sintética (ARDS).

Las Figuras I.XIX-I.XXXIV muestran el error cometido en el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales de inactivación bacteriana mediante UVA-vis, UVA-vis/H₂O₂, UVA-vis/TiO₂ y UVA-vis/TiO₂/H₂O₂.

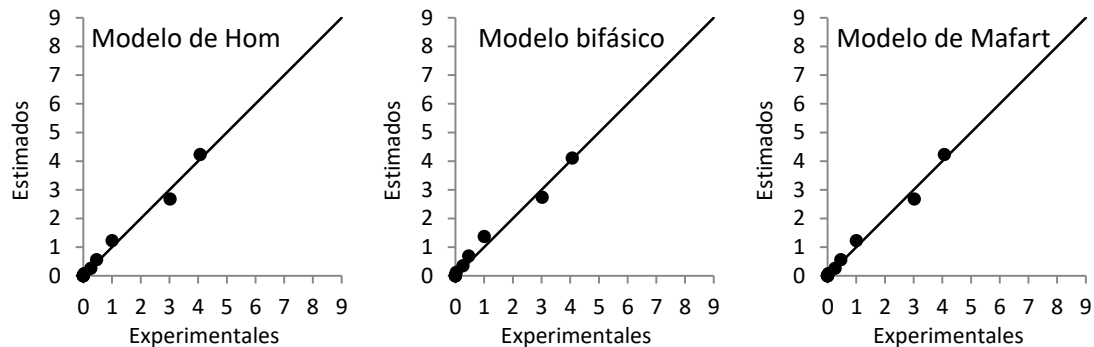


Figura I. XIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *E. coli* en solución salina (NaCl).

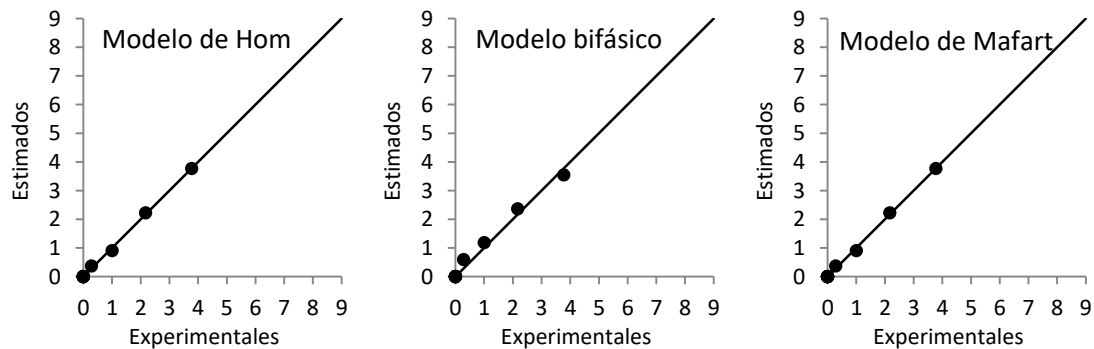


Figura I. XX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *E. coli* en ARPF.

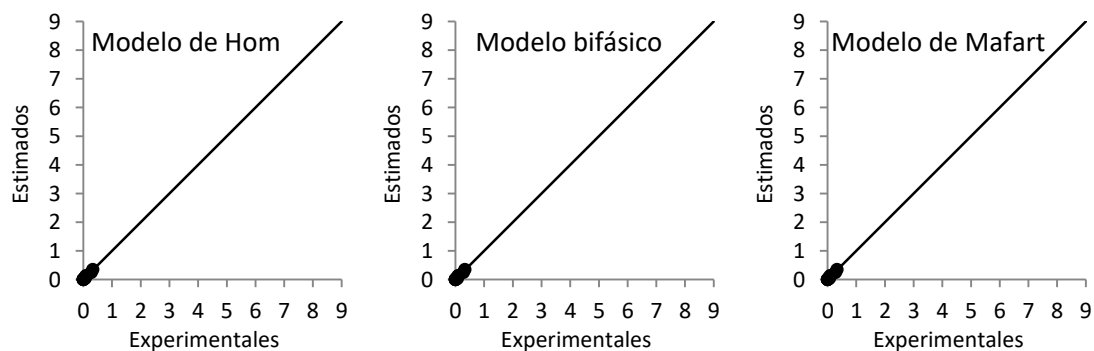


Figura I. XXI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *Enterococcus* sp. en solución salina (NaCl).

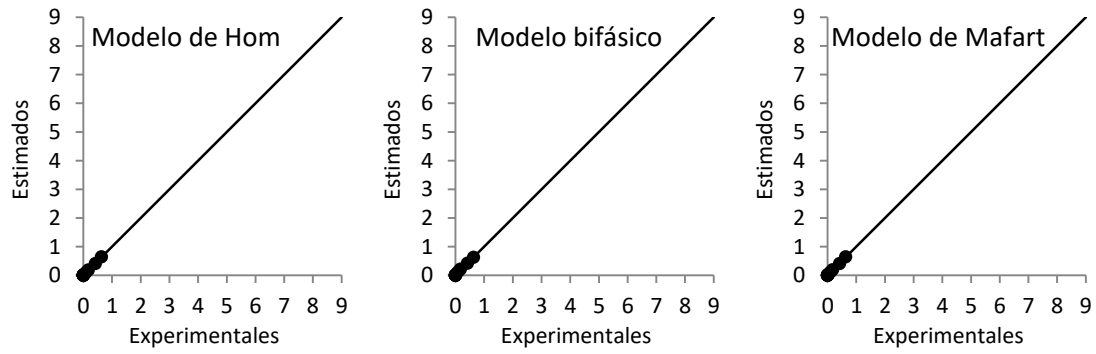


Figura I. XXII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis sobre *Enterococcus* sp. en ARPF.

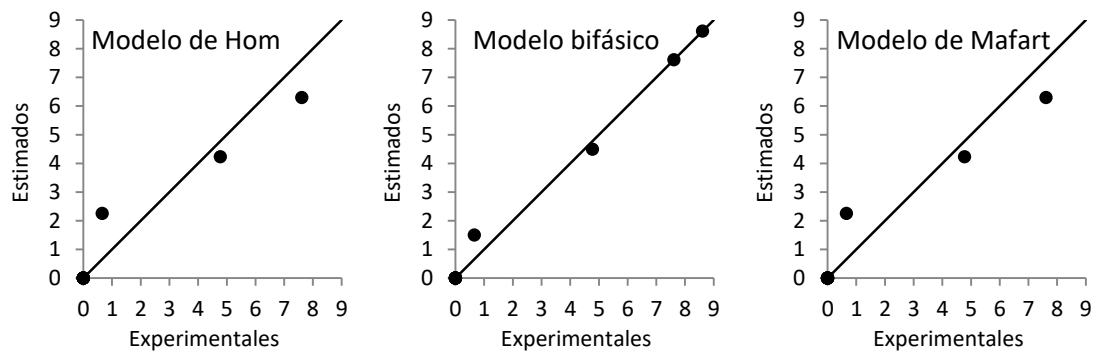


Figura I. XXIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis + 680 mg H₂O₂/L sobre *E. coli* en ARPF.

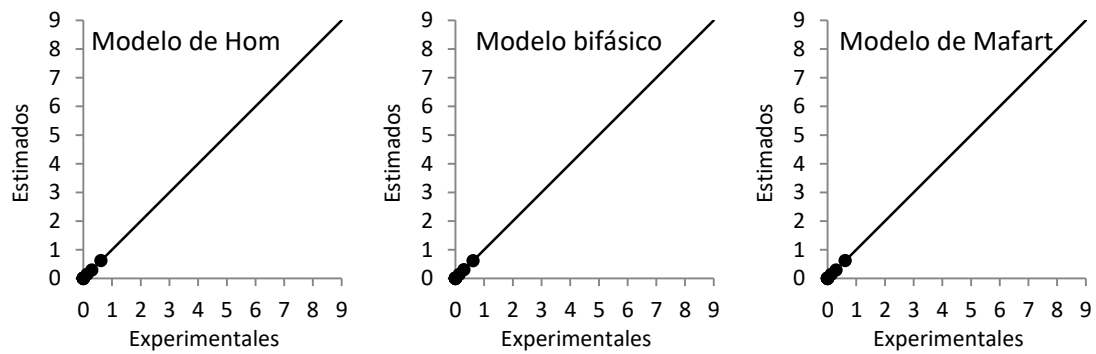


Figura I. XXIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento UVA-vis + 680 mg H₂O₂/L sobre *Enterococcus* sp. en ARPF.

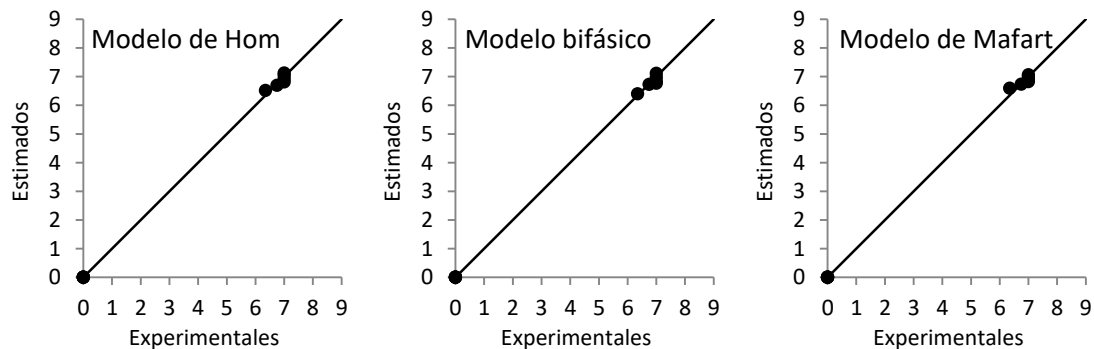


Figura I. XXV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 sobre *E. coli* en la solución salina (NaCl).

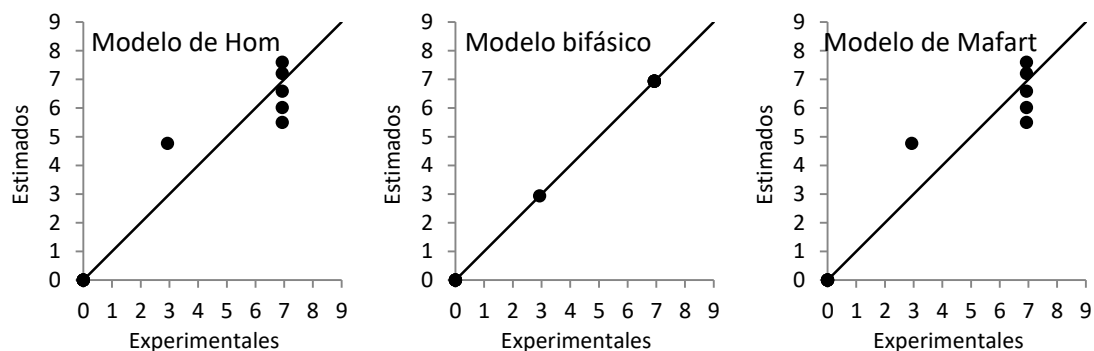


Figura I. XXVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis$ con 1 g/L TiO_2 Levenger sobre *E. coli* en la solución salina (NaCl).

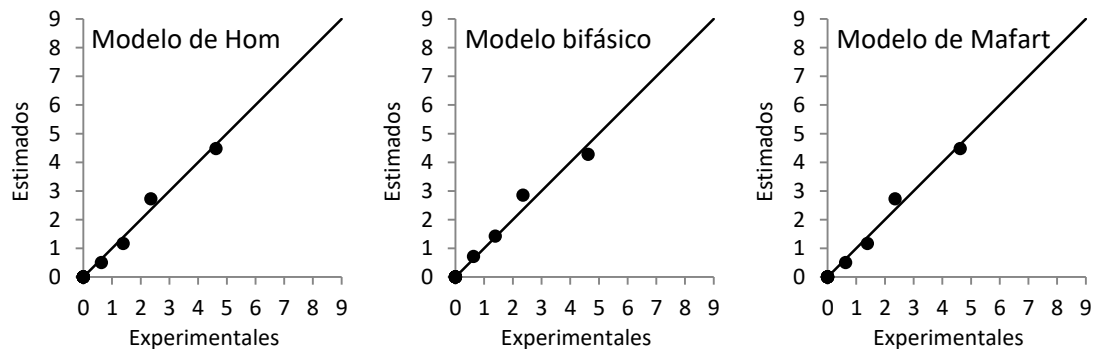


Figura I. XXVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 sobre *E. coli* en ARPF.

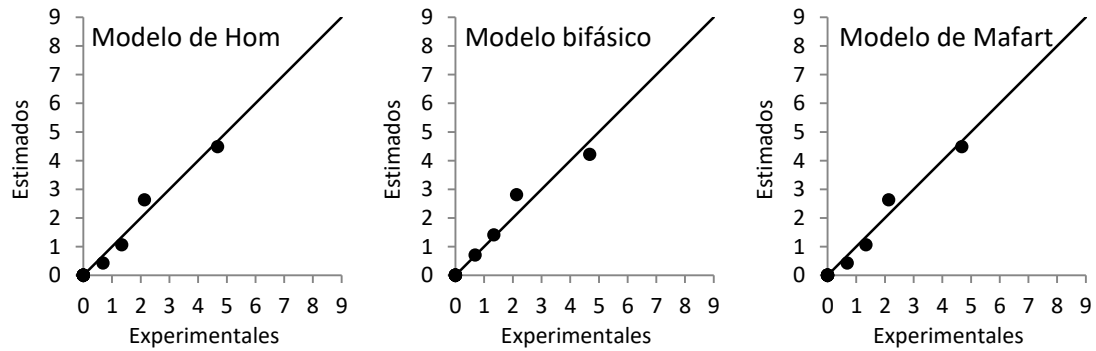


Figura I. XXVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO₂/UVA-vis con 1 g/L TiO₂ Levenger sobre *E. coli* en ARPF.

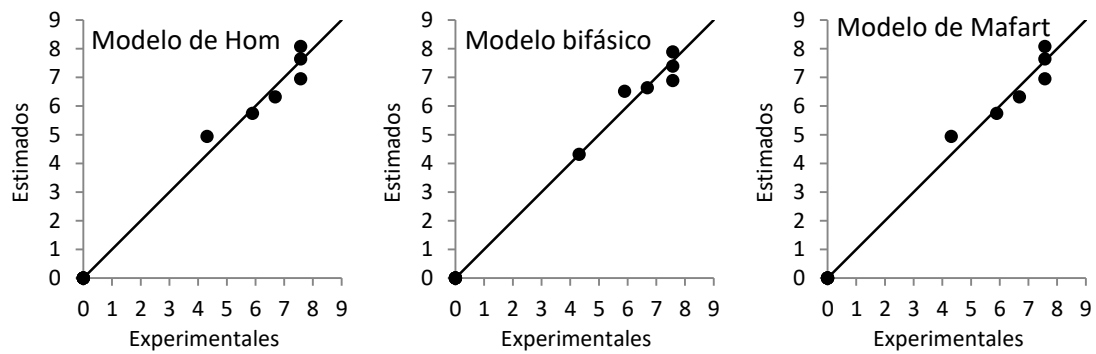


Figura I. XXIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO₂/UVA-vis con 1 g/L TiO₂ Degussa P25 sobre *Enterococcus* sp en solución salina (NaCl).

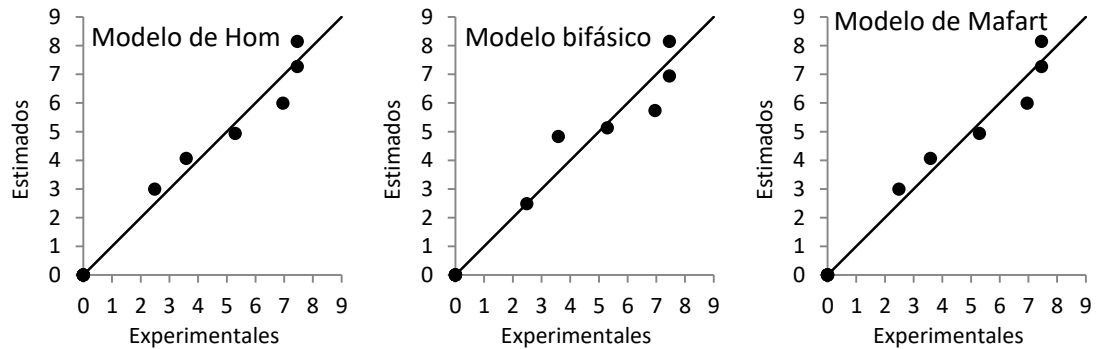


Figura I. XXX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento TiO₂/UVA-vis con 1 g/L TiO₂ Levenger sobre *Enterococcus* sp en solución salina (NaCl).

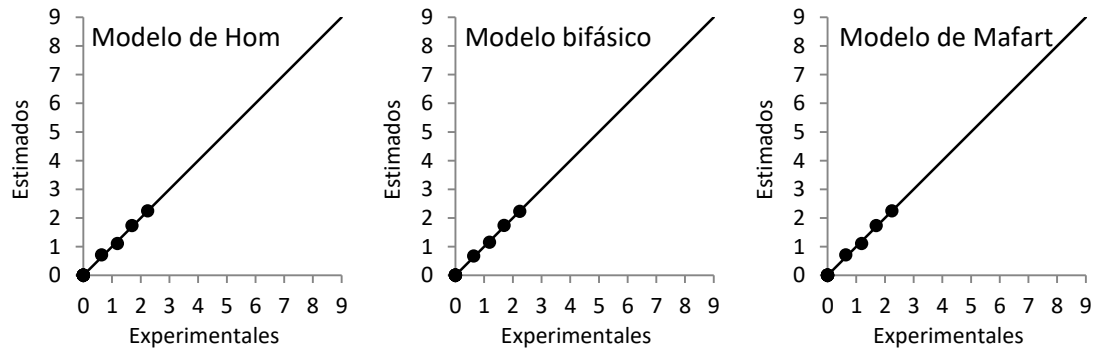


Figura I. XXXI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 sobre *Enterococcus* sp en ARPF.

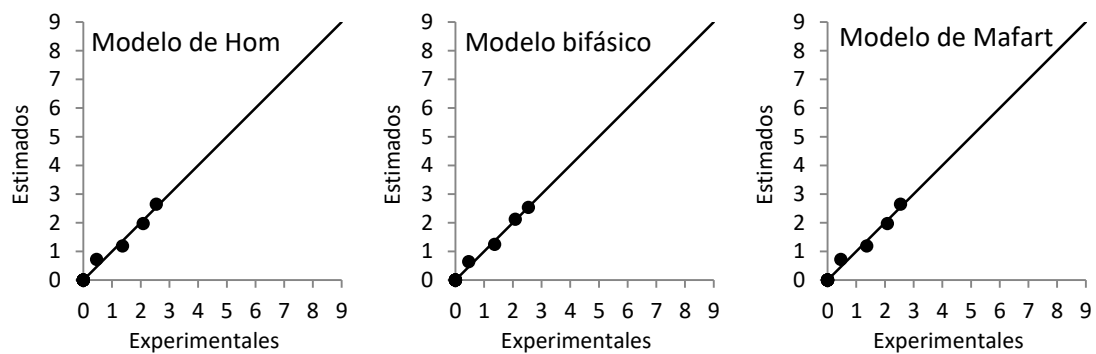


Figura I. XXXII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis$ con 1 g/L TiO_2 Levenger sobre *Enterococcus* sp en ARPF.

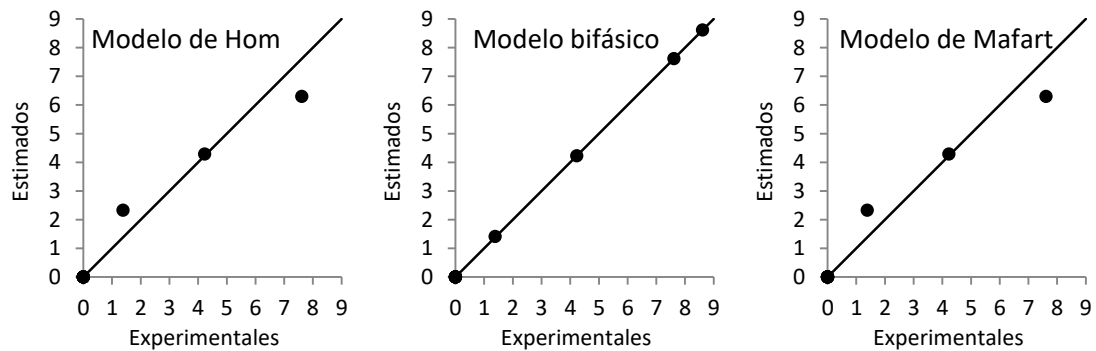


Figura I. XXXIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $TiO_2/UVA-vis/H_2O_2$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 y 680 mg H_2O_2/L sobre *E. coli* en ARPF.

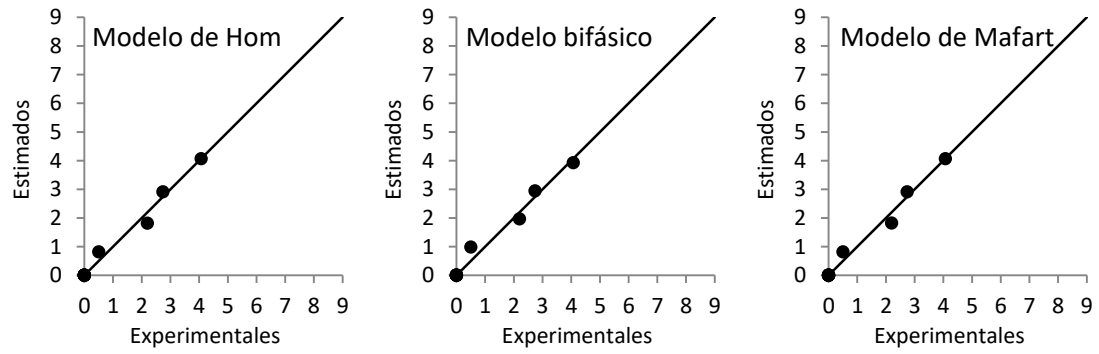


Figura I. XXXIV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento $\text{TiO}_2/\text{UVA-vis}/\text{H}_2\text{O}_2$ con 1 g/L TiO_2 Degussa P25 y 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$ sobre *Enterococcus* sp. en ARPF.

Las Figuras I.XXXV-I.XLIII muestran el error cometido en el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales de inactivación bacteriana mediante radiación UVA, desinfección electroquímica, desinfección foto-electroquímica, electro-Fenton y foto-electro-Fenton.

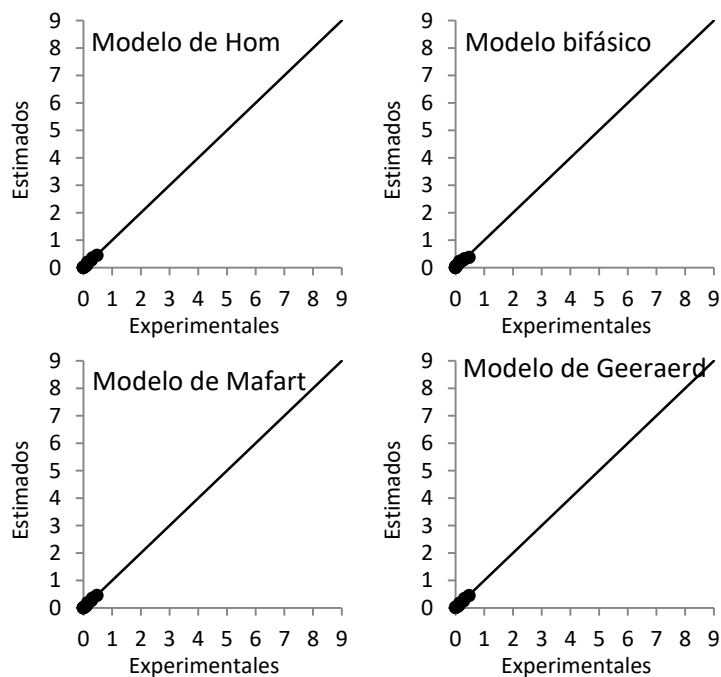


Figura I. XXXV. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de irradiación UVA sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

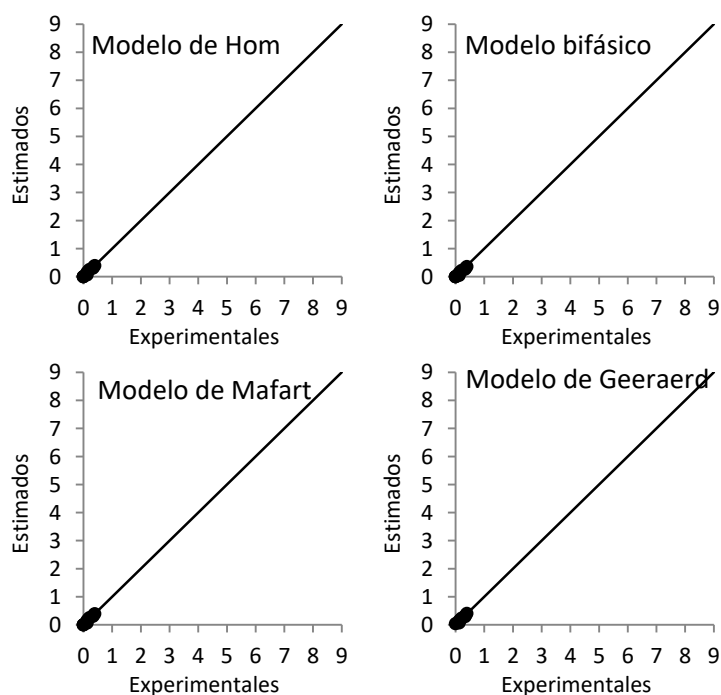


Figura I. XXXVI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de desinfección electroquímica (DEQ, GDE+IrO₂_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

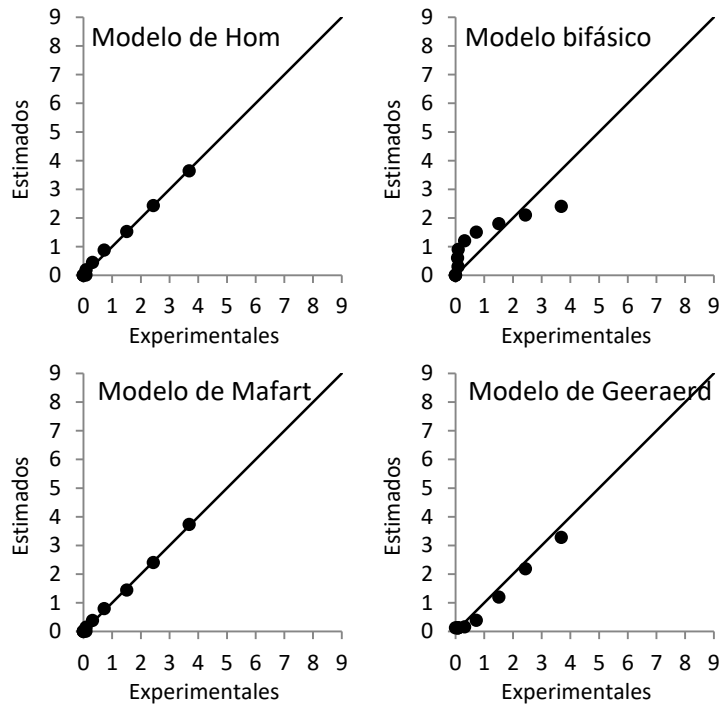


Figura I. XXXVII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento de desinfección foto-electroquímica (DFEQ, GDE+IrO₂+UVA_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

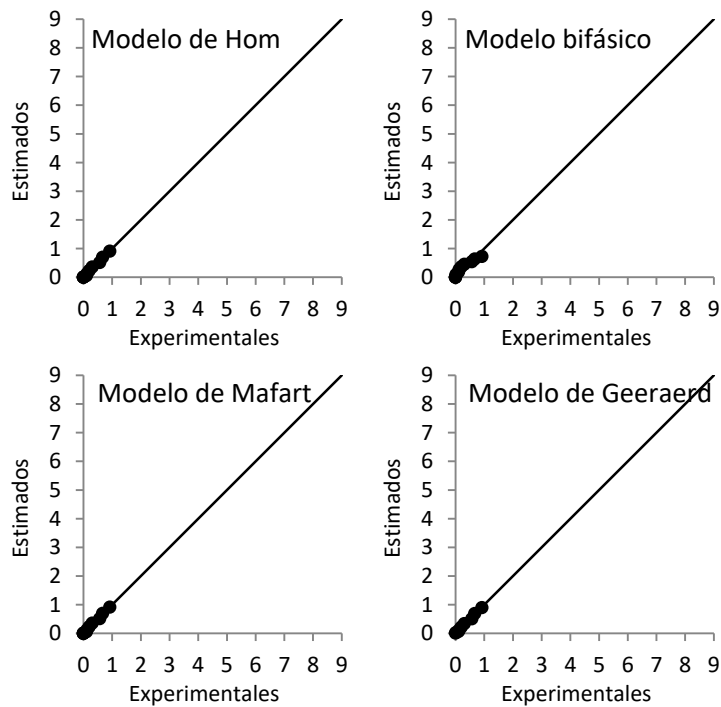


Figura I. XXXVIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento electro-Fenton (EF, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L_20mA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

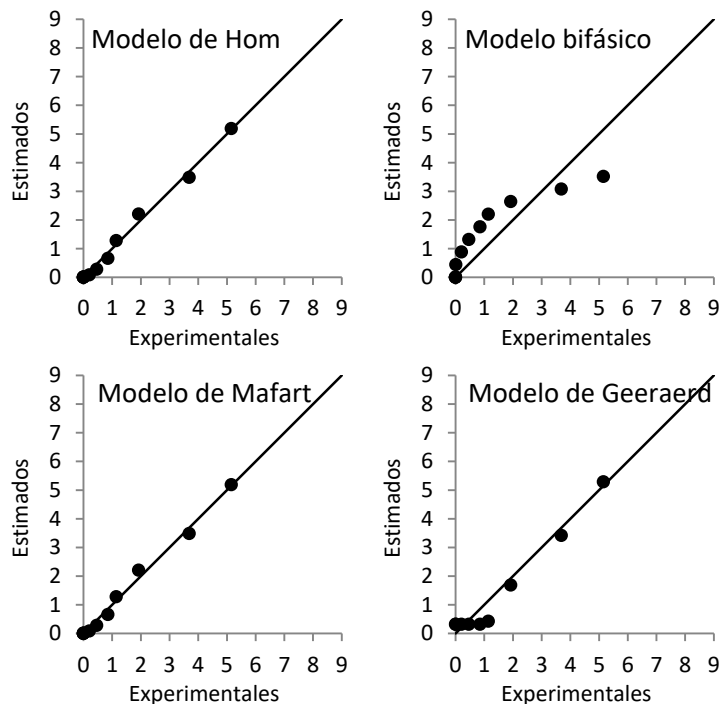


Figura I. XXXIX. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 20 mA (FEF 20 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

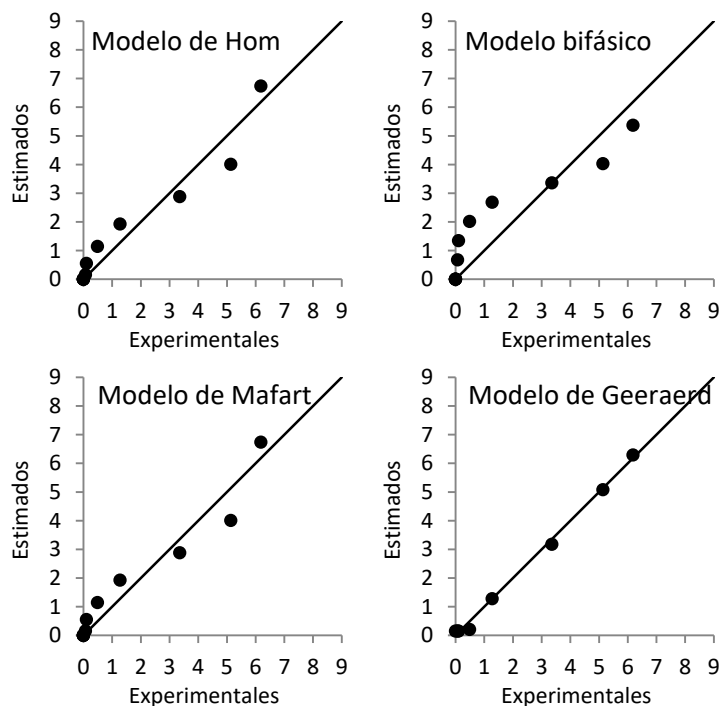


Figura I. XL. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 30 mA (FEF 30 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

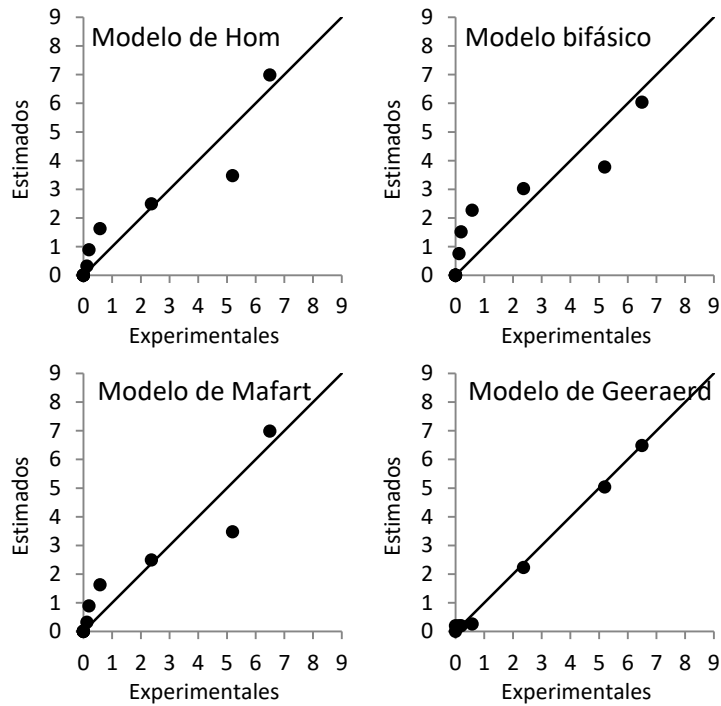


Figura I. XLI. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con 40 mA (FEF 40 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe²⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

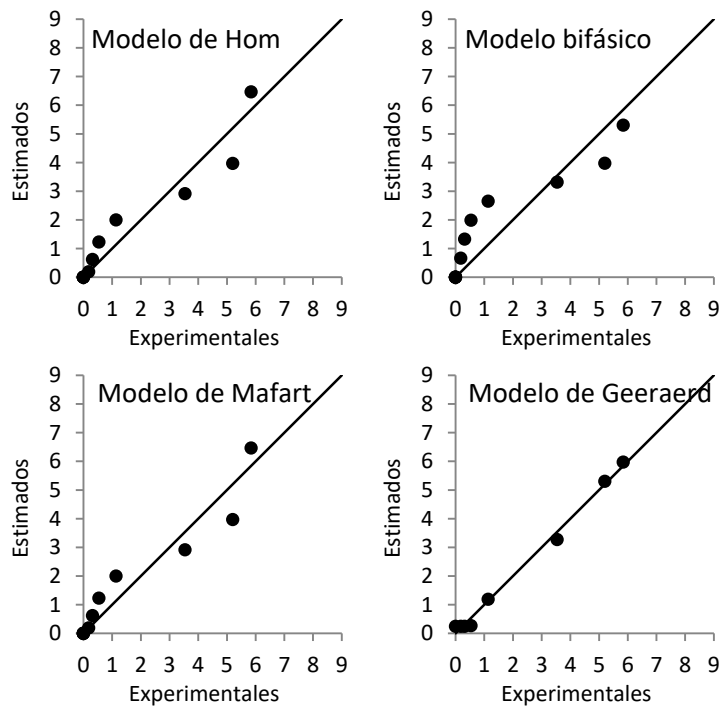


Figura I. XLII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con Fe³⁺ (FEF Fe³⁺ 30 mA, GDE+IrO₂+5 mg Fe³⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

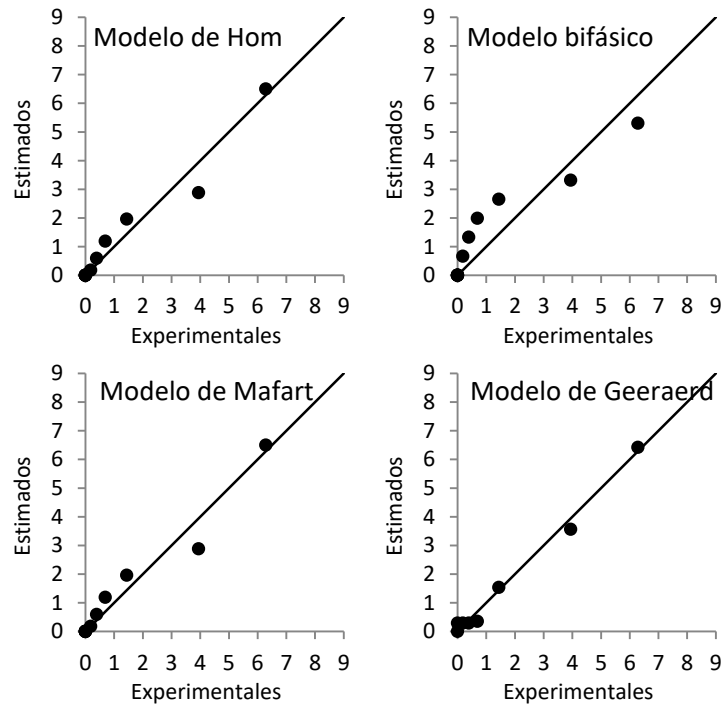


Figura I. XLIII. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados y la inactivación logarítmica experimental observada durante el tratamiento foto-electro-Fenton con ánodo de Ti (FEF Fe³⁺_Ti_30 mA, GDE+Ti+5 mg Fe³⁺/L+UVA) sobre *Staphylococcus aureus* en ARDS.

**ANEXO II. Generación electroquímica de oxidantes
totales y H₂O₂**

En el presente anexo se muestran las gráficas que ilustran la generación de oxidantes totales y H₂O₂ durante los tratamientos electroquímicos aplicados en el Capítulo 7.

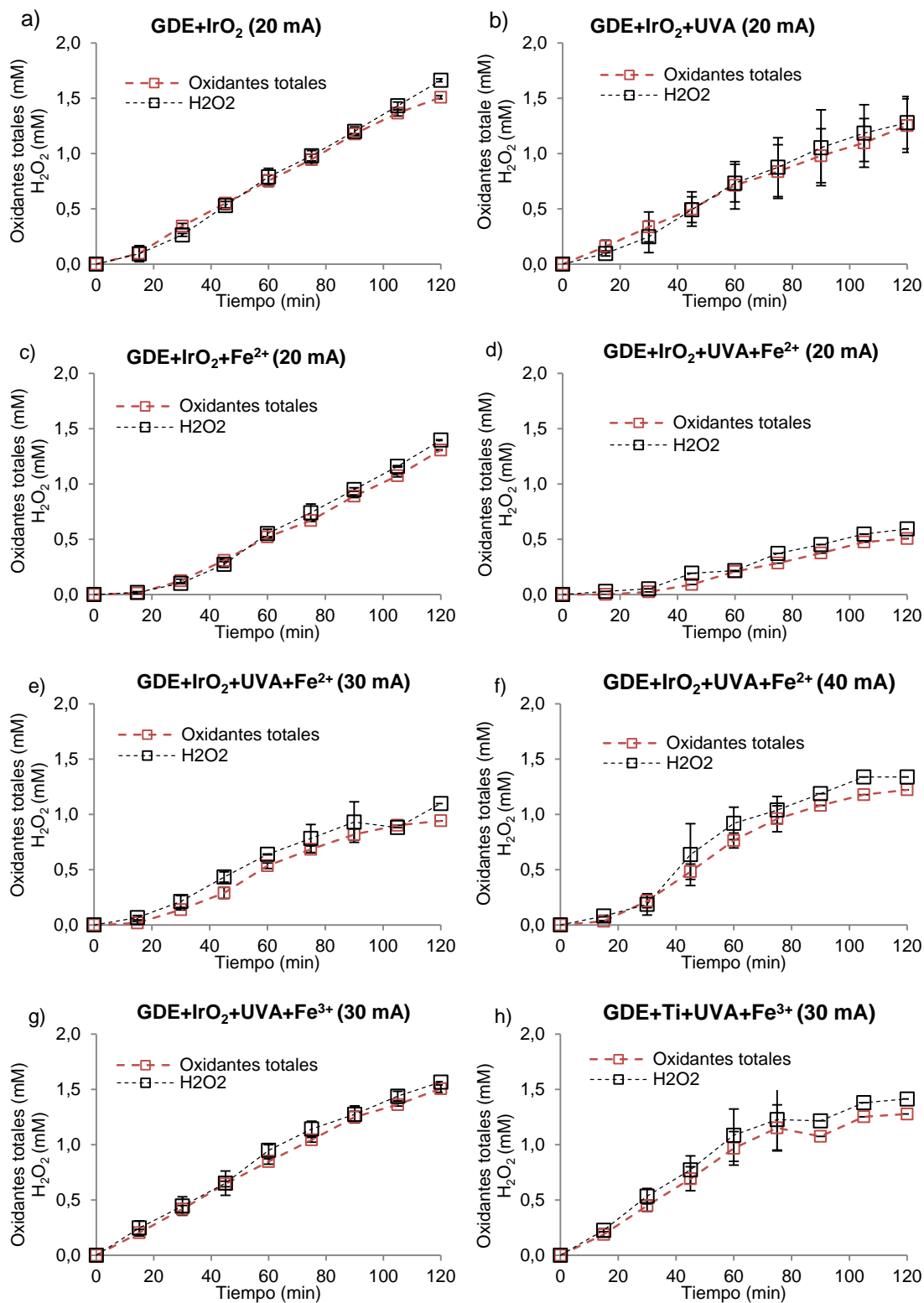


Figura II. I. Acumulación de oxidantes totales y H₂O₂ durante los tratamientos electroquímicos.

ANEXO III. Publicaciones científicas

III.I. Publicación nº 1	287
III.II. Publicación nº 2	297
III.III. Publicación nº 3	309

III.I. Publicación nº 1

Autores: P. Valero, R. Mosteo, M.P. Ormad, L. Lázaro, J.L. Ovelleiro

Título: Inactivation of *Enterococcus* sp. by conventional and advanced oxidation processes in synthetic treated urban wastewater

Publicación: Ozone: Science & Engineering 37 (5), 467- 475

Año: 2015

DOI: 10.1080/01919512.2015.1042572

ISSN: 01919512 (versión impresa)/15476545 (versión online)

Ozone: Science & Engineering, 37: 467–475
Copyright © 2015 International Ozone Association
ISSN: 0191-9512 print / 1547-6545 online
DOI: 10.1080/01919512.2015.1042572



Inactivation of *Enterococcus* sp. by Conventional and Advanced Oxidation Processes in Synthetic Treated Urban Wastewater

Pilar Valero, Rosa Mosteo, María P. Ormad, Luisa Lázaro, and José L. Ovelleiro

Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain

The aim of this research work was to evaluate the disinfection efficiency of several techniques on the inactivation of the bacteria Enterococcus sp. inoculated in synthetic treated urban wastewater. Different types and doses of reagents and times of exposure were studied. The compared treatments include chlorination, ozone-based treatments in the absence and presence of H₂O₂ and UVA-visible irradiation-based processes with TiO₂ and H₂O₂. Different combinations of chlorine doses and times of contact inactivated all the bacteria (-7.5 log units). Ozone and O₃/H₂O₂ also achieved high disinfection levels (-6 log units), showing similar inactivation curves. However, the studied phototreatments were less efficient.

Keywords Ozone, Chlorine, Disinfection, *Enterococcus* sp, Photocatalysis, Wastewater Treatment

INTRODUCTION

Over the last few decades, reuse of treated urban wastewater has become more important due to the increase in water demand in some regions where there is a need of using reclaimed water for agricultural, industrial, environmental and municipal sectors. Effluents of wastewater treatment plants (WWTPs) still contain pollutants, such as organic matter, hazardous substances and pathogenic microorganisms, which must be removed before water reuse. Potentially pathogenic microorganisms present in treated wastewater include different virus, protozoa, and bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* . . .), which might pose a sanitary and environmental risk (Mosteo et al. 2013).

Received 1/19/2015; Accepted 3/20/2015

Address correspondence to Pilar Valero, Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, University of Zaragoza, 3 María de Luna Street, 50018 Zaragoza, Spain. E-mail: pvalero@unizar.es

Microbiological control is therefore necessary for water susceptible of being reused in order to avoid sanitary risk.

Several international guidelines on water reuse establishing quality criteria have appeared in recent years, such as the WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater or the EPA Guidelines for Water Reuse. In Spain, the reuse of treated urban wastewater is regulated by Royal Decree 1620/2007, which establishes quality criteria for urban treated wastewater being reused, depending on its final use: urban, agricultural, industrial, recreational or environmental. Concerning pathogenic microorganism, RD 1620/2007 imposes emission limits for *E. coli* and intestinal nematodes in all cases, and *Legionella* sp. and *Salmonella* sp. for several uses including industrial use. Therefore, WWTP effluents being reused must undergo disinfection treatments that guarantee an appropriate water quality.

Chlorination has been the most widely used disinfection treatment due to its effectiveness, residual activity and low cost. Sodium hypochlorite (NaClO) is commonly used as the disinfectant agent in chlorination, although gaseous or liquid chlorine can be applied too. Chlorine reacts fast with different inorganic and organic compounds and with microorganisms present in water. Despite its effectiveness, chlorination generates toxic disinfection by-products such as trihalomethanes or haloacetic acids (Black and Veatch Corporation 2010). To avoid chlorination problems, research has focused on developing alternative treatments such as ozonation, UV irradiation, Fenton process or TiO₂ photocatalysis. Some of these technologies, known as advanced oxidation processes (AOPs), involve the formation of reactive oxygen species (ROS), such as the hydroxyl radical, •OH, which is a very powerful oxidizing agent (Parsons 2004).

Ozone is an efficient disinfectant capable of removing taste, odour and colour from water; thus, ozonation has been successfully implemented in many drinking water treatment plants. Ozone can directly react with compounds in water or

it can decompose generating $\cdot\text{OH}$ (Matilainen and Sillampää 2010). Whereas ozone reacts selectively, hydroxyl radicals are very non-selective oxidants, which can lead to a very large number of possible reactions. Moreover, the reaction rate of a compound via $\cdot\text{OH}$ oxidation is usually several orders of magnitude higher than the reaction rate with molecular ozone under the same conditions (Parsons 2004). Addition of H_2O_2 in ozonation, also known as a peroxone system, might be beneficial since it involves higher ROS formation, although an excess of H_2O_2 may act as a radical scavenger (Gago-Ferrero et al. 2013; Mosteo et al. 2009).

Irradiation of water in the range of UV (100–400 nm) can also lead to the formation of ROS. In recent years there has been an increasing interest in sunlight as source of UV irradiation to produce $\cdot\text{OH}$ (Malato et al. 2009), since the solar spectrum comprises wavelengths from the UV to the infrared range, including visible light. UV irradiation, mainly UV-C (100–280 nm) and UV-B (280–315 nm), is sufficiently energetic to directly modify DNA bases, causing cell inactivation, whereas UV-A (315–400 nm) contributes to ROS formation (McGuigan et al. 2012). Combining solar irradiation with oxidants, such as H_2O_2 , might enhance cell inactivation due to the higher $\cdot\text{OH}$ generation caused by H_2O_2 photolysis at $\lambda < 254$ nm, cellular membrane attack and intracellular ROS formation (Spuhler et al. 2010).

In addition, some semiconductor materials, such as titanium dioxide (TiO_2), can be used as photocatalysts to remove pollutants or pathogens in water. When the TiO_2 is irradiated with wavelengths below 390 nm, an electron-hole pair formation occurs, contributing to the ROS production. In order to avoid the recombination of the photo-excited electron with the valence band hole, the presence of an electron scavenger is necessary. Therefore, the addition of H_2O_2 in TiO_2 photocatalytic treatments can promote the radical formation reactions, increasing the efficiency of the process (Chong et al. 2010; Malato et al. 2009).

The Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, commonly used as a faecal pollution indicator in water, is one of the most extensively studied bacteria in disinfection research (Cho et al. 2004; Rincón and Pulgarín 2003; Spuhler et al. 2010). In this study, the Gram-positive bacteria *Enterococcus* sp. has been selected as the indicator of faecal contamination due to their higher resistance to disinfection treatments than *E. coli* (Malato et al. 2009; Rodríguez-Chueca et al. 2014). *Enterococcus* sp. and *Clostridium perfringens* have been successfully inactivated by various advanced oxidation

processes combining ozone, TiO_2 , H_2O_2 and UVA-Visible irradiation, applied in drinking water treatments (Lanao et al. 2008; Lanao et al. 2010; Lanao et al. 2012).

The aim of this research work was to evaluate the disinfection power of different treatments based on chlorine (chlorination), ozone (ozonation and peroxone) and UVA-Visible irradiation (in the presence and absence of H_2O_2 and/or TiO_2), on *Enterococcus* sp. present in synthetic WWTP effluent. The influence of the type of reagents, dose of reagents and the time of exposure on the inactivation of enterococci in the different treatments is also studied.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation and Characteristics

The samples used in this study were synthetic treated urban wastewater samples collected from the outflow of an activated sludge pilot-plant at laboratory scale. The pilot plant was fed with a synthetic wastewater prepared according to Directive 82/243/EEC, simulating conventional urban wastewater. The feeding was introduced into the reactor, which was provided with continuous aeration, and purification of the wastewater occurred due to the action of the microorganisms present in the sludge. The treated wastewater was then separated and removed from the top of a settling tank while the sludge was returned to the reactor (Rodríguez-Chueca et al. 2012). The treated wastewater effluent from the activated sludge pilot plant had a physicochemical composition (Table 1) similar to treated urban wastewater from a real scale WWTP.

The synthetic treated urban wastewater samples have a low concentration of *Enterococcus* sp. (10^4 – 10^5 CFU 100 mL^{-1}), which was insufficient for an adequate evaluation of the effectiveness of the treatments. In addition, there were other microorganisms in the samples that might influence the results, so the treated urban wastewater samples were sterilized at $121\text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min to remove any endogen microorganism. Then, the bacterial population was artificially increased using an *Enterococcus* sp. wild strain isolated from a municipal WWTP effluent (Spain). A concentrated cell suspension in saline solution was prepared from the stock cultures of the *Enterococcus* sp. strain incubated on nutritive agar (Scharlab) after 48 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in aerobic conditions. This bacterial suspension was added to the treated urban wastewater samples to achieve an approximate final concentration of 10^7 – 10^8 CFU 100 mL^{-1} .

TABLE 1. Characterization of the Synthetic Urban Wastewater Samples

Parameter	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TSS (mg L^{-1})	Turbidity (NTU)	DOC (mg C L^{-1})	Total nitrogen (mg L^{-1})	COD ($\text{mg O}_2\text{ L}^{-1}$)	BOD ₅ ($\text{mg O}_2\text{ L}^{-1}$)
Mean value	7	1200	44	39	13	7	60	18

Detection, Enumeration and Inactivation of *Enterococcus* sp.

The culture and enumeration of *Enterococcus* sp. was carried out according to the membrane filtration procedure ISO 7899-2:2000, using sterile cellulose membranes (Millipore) of 0.45- μm pore size, and the spread plate standard method 9215 C. From each sample taken in the experiments, several different volumes were filtered and dilutions were made when necessary to ensure a reliable count in each sampling time. Cultured *Enterococcus* sp. bacteria were detected by incubation after 48 h at 37 °C in Slanetz-Bartley agar (Scharlab) as the selective medium. After this period, colonies with a pink-dark red color were counted.

The enumeration of the bacteria was expressed as CFU (colony-forming units) per 100 mL of sample in each contact time. The bacterial inactivation was determined by $\log(N_t/N_0)$, where N_0 and N_t were the *Enterococcus* sp. concentrations before and after disinfection.

Experimental Treatments

All glassware in contact with the samples was autoclaved at 121 °C for 15 min. All solutions and culture mediums were prepared with distilled water, and analytical-reagent-grade chemicals were used throughout.

Chlorination Experiments

The chlorination assays were conducted in 600 mL glass reactors containing 300 mL of sample. The stock chlorine solution, was prepared by dilution 1:10 of sodium hypochlorite (NaClO 5%, Panreac) in distillate water. Chlorine doses of 4, 15, 30 and 65 mg Cl_2 L^{-1} were applied to the samples. The solutions were stirred at 100 rpm during the experiments, with a maximum contact time of 30 min. The highest dose, 65 mg Cl_2 L^{-1} , is the chlorine demand of the treated urban wastewater used in this study. The chlorine demand of the samples was determined according to 4500-Cl B and 5710 B Standard Methods.

During the experiments, aliquots were taken at different times to evaluate the effectiveness of the treatments on *Enterococcus* sp. inactivation. Residual chlorine in the samples was immediately quenched with sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 99.5%, Panreac) to stop the disinfection reaction. Alternatively, the same experiments were carried out in parallel, without $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ addition, to determine the residual chlorine at different times. Residual chlorine was measured in a HANNA HI 83099 multiparametric spectrophotometer, according to colorimetric method DPD 330.5 EPA.

For comparison of the inactivation results obtained with different chlorine doses, the Ct parameter was used, defined as $Ct = C \cdot t$, where C is the chlorine concentration (mg Cl_2 L^{-1}) and t is the treatment time (min).

Ozone-Based Experiments

The ozone-based treatments were performed with ozone generated "in situ" in the laboratory from dry oxygen using a Fischer model 500 ozone generator. The generator was connected to a closed glass spherical reactor containing the sample and the ozone gas was transferred by a porous diffuser (O_3 generated). The reactor worked in semi-continuous mode: continuous to gas and discontinuous to liquid. Ozone not transferred to the sample during contact time was released from the reactor as O_3 not consumed. The unconsumed ozone was routed to two ozone destruction units containing 250 mL of 2% KI solution. When the ozone reacted with the KI, it was reduced to oxygen and released to the atmosphere as an innocuous element. Both, ozone generated and ozone not consumed, were calculated by an iodometric method. The ozone consumed by the sample is defined by Equation [1].

$$O_3 \text{ consumed} = O_3 \text{ generated} - O_3 \text{ not consumed} \quad [1]$$

The ozone flow (O_3 generated) was kept constant at 900 mg O_3 h^{-1} during the ozone-based treatments. Experiments were conducted at different times, up to a maximum of 15 min, which led to a maximum ozone consumed dose of 90 mg O_3 L^{-1} consumed. In each essay, 1 L of sample was treated and the experiments were carried out at room temperature (23 °C). For the treatment by ozone combined with hydrogen peroxide (peroxone treatment), a dose of 1.4 mg H_2O_2 L^{-1} (0.04 mM H_2O_2) was applied, using a stock solution of H_2O_2 30% w/v, Panreac. In previous ozonation studies, some authors have worked with lower doses of H_2O_2 (0.02–0.04 mM) with good disinfection results (Cho and Yoon 2006; Lanao et al. 2008). Residual O_3 and H_2O_2 in the samples were immediately quenched with sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 99.5%, Panreac) to stop the bacterial inactivation.

UVA-Vis Irradiation-Based Experiments

All the experiments based on irradiation, (including UVA-visible irradiation alone or combined with H_2O_2 , TiO_2 or both), were conducted in an Atlas Suntest CPS+/XLS+ solar chamber provided with a xenon lamp. This system enabled reproduction of natural sunlight conditions in the laboratory. A quartz filter and an additional glass filter (Xenochrome 320) were used to cut off wavelengths below 320 nm, removing the UVB and UVC ranges. Therefore, the samples were exposed to wavelengths between 320 and 800 nm, corresponding to the UVA and visible bands. The solar chamber was equipped with a magnetic agitator and a regulator of intensity and time of exposure, as well as a temperature control.

The intensity of the irradiation selected for all experiments was 500 W m^{-2} , corresponding to the 50% of the light intensity of the midday equatorial solar radiation (Yuranova et al. 2004). Maximum temperature reached in the solar chamber was 35 °C, although the samples did not exceed 30 °C. The samples were stirred at 300 rpm throughout the essays

and maximum irradiation time was 60 min. For UVA-Vis irradiation/TiO₂ or photocatalysis treatments, TiO₂ dose of 1 g L⁻¹ was used, recommended by several authors (Cho et al. 2004; Lanao et al. 2012; Rincón and Pulgarín 2003). For irradiation treatments combined with H₂O₂, H₂O₂ doses were: 1.4, 20, 200, and 680 mg H₂O₂ L⁻¹, doses previously used in photocatalytic treatments (Ibarz 2008; Lanao et al. 2010; Lanao et al. 2012). The solution of hydrogen peroxide used in this study was H₂O₂ 30% w/v, Panreac, and the photocatalyst was commercial TiO₂ (Degussa, P25). Residual hydrogen peroxide in the samples was measured by colorimetric method with test strips (H₂O₂ Merckoquant) and then immediately quenched with catalase (Sigma Aldrich) to prevent further disinfection.

Kinetic Models of Microbial Inactivation

Models Description

Microbial inactivation curves can have different shapes. In the simplest case, microbial inactivation vs. time follows a linear decay, although deviations such as shoulders or tails are commonly observed. The phenomenon of an initial shoulder occurs when there is a “lag” phase in which a fraction of surviving microorganisms is maintained constant during the first instants of treatment, followed by a linear decline. The tailing-off effect consists of an initial linear inactivation phase followed by a slow decrease in microbial populations. When

both phenomena occur, the inactivation curve has sigmoidal shape.

Adjusting the experimental bacterial inactivation data to kinetic models can provide useful information for reactor design purposes (Marugán et al. 2013). However, in this research work the use of kinetic models did not pretend to serve as a reactor modelling tool, but to check the viability of using these models to predict the disinfection level under specific operational conditions and treatments. Table 2 summarizes the different kinetic models proposed to describe the inactivation curves obtained in the present research. Several authors have previously used the selected kinetic models to describe the inactivation of microbes in water by different treatments (Barbeau et al. 1999; Chong et al. 2011; Lee and Nam 2002; Younas et al. 2014).

Fitting Experimental Data and Error Rates

To obtain the kinetic coefficients of each model described above, it was necessary to adjust the experimental values to the corresponding equations by non-linear regression techniques. The parameters of the models were adjusted to equations using interactive algorithms based on the least squares method (Cho et al. 2003; Pernistky et al. 1995). The Solver and GInaFIT (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) (Geeraerd et al. 2005) tools of the Microsoft Excel program were used in this study.

TABLE 2. Kinetic Models Applied to Microbial Inactivation Curves

Kinetic model	Equation and parameters	References
Hom model	$\log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -k^* \cdot t^m$ k: inactivation rate constant C: concentration of disinfectant n: coefficient of dilution m: empirical constant k*: apparent reaction rate constant	Hom (1972)
Modified Hom model	$\ln \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nkI}\right)^m \cdot k \cdot C_0^n \cdot \left[1 - e^{-\frac{nkI}{m}}\right]^m$ k: inactivation rate constant C ₀ : initial concentration of disinfectant n: coefficient of dilution m: empirical constant k': disinfectant decomposition rate constant	Haas and Joffe (1994)
Selleck model	$\log \frac{N_t}{N_0} = -n \cdot \log \left(1 + \frac{C \cdot t}{k}\right)$ k: inactivation rate constant n: empirical constant	Selleck et al. (1978)
Geeraerd model	$N_t = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{(-k_{max} \cdot t)} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot Sl}}{1 + (e^{k_{max} \cdot Sl} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}}\right) + N_{res}$ N _{res} : concentration of the survival bacteria k _{max} : first-order inactivation rate constant Sl: length of the initial shoulder	Geeraerd et al. (2000)

Two indexes were used to evaluate the quality of the adjustments of the experimental data obtained to the mathematical models: the correlation coefficient (R^2) and the root mean square error ($RMSE$). In addition, the models adjustment quality was assessed by graphical representation of the calculated values and the experimental data.

RESULTS AND DISCUSSION

Chlorination experiments

Enterococcus sp. Inactivation by Chlorination

Figure 1a summarizes the results of *Enterococcus sp.* inactivation during the chlorination treatments. In general, it can be noticed that the higher the chlorine dose was, the faster the bacterial inactivation occurred. Applying the lowest dose ($4 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$), which is far below the chlorine demand of WWTP effluents, to the treated wastewater sample containing an initial concentration of *Enterococcus sp.* of $6.6 \times 10^7 \text{ CFU } 100 \text{ mL}^{-1}$, resulted in 3.2 log units of bacterial inactivation after 30 min, with $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ of chlorine consumed. Tyrrell et al. (1995) observed similar enterococci inactivation in a secondary sewage effluent treated with a chlorine dose of $1.5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ after 15 min.

When adding the chlorine demand of a treated wastewater ($65 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$) to the sample, total inactivation (7.5 log units) of *Enterococcus sp.* was achieved within less than 3 min and $39 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ of chlorine consumed. However, after 30 min of treatment, the same disinfection effectiveness could be obtained in the studied sample with smaller chlorine doses (30 and $15 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$) and consumption

(18 and $9 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$, respectively), although the bacterial inactivation rates were slower. Thus, the same level of disinfection could be achieved combining different contact times and chlorine doses, that is, the bacterial inactivation could be related to the Ct parameter. This parameter has also been used by other authors studying disinfection (Barbeau et al. 1999; Cho et al. 2003). Figure 1b shows the bacterial inactivation in relation to the Ct parameter.

Evaluation of Kinetic Models in Chlorination

The experimental data of the inactivation curves of *Enterococcus sp.* obtained during chlorination treatments were analyzed through three mathematical models, the Hom model, the modified Hom model and the Selleck model. All these models consider the concentration of the disinfectant agent. The kinetic parameters of the models were calculated considering all together the inactivation data of the four chlorine doses applied. Table 3 summarizes the kinetic parameters of the applied mathematical models. As an example, Figure 2a shows graphically the adjustment of the different models to the experimental data for a dose of $30 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$.

The values of the adjustment indexes R^2 and $RMSE$ are shown in Table 3. In general, these values showed a similar fitting of the three models, Hom, modified Hom and Selleck, to the inactivation curves achieved in chlorination experiments. However, other authors applying chlorination have been found to get better descriptions of their experimental data using the modified Hom model (Barbeau et al. 1999) or the Selleck model (Lee and Nam 2002), since inactivation curves not only

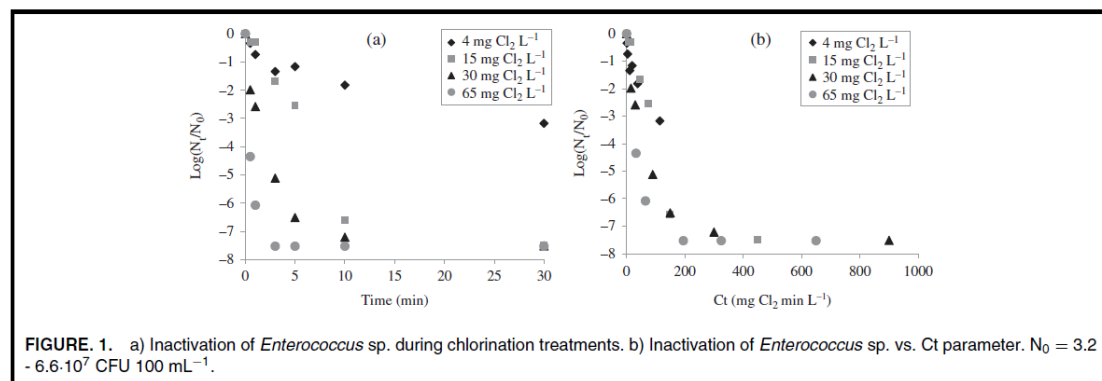


FIGURE 1. a) Inactivation of *Enterococcus sp.* during chlorination treatments. b) Inactivation of *Enterococcus sp.* vs. Ct parameter. $N_0 = 3.2 \times 10^7 \text{ CFU } 100 \text{ mL}^{-1}$.

TABLE 3. Kinetic Parameters of the Models Applied to the Inactivation Data of *Enterococcus sp.* in the Chlorination Treatments Considering the Inactivation Data of all Chlorine Doses Together

Empirical model	k	k'	m	n	Correlation coefficient R^2	$RMSE$
Hom	0.79	—	0.22	0.43	0.911	1.241
Modified Hom	1.2	1.6	1.4	0.45	0.910	2.866
Selleck	7.7	—	—	4.0	0.927	1.118

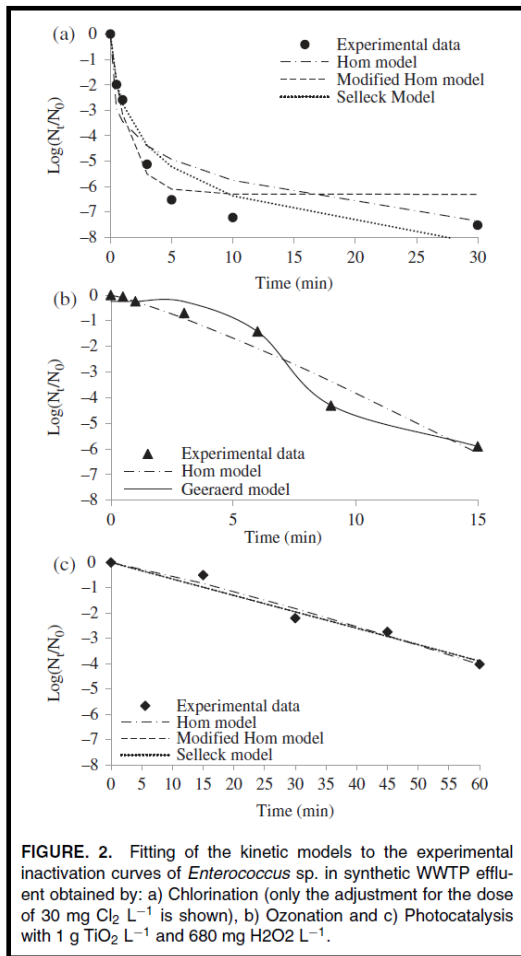


FIGURE 2. Fitting of the kinetic models to the experimental inactivation curves of *Enterococcus* sp. in synthetic WWTP effluent obtained by: a) Chlorination (only the adjustment for the dose of 30 mg $\text{Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ is shown), b) Ozonation and c) Photocatalysis with 1 g $\text{TiO}_2 \text{ L}^{-1}$ and 680 mg $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$.

depend on the disinfection treatment, but also on the type of bacteria and aqueous matrix.

Ozone-Based Experiments

Enterococcus sp. Inactivation by Ozone-Based Treatments

Figure 3 shows the bacterial inactivation and the consumed ozone in relation to the treatment time. At the end of the ozonation and peroxone treatments, a final inactivation of 5.9 and 6.4 log units was obtained, respectively, with consumed ozone of 90 mg $\text{O}_3 \text{ L}^{-1}$. In both cases, there was an initial shoulder or “lag” phase in which enterococci inactivation occurred slowly, followed by a linear decay and a final tailing-off effect, as shown in Figure 3a. The initial shoulder phenomena might be caused by many different reasons (Geeraerd et al. 2000): the presence of clumps of bacteria, a period of cells vital components resynthesis, a stabilization effect of the membrane due to proteins or fats in the medium, a poor mix of the disinfectant, the presence of other ozone-consuming compounds in the water, etc. Anyway, to inactivate the first logarithmic unit of *Enterococcus* sp., an ozone dose higher than 50 mg $\text{O}_3 \text{ L}^{-1}$ had to be applied. Gehr et al. (2003) also obtained a low disinfection efficiency of ozone in municipal wastewater with 50 mg $\text{O}_3 \text{ L}^{-1}$, achieving the inactivation of 2 log units of faecal coliforms and enterococci and 1 log unit of *Clostridium perfringens*.

In general, it could be noticed that similar bacterial inactivation curves were obtained by ozone disinfection in absence or presence of H_2O_2 , indicating that the addition of the selected dose of hydrogen peroxide did not clearly affect the disinfection power of ozonation. However, previous research has shown the positive disinfection effect of combining hydrogen peroxide and ozone to inactivate *Bacillus subtilis* spores (Cho and Yoon 2006) or *Clostridium perfringens* vegetative cells (Lanao et al. 2008).

The physicochemical parameters of the samples (pH, conductivity and turbidity) remained practically invariable

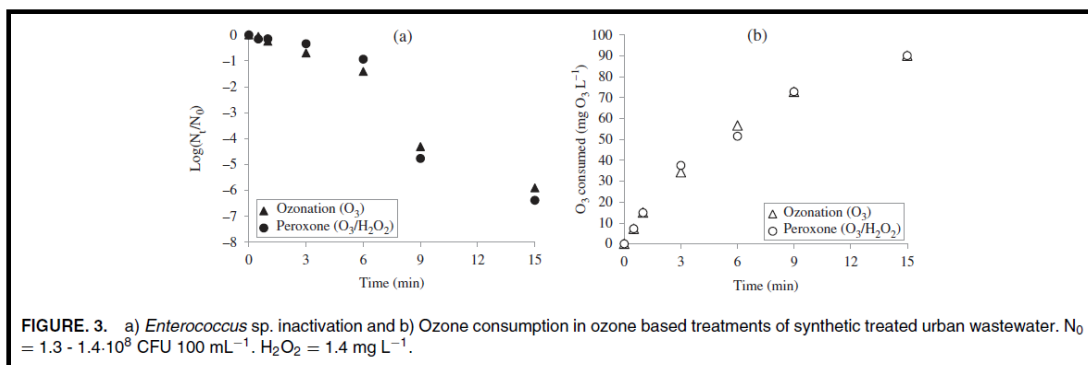


FIGURE 3. a) *Enterococcus* sp. inactivation and b) Ozone consumption in ozone based treatments of synthetic treated urban wastewater. $N_0 = 1.3 - 1.4 \cdot 10^8 \text{ CFU } 100 \text{ mL}^{-1}$. $\text{H}_2\text{O}_2 = 1.4 \text{ mg L}^{-1}$.

during ozonation and peroxone treatments. This insignificant variation in pH and conductivity was also observed by Lanao et al. (2008).

Evaluation of Kinetic Models in Ozone-Based Treatments

In the ozone-based treatments a constant flow of ozone was passed through the sample during the treatment time; thus, models including the initial concentration of disinfectant reagent might not be suitable for this experiment setting. The experimental data of the inactivation curves of *Enterococcus* sp. obtained during ozonation and peroxone treatments were analyzed through two mathematical models, the Hom model, considering the apparent reaction rate constant k^* , and the Geeraerd model. Table 4 summarizes the kinetic parameters of the models applied to the inactivation curves in ozonation and peroxone treatments. Figure 2b shows graphically the fitting of the different kinetic models to the experimental data obtained during the ozonation treatment. A similar fitting was observed for the peroxone treatment data.

In general, the fitting of the experimental data to the models was reasonably good, since *RMSE* values were close to 0 and R^2 values close to 1. However, the graphical representations of the kinetics models for the ozone-based treatments (Figure 2b) showed that the Geeraerd model could better explain the initial shoulder and the tailing-off phenomena observed in the inactivation curve of the experimental data. The kinetic parameters calculated for the ozonation and the peroxone treatments were on the same order of magnitude, showing a similar effectiveness of both processes.

UVA-Visible Irradiation-Based Experiments

Enterococcus sp. Inactivation by UVA-Visible Irradiation-Based Treatments

Table 5 shows the inactivation of *Enterococcus* sp. in the synthetic WWTP effluent sample by applying different treatments based on UVA-Vis irradiation combined with H_2O_2 and TiO_2 for 30 min. Exposure of the sample to UVA-Vis irradiation alone did not achieve any bacterial inactivation in that period. The UVA-Vis/ H_2O_2 processes with doses of 1.4, 20, and 680 mg H_2O_2 L^{-1} produced a slightly higher bacterial inactivation, achieving 0.3 log units of disinfection with 680 mg H_2O_2 L^{-1} .

Hydrogen peroxide decomposes at 254 nm, leading to the formation of ROS (Parsons 2004); however, in this work irradiation between 320 and 800 nm was applied, thus, the addition of H_2O_2 did not produce further disinfection. The UVA-Vis/ TiO_2 treatment, with a catalyst concentration of 1 g TiO_2 L^{-1} , obtained less than 0.1 log units of *Enterococcus* sp. inactivation after 30 min of treatment. Other authors have also achieved low *Enterococci* disinfection efficiency (< 1 log unit) when applying TiO_2 photocatalytic treatments to biological treated wastewater samples for short time periods (30 min) (Lydakis-Simantiris et al. 2010; Rincón and Pulgarín 2003). The UVA-vis/ TiO_2 / H_2O_2 treatments were more efficient, but a high dose of 680 mg H_2O_2 L^{-1} had to be used to produce a considerable increase on the disinfection level, inactivating 2.2 log units of bacteria after 30 min.

Figure 4 shows the bacterial inactivation results of the treatments UVA-Vis/ H_2O_2 , UVA-Vis/ TiO_2 and UVA-Vis/ TiO_2 / H_2O_2 with concentrations of 1 g TiO_2 L^{-1} and 680 mg H_2O_2 L^{-1} . This UVA-Vis/ TiO_2 / H_2O_2 treatment inactivated 4 logarithmic units of enterococci after 60 min, consuming all the H_2O_2 , which may involve no further disinfection. However, the sum of the bacterial reduction achieved by UVA-Vis/ H_2O_2 and UVA-Vis/ TiO_2 was much lower. These results confirmed the existence of a synergistic effect between H_2O_2 and TiO_2 , which increases the formation of ROS, and thus, the bacterial inactivation. Despite the high dose of H_2O_2 , this photocatalytic treatment was still too slow compared to chlorination or ozonation.

TABLE 5. *Enterococcus* sp. Inactivation in Synthetic Treated Urban Wastewater by Different Treatments Based on UVA-Visible Irradiation, H_2O_2 and TiO_2 . t = 30 min. $N_0 = 1.1-1.6 \times 10^8$. CFU 100 mL $^{-1}$.

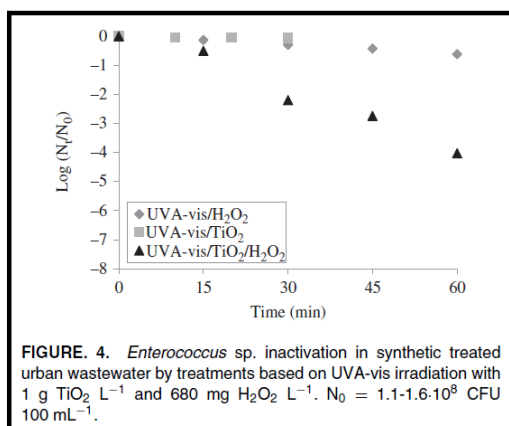
Treatment	Log (N_t/N_0)
UVA-Vis	0.0
UVA-Vis + 1.4 mg H_2O_2 L^{-1}	-0.1
UVA-Vis + 20 mg H_2O_2 L^{-1}	-0.1
UVA-Vis + 680 mg H_2O_2 L^{-1}	-0.3
UVA-Vis + 1 g TiO_2 L^{-1}	-0.1
UVA-Vis + 20 mg H_2O_2 L^{-1} + 1 g TiO_2 L^{-1}	-0.3
UVA-Vis + 200 mg H_2O_2 L^{-1} + 1 g TiO_2 L^{-1}	-0.4
UVA-Vis + 680 mg H_2O_2 L^{-1} + 1 g TiO_2 L^{-1}	-2.2

TABLE 4. Kinetic Parameters of the Models Applied to the Inactivation Curve of *Enterococcus* sp. in the Ozone-Based Treatments

Empirical model	k^*	m	Sl	k_{max}	Correlation coefficient R^2	<i>RMSE</i>
Hom (Ozonation)	0.25	1.2	—	—	0.957	0.456
Hom (Peroxone)	0.18	1.3	—	—	0.921	0.684
Geeraerd (Ozonation)	—	—	4.8	2.2	0.991	0.312
Geeraerd (Peroxone)	—	—	5.5	3.0	0.999	0.141

TABLE 6. Kinetic Parameters of the Models Applied to the Inactivation Curve of *Enterococcus* sp. in the Photocatalytic Treatment with 1 g TiO₂ L⁻¹ and 680 mg H₂O₂ L⁻¹

Empirical model	k	k'	m	n	Correlation coefficient R^2	RMSE
Hom	0.037	—	1.1	0.20	0.988	0.233
Modified Hom	0.024	0.00031	1.2	0.062	0.987	0.596
Selleck	20	—	—	5.7	0.957	0.482



Evaluation of Kinetic Models in UVA-Vis Irradiation-Based Treatments

As mentioned before, only the photocatalytic treatment with 1 g TiO₂ L⁻¹ and 680 mg H₂O₂ L⁻¹ achieved more than 1 log unit of bacterial inactivation. Thus, only the experimental data of the inactivation curve of *Enterococcus* sp. obtained during this photocatalytic treatment were analyzed. Three kinetic models were evaluated, the Hom model, the modified Hom model and the Selleck model. Table 6 summarizes the kinetic parameters of the applied models. Figure 2c shows the fitting of the different models to the experimental data.

In general, the fitting of the experimental data to the three models was good because the RMSE values were close to 0 and the R² values were close to 1. In addition, the graphical representation (Figure 2c) showed a very similar adjustment of the three models since the experimental data described an inactivation curve with almost linear decay. However, other authors (Chong et al. 2011; Younas et al. 2014) have found a better fitting of the modified Hom model to their sigmoidal inactivation curves obtained by photocatalytic treatments, since this model is able to describe curves with shoulders, linear region, and tailing effect.

CONCLUSIONS

To compare the efficiency of the different treatments on the disinfection of *Enterococcus* sp. in synthetic treated

wastewater, 2 logarithmic units of inactivation are taken as reference. Less than 15 sec are needed when adding the chlorine demand of the sample (65 mg Cl₂ L⁻¹). Lower doses of chlorine can be obtained the same level of inactivation by increasing the contact time. For example, with 4 mg Cl₂ L⁻¹, which might be the chlorine demand of a pre-drinking water, 2 log units of inactivation are reached in about 13 min. In the treatments based in ozone, this level of disinfection requires 6.5 min with 60 mg O₃ consumed L⁻¹ in ozonation and 6.75 min with 57 mg O₃ consumed L⁻¹ and 1.4 mg H₂O₂ L⁻¹ in peroxone treatment.

The combination of 1 g TiO₂ L⁻¹ with 680 mg H₂O₂ L⁻¹ in the presence of UVA-visible irradiation needs 30 min to achieve 2 log units of inactivation. These results show that chlorine is the most effective disinfectant agent, it produces faster bacterial inactivation and the residual chlorine can achieve ever further disinfection. Ozone seems to be a good bactericidal as well, even though the consumption of disinfectant reagent is higher than in chlorination. Treatments based on UVA-visible irradiation are less effective but can produce considerable bacterial inactivation in the presence of TiO₂ and high doses of H₂O₂. The shape of the inactivation curves is different depending on the type of treatment; thus experimental data can better fit to one kinetic model or another. Whereas the Hom, modified Hom, and Selleck models properly describe the inactivation curves in chlorination and photocatalysis, the Geeraerd model fits the best to the experimental data achieved in ozone-based treatments.

FUNDING

The authors would like to thank the Aragón Government and the European Social Fund for their funding to the Research Team T33. In addition, this work was financed through the Project CTM2013-41397-R funded by MINECO-FEDER. The authors would also like to thank the Aragón Government for the Ph.D. grant awarded to Pilar Valero.

REFERENCES

- Barbeau, B., L. Boulos, R. Desjardins, J. Coallier, and M. Prévost. 1999. "Examining the Use of Aerobic Spore-Forming Bacteria to Assess the Efficiency of Chlorination." *Water Research* 33(13): 2941–2948.
- Black and Veatch Corporation. 2010. *White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, 5th ed. Hoboken, NJ: John Wiley.

- Cho, M., H. Chung, and J. Yoon. 2003. "Disinfection of Water Containing Natural Organic Matter by Using Ozone-Initiated Radical Reactions." *Applied and Environmental Microbiology* 69(4): 2284–2291.
- Cho, M., H. Chung, W. Choi, and J. Yoon. 2004. "Linear Correlation Between Inactivation of *E. coli* and OH Radical Concentration in TiO₂ Photocatalytic Disinfection." *Water Research* 38(4): 1069–1077.
- Cho, M., and J. Yoon. 2006. "Enhanced Bactericidal Effect of O₃/H₂O₂ Followed by Cl₂." *Ozone: Science and Engineering* 28: 335–340.
- Chong, M.N., B. Jin, C.W.K. Chow, and C. Saint. 2010. "Recent Developments in Photocatalytic Water Treatment Technology: A Review." *Water Research* 44(10): 2997–3027.
- Chong, M.N., B. Jin, and C.P. Saint. 2011. "Bacterial Inactivation Kinetics of a Photo-disinfection System Using Novel Titania-Impregnated Kaolinite Photocatalyst." *Chemical Engineering Journal* 171(1): 16–23.
- Gago-Ferrero, P., K. Demeestere, M.S. Díaz-Cruz, and D. Barceló. 2013. "Ozonation and Peroxone Oxidation of Benzophenone-3 in Water: Effect of Operational Parameters and Identification of Intermediate Products." *Science of the Total Environment* 443: 209–217.
- Geeraerd, A.H., C.H. Herremans, and J.F. Van Impe. 2000. "Structural Model Requirements to Describe Microbial Inactivation During a Mild Heat Treatment." *International Journal of Food Microbiology* 59(3): 185–209.
- Geeraerd, A.H., V.P. Valdramidis, and J.F. Van Impe. 2005. "GInaFit, a Freeware Tool to Assess Non-Log-Linear Microbial Survivor Curves." *International Journal of Food Microbiology* 102(1): 95–105.
- Gehr, R., M. Wagner, P. Veerasubramanian, and P. Payment. 2003. "Disinfection Efficiency of Peracetic Acid, UV and Ozone after Enhanced Primary Treatment of Municipal Wastewater." *Water Research* 37(19): 4573–4586.
- Haas, C.N., and J. Joffe. 1994. "Disinfection under Dynamic Conditions: Modification of Hom's Model for Decay." *Environmental Science and Technology* 28: 1367–1369.
- Hom, L.W. 1972. "Kinetics of Chlorine Disinfection in an Ecosystem." *Journal of the Sanitary Engineering Division* 98: 183–193.
- Ibarz, C. 2008. *Desactivación de Enterococos en agua natural mediante fotocatalisis con dióxido de titanio y radiación solar*. PhD thesis, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.
- Lanao, M., M.P. Ormad, C. Ibarz, N. Miguel, and J.L. Ovelleiro. 2008. "Bactericidal Effectiveness of O₃, O₃/H₂O₂ and O₃/TiO₂ on *Clostridium perfringens*." *Ozone Science and Engineering* 30: 431–438.
- Lanao, M., M.P. Ormad, P. Goñi, N. Miguel, R. Mosteo, and J.L. Ovelleiro. 2010. "Inactivation of *Clostridium perfringens* Spores and Vegetative Cells by Photolysis and TiO₂ Photocatalysis with H₂O₂." *Solar Energy* 84(4): 703–709.
- Lanao, M., M.P. Ormad, R. Mosteo, and J.L. Ovelleiro. 2012. "Inactivation of *Enterococcus* sp. by Photolysis and TiO₂ Photocatalysis with H₂O₂ in Natural Water." *Solar Energy* 86(1): 619–625.
- Lee, Y., and S. Nam. 2002. "Reflection on Kinetic Models to Chlorine Disinfection for Drinking Water Production." *The Journal of Microbiology* 40(2): 119–124.
- Lydakis-Simantiris, N., D. Riga, E. Katsivela, D. Mantzavinos, and N.P. Xekoukoulotakis. 2010. "Disinfection of Spring Water and Secondary Treated Municipal Wastewater by TiO₂ Photocatalysis." *Desalination* 250(1): 351–355.
- Malato, S., P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, and W. Gernjak. 2009. "Decontamination and Disinfection of Water by Solar Photocatalysis: Recent Overview and Trends." *Catalysis Today* 147(1): 1–59.
- Marugán, J., R. Grieken, C. Pablos, M.L. Satuf, A.E. Cassano, O.M. Alfano. 2013. "Modeling of a Bench-Scale Photocatalytic Reactor for Water Disinfection From Laboratory-Scale Kinetic Data." *Chemical Engineering Journal* 224: 39–45.
- Matilainen, A., and M. Sillanpää. 2010. "Removal of Natural Organic Matter from Drinking Water by Advanced Oxidation Processes." *Chemosphere* 80(4): 351–365.
- McGuigan, K.G., R.M. Conroy, H.J. Mosler, M. Preez, E. Ubomba-Jaswa, and P. Fernández-Ibáñez. 2012. "Solar Water Disinfection (SODIS): A Review from Bench-top to Roof-Top." *Journal of Hazardous Materials* 235–236:29–46.
- Mosteo, R., N. Miguel, S. Martín-Muniesa, M.P. Ormad, and J.L. Ovelleiro. 2009. "Evaluation of Trihalomethane Formation Potential in Function of Oxidation Processes Used During the Drinking Water Production Process." *Journal of Hazardous Materials* 172(2–3): 661–666.
- Mosteo, R., M.P. Ormad, P. Goñi, J. Rodríguez-Chueca, A. García, and A. Clavel. 2013. "Identification of Pathogen Bacteria and Protozoa in Treated Urban Wastewaters Discharged in the Ebro River (Spain): Water Reuse Possibilities." *Water Science and Technology* 68(3): 575–583.
- Parsons, S. 2004. *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*. London, United Kingdom: IWA Publishing.
- Pernitsky, D.J., G.R. Finch, and P.M. Huck. 1995. "Disinfection Kinetics of Heterotrophic Plate Count Bacteria in Biologically Treated Potable Water." *Water Research* 29(5): 1235–1241.
- Rincón, A.G., and C. Pulgarin. 2003. "Photocatalytic Inactivation of *E. coli*: Effect of (Continuous-Intermittent) Light Intensity and of (Suspended-Fixed) TiO₂ Concentration." *Applied Catalysis B: Environmental* 44(3): 263–284.
- Rodríguez-Chueca, J., R. Mosteo, M.P. Ormad, and J.L. Ovelleiro. 2012. "Factorial Experimental Design Applied to *Escherichia coli* Disinfection by Fenton and Photo-Fenton Processes." *Solar Energy* 86(11): 3260–3267.
- Rodríguez-Chueca, J., M.I. Polo-López, R. Mosteo, M.P. Ormad, and P. Fernández-Ibáñez. 2014. "Disinfection of Real and Simulated Urban Wastewater Effluents Using a Mild Solar Photo-Fenton." *Applied Catalysis B: Environmental* 150–151:619–629.
- Selleck, R.E., B.M. Saunier, and H.F. Collins. 1978. "Kinetics of Bacterial Deactivation with Chlorine." *Journal of Environmental Engineering* 104: 1197–1212.
- Spuhler, D., J.A. Rengifo-Herrera, and C. Pulgarin. 2010. "The Effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the Photo-Fenton Reagent at Near Neutral pH on the Solar Disinfection (SODIS) at Low Temperatures of Water Containing *Escherichia coli* K12." *Applied Catalysis B: Environmental* 96(1–2): 126–141.
- Tyrrell, S.A., S.R. Rippey, and W.D. Watkins. 1995. "Inactivation of Bacterial and Viral Indicators in Secondary Sewage Effluents, Using Chlorine and Ozone." *Water Research* 29(11): 2483–2490.
- Younas, H., I.A. Qazi, I. Hashmi, M.A. Awan, A. Mahmood, and H.A. Qayyum. 2014. "Visible Light Photocatalytic Water Disinfection and its Kinetics Using Ag-Doped Titania Nanoparticles." *Environmental Science and Pollution Research* 21: 740–752.
- Yuranova, T., O. Enea, E. Mielczarski, J. Mielczarski, P. Albers, and J. Kiwi. 2004. "Fenton Immobilized Photo-Assisted Catalysis Through a Fe/C Structured Fabric." *Applied Catalysis B: Environmental* 49(1): 39–50.

III.II. Publicación nº 2

Autores: P. Valero, S. Giannakis, R. Mosteo, M.P. Ormad, C. Pulgarin

Título: Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment

Publicación: Chemical Engineering Journal 313, 109-120

Año: 2017

DOI: 10.1016/j.cej.2016.11.126

ISSN: 13858947

Chemical Engineering Journal 313 (2017) 109–120



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

Chemical Engineering Journal

Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment



Pilar Valero^{a,b}, Stefanos Giannakis^{b,*}, Rosa Mosteo^a, María P. Ormad^a, César Pulgarin^{b,*}

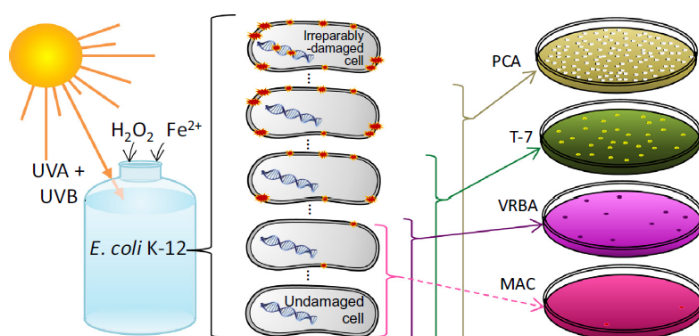
^aDepartment of Chemical Engineering and Environmental Technologies, University of Zaragoza, 3 María de Luna Street, 50018 Zaragoza, Spain

^bSB, ISIC, Group of Advanced Oxidation Processes, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Station 6, Lausanne, Switzerland

HIGHLIGHTS

- Selective media noticeably reduced recovery of photo-treated *Escherichia coli*.
- PCA supported the growth of injured bacteria with possible membrane damage.
- Catalase and sodium pyruvate enhanced the recuperation of photo-treated *E. coli*.
- Photo-Fenton inflicted multi-level cellular damages more severely than SODIS.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2016
Received in revised form 18 November 2016
Accepted 19 November 2016
Available online 21 November 2016

Keywords:

Escherichia coli
SODIS
Photo-Fenton
Culture media
Catalase
Sodium pyruvate

ABSTRACT

This study intends to assess the cultivability of photo-treated *Escherichia coli* K-12 on media with different selectivity (PCA, LBA, T-7, T-7 + TTC, VRBA and MAC) and to establish optimal conditions for bacterial recuperation. For these purposes, immediate and long-term bacterial recovery after SODIS and photo-Fenton are evaluated. Moreover, the use of catalase and sodium pyruvate supplements in the medium is studied. The non-selective medium PCA showed the highest counts for the untreated and treated cells due to its content in nutrients (e.g. glucose) and lack of inhibitors. On the contrary, the selective media showed lower recovery, being the culture media effectiveness: PCA > LBA > T-7 > T-7 + TTC > VRBA > MAC. The presence of inhibitors, such as heptadecyl sulfate in T-7 or bile salts in VRBA and MAC, reduced the cultivability of the treated cells. These compounds can probably diffuse into the cells more easily after SODIS and photo-Fenton as a consequence of the loss of the membrane integrity. In addition, the lack of yeast extract in MAC had a detrimental effect on *E. coli* recovery. Sodium pyruvate was tested as supplement to PCA, leading to slightly enhanced bacterial immediate recovery after SODIS, SODIS + H₂O₂ and photo-Fenton. The addition of catalase and sodium pyruvate to the bulk was studied as well, considerably increasing bacterial survival in the long-term due to their ability to neutralize residual H₂O₂.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: stefanos.giannakis@epfl.ch (S. Giannakis), cesar.pulgarin@epfl.ch (C. Pulgarin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.126>

1385-8947/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In an effort to address the issue of a proper and universal access to clean water and sanitation, many researchers have focused on solar-driven techniques as a good alternative for an effective, non-expensive and environmentally-friendly water disinfection treatment [1]. Solar Disinfection (SODIS) consists of placing the water in transparent containers and exposing them to sunlight for several hours. This simple technique achieves high pathogens inactivation by the combined effect of UVA + UVB radiation (if the material permits the transmission) and thermal heating [2]. SODIS can be enhanced by the presence of certain substances, such as hydrogen peroxide and/or iron [3], which can be naturally present in the water, thus augmenting the photo-Fenton process [4,5].

Although it often becomes a matter of debate [6], and other techniques have been used to monitor bacteria [7], cultivability is the golden standard when it comes to assessing the efficiency of disinfection processes. Bacterial inactivation efficiency of these and other disinfection treatments is usually assessed by analyzing the cultivability of cells on growth media. Microbial cells are structurally complex so they require culture media that provide a balanced mixture of macronutrients (C, O, H, N, S, P, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Fe^{2+/3+}) and micronutrients (Mn, Zn, Co, Mo, Ni and Cu) [8]. For isolation and enumeration of certain families of microorganisms, many media also contain selective agents, such as toxic compounds and dyes, to inhibit the growth of the non-targeted microorganisms [9].

Escherichia coli is a Gram-negative bacterium used as indicator of fecal pollution in water. For simulation studies in the laboratory, *E. coli* K-12 is the most popular fecal indicator model, since it is non-pathogenic to humans and it is easily cultivated. When assessing the efficiency of a treatment under controlled laboratory conditions, where there is only *E. coli* in synthetic samples, non-selective media, such as Plate Count Agar or Luria Bertani Agar, are commonly used [10–12]. However, when treating real waters, in which there is a consortium of bacteria, selectivity is required and samples are plated on specific media [13–15]. For example, in drinking water *E. coli* presence is often analyzed using the selective agars Tergitol-7, MacConkey and Violet Red Bile Agar [9,16]. The detection and enumeration of *E. coli* on these media is based on its ability to ferment lactose with acid production denoted by the pH indicators (bromothymol blue or neutral red) and on the inhibition of Gram-positive bacteria by other compounds (Tergitol-7, bile salts, crystal violet...). Unfortunately, one of the main disadvantages of selective media is that treated bacteria suffering sublethal damages are not properly detected [17].

Another drawback related to solar treatments is the risk of bacterial reactivation. Post-irradiation events have been reported to be dependent on the applied UV dose [18] and storage conditions such as temperature and availability of nutrients [19]. In addition, regrowth is more likely to happen in the absence of residual H₂O₂ [12].

For research purposes, it is common to add some substances to remove the remaining H₂O₂ in laboratory assays. For instance, catalase and sodium pyruvate have been used for years as H₂O₂ scavengers in samples incubated after SODIS [20–22]. Recently, the addition of catalase to neutralize H₂O₂ and study bacterial survival after Fenton processes is becoming more common [10,12,14,15], while the same use for sodium pyruvate has not been found in literature.

The aim of this study is to compare the immediate recovery and possible regrowth in several culture media with different composition and selectivity of *Escherichia coli* K-12 submitted to different photo-treatments (SODIS, SODIS + H₂O₂ and photo-Fenton). Moreover, the addition of catalase and sodium pyruvate will be tested in

the agar with the maximum recovery. This approach intends to have a double purpose: i) To assess the effect of the media selectivity on the recovery of photo-treated bacteria and ii) To establish optimal conditions in which maximum bacteria recuperation can be obtained, thus reducing the underestimation of bacteria (false negatives) in photo-treatments and the risks associated with it. Ultimately, SODIS and photo-treatment related studies either in lab or field conditions will have a reference of practice and selection of working cultivation media.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO₄·7H₂O) (Sigma-Aldrich); Hydrogen peroxide (H₂O₂) 30% w/w (Sigma-Aldrich); Catalase from bovine liver (3000 u/mg Sigma-Aldrich); Sodium pyruvate (C₃H₃NaO₃) (Sigma-Aldrich); Hydroxylamine Hydrochloride (NH₂-OH·HCl); Ferrozine (Sigma-Aldrich) and Titanium (IV) oxysulfate (TiOSO₄) (Fluka) were purchased from Sigma-Aldrich, Switzerland. All chemicals were reagent grade. Glassware and reactors containing iron were acid soaked after every use to avoid cross-contamination (10% HNO₃, 2 days). All samples and solutions were prepared with Milli-Q water (18.2 MΩ·cm).

2.2. Bacterial strain

Escherichia coli strain K-12 (MG1655) was used for all the experiments. The preparation of the bacteria inoculum was described elsewhere [23]. The resulting *E. coli* suspension has a concentration of 10⁹ colony forming units per mL (CFU/mL) and the sample was prepared by diluting 1000 times the inoculum in Milli-Q water (i.e. 100 μL *E. coli* suspension in 100 mL Milli-Q water), leading to an initial concentration of approximately 10⁶ CFU/mL.

2.3. Photo-inactivation experiments

Transparent Pyrex glass reactors containing 100 mL sample were used for the experiments. The trials were performed in a Suntest solar simulator provided with a Xenon lamp emitting in the UVB, UVA and visible range (similar to solar spectrum) with a radiation intensity of 900 W/m². The reactors, properly distributed in the solar simulator, were continuously stirred at 350 rpm during the experiments. Three systems were tested for their photo-inactivation effect on *E. coli*: i) SODIS (*hν*), ii) SODIS + H₂O₂ (*hν* + H₂O₂) and iii) photo-Fenton (*hν* + H₂O₂ + Fe²⁺). H₂O₂ and Fe²⁺ (added as FeSO₄·7H₂O) concentrations were 10 mg/L and 0.6 mg/L, respectively. These values were experimentally determined as optimal by Spuhler et al. [12]. pH, H₂O₂ and dissolved iron were concurrently monitored in an additional reactor placed in the solar simulator.

2.4. Post-irradiation events

For the post-irradiation monitoring of survival or regrowth of *Escherichia coli*, aliquots were withdrawn at different treatment times and stored in the dark at 29.5 ± 0.5 °C. The temperature was selected as representative of the room temperature in the developing countries where SODIS is applied and the treated water is kept in the settlements. Bacterial population was determined every 24 h after the initial acquisition time for several days, depending on the applied photo-treatment.

In addition, the roles of catalase and sodium pyruvate in post-irradiation events were separately assessed. Catalase or sodium

pyruvate was immediately added to the samples prior to storage with concentrations of 900 u/L and 1 mM, respectively.

2.5. Analytical methods

Hydrogen peroxide (H₂O₂) was determined by the titanium oxysulfate method. 1 mL sample was mixed with 20 µL titanium (IV) oxysulfate and measured in a spectrophotometer at 410 nm. Dissolved iron (Fe²⁺ and Fe³⁺) was analyzed by the ferrozine method, as described elsewhere [12]. Briefly, for 1.6 mL sample, 0.2 mL hydroxylamine hydrochloride (10% w/w), 0.5 mL acetate buffer (pH 4.65) and 0.2 mL ferrozine (4.9 mM) were added. After 20 min of reaction, the final coloration was measured at 562 nm in a spectrophotometer. pH was monitored with a pH-meter Metrohm 827.

2.6. Microbiological methods

2.6.1. Media

The recovery of *Escherichia coli* K-12 was tested on different media: Plate Count Agar (PCA) (Merck); Luria Bertani Agar (LBA); MacConkey Agar (MAC) (Sigma-Aldrich); Violet Red Bile Agar (VRBA) (Sigma-Aldrich); Tergitol-7 Agar (T-7) (Fluka). LBA was prepared with the following composition [9]: 10 g tryptone (BD Bacto), 5 g yeast extract (Fluka), 10 g NaCl (Sigma-Aldrich) and 15 g agar (Panreac) were dissolved in 1 L deionized H₂O. VRBA was made in two different ways: with and without autoclaving it, named as VRBA sterilized and VRBA unsterilized, respectively. As instructed by the manufacturer, unsterilized VRBA improves the recovery of the stressed microorganisms. Tergitol-7 Agar was tested with and without addition of 30 mg/L triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma-Aldrich). Table 1 summarizes the composition of the different media used for the recovery of *E. coli* in this work.

In additional experiments, the effect of including sodium pyruvate, in concentrations of 1 mM, 10 mM and 100 mM, as supplement to PCA medium after autoclaving and before solidification was studied.

2.6.2. Plating

Bacterial analysis was carried out according to the spread plate standard method 9215 C. 1 mL of sample was taken from each reactor and treatment time, and decimal dilutions were made when necessary. For each sample, at least two dilutions were plated by duplicate onto each culture media. After 24 h of incubation at 37 °C, the colonies were counted.

3. Results

3.1. Immediate *Escherichia coli* recovery in different media

3.1.1. Recovery of untreated *E. coli*

Firstly, a preliminary experiment to assess *Escherichia coli* K-12 growth on the different tested media was conducted. Each untreated sample was plated onto seven culture media. Fig. 1 represents the percentage of recovery on each agar compared to PCA, considering the log values of the counting. PCA presented the highest numbers ($3.5 \cdot 10^6 \pm 7.2 \cdot 10^5$ CFU/mL), closely followed by LBA ($3.3 \cdot 10^6 \pm 6.9 \cdot 10^5$ CFU/mL), Tergitol-7 with TTC supplement ($3.3 \cdot 10^6 \pm 3.9 \cdot 10^5$ CFU/mL) and without it ($3.2 \cdot 10^6 \pm 6.1 \cdot 10^5$ CFU/mL) and VRBA unsterilized ($3.1 \cdot 10^6 \pm 7.3 \cdot 10^5$ CFU/mL) or sterilized ($3.0 \cdot 10^6 \pm 6.9 \cdot 10^5$ CFU/mL). The lowest *E. coli* enumeration ($1.1 \cdot 10^6 \pm 1.0 \cdot 10^6$ CFU/mL) was observed in MacConkey agar. The initial tests confirmed that, except for MAC agar, the media can support sufficiently well the growth of healthy, non-treated microorganisms.

3.1.2. Recovery of photo-treated *E. coli*

Fig. 2 shows the immediate recovery of *Escherichia coli* spread onto different media after solar disinfection (Fig. 2a) and photo-Fenton (Fig. 2b). Important differences on *E. coli* inactivation were observed depending on the type of agar. Culture media effectiveness for treated bacteria recovery followed this order in both cases: PCA > LBA > Tergitol-7 > T-7 + TTC > VRBA sterilized = VRBA unsterilized > MAC.

The final pH was around pH 6 for SODIS tests and did not drop under 5 in the photo-Fenton assays. Therefore, cell damage and consequent loss of cultivability were light-induced. As expected, photo-Fenton produced much faster inactivation than SODIS. Taking into account the most favorable medium for *E. coli* recovery (i.e. PCA), total inactivation (6-log reduction) was achieved in 60 min during photo-Fenton, while only 4 log units were removed in 180 min when applying artificial solar light alone. As it can be seen in Fig. 2, LBA and Tergitol-7 Agar followed similar trends when the sample was exposed to light only, but differed during photo-Fenton, with LBA efficiency being very close to PCA for the first 30 min of treatment in the latter case. It can be also observed that at some points recovery on Tergitol-7 + TTC led to counts slightly inferior than in Tergitol-7 alone. Regarding the performance of VRBA, poor *E. coli* growth took place and omitting sterilization of the medium did not enhance the recovery of stressed bacteria. MacConkey agar presented a singular behavior. Even initial recovery of untreated cells was lower (which is in agreement

Table 1
Culture media composition.

	PCA	LBA	Tergitol-7	VRBA	MAC
Tryptone (g/L)	–	10	–	–	–
Peptone from casein (g/L)	5	–	–	–	–
Peptone (g/L)	–	–	5	–	17
Peptone from gelatin (g/L)	–	–	–	7	–
Proteose peptone (g/L)	–	–	–	–	3
Yeast extract (g/L)	2.5	5	3	3	–
NaCl (g/L)	–	10	–	5	5
Agar (g/L)	14	15	15	12	13.5
α(+)-Glucose (g/L)	1	–	–	–	–
Lactose (g/L)	–	–	10	10	10
Tergitol-7 (g/L)	–	–	0.1	–	–
Bromothymol blue (g/L)	–	–	0.025	–	–
Bile salts (g/L)	–	–	–	1.5	1.5
Crystal violet (g/L)	–	–	–	0.002	0.001
Neutral red (g/L)	–	–	–	0.03	0.03
TTC (g/L)	–	–	0.03*	–	–

* Tergitol-7 Agar was tested with and without TTC supplement.

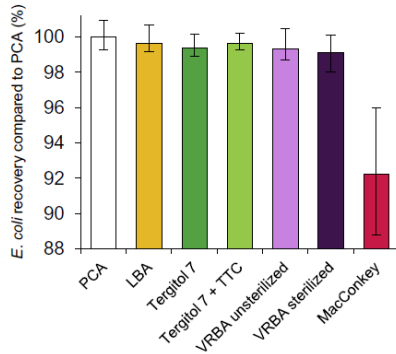


Fig. 1. Percent recovery of *Escherichia coli* in untreated Milli-Q water in different media compared to PCA.

with results in Fig. 1) and, whereas disinfection curves showed a kind of shoulder in all the other culture media, bacterial inactivation in MAC dropped by linear decay from the beginning.

A growth restriction ratio, defined as the time to reach detection limit in PCA divided by the time needed to reach detection limit in the other media Eq. (1), will be used for further comparison. The higher the ratio is, the higher the inability of *E. coli* to grow in the medium is.

$$\text{Growth restriction ratio} = \frac{t_{DL}^{PCA}}{t_{DL}^{medium}} \quad (1)$$

As detection limit was not reached in SODIS when plating in some media (PCA, LBA, T-7 + TTC and T-7), time for total inactivation has been calculated from disinfection kinetics ($k_{PCA} = 0.030 \text{ min}^{-1}$, $k_{LBA} = 0.040 \text{ min}^{-1}$, $k_{T-7+TTC} = 0.043 \text{ min}^{-1}$, $k_{T-7} = 0.047 \text{ min}^{-1}$). The predicted values would be 269 min, 214 min, 188 min and 189 min, respectively. Consequently, the growth restriction ratios in SODIS were 1.3 for LBA, 1.4 for T-7 and T-7 + TTC and 2.0 for VRBA (sterilized and unsterilized) and MAC. The growth restriction ratios in photo-Fenton (Fig. 2b) were 1.5 for LBA, T-7 and T-7 + TTC and 2.0 for VRBA and MAC; this means that *E. coli* actually remained in the sample for 2 or 1.5 times longer than estimated by VRBA and MAC or by T-7 and LBA, respectively. The ratios, and consequently the inhibition, for T-7, T-7 + TTC and LBA are comparable and so are for VRBA and MAC. In addition, the values of the ratios are quite alike for each agar in both systems, meaning that the selective media posed similar restrictions to growth regardless the applied treatment.

Finally, it has to be mentioned that as treatment time increased, more significant differences in bacterial recuperation among the studied media were observed. Most probably, this effect is attributed to the greater number of injured cells which were unable to develop in the presence of the selective compounds. These results suggest that there is a synergistic-like phenomenon between cell damage and media composition, which involves an additional inhibitory effect, especially noticeable in VRBA and MAC agars. The

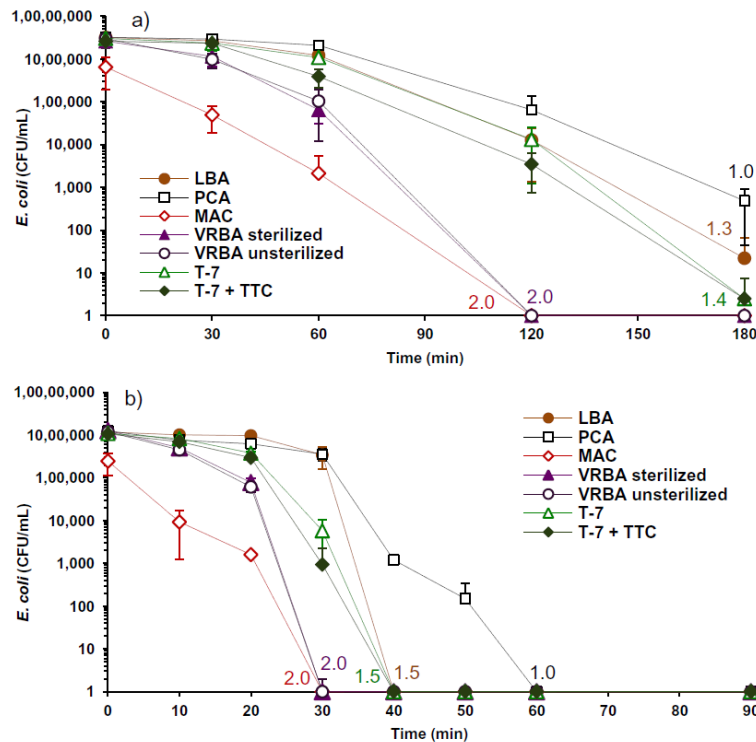


Fig. 2. *E. coli* immediate recovery in different media after a) Solar Disinfection and b) photo-Fenton. Values included in the figures correspond to the growth restriction ratio of each medium.

presence of bile salts in these media, along with the lack of yeast extract in MAC, might reduce their capacity to support the growth of photo-treated *E. coli*.

3.2. Post-irradiation survival or regrowth of *Escherichia coli*

Considering the similarities that some of the studied media presented, as showed in Section 3.1, post-irradiation survival or regrowth of *E. coli* was only tested on PCA, Tergitol-7 agar, VRBA and MacConkey agar.

3.2.1. Post-irradiation events after SODIS treatment

Fig. 3(a–d) represents bacterial post-irradiation events after exposure of the sample to simulated solar light for different time periods (0, 30, 60, 90, 120 and 180 min). The withdrawn aliquots were stored in the dark at 29.5 °C and analyzed in four different media every 24 h up to 96 h. Firstly, it has to be noticed that no regrowth occurred for any irradiation time. The treated cells might have been unable to experiment propagation because: i) the relatively high, and not intermittent, irradiation doses applied (considering that the light intensity was 900 W/m²) caused irreparable damages, ii) there was a lack of nutrients in the water matrix (i.e. Milli-Q water) and iii) cells suffered from osmotic stress.

Secondly, as shown in Fig. 3 and in Table 2, bacteria photo-treated for longer periods presented faster a loss of long-term bac-

Table 2
Summary of estimated inactivation rate constants (k_i , [min⁻¹]) in the different media assuming first order kinetics during post-SODIS survival in the dark.

Treatment time (min)	PCA	T-7	VRBA	MAC
0	0.003	0.002	0.011	0.005
30	0.009	0.020	0.028	0.007
60	0.027	0.044	0.048	-
90	0.028	0.078	0.076	-
120	0.033	0.105	-	-
180	0.033	-	-	-

terial viability. In the aliquot irradiated for 30 min *E. coli* survival was very similar to that of the untreated cells within 48 h when plated on the most favorable medium (i.e. PCA), so, in this case, immediate severe photo-damage was not induced. Subsequent inactivation (>48 h) might be related to minor injuries combined with starvation and osmotic stress. However, 60 min or longer exposures to SODIS caused direct mortality and prevented regrowth. Therefore, in all the media there is a correlation between the accumulated cellular photo-damage and the inability of *E. coli* to survive.

Concerning bacterial long-term recovery on the different media, the presence of selective compounds had a detrimental effect. Aliquots spread onto PCA showed more than 96 h survival in the dark after 120 min or shorter exposure to SODIS and total decay only

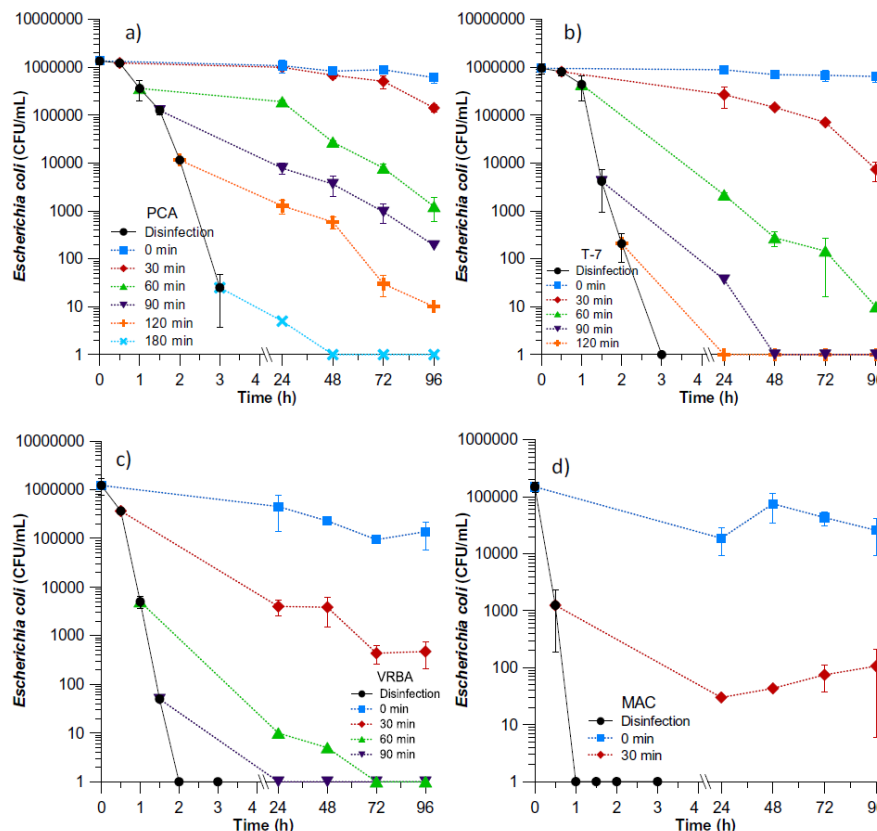


Fig. 3. Post-SODIS survival of *E. coli* stored in the dark at 29.5 ± 0.5 °C and plated on different media: a) PCA; b) Tergitol-7 Agar; c) VRBA; d) MacConkey Agar.

happened within 48 h when the treatment lasted 180 min (Fig. 3a). However, when the same aliquots were plated on the other media, all of them containing substances which confer various degrees of selectivity, lower recovery was achieved. On Tergitol-7 (Fig. 3b), detection limit was reached after 48 h and 24 h if exposed to 90 min or 120 min SODIS, respectively and *E. coli* survived longer than 96 h only when photo-treated for 30 min or 60 min. On VRBA and MAC agars (Fig. 3c and d), bacterial survival beyond 96 h only took place when plating the 30 min-treated aliquot.

The fact that after a certain time of irradiation and subsequent storage in the dark, *E. coli* was able to grow on PCA, but limited or no recovery occurred in the other media suggests that there are sub-lethally injured cells whose cultivability strongly depends on media composition. Selective compounds impair the recuperation of cells which are damaged but still are cultivable in PCA.

3.2.2. Post-irradiation events after photo-Fenton treatment

Fig. 4(a–d) illustrates the post-irradiation events in the dark in the presence of catalase after applying the photo-Fenton process for 0, 15, 30, 45 and 60 min. The stored samples were analyzed every 24 h.

First thing to stand out is that no regrowth was observed during this experiment. Secondly, photo-Fenton clearly demonstrated a superior disinfection power than the artificial solar light alone.

For instance, 30 min of photo-Fenton led to total inactivation (6 log reduction) after 24 h (in T-7, VRBA and MAC; Fig. 4b–d) or after 72 h (in PCA; Fig. 4a), whereas 30 min of SODIS reduced bacterial population less than 3 log within 96 h in any of the culture media (Fig. 3). Even very short exposure to photo-Fenton (i.e. 15 min) involved immediate irreparable cellular damage and long-term inability to survive (Fig. 4). Besides, for a certain number of surviving bacteria, total decay was sooner achieved in photo-Fenton than in SODIS (e.g. $\sim 4 \cdot 10^5$ CFU/mL, Figs. 3b and 4b). Despite the fact that H_2O_2 in the bulk was neutralized with catalase, the “residual” effect of photo-Fenton was more noticeable than that of solar disinfection; hence, bacterial injury was more pronounced in the former treatment, since solar light alone inactivation mode of action relies in a considerable percentage in damages that can be repaired, i.e. DNA mutations. Our results suggest that photo-Fenton mode of action inflicts multi-level damage internally and externally, and bacterial recovery potential is diminished. Combined with the selective agents in the different media, the cultivability is severely restricted.

Moreover, *E. coli* survival in the dark after the photo-Fenton process was also studied without catalase addition (see Supplementary Material Fig. S1). No recovery was observed after 24 h in all the cases except for *E. coli* treated for 15 min and plated in PCA, which survived 48 h. In the absence of catalase, unreacted

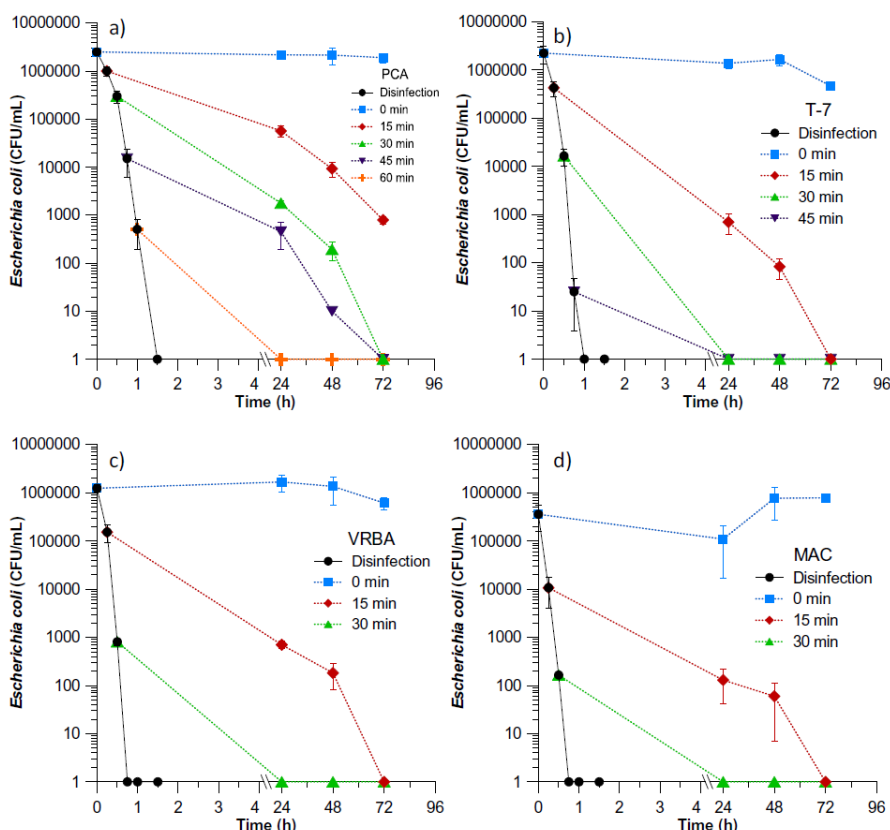


Fig. 4. Post-photo-Fenton survival of *E. coli* stored with catalase addition in the dark at 29.5 ± 0.5 °C and plated on different media: a) PCA; b) Tergitol-7 Agar; c) VRBA; d) MacConkey Agar.

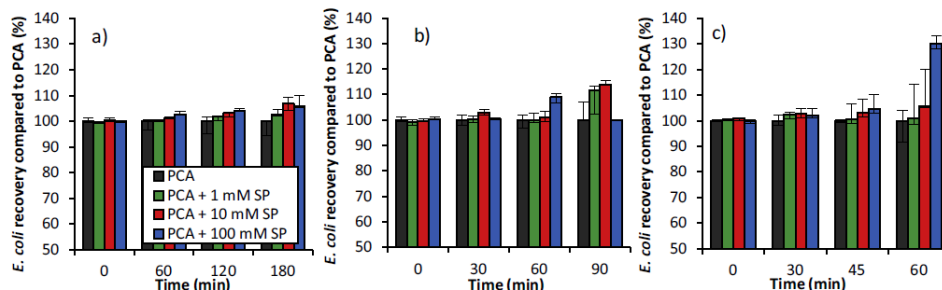


Fig. 5. *E. coli* immediate recovery in PCA supplemented with different concentrations of sodium pyruvate after a) SODIS, b) SODIS + H₂O₂ and c) photo-Fenton.

H₂O₂ might have continued bacterial inactivation in the dark, especially if the cells were already injured and their permeability had increased [24], thus contributing to cause internal cellular damage.

Again, among the different media tested, only PCA detected viable cells for longer (Fig. 4). Recovery on T-7, VRBA and MAC agars showed some similarities, with total inactivation achieved within 24 h for the 30 min-treated sample and within 72 h for the 15 min-treated one. Nevertheless, analysis of those aliquots on PCA presented higher survival of *E. coli* (72 h and >72 h, respectively). Consequently, keeping in mind the purpose of this research, PCA was considered the best media for further studies involving supplement addition when laboratory, controlled conditions are involved. For natural bacterial consortia from field tests, T-7 without TTC would be recommended for minimum cultivability reduction.

3.3. Enhanced immediate *E. coli* recovery and regrowth with sodium pyruvate

This part of the research deals with the effect of using the supplement sodium pyruvate (SP) to provide optimal conditions for the recovery of photo-treated bacteria. Sodium pyruvate was added either during agar preparation or directly into the treated sample.

3.3.1. Sodium pyruvate added to the culture plates

Fig. 5a–c shows the efficiency of PCA medium containing different concentrations of sodium pyruvate (0 mM, 1 mM, 10 mM and 100 mM SP) on the immediate recovery of *E. coli* after SODIS, SODIS + H₂O₂ and photo-Fenton. Results are expressed as percentage (considering the values in logarithmic scale) compared to recovery on PCA without sodium pyruvate. In general, the use of sodium pyruvate in the PCA plates enhanced bacterial recovery, especially as treatment time passed and damage was accumulating in the cells. Note that for 90 min of SODIS + H₂O₂, bacterial count in PCA + 100 mM SP is the same than in PCA without SP because detection limit was reached on that experiment. Fig. 5 also shows that increasing amounts of sodium pyruvate progressively improved *E. coli* recuperation. If the different treatments are compared, SP permitted a maximum increase in growth of 6%, 14% and 30% for SODIS, SODIS + H₂O₂ and photo-Fenton, respectively. The presence of unreacted hydrogen peroxide remaining in the samples after SODIS + H₂O₂ and photo-Fenton (see Supplementary Material Fig. S2) might have contributed to cause bacterial injuries even once plated, but the sodium pyruvate included in the agar could probably react with this excess of H₂O₂ and prevent further cell damages. During SODIS, no exogenous H₂O₂ was added; however its production and accumulation inside the cell must have been neutralized by SP.

3.3.2. Sodium pyruvate added to the bacterial suspension

Sodium pyruvate was added to the photo-treated aliquots with a final concentration of 1 mM. The samples were stored in the dark and the post-irradiation events were studied, using PCA as the culture medium.

Fig. 6 illustrates the bacterial survival in the dark after the different photo-treatments when the aliquots were stored in the absence or presence of 1 mM SP.

When applying SODIS (Fig. 6a and b), immediate recovery was not affected by sodium pyruvate (see Supplementary Material Fig. S3a), possibly because of its presence in the employed low concentration (1 mM SP), which had also low impact when inserted in the medium (Fig. 5). Addition of SP to the bulk enhanced bacterial survival in the long-term, although no regrowth occurred. The most remarkable fact in Fig. 6a and b is that when bacteria were exposed for 120 min of light, posterior survival was noticeably enhanced in the presence of SP (>72 h), while total inactivation occurred within 24 h when no supplement was added. In addition, for longer treatment times, higher enhancing effect of sodium pyruvate on recovery was observed. This is further proof of the intracellular H₂O₂ accumulation during SODIS, able to affect the post-irradiation survival events. After 48 h of storage, inactivation started to be noticeable even in the untreated sample (0 min, blue line), so, from that time on, starvation and osmotic stress might have been important facts for the loss of cultivability.

Survival in the dark with SP addition to the sample after photo-Fenton is showed in Fig. 6e and f. Photo-Fenton was the most aggressive treatment and only bacteria shortly exposed (<30 min) could survive for more than 1 day. SP clearly increased bacterial survival in 1 log and 3 log for 15 min and 30 min-treated cells, respectively, after 24 h.

4. Discussion

4.1. Mode of action of SODIS ($h\nu$), SODIS+ H₂O₂ ($h\nu + H_2O_2$) and photo-Fenton ($h\nu + H_2O_2 + Fe^{2+}$)

Bacteria undergoing SODIS are mainly inactivated by the exposure to wavelengths UVA (320–400 nm) and UVB (280–320 nm) present in solar light [1]. Despite the fact that only small quantities of UVB reach the earth surface, its contribution to solar disinfection can be significant, if the reactor material does not filter it out [25]. Radiation in the UVB can be absorbed by cellular DNA components causing important lesions in pyrimidine and purine bases [26–28] which finally lead to cellular mutations or even cell death [25]. Direct DNA damage can also occur in the presence of UVA light, but to a lower extent than with UVB [4]. In fact, the predominant UVA damage is attributed to the absorption of UVA photons by endogenous photosensitizers inducing photo-oxidation reactions

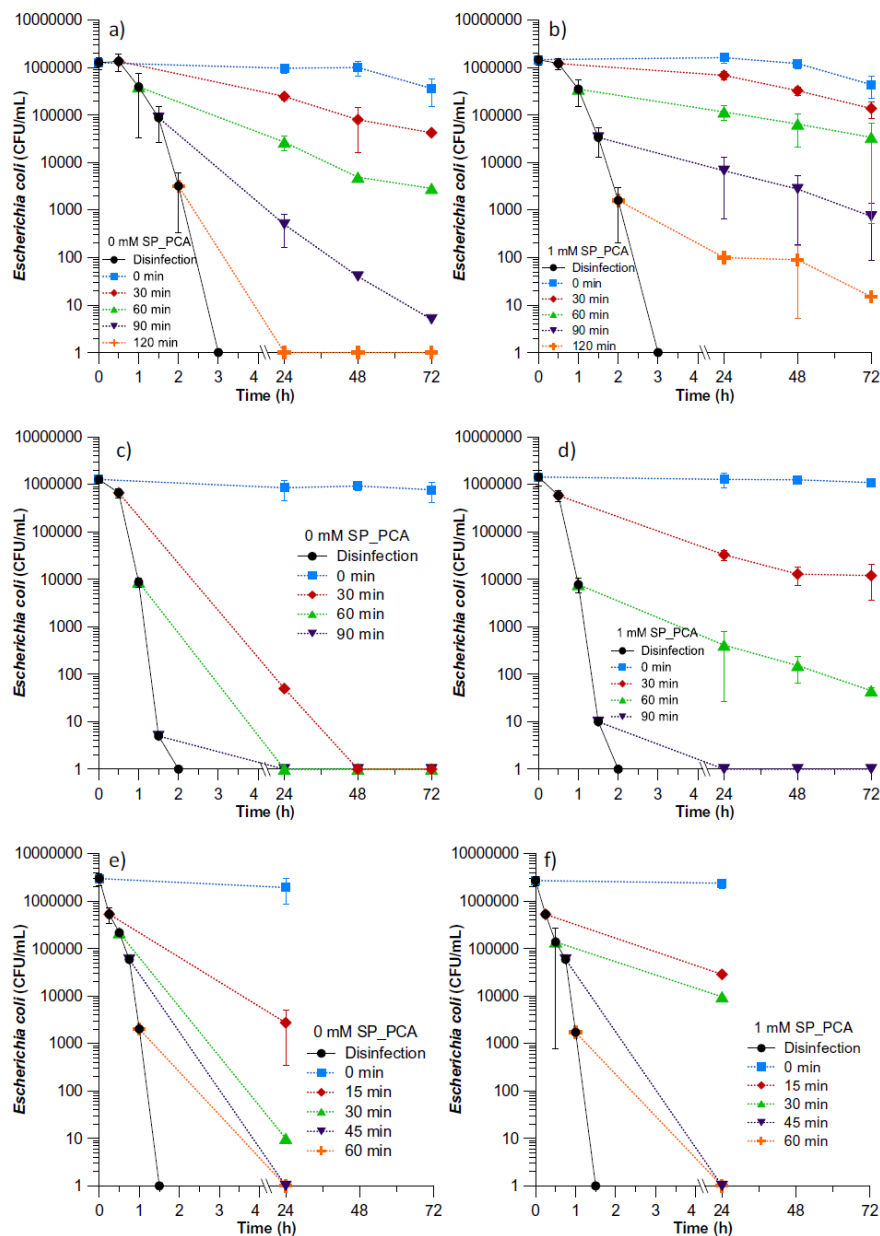


Fig. 6. Survival of *E. coli* stored in the dark at 29.5 ± 0.5 °C and plated on PCA after: a) SODIS (0 mM SP), b) SODIS and addition of sodium pyruvate (1 mM SP), c) SODIS + H₂O₂ (0 mM SP), d) SODIS + H₂O₂ and addition of sodium pyruvate (1 mM SP), e) photo-Fenton (0 mM SP), f) photo-Fenton and addition of sodium pyruvate (1 mM SP).

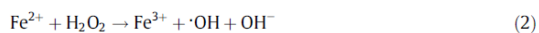
type I and II which involve the formation of reactive oxygen species (ROS) [28,29]. Moreover, an internal Fenton process can happen during UVA exposure if H₂O₂ produced via cellular respiration (along with O₂) [30] or by activation of flavoenzymes [31] reacts with free iron released from ferritins [32] or from oxidation of

iron-sulfur clusters [30] or enterobactin proteins [33]. As a result, the ROS generated in photo-oxidation and Fenton reactions, including the highly reactive ·OH, attack DNA, RNA, lipids and proteins, thus initiating complex chain reactions that end up in loss of cell functions, mutations and DNA replication block [34]. More pre-

cisely, Berney et al. [24] observed that as UVA light dose increase, *E. coli* experiments reduction of efflux pump activity and ATP synthesis, loss of membrane potential, glucose uptake activity and cultivability and, finally, permeabilization of the cytoplasmic membrane.

In the presence of 10 mg/L H₂O₂ the bacterial photo-inactivation was considerably enhanced (Fig. 6c and d). There are several possible pathways that explain this improvement in Milli-Q water [4,12,30]: i) direct membrane attack by H₂O₂ and its derived oxygen species, ii) diffusion of external H₂O₂ into the cell, iii) increase of free iron release by H₂O₂-assisted oxidation of the sulfur clusters and iv) damage by UVA light of the ROS-regulating enzymes (i.e. catalase, peroxidase and superoxide dismutase). The combination of these mechanisms leads to an enhanced intracellular Fenton that causes ROS accumulation and consequent oxidative stress. The observed hydrogen peroxide consumption when combined with artificial solar light (see Supplementary Material Fig. S2a) implies its increased intracellular reaction and the formation of ROS, subsequently inactivating *E. coli* cells.

When the photo-Fenton system ($h\nu/H_2O_2/Fe^{2+}$) was implemented, disinfection was faster with shorter delay on initial bacterial inactivation (Fig. 2b). Iron was added as FeSO₄ to have available ferrous ions (Fe²⁺), but the fast drop in total dissolved iron concentration (see Supplementary Material Fig. S2b) suggest that, in the presence of H₂O₂ and at near neutral pH (~5), Fe²⁺ was rapidly oxidized to Fe³⁺, thus forming iron species such as oxides and hydroxides (e.g. Fe(OH)²⁺), which are insoluble [35]. However, Fe³⁺ irradiated with UV light undergoes photochemical reduction to Fe²⁺ completing the redox cycle of iron [36]. Consequently, reactive oxygen species are expected to be generated according to the following reactions (Eqs. (2)–(4)):



The existence of H₂O₂ and iron species in the water implies more efficient bacterial removal for several reasons. External hydrogen peroxide may increase permeability of the membrane, so Fe²⁺ can more easily diffuse into the cell contributing to the internal formation of ROS by the (photo)-Fenton process [12]. Additionally, exogenous ROS generated by external photo-Fenton reactions might attack the membrane, eventually causing cellular dysfunction by oxidative stress [35].

4.2. Cell repair possibilities

Experimental results showed no regrowth in the dark after the photo-treatments (Figs. 3, 4 and 6) and, in general, *E. coli* post-irradiation survival was observed only for low UV doses (i.e. shorter treatment times) while for higher doses (i.e. longer exposure) detection limit was reached during the photo-treatment. Therefore, cells probably experienced immediate sub-lethal and lethal photo-damages, along with starvation and osmotic stress on the long term.

In principle, organisms are provided with repair mechanisms to counteract the lethal effects of DNA lesions. For instance, photo reactivation, controlled by the photolyase enzyme, is one of the simplest repair mechanisms [25]. Nevertheless, the storage of the pre-treated samples was carried in the dark; hence, other restoration pathways like base excision repair, Pol V polymerase, lesion bypass or recombinational repair took place. Small colony variants, considered as mutations resulting from DNA damage by

UV radiation and/or subsequent repair [37], were observed especially after SODIS (see Supplementary Material Fig. S4).

On the other hand, oxidative stress can in turn induce the response of superoxide dismutases (FeSOD and MnSOD), glutathione reductase, peroxidases and catalases, which are enzymes that scavenge the intracellular ROS, thus preventing their accumulation [38]. Oxidized iron-sulfur clusters can also be repaired to the reduced form, but the mechanisms remain unclear [39]. Moreover, proteins, which are a target of ROS as well, especially through Fenton chemistry when iron is bound to polypeptides, might have their structure recovered by reduction of oxidized disulfide bonds [34].

Establishing to which extent each of the different destruction and repair mechanisms took place is complex and would require numerous analyses. However, it could be said that the repair mechanisms were not enough to cope with all the inflicted damage, since no reactivation was observed. It was also evident that photo-Fenton caused more severe, irreparable injuries than SODIS and reduced bacterial survival opportunities. Besides, the possible presence of H₂O₂ and the absence of nutrients and of osmotic balance caused by the Milli-Q water have to be considered. Storage of photo-damaged bacteria under unfavorable conditions reduces dehydrogenase activity, membrane potential and membrane integrity [40] and eventually contributes to the decay of the *E. coli* concentration [19].

4.3. Culture media composition affecting cultivability of untreated cells

Culture media are continuously evolving to faster provide more accurate results. Some of the most desired characteristics of the media are sensitivity and specificity [41]. Unfortunately, selective media are not always able to detect all the targeted microorganisms because of the growth inhibition caused by the selective agents [17]. Consequently, general or non-selective agars containing only nutrients, such as PCA and LBA, are expected to have higher recovery rates.

Counts of untreated *E. coli* were only slightly superior on PCA than in the other agars (Fig. 1). Regarding the selective media tested, Tergitol-7 agar, which contains sodium heptadecyl sulfate (Tergitol-7) and bromothymol blue acting as inhibitors of gram-positive bacteria, allowed high *Escherichia coli* recuperation [42,43]. VRBA and MacConkey agar include bile salts, crystal violet and neutral red as inhibitors of gram-positive microorganisms and/or dyes for differentiation. Despite the high tolerance of *E. coli* to bile salts, the outer membrane barrier can only retard the influx of this component [44], which, in addition, might increase cellular permeability [45]. Moreover, Berstein et al. [46] reported that bile salts induced expression of specific stress response genes related to membrane perturbation, oxidative stress and DNA damage. Crystal violet presents bacteriostatic and bactericidal actions against several bacteria [47]. In *E. coli* these effects are less significant because of the high isoelectric point and lower acidic content which leads to an slower combination of the dye and this gram-negative microorganism [48]. Neutral red has also demonstrated to cause loss of viability of *E. coli* and it might induce SOD response [49]. Yet, under normal conditions, untreated *E. coli* is apparently able to cope with these substances in VRBA (Fig. 1).

On the contrary, low counts were obtained in MacConkey agar when plating undamaged cells. While PCA, LBA, T-7 and VRBA can provide all short of nutrients to the cells, MAC agar lacks yeast extract, which is an excellent source of vitamins from group B. Vitamins conduct essential functions in the cell; therefore, they are necessary, even in very small quantities, to promote microbial growth [8]. Since some strains of *E. coli* are unable to synthesize certain vitamins, such as vitamin B12 [50], they need to obtain them from the environment. Deficiency of vitamins B in this med-

ium could mean failure of some cellular functions such as the transport of methyl groups, electrons or hydrogen atoms [8], thus limiting *E. coli* growth.

4.4. Cultivability of photo-treated cells in different media

The experimental results showed a synergy between photo-damage in bacteria and their ability to grow on different media. The highest recovery of light-exposed cells was achieved in the general medium PCA, in which, unlike the other tested media, glucose was available (Table 1). During solar disinfection cellular glucose uptake activity drops, meaning that the PEP-PTS system, which is in charge of the transport of external sugars into the cell, is compromised [24]. When spread onto PCA the cells might still be able to use some glucose as source of energy for their growth, even if the PEP-PTS system is not fully operating. This extra nutrient and the absence of inhibitors may also benefit the recovery of the starved photo-treated bacteria.

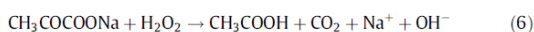
T-7 agar intermediate effectiveness in the short and in the long term recovery might be related to the adverse effects of sodium heptadecyl sulfate and bromothymol blue. Reduction on the recovery of injured coliform bacteria in the presence of Tergitol-7 has been previously observed [51] and it may be the result of increased sensitivity to detergents [52], such as Tergitol-7, caused by lipid peroxidation in membranes of ROS-attacked cells [34]. Besides, the bromothymol blue dye is able to inhibit the growth of some strains of *E. coli* under specific conditions [53]. The additive TTC also led to smaller counts on Tergitol-7, since TTC reacts with dehydrogenases and this affects the respiratory chain of the cell [54].

The diminished growth on VRBA and MAC agar was noticeably impaired by the selective components. The influx of bile salts through a compromised membrane eventually produces growth inhibition [44] and crystal violet can reach the cytoplasm of *E. coli* cells whose outer membrane has been altered, being their survival inversely correlated to the accumulation of the dye [55,56]. Moreover, growth inhibition of treated or stressed *E. coli* in the presence of neutral red and NaCl has also been reported [17].

Considering these facts, although the internal processes are of outmost importance for the viability of the cell, it is possible that membrane integrity is a determining factor on the cultivability of photo-treated bacteria. As treatment time increases, membrane damage is greater and cellular accumulation of toxic inhibitory substances from the media is more likely to happen. It might be possible that *E. coli* presenting unimportant or no damage in the cell wall are able to grow in VRBA and MAC, while in Tergitol-7 and especially in PCA more harmed cells can be recovered.

4.5. Enhanced recovery with supplements

After light exposure, the unreacted H_2O_2 has a residual effect because it is able to promote dark Fenton reactions, thus impairing cell survival [12]. Consequently, if H_2O_2 is removed from the system, further oxidative cellular damage by ROS should not be expected, although inactivation can continue to happen due to irreparable cellular damages and starvation, along with the adverse effects caused when plating on selective media. Some substances can be added to scavenge hydrogen peroxide, such as catalase or sodium pyruvate. Catalase, which is an enzyme produced endogenously by the cells, is able to catalyze H_2O_2 decomposition (Eq. (5)) [39], while sodium pyruvate reacts with H_2O_2 producing decarboxylation of the molecule (Eq. (6)) [57]:



Catalase is commonly applied over the prepared medium to stop the residual effect of H_2O_2 after SODIS, SODIS + H_2O_2 and photo-Fenton [12,21], while sodium pyruvate is usually incorporated to the medium before autoclaving and incubation is carried out under anaerobiosis to provide optimal recovery conditions [22,24,58]. Moreover, no use of sodium pyruvate to enhance photo-Fenton-treated bacteria recuperation has been found in literature.

In this study, sodium pyruvate slightly enhanced the immediate recovery of photo-treated cells (especially when added in the medium) and, in the long term, both supplements added to the bulk noticeably increased *E. coli* survival after photo-Fenton. SP was successful in increasing bacterial recovery after SODIS and SODIS + H_2O_2 , as well. Therefore, the excess of H_2O_2 that remained in the samples was effectively removed by any of these compounds. Although incubation in anaerobic conditions might have improved the recovery, 48 h would have been necessary to obtain colonies big enough to be count [22] while 24 h were sufficient in the aerobic conditions performed in this research.

Kapuscinski et al. [20] consider that the use of catalase might be more recommendable because it is more specific than SP, which could interact with media components. On the other hand, Gandomenico et al. [59], propose that sodium pyruvate generates no toxic products (only acetate and carbon dioxide), whereas with catalase high local oxygen concentrations and peroxidation of other substrates can occur. However, similar bacterial recovery efficiencies after exposure to solar disinfection have been reported either with catalase or with sodium pyruvate [20–22]. A practical issue pointed out by Kehoe et al. [21] is that SP is more stable than catalase at room temperature and, therefore, its action can be more predictable.

5. Conclusions

Water treatments based on solar light could efficiently inactivate the bacteria *Escherichia coli* and prevented its posterior reactivation under the studied conditions (Milli-Q H_2O , 900 W/m²). The addition of 10 mg/L H_2O_2 produced faster disinfection and when combined with iron (0.6 mg/L Fe^{2+}) the effect of internal and external photo-Fenton was augmented, inducing higher ROS production and consequent increase in bacterial inactivation.

During the photo-treatments the bacteria experienced different levels of damage, which accumulated as time passed. If the injuries extensively affected DNA and/or vital functions, the cells might have lost their cultivability. When the treated *E. coli* were plated on the different agars, PCA showed higher counts in all the cases, while the other media (T-7, VRBA, MAC), all of them containing selective substances, inhibited recovery in the short and in the long-term. The results suggest that there is a loss of membrane integrity caused by the photo-treatments and thus, the selective agents might easily be absorbed by the cells, leading to high intracellular concentrations and eventually inactivating the bacteria. However, when spread onto PCA, the presence of nutrients and absence of inhibitors could support the growth of intensively wounded *E. coli*. In addition, the presence of glucose in PCA might benefit the recovery of bacteria whose PEP-PTS system is damaged. So, in general, as selectivity of the media increased bacterial recovery diminished. Moreover, cultivability in selective media was lost before cells were actually inactivated. Therefore, selective media underestimate the real concentration of the targeted bacteria submitted to solar treatments.

Further enhancement of cells recovery was tested by addition of catalase or sodium pyruvate in PCA. Both supplements clearly increased the long-term recovery when added to the bulk, especially after the treatments where extracellular H_2O_2 was present

(i.e. photo-Fenton and SODIS + H₂O₂). In addition, the enhanced immediate and long-term *E. coli* recovery in the presence of SP proves the production and accumulation of intracellular H₂O₂ during SODIS, able to reduce post-irradiation survival.

Considering the results obtained in this study, it would be advisable to use PCA containing 100 mM SP for assessing the disinfection effectiveness of photo-treatments under controlled laboratory conditions in which only a specific bacterium (e.g. *E. coli*) is present in the sample. However, when facing a real case with natural waters, where a consortium of bacteria and other microorganisms is always present, Tergitol 7 agar without TTC would provide good selectivity while minimizing the risks related to the underestimation of *Escherichia coli* cultivable cells.

Acknowledgements

The authors thank the Universidad de Zaragoza, Fundación Bancaria Ibercaja and Fundación CAI for the grant awarded to Pilar Valero which enabled a research stay in the EPFL (Switzerland). The authors would also like to acknowledge the Aragón Government for the Ph.D. grant awarded to Pilar Valero, and the European project WATERSPOUTT H2020-Water-5c-2015 (GA 688928) for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.126>.

References

- [1] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, *Catal. Today* 147 (2009) 1–59.
- [2] K.G. McGuigan, R.M. Conroy, H.-J. Mosler, M.D. Preez, E. Ubomba-Jaswa, P. Fernández-Ibáñez, Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top, *J. Hazard. Mater.* 235–236 (2012) 29–46.
- [3] A. Moncayo-Lasso, J. Sanabria, C. Pulgarin, N. Benítez, Simultaneous *E. coli* inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor. A new way for enhancing solar disinfection of natural water, *Chemosphere* 77 (2009) 296–300.
- [4] S. Giannakis, M.I. Polo López, D. Spuhler, J.A. Sánchez Pérez, P. Fernández Ibáñez, C. Pulgarin, Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process, *Appl. Catal. B* 199 (2016) 199–223.
- [5] S. Giannakis, M.I.P. López, D. Spuhler, J.A.S. Pérez, P.F. Ibáñez, C. Pulgarin, Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 2: A review of the applications for drinking water and wastewater disinfection, *Appl. Catal. B* 198 (2016) 431–446.
- [6] I. Michael, E. Hapeshi, C. Michael, A.R. Varela, S. Kyriakou, C.M. Manaia, D. Fatta-Kassinos, Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci, *Water Res.* 46 (2012) 5621–5634.
- [7] E. Chatzisympson, A. Droumpali, D. Mantzavinos, D. Venieri, Disinfection of water and wastewater by UV-A and UV-C irradiation: application of real-time PCR method, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 389–395.
- [8] J.M. Willey, L.M. Sherwood, C.J. Woollverton, *Microbiología de Prescott*, seventh ed., Harley y Klein, 2009.
- [9] R.M. Atlas, *Handbook of Microbiological Media*, fourth ed., Taylor & Francis, 2010.
- [10] I. García-Fernández, M.I. Polo-López, I. Oller, P. Fernández-Ibáñez, Bacteria and fungi inactivation using Fe³⁺/sunlight, H₂O₂/sunlight and near neutral photo-Fenton: a comparative study, *Appl. Catal. B* 121–122 (2012) 20–29.
- [11] A. Moncayo-Lasso, L.E. Mora-Arismendi, J.A. Rengifo-Herrera, J. Sanabria, N. Benítez, C. Pulgarin, The detrimental influence of bacteria (*E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*) on the degradation of organic compounds (and vice versa) in TiO₂ photocatalysis and near-neutral photo-Fenton processes under simulated solar light, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 821–827.
- [12] D. Spuhler, J. Andrés Rengifo-Herrera, C. Pulgarin, The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12, *Appl. Catal. B* 96 (2010) 126–141.
- [13] J. Ndounla, S. Kenfack, J. Wéthé, C. Pulgarin, Relevant impact of irradiance (vs. dose) and evolution of pH and mineral nitrogen compounds during natural water disinfection by photo-Fenton in a solar CPC reactor, *Appl. Catal. B* 148–149 (2014) 144–153.
- [14] E. Ortega-Gómez, B. Esteban García, M.M. Ballesteros Martín, P. Fernández Ibáñez, J.A. Sánchez Pérez, Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH, *Water Res.* 63 (2014) 316–324.
- [15] J. Rodríguez-Chueca, M.I. Polo-López, R. Mosteo, M.P. Ormad, P. Fernández-Ibáñez, Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using a mild solar photo-Fenton, *Appl. Catal. B* 150–151 (2014) 619–629.
- [16] A. Rompré, P. Servais, J. Baudart, M.-R. de-Roubin, P. Laurent, Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches, *J. Microbiol. Methods* 49 (2002) 31–54.
- [17] D.L. Scheusner, F.F. Busta, M.L. Speck, Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents, *Appl. Microbiol.* 21 (1971) 46–49.
- [18] E. Ubomba-Jaswa, C. Navntoft, M.I. Polo-Lopez, P. Fernandez-Ibanez, K.G. McGuigan, Solar disinfection of drinking water (SODIS): an investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 587–595.
- [19] S. Giannakis, A.I. Merino Gamó, E. Darakas, A. Escalas-Cañellas, C. Pulgarin, Monitoring the post-irradiation *E. coli* survival patterns in environmental water matrices: implications in handling solar disinfected wastewater, *Chem. Eng. J. (Lausanne)* 253 (2014) 366–376.
- [20] R.B. Kapuscinski, R. Mitchell, Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 670–674.
- [21] S.C. Kehoe, M.R. Barer, L.O. Devlin, K.G. McGuigan, Batch process solar disinfection is an efficient means of disinfecting drinking water contaminated with *Shigella dysenteriae* type I, *Lett. Appl. Microbiol.* 38 (2004) 410–414.
- [22] R. Khaengraeng, R.H. Reed, Oxygen and photoinactivation of *Escherichia coli* in UVA and sunlight, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 39–50.
- [23] S. Giannakis, A.I. Merino Gamó, E. Darakas, A. Escalas-Cañellas, C. Pulgarin, Impact of different light intermittence regimes on bacteria during simulated solar treatment of secondary effluent: implications of the inserted dark periods, *Solar Energy* 98 (Part C) (2013) 572–581.
- [24] M. Berney, H.-U. Weilenmann, T. Egli, Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS), *Microbiology* 152 (2006) 1719–1729.
- [25] R.P. Sinha, D.P. Hader, UV-induced DNA damage and repair: a review, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 225–236.
- [26] J.-H. Yoon, C.-S. Lee, T.R. O'Connor, A. Yasui, G.P. Pfeifer, The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight1, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 681–693.
- [27] P.H. Clingen, C.F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, M.H. Green, Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6–4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells, *Cancer Res.* 55 (1995) 2245–2248.
- [28] J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *J. Photochem. Photobiol. B* 63 (2001) 88–102.
- [29] G.P. Pfeifer, Y.-H. You, A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light, *Mutat. Res. Fund. Mol. Mechan. Mutagen.* 571 (2005) 19–31.
- [30] J.A. Imlay, Pathways of oxidative damage, *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003) 395–418.
- [31] P.E. Hockberger, T.A. Skimina, V.E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, S. Dadras, J.K. Reddy, J.G. White, Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6255–6260.
- [32] C. Pourzand, R.D. Watkin, J.E. Brown, R.M. Tyrrell, Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6751–6756.
- [33] J. Hoerter, A. Pierce, C. Troupe, J. Epperson, A. Eisenstark, Role of enterobactin and intracellular iron in cell lethality during near-UV irradiation in *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol.* 64 (1996) 537–541.
- [34] E. Cabisco, J. Tamarit, J. Ros, Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, *Int. Microbiol.* 3 (2000) 3–8.
- [35] C. Ruales-Lonfat, J.F. Barona, A. Sienkiewicz, M. Bensimon, J. Véllez-Colmenares, N. Benítez, C. Pulgarin, Iron oxides semiconductors are efficient for solar water disinfection: a comparison with photo-Fenton processes at neutral pH, *Appl. Catal. B* 166–167 (2015) 497–508.
- [36] W. Feng, D. Nansheng, Photochemistry of hydrolytic iron(III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview, *Chemosphere* 41 (2000) 1137–1147.
- [37] J.M.C. Robertson, P.K.J. Robertson, L.A. Lawton, A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms, *J. Photochem. Photobiol. A* 175 (2005) 51–56.
- [38] J.D. Hoerter, A.A. Arnold, D.A. Kuczynska, A. Shibuya, C.S. Ward, M.G. Sauer, A. Gizachew, T.M. Hotchkiss, T.J. Fleming, S. Johnson, Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*, *J. Photochem. Photobiol. B* 81 (2005) 171–180.
- [39] J.A. Imlay, Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 755–776.
- [40] L. Fiksdal, I. Tryland, Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* beta-D-galactosidase activity and other potential viability parameters, *J. Appl. Microbiol.* 87 (1999) 62–71.
- [41] A. Hörman, M.-L. Hänninen, Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples, *Water Res.* 40 (2006) 3249–3256.

- [42] A.L. Pollard, A useful selective bactericidal property of tergitol-7, *Science* 103 (1946) 758–759.
- [43] D.Y. Fung, R.D. Miller, Effect of dyes on bacterial growth, *Appl. Microbiol.* 25 (1973) 793–799.
- [44] D.G. Thanassi, L.W. Cheng, H. Nikaïdo, Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 2512–2518.
- [45] T. Fujisawa, M. Mori, Influence of bile salts on beta-glucuronidase activity of intestinal bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.* 22 (1996) 271–274.
- [46] C. Bernstein, H. Bernstein, C.M. Payne, S.E. Beard, J. Schneider, Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*, *Curr. Microbiol.* 39 (1999) 68–72.
- [47] C.E. Hoffmann, O. Rahn, The bactericidal and bacteriostatic action of crystal violet, *J. Bacteriol.* 47 (1944) 177–186.
- [48] E. Adams, The antibacterial action of crystal violet, *J. Pharm. Pharmacol.* 19 (1967) 821–826.
- [49] F. Kastury, A. Juhasz, S. Beckmann, M. Manefield, Ecotoxicity of neutral red (dye) and its environmental applications, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122 (2015) 186–192.
- [50] J.G. Lawrence, J.R. Roth, Evolution of coenzyme B(12) synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex, *Genetics* 142 (1996) 11–24.
- [51] G.A. McFeters, S.C. Cameron, M.W. LeChevallier, Influence of diluents, media, and membrane filters on detection for injured waterborne coliform bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 97–103.
- [52] E. Painbeni, M. Caroff, J. Rouviere-Yaniv, Alterations of the outer membrane composition in *Escherichia coli* lacking the histone-like protein HU, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 6712–6717.
- [53] S.M. Gubash, C.M. Anand, M. Stokman, Inhibition of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by bromthymol blue, *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 2248–2249.
- [54] P.R. Rich, L.A. Mischis, S. Purton, J.T. Wiskich, The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains, *FEMS Microbiol. Lett.* 202 (2001) 181–187.
- [55] P. Gustafsson, K. Nordström, S. Normark, Outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12: kinetics of the uptake of Gentian Violet by wild type and envelope mutants, *J. Bacteriol.* 116 (1973) 893–900.
- [56] C.-C. Chou, S.-J. Cheng, Recovery of low-temperature stressed *E. coli* O157:H7 and its susceptibility to crystal violet, bile salt, sodium chloride and ethanol, *Int. J. Food Microbiol.* 61 (2000) 127–136.
- [57] K.A. Nath, E.O. Ngo, R.P. Hebbel, A.J. Croatt, B. Zhou, L.M. Nutter, Alpha-ketoacids scavenge H₂O₂ in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) C227–C236.
- [58] S.K. Mani, R. Kanjur, I.S. Bright Singh, R.H. Reed, Comparative effectiveness of solar disinfection using small-scale batch reactors with reflective, absorptive and transmissive rear surfaces, *Water Res.* 40 (2006) 721–727.
- [59] A.R. Giandomenico, G.E. Cerniglia, J.E. Biaglow, C.W. Stevens, C.J. Koch, The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide, *Free Radical Biol. Med.* 23 (1997) 426–434.

III.III. Publicación nº 3

Autores: N. Miguel, M. Lanao, P. Valero, R. Mosteo, M.P. Ormad

Título: *Enterococcus* sp. inactivation by ozonation in natural water: influence of H₂O₂ and TiO₂ and inactivation kinetics modeling

Publicación: Ozone: Science & Engineering 38 (6), 443-451

Año: 2016

DOI: 10.1080/01919512.2016.1204223

ISSN: 01919512 (versión impresa)/ 15476545 (versión online)

OZONE: SCIENCE & ENGINEERING
2016, VOL. 38, NO. 6, 443-451
<http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2016.1204223>



Enterococcus sp. Inactivation by Ozonation in Natural Water: Influence of H₂O₂ and TiO₂ and Inactivation Kinetics Modeling

Natividad Miguel^a, Munia Lanao^b, Pilar Valero^a, Rosa Mosteo^a, and María Peña Ormad^a

^aResearch Group Water Quality and Treatment, Institute of Environmental Sciences of Aragón, Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, Architecture and Engineering Faculty, University of Zaragoza, 50018, Zaragoza, Spain; ^bZebra Mussel Group, Confederación Hidrográfica del Ebro, 50004, Zaragoza, Spain

ABSTRACT

This article presents the results about the disinfectant power of treatments based on the application of ozone (578 mg O₃ h⁻¹) and ozone combined with TiO₂ (1 g L⁻¹) and H₂O₂ (0.04 mM) on *Enterococcus* sp., a bacteria indicator used in the control of water quality. The results show that all the ozone-based treatments under study achieve the inactivation of *Enterococcus* sp. solution in natural water. Moreover, the combination of ozone with H₂O₂ or TiO₂ lightly improves the inactivation of *Enterococcus* sp. compared to the ozonation. However, the treatment with O₃, H₂O₂ and TiO₂ is less effective than the use of O₃, O₃/H₂O₂ or O₃/TiO₂. Finally, the primary mathematical models are applied (Hom, biphasic and Mafart) and they adequately describe the disinfection kinetics of the ozonation treatments studied for *Enterococcus* sp.

ARTICLE HISTORY

Received 9 November 2015
Accepted 15 June 2016

KEYWORDS

Ozone; *Enterococcus* sp.;
Hydrogen Peroxide;
Titanium Dioxide; Water
Disinfection

Introduction

In general, one of the main purposes of water treatments for drinking or reclamation water is the disinfection or elimination of the pathogenic microorganisms present in the water. Chlorination has been the most widely used treatment, but since the harmful character of organochlorinated by-products was discovered after the application of chlorine, the scientific literature has increasingly focused on alternative processes to obtain the disinfection and removal of the pollution present in waters without the generation of these by-products (Blake et al. 1999; Chong et al. 2010). Possible alternative treatments include the application of ozone, the Fenton process, the photo-Fenton process and photolysis. Some of these treatments may be combined with other elements that improve their actions, such as hydrogen peroxide, metallic cations and other catalysts. These new treatments, generally known as Advanced Oxidation Processes (AOPs), are based on the generation of highly reactive temporary species with a short life. These species, known as reactive oxygen species (ROS), are able to remove a high proportion of pathogenic microorganisms present in waters and to degrade organic compounds in simple or easier oxidizing products when combined with other treatment steps (Maness et al. 1999; Peyton and Glaze 1988). Among the AOPs applicable to

the production of potable and regenerated water, ozonation has been recognized as a particularly efficient treatment for the disinfection and degradation of organic pollutants.

Ozone is a very efficient disinfectant and a potent oxidizing agent normally generated by electrical discharges from oxygen. It acts on all types of bacteria, viruses and protozoa, and it is estimated that its microbial inactivation efficacy is about 3,000 times greater than that of chlorine. Its oxidation potential is 2.07 V, and it is 10 times more soluble in water than oxygen.

Two types of reactions of ozone in water can be identified. The direct reaction is a highly selective reaction which occurs at low pH. The indirect reaction, which is not selective, is produced at high pH and ROS formed in the decomposition of ozone are involved (Hoigné and Bader 1977). In aqueous media, the production of ROS can increase by adding to ozone compounds such as hydrogen peroxide, which produces a promotion of the ozone decomposition into radicals (Glaze, Kang, and Chapin 1987; Oppenländer 2003; Staehelin and Hoigné 1982), and metal catalysts such as titanium dioxide, which can decompose the ozone into radicals or adsorb reagents facilitating its reaction (Carbajo et al. 2007).

CONTACT Natividad Miguel ✉ nmiguel@unizar.es Research Group Water Quality and Treatment, Institute of Environmental Sciences of Aragón, Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, Architecture and Engineering Faculty, University of Zaragoza, María de Luna 3, 50018, Zaragoza, Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/BOSE.

© 2016 International Ozone Association

The mechanism responsible for the inactivation of microorganisms by ozone is not well understood. Some researchers believe that ozone disinfection is a result of a direct ozone reaction (Finch, Yuen, and Uibel 1992; Hoigné and Bader 1975, 1978; Hunt and Mariñas 1999; Labatiuk, Belosevic, and Finch 1994), while others believe that the hydroxyl radical mechanism for disinfection is the most important mechanism (Bancroft 1984; Cho, Chung, and Yoon 2003). What is well established is that the sensitivity of microorganisms to ozone is affected by the organic matter and by the physico-chemical parameters of water (Bezirtzoglou et al. 1997).

The mechanism for hydroxyl radical attack on microorganisms results in an oxidation of the structural components of the cell wall and membrane; it acts similarly as ozone (Huang et al. 2000; Maness et al. 1999). Hydroxyl radicals can be more harmful to the components of the cell surface than ozone because their oxidation potential (2.70 V) is higher than that of molecular ozone (2.07 V). Moreover, these radicals can react unselectively with the components of the outer structure of the cell, which sometimes resist the action of ozone (Cho and Yoon 2006).

As for the combined treatments, Wolfe et al. (1989) states that the microbiocidal effectiveness of the peroxone system (O_3/H_2O_2) depends on several factors, the most significant being the H_2O_2/O_3 ratio, the dose of ozone applied, the concentration of residual ozone, the contact time, the water quality and the type of microorganism studied. It is important to optimize the H_2O_2/O_3 ratio because if a high dose of hydrogen peroxide is added to the system, the residual ozone concentration in the sample can be reduced. Furthermore, the scavenging of free hydroxyl radicals can be enhanced to the detriment of the disinfectant activity of the process.

With respect to O_3 combined with TiO_2 , Gracia et al. (1999) states that two effects occur simultaneously in the catalytic ozonation. On one hand, ozonation of the compounds (microorganisms and organic compounds) dissolved by the direct action of the molecular ozone and an indirect attack of the radical species from the decomposition of ozone take place. On the other hand, ozonation of compounds adsorbed on the surface of the catalyst occurs. Thus, the simultaneous effects of ozonation and catalysis are developed.

Logemann and Annee (1997) determined that the surface phenomena in the catalyst during catalytic oxidation processes are important for producing successful disinfection. Three actions are involved: the simultaneous adsorption of the ozone and organic matter or the by-products of ozonation on the catalyst surface; the ozone decomposition in the active points of the catalyst generating more reactive radical species than the ozone itself, which oxidizes the

compounds adsorbed, and desorption of the end products of the oxidation.

The most extensively used indicator of fecal contamination in research into disinfection is the bacterium *Escherichia coli* (Benabbou et al. 2007; Rincón and Pulgarin 2003, 2004). This study focuses on *Enterococcus* sp., another bacterial indicator with a greater degree of bacterial survival in aquatic environments and which is more resistant to drying, freezing, saline conditions and disinfecting situations than *E. coli* (Junco et al. 2001; Porte et al. 2007). The objectives are:

- (1) To investigate the disinfecting power of ozone in the presence and absence of TiO_2 and/or H_2O_2 on natural water samples contaminated with *Enterococcus* sp.
- (2) To evaluate the influence of the addition of TiO_2 and/or H_2O_2 on the disinfection of *Enterococcus* sp.
- (3) To develop a kinetic study of the results of the inactivation of *Enterococcus* sp. obtained in the different disinfection treatments under study by the application of primary mathematical models.

Materials and methods

Sample preparation

All the treatments conducted in this study have been carried out with natural water from the river Ebro, collected at a point previous to the entrance to the drinking water treatment plant in Zaragoza (Spain). A sample of 25 L was placed in 1-L ISO collection bottles and conserved at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for a perfect support.

Natural water from the river Ebro has a low concentration of *Enterococcus* sp. of $1-5 \times 10^2$ CFU-100 mL⁻¹. This is insufficient for an adequate evaluation of the effectiveness of the treatments. The bacterial population was therefore artificially increased with an *Enterococcus* sp. strain isolated from the river Ebro and confirmed by biochemical tests. The preparation of the concentrated suspension involved the incubation from a stock culture of *Enterococcus* sp. on nutritive agar (Scharlab). After 48 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in aerobic conditions, a cell suspension in sterile saline solution was prepared. Before irradiation inactivation experiments were carried out, the water sample was sterilized at $121\text{ }^\circ\text{C}/15$ min to remove any endogen microorganism. The natural water was then inoculated with this bacterial suspension to give an approximate final concentration of 10^8 CFU-100 mL⁻¹.

Detection and enumeration of *Enterococcus* sp.

The culture and enumeration of *Enterococcus* sp. was carried out according to the procedure ISO 7899-2:2001 (UNE-EN ISO 7899-2:2001), using membrane filtration with sterile cellulose membranes (Millipore) of 0.45- μm pore size. Cultured *Enterococcus* sp. organisms were detected by incubation after 48 h at 37 °C using Slanetz & Bartley agar (Scharlab, Spain) as the selective medium. After this period, colonies with a pink-purple color were counted and some were subjected to confirmation tests by Gram stain.

Several different volumes were filtered from each sample taken in the experiments to ensure a reliable count in each sampling time, and dilutions were made where necessary. The enumeration of colonies was expressed as CFU (colony-forming units) per 100 mL of sample in each contact time. These concentrations were transformed to \log_{10} . The bactericidal removal was determined by $\text{Log}(N_t/N_0)$, where N_0 and N_t are the *Enterococcus* sp. before and after disinfection. All zero counts were replaced by the lowest possible count, this is, 1 CFU per 100 mL.

Material, reagents and instrumentation

All glassware in contact with the samples was autoclaved at 121 °C for 15 min. All solutions and culture mediums were prepared with MilliQ® water, and analytical-reagent-grade chemicals were used throughout.

The ozone was generated “in situ” using a Fischer Model 500 ozone generator. The generator consisted of two electrodes producing a high voltage. A pure oxygen current was passed through the electrodes, a discharge occurred and atomic oxygen was produced. When the atomic and molecular oxygen were combined, an ozone molecule was generated.

Oxygen was supplied from a compressed gas bottle directly connected to the ozone generator. A layer of silica gel was placed between the gas bottle and the ozonizer, because its hygroscopic properties remove moisture from the O_2 stream before entering the generator. The ozonizer was connected to a closed glass reactor operating in semi-continuous mode, continuous to gas and discontinuous to liquid. This reactor was made of Pyrex glass with a spherical shape and a capacity of 3 L. The ozone gas was transferred to the sample at the top of the reactor through a porous diffuser (O_3 introduced). The transfer of ozone into the water produced a bubbling effect which provided agitation to the sample, favoring the ozone-water contact. The incoming ozone was kept constant throughout each experiment.

Ozone not transferred to the water during contact was released from the reactor (as O_3 not consumed). This unconsumed O_3 was routed to two ozone destruct units containing 250 mL of a 2% KI solution. When the ozone reacted with this KI, it was reduced to oxygen and released to the atmosphere as an innocuous element.

The ozone consumed by the sample is defined by Equation [1]. Residual ozone, dissolved in the sample, was measured by a color-meter test (Merck).

$$\text{O}_3 \text{ consumed} = \text{O}_3 \text{ generated} - (\text{O}_3 \text{ not consumed} + \text{O}_3 \text{ residual dissolved}) \quad [1]$$

The catalyst used in this study was TiO_2 P25 (Degussa). It was applied in solution but could be removed by sedimentation after use (Fernández-Ibáñez et al. 2003; Ljubas 2005; Miguel et al. 2010). Finally, the hydrogen peroxide solution was prepared from a concentrated H_2O_2 solution at 30% by weight (Carlo Erba, quality for analysis).

Operational conditions

Replicates of the experiments were performed and an average value was calculated for each sampling point.

The ozone dose was 578 $\text{mg O}_3 \text{ h}^{-1}$. The volume of samples to be treated was 1.5 L and the treatments were carried out at room temperature (23 °C).

For treatments by ozone combined with hydrogen peroxide (peroxone) and ozone combined with titanium dioxide, H_2O_2 doses of 0.04 mM (1.365 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$) and TiO_2 doses of 1 g L^{-1} were used. In previous ozonation studies, some authors have worked with low doses of H_2O_2 (0.02–0.04 mM) with good disinfection results (Cho and Yoon 2006; Sommer et al. 2004). Others have recommended establishing a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ molar ratio of 0.5 to improve the removal of components in water (Bellamy et al. 1991; Glaze, Kang, and Chapin 1987; Miguel et al. 2010; Mosteo et al. 2009).

During the experiments, samples were taken at different time intervals to evaluate the effectiveness of the treatments on the bacterial populations studied. The maximum was 10 min at the end of the assays. Both ozone and hydrogen peroxide residual in the samples were neutralized with sodium thiosulfate to prevent the residual levels from continuing to exert their bactericidal effect on surviving bacterial populations.

Kinetic models of microbial inactivation

Models description

Of the existing mathematical models, this research focuses on inactivation models which study the mortality rate of bacterial populations during a process.

Chick (1908) (Chick 1908) was the first to propose a first-order kinetic to model linear inactivation curves. In the same year, Watson (1908) (Watson 1908) made a modification to the Chick model, incorporating the effect of the disinfectant concentration in the disinfection process.

These simple kinetics assume that all microorganisms of the population exhibit the same sensitivity to the killing agent. Thus, when inactivation vs. treatment time is represented under a constant intensity, a straight line is obtained.

Alternative kinetics have been developed for describing nonlinear survival curves applied by many authors to describe the behavior of microorganisms in the disinfection field (Azzellino et al. 2011; Boyle et al. 2008; Cho, Chung, and Yoon 2003; Gomes et al. 2009).

Table 1 summarizes the proposed mathematical models to describe the inactivation graphs obtained in the present research. The selection of these models is based on the principle of parsimony whereby the models must be as simple as possible, with the lowest possible number of parameters (Gómez 2005). The goodness-of-fit can be greatly improved by adding more parameters to the model; however, a large increase in the number of parameters can sometimes lead to meaningless predictions.

Fitting experimental data and error rates

To obtain the kinetic coefficients of each model described here, it is necessary to adjust the experimental values to the corresponding equations by nonlinear regression techniques. The parameters of the models are adjusted to equations using interactive algorithms based on the least squares method (Cho, Chung, and Yoon 2003; Pernitsky, Finch, and Huck 1995). Currently, many statistical programmes allow these adjustments to be carried out. These include the Solver and GlnaFiT tools of the Microsoft Excel program used in this study (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

Table 1. Kinetic models studied.

Kinetic model	Integrated equation	Kinetic coefficient	References
Hom model	$Log \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -k_{app} \cdot t^m$ <i>k</i> : first-order inactivation rate <i>C</i> : concentration of disinfectant <i>n</i> : constant of dilution <i>m</i> : empirical constant of model	k_{app}, n, m	[Hom 1972]
Biphasic model	$Log \frac{N_t}{N_0} = Log [P \cdot e^{-k_1 t} + (1 - P) \cdot e^{-k_2 t}]$ <i>P</i> : fraction of surviving organisms of subpopulation 1 (1- <i>P</i>): fraction of surviving organisms of subpopulation 2 <i>k</i> ₁ : inactivation rate of the weak population <i>k</i> ₂ : inactivation rate of the resistant population	P, k_1, k_2	[Pruitt and Kamau 1993]
Mafart model	$Log \frac{N_t}{N_0} = -(\frac{t}{\delta})^p$ <i>δ</i> : time to reduce the first decimal logarithmic unit of the bacterial population (scale parameter) <i>p</i> : indicates the shape of the curve of the equation (shape parameter)	δ, p	[Mafart et al. 2002]

To evaluate the quality of the adjustments of the models to the experimental data obtained, two indexes are used: the coefficient of determination (*R*²) and the mean square error (MSE).

The coefficient of determination, *R*², is used as an overall measure of the quality of the fit. This coefficient provides information on the proportion of total variability of the dependent variable that is explained by the model. The closer the *R*² value is to 1, the better is the predictive accuracy of the model, and therefore the estimated values are more consistent with the observed values. The equation of the coefficient of determination is determined by Equation [2], where *y*_{*i*} are the estimated values and *y* is the average of the real values (Gómez 2005).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \tag{2}$$

The mean square error, MSE, is defined as the square root of the mean of square of the residuals (the difference between the observed values and estimated values) and is determined by Equation [3], where *n* is the size of the sample. An MSE value of 0 indicates that there is a perfect agreement between the estimated and real values.

$$MSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2}{n}} \tag{3}$$

Results and discussion

Three replicates of the experiments were performed and average values are showed for each sampling point. The maximum error obtained among replicates was 3%.

Results of *Enterococcus* sp. inactivation

Table 2 shows the consumed ozone and the inactivation of *Enterococcus* sp. by the ozone-based treatments. Figure 1 summarizes the results of *Enterococcus* sp. inactivation during the treatments.

a) Ozonation (O₃).

At the end of the treatment (12.3 min), a final inactivation of 7.7 log units is obtained with an ozone dose of 74.2 mg L⁻¹. The inactivation is faster at the first time of the reaction achieving a inactivation of 4.2 log after 2.5 min. of treatment. After, the inactivation continues slower as shown in Figure 1.

b) Treatment with O₃/H₂O₂.

The treatment with O₃/H₂O₂ (peroxone) produces a continuous reduction of the bacterial population achieving a disinfection of 8 log at the end of the experiment (12.3 min) with an ozone dose of 69.1 mg L⁻¹. Like using ozone, the treatment with O₃/H₂O₂ is faster at the beginning. The inactivation achieved after 2 min of treatment is 4.9 log. If a level of inactivation of 4 log units is required, an ozone dose of 5.7 mg L⁻¹ is required. If treatments with O₃

and O₃/H₂O₂ are compared, to obtain the same inactivation of *Enterococcus* sp., the dose ozone required in the treatment with O₃ and H₂O₂ is less than for the treatment with O₃ only in all cases. Then, the addition of H₂O₂ to the ozonation treatment improves the process. The positive effect of the combination of hydrogen peroxide and ozone disinfection has also been shown in research involving other indicators of fecal pollution as *E. coli* (Cho and Yoon 2006; Sommer et al. 2004; Wolfe et al. 1989), bacteria less resistant to drying, freezing and disinfecting and saline conditions than *Enterococcus* (Junco et al. 2001; Porte et al. 2007), and *Clostridium perfringens* (vegetative cells) (Lanao et al. 2008), anaerobic bacteria.

c) Treatment with O₃/TiO₂.

It can be observed in Figure 1 that the O₃/TiO₂ process produces total disinfection (7.8 log units) at 9 min using 50.2 mg O₃ L⁻¹. To achieve the same inactivation, in all cases the ozone dosage required by this treatment is less than the dosage required for the ozonation treatment but is slightly higher than the value obtained in the peroxone system (O₃/H₂O₂). As two previous cases, the inactivation

Table 2. *Enterococcus* sp. count and conditions of ozonation treatments in natural water.

Treatment with O ₃						
Time (min)	0	1.3	2.5	7.1	12.3	
N _t (CFU 100 mL ⁻¹)	3.2 · 10 ⁸	1.2 · 10 ⁶	2.0 · 10 ⁴	2.1 · 10 ²	6.0	
mg O ₃ L ⁻¹ consumed	0	6	13.07	41.93	74.2	
Treatment with O ₃ /H ₂ O ₂						
Time (min)	0	1.1	2	6.2	12.3	
N _t (CFU 100 mL ⁻¹)	4.7 · 10 ⁸	1.2 · 10 ⁵	6.2 · 10 ³	1.9 · 10 ¹	4.0	
mg O ₃ L ⁻¹ consumed	0	4.1	9.46	33.85	69.1	
Treatment with O ₃ /TiO ₂						
Time (min)	0	1.1	1.8	4.8	9.1	15.3
N _t (CFU 100 mL ⁻¹)	6.2 · 10 ⁷	1.4 · 10 ⁴	3.5 · 10 ³	6.0 · 10 ¹	0	0
mg O ₃ L ⁻¹ consumed	0	3.9	8.27	25.71	50.21	86.21
Treatment with O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂						
Time (min)	0	1.1	1.8	4.8	9	15
N _t (CFU 100 mL ⁻¹)	7.5 · 10 ⁷	1.1 · 10 ⁵	9.1 · 10 ³	1.9 · 10 ³	1.1 · 10 ³	6.7 · 10 ²
mg O ₃ L ⁻¹ consumed	0	3.9	8.3	25.21	49.28	82.96

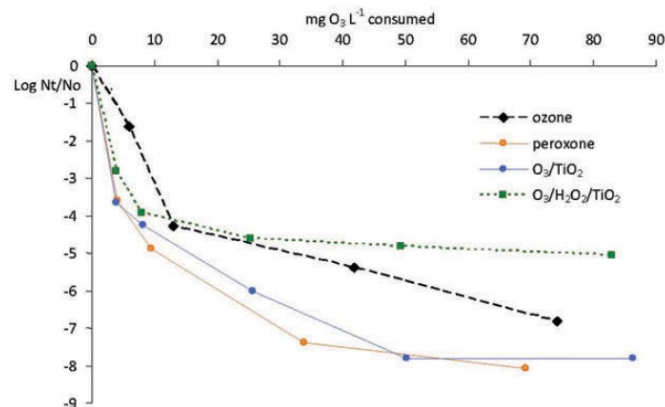


Figure 1. *Enterococcus* sp. inactivation in ozonation treatments in natural water.

of *Enterococcus* sp. is faster in the first minutes of the treatment, achieved an inactivation of 4.2 log after 1.8 min ($8.27 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$). Different results were obtained in the study of Lanao et al. (2008), where the inactivation of *C. perfringens* vegetative cells by O_3/TiO_2 was higher compared to the ozonation system but lower than the peroxone treatment. Therefore, according to obtained results, vegetative cells of *C. perfringens* (anaerobic) appear to be more sensitive to the O_3/TiO_2 process than *Enterococcus* sp.

d) Treatment with $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$.

In the case of the treatment with $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$, two different effects can be observed in the Figure 1. At the beginning of treatment and with low doses of ozone, this treatment is more effective than ozonation. After 1.8 min. of treatment with O_3 , H_2O_2 and TiO_2 , and with an ozone dose of 8.3 mg L^{-1} , the inactivation of *Enterococcus* is 3.9 log. However, with a dose of $6 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ and 1.3 min. of treatment, an inactivation of 2.4 log is achieved with O_3 . On the other hand, from 2 min approximately to the end of treatment, the ozonation is more effective treatment than $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$. In all cases, the inactivation obtained with $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ is lower than the value achieved with the peroxone and O_3/TiO_2 systems. Consequently, the addition of H_2O_2 and TiO_2 , both separately and together, improves the disinfection obtained compared to the ozonation treatment alone in the first minutes. Nevertheless, this combination does not produce an improvement over the peroxone and O_3/TiO_2 treatments in any case.

Kinetic modelization

The experimental data of the inactivation curves of *Enterococcus* sp. obtained during ozonation, $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, O_3/TiO_2 and $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ treatments are analyzed through 3 mathematical models, the Hom model, the biphasic model and the Mafart model.

Figures 2a–2d graphically show the adjustments of the models applied to the inactivation curves of *Enterococcus* sp. versus the different treatments studied. Table 3 shows the values of the kinetic parameters obtained after applying the mathematical models selected to the inactivation curves of *Enterococcus* sp. during ozonation, $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, O_3/TiO_2 and $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ treatments, respectively.

The values of the fit indexes, MSE and R^2 , in the treatments applied are reasonably good because they show values close to 1 in the case of the correlation coefficient (R^2) and values close to 0 for squared error (MSE). The values of the rate constants of inactivation (k_{ap} in the Hom model and k_1 and k_2 in the biphasic model) are lower in the ozonation treatment than the peroxone, O_3/TiO_2 and $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ treatments because the former is the

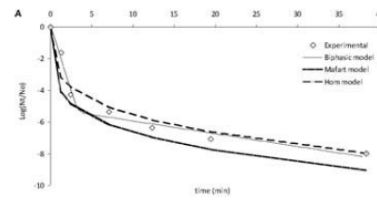


Figure 2A. Adjustment of the four mathematical models to the inactivation curve of *Enterococcus* sp. in ozonation treatment.

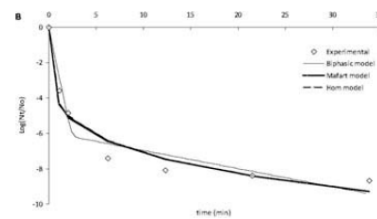


Figure 2B. Adjustment of the four mathematical models to the inactivation curve of *Enterococcus* sp. in peroxone treatment.

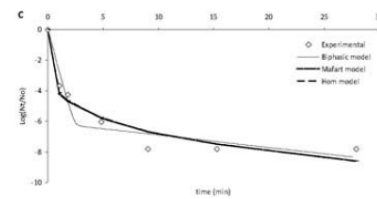


Figure 2C. Adjustment of the four mathematical models to the inactivation curve of *Enterococcus* sp. in O_3/TiO_2 treatment.

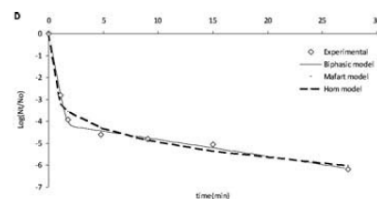


Figure 2D. Adjustment of the four mathematical models to the inactivation curve of *Enterococcus* sp. in $\text{O}_3/\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ treatment.

less effective treatment for achieving the disinfection of *Enterococcus* sp. The value of the δ parameter of the Mafart model is lower in the peroxone and O_3/TiO_2 treatments. These systems reach an inactivation of 1 log unit in a shorter time than the ozonation process, whose value is similar to the value obtained in the $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ treatment.

Table 3. Kinetic parameters of the mathematical models applied to the inactivation of *Enterococcus* sp. in the ozonation treatment.

Treatment with O ₃			
<i>Hom model</i>			
k_{ap} (min ⁻¹ ·mgL ⁻¹)	<i>m</i>	MSE	<i>R</i> ²
3.001	0.26	0.69	0.94
<i>Biphasic model</i>			
<i>P</i>	k_1 (min ⁻¹) k_2 (min ⁻¹)	MSE	<i>R</i> ²
0.999993	3.862 0.185	0.49	0.98
<i>Mafart model</i>			
<i>p</i>	δ (min)	MSE	<i>R</i> ²
0.23	0.002	0.74	0.93
Treatment with O ₃ /H ₂ O ₂			
<i>Hom model</i>			
k_{ap} (min ⁻¹ ·mgL ⁻¹)	<i>m</i>	MSE	<i>R</i> ²
4.321	0.21	0.58	0.96
<i>Biphasic model</i>			
<i>P</i>	k_1 (min ⁻¹) k_2 (min ⁻¹)	MSE	<i>R</i> ²
0.999998	5.98 0.24	0.94	0.95
<i>Mafart model</i>			
<i>p</i>	δ (min)	MSE	<i>R</i> ²
0.21	0.001	0.58	0.96
Treatment with O ₃ /TiO ₂			
<i>Hom model</i>			
k_{ap} (min ⁻¹ ·mgL ⁻¹)	<i>m</i>	MSE	<i>R</i> ²
4.072	0.22	0.58	0.95
<i>Biphasic model</i>			
<i>P</i>	k_1 (min ⁻¹) k_2 (min ⁻¹)	MSE	<i>R</i> ²
0.9999991	6.04 0.19	0.94	0.94
<i>Mafart model</i>			
<i>p</i>	δ (min)	MSE	<i>R</i> ²
0.22	0.001	0.58	0.95
Treatment with O ₃ /H ₂ O ₂ /TiO ₂			
<i>Hom model</i>			
k_{ap} (min ⁻¹ ·mgL ⁻¹)	<i>m</i>	MSE	<i>R</i> ²
3.180	0.19	0.26	0.97
<i>Biphasic model</i>			
<i>P</i>	k_1 (min ⁻¹) k_2 (min ⁻¹)	MSE	<i>R</i> ²
0.99991	5.93 0.18	0.16	0.99
<i>Mafart model</i>			
<i>p</i>	δ (min)	MSE	<i>R</i> ²
0.19	0.002	0.26	0.97

Conclusions

The ozonation, O₃/H₂O₂, O₃/TiO₂ and O₃/H₂O₂/TiO₂ treatments effectively inactivate populations of *Enterococcus* sp. Moreover, the combination of ozone with hydrogen peroxide or titanium dioxide improves the results of inactivation of *Enterococcus* sp. given by the ozonation treatment but hydrogen peroxide does not directly promote the action of titanium dioxide.

The inactivation of *Enterococcus* sp. is faster at the beginning of treatments and require less time and lower ozone doses obtain the same inactivation; the times and ozone doses required by O₃/H₂O₂ and O₃/TiO₂ are less than by O₃ and O₃/H₂O₂/TiO₂.

The inactivation curves of *Enterococcus* sp. do not respond to linear functions but exhibit a “tail” phenomenon and the primary mathematical models applied (Hom, biphasic and Mafart) adequately describe the kinetics of disinfection of the ozonation treatments studied for *Enterococcus* sp., as the fit indexes *R*² and *MCE* show values close to 1 and 0, respectively.

Funding

The authors of this work are grateful for financing by DGA-FSE Research Team T33 and by MINECO-FEDER with the Project CTM2013-41397.

References

- Azzellino, A., M. Antonelli, R. Canziani, F. Malpei, M. Marinetti, and C. Nurizzo. 2011. “Multivariate Modelling of Disinfection Kinetics: A Comparison Among Three Different Disinfectants.” *Desalination and Water Treatment* 29:128–39. doi:10.5004/dwt.2011.1610.
- Bancroft, K. P. 1984. “Ozonation and Oxidation Competition Values.” *Water Research* 18:473. doi:10.1016/0043-1354(84)90156-8.
- Bellamy, W. D., G. T. Hickman, P. A. Mueller, and N. Ziemba. 1991. “Treatment of VOC-Contaminated Groundwater by Hydrogen Peroxide and Ozone Oxidation.” *Research Journal Water Pollution Control Federation* 63 (2):120–8.
- Benabbou, A. K., Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune, and C. Guillard. 2007. “Photocatalytic Inactivation of *Escherichia Coli*. Effect of Concentration of TiO₂ and Microorganism, Nature, and Intensity of UV Irradiation.” *Applied Catalysis B: Environmental* 76:257–63. doi:10.1016/j.apcatb.2007.05.026.
- Bezirtzoglou, E., A. Panagiou, I. Savvaidis, and V. Maipa. 1997. “Distribution of *Clostridium Perfringens* in Polluted Lake Environments.” *Anaerobe* 3:169–72. doi:10.1006/anae.1997.0101.
- Blake, D. M., P. C. Maness, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and J. Huang. 1999. “Application of the Photocatalytic Chemistry of Titanium Dioxide to Disinfection and Killing of Cancer Cells.” *Separation and Purification Methods* 28:1–50. doi:10.1080/03602549909351643.
- Boyle, M., C. Sichel, P. Fernández-Ibañez, B. Arias-Quiroz, M. Iriarte-Puña, A. Mercado, E. Ubomba-Jaswa, and K. G. McGuigan. 2008. “Bactericidal Effect of Solar Water Disinfection under Real Sunlight Conditions.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (10):2997–3001. doi:10.1128/AEM.02415-07.
- Carbajo, M., F. J. Beltrán, O. Gimeno, B. Acedo, and F. J. Rivas. 2007. “Ozonation of Phenolic Wastewaters in the Presence of a Perovskite Type Catalyst.” *Applied Catalysis B: Environmental* 74 (3–4):203–10. doi:10.1016/j.apcatb.2007.02.007.
- Chick, H. 1908. “An Investigation of the Laws of Disinfection.” *Journal of Hygiene* 8:92–158. doi:10.1017/S0022172400006987.
- Cho, M., H. Chung, and J. Yoon. 2003. “Disinfection of Water Containing Natural Organic Matter by Using Ozone-Initiated Radical Reactions.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4):2284–91. doi:10.1128/AEM.69.4.2284-2291.2003.
- Cho, M., and J. Yoon. 2006. “Enhanced Bactericidal Effect of O₃/H₂O₂ Followed by Cl₂.” *Ozone: Science & Engineering* 28:335–40. doi:10.1080/01919510600900316.
- Chong, M. N., B. Jin, C. W. K. Chow, and C. Saint. 2010. “Recent Developments in Photocatalytic Water Treatment Technology: A Review.” *Water Research* 44:2997–3027. doi:10.1016/j.watres.2010.02.039.
- Fernández-Ibañez, P., J. Blanco, S. Malato, and F. J. De Las Nieves. 2003. “Application of the Colloidal Stability of TiO₂ Particles for Recovery and Reuse in Solar

- and Hydrogen Peroxide." *Environmental Science and Technology* 16 (10):676–81. doi:10.1021/es00104a009.
- UNE-EN ISO 7899-2:2001. "Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: método de filtración de membrana".
- Watson, H. E. 1908. "A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant." *Journal of Hygiene* 8:536–42. doi:10.1017/S0022172400015928.
- Wolfe, R. L., M. H. Stewart, S. Liang, and M. J. McGuire. 1989. "Disinfection of Model Indicator Organisms in a Drinking Water Pilot Plant by Using Peroxona." *Applied Environmental Microbiology* 55 (9): 2230–41.