



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desinfecció electroquímica d'aigües residuals per processos d'oxidació avançada

Carmina Bruguera Casamada

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de doctorat de Biotecnologia.
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística.

TESI DOCTORAL
DESINFECCIÓ ELECTROQUÍMICA D'AIGÜES RESIDUALS PER PROCESSOS D'OXIDACIÓ
AVANÇADA

Memòria presentada per
Carmina Bruguera Casamada

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosa Ma. Araujo Boira
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
Facultat de Biologia - Universitat de Barcelona

Directora i tutora

Autora

Rosa Ma. Araujo Boira

Carmina Bruguera Casamada

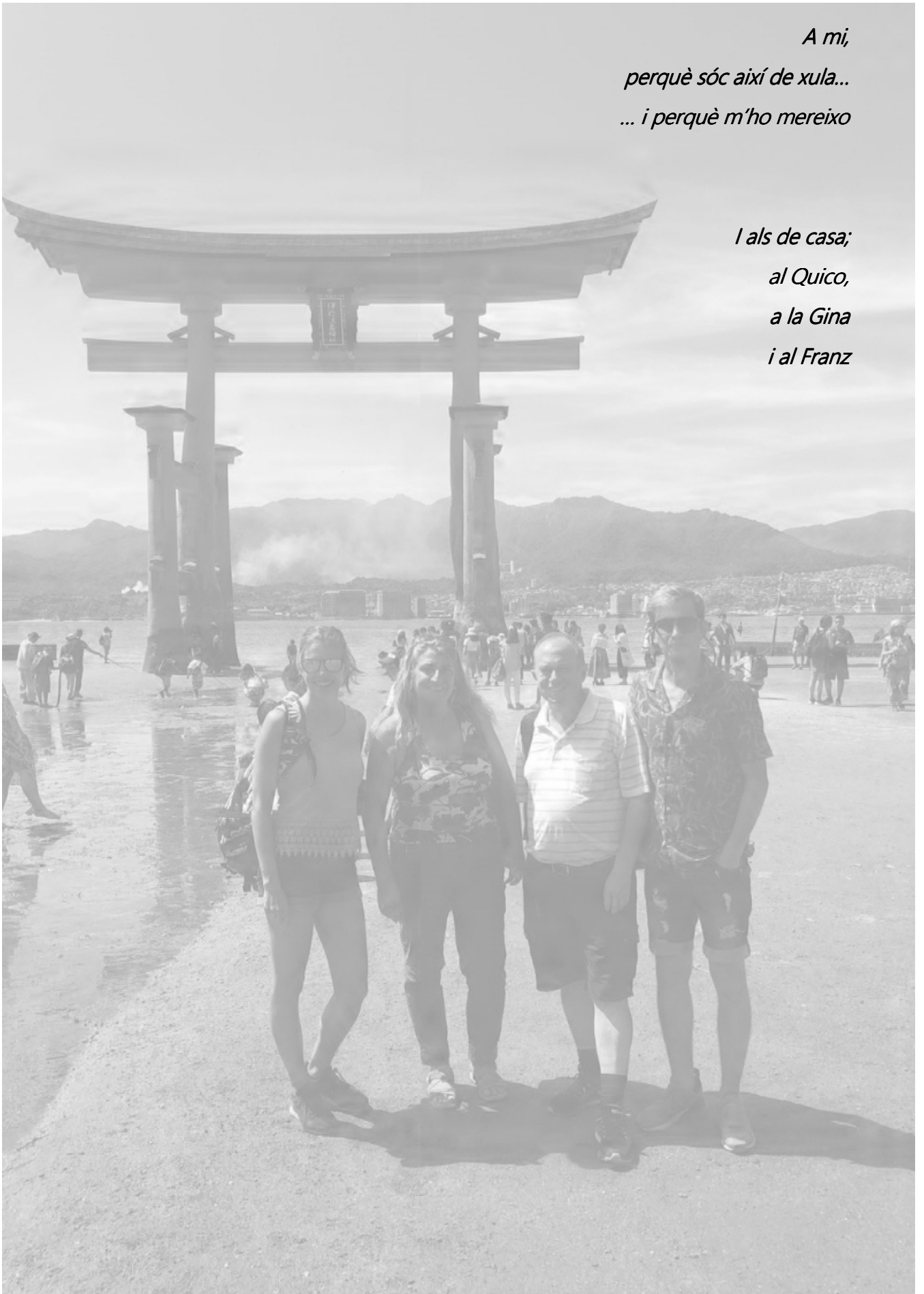
Barcelona, setembre 2018

*Que mai no és tard per començar de nou,
per atrapar els teus somnis.*

No t'adormis-Txarango

*A mi,
perquè sóc així de xula...
... i perquè m'ho mereixo*

*I als de casa;
al Quico,
a la Gina
i al Franz*



*“Ningú et concedirà els teus desitjos,
és millor que t’espavilis per fer que es compleixin”*

I aquest era el meu desig, la meva afició; investigar i escriure articles. Així de rareta sóc.

I t’espaviles, i intentes sobreposar-te a totes les adversitats que et trobes pel camí, però si estàs acompanyada del millor equip del món tot és més fàcil. I aquest equip s’anomena “microlloros” per això mateix, perquè davant les adversitats hem intentat deixar de banda els plors i plorar plegats però de riure. *No quiero más dramas en mi vida, solo comedias entretenidas. Así que no me vengas con historias de celos, llantos y tragedias, nooooo.*

I, amb el temps, oblidaré els instants negatius i em quedaré amb l’agradable record dels “microlloros”. Un equip, un gran equip a qui vull agrair-li TOT.



Els microlloros, els meus “nens adoptius”; el Xavi (Persi), la Marta, la Montse, l’Aurora, la Sandra, l’Anna, l’Edu, l’Eva, l’Alberto amb els “respectius”; l’Alfio, el Dani, l’Alvaro, l’Oriol, el Yol i els “petits”; l’Anna i el microFerran (que d’alguna manera també surt a la foto juntament amb els altres micros que vindran jejeje). Sense oblidar-me dels microlloros que no es deixen fotografiar; la Natàlia (tecles) i el David.

I entre microlloros, abelles i *Paenibacillus* va sorgir l’oportunitat de col·laborar en un projecte transversal amb els químics. Química?? Arg!!! Però res més lluny de la realitat, perquè aquí va aparèixer el Nacho, el millor referent en electroquímica que hagués pogut tenir, i tot va ser molt fàcil. A ell, li vull agrair tot el què m’ha ensenyat

(químicament parlant ;)), i sobretot els moments que m'ha recolzat i animat a seguir endavant subornada per una xocolatina.



I parlant de químiques, no m'oblido de les meves companyes de l'equip "Power rubias"; la Carlota i la Juliana, ni de les tardes compartides tot discutint les diferències entre quimiadsorció i fisiadsorció. A vegades, només a vegades, els investigadors tenim converses una mica... diferents??

I, evidentment als catedràtics (paraules majors), a l'Enric Brillas i a la Rosa M. Araujo perquè sense el seu vist-i-plau res d'això no hauria estat possible.

Finalment, també vull tenir unes paraules d'agraïment a tothom que m'ha animat a seguir endavant amb aquesta història tot i que en algun moment m'han mirat amb cara estranya tot dient: "Electro quèèèèè??? A mi, hablame sencillo" :D

Total, que si has arribat fins aquí i has somrigut recordant la situació t'ho agraeixo a tu, de tot cor.

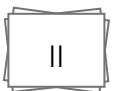
I una dedicatòria especial al Carles, l'Oriol, el Josep, el Jordi T., el Joaquim, la Carme, la Dolors, el Raül, el Jordi C., el Jordi S., el Toni, el Lluís, la Meritxell, la Clara, la Marta i l'Anna, perquè d'alguna manera, i contra la seva voluntat, també han influït en el meu estat d'ànim a l'hora d'escriure aquesta memòria.

I aquí acaba el meu viatge.

Es el viaje a ninguna parte que me lleva a pensar / Que podría ir rindiendo cuentas / Debería ir cerrando puertas / Sin nostalgia, sin volver la vista atrás.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1 ELS TRACTAMENTS ELECTROQUÍMICS.....	3
1.1.1 PROCESSOS ELECTROQUÍMICS D'OXIDACIÓ AVANÇADA	5
1.1.1.1 OXIDACIÓ ELECTROQUÍMICA	7
1.1.1.2 ELECTRO-FENTON	9
1.1.1.3 FOTOELECTRO-FENTON.....	10
1.1.2 SEPARACIÓ DE FASES	11
1.1.2.1 ELECTROCOAGULACIÓ.....	11
1.2 REUTILITZACIÓ DE L'AIGUA	13
1.3 SOSTENIBILITAT DEL RECURS HÍDRIC	15
1.4 CONTAMINANTS DE L'AIGUA	17
1.4.1 CONTAMINACIÓ MICROBIOLÒGICA A L'AIGUA.....	19
CONSEQÜÈNCIES DE LA CONTAMINACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA PER A LA SALUT PÚBLICA	21
ELS MICROORGANISMES ÍNDEX I ELS INDICADORS DE PROCÉS	24
1.4.1.1 BACTERIS PATÒGENS A L'AIGUA	25
1.4.1.2 VIRUS A L'AIGUA	26
1.4.1.3 PROTOZOUS I HELMINTS A L'AIGUA	27
1.4.2 CONTAMINACIÓ QUÍMICA.	28
1.5 TRACTAMENT D'AIGÜES RESIDUALS	29
2. OBJECTIUS	37
3. INFORME DELS ARTICLES	41
4. PUBLICACIONS	47
CAPÍTOL 1_AIGÜES SINTÈTIQUES	49
1.1_ LA CAPACITAT DE L'OXIDACIÓ ELECTROQUÍMICA AMB UN ÀNODE DE BDD PER INACTIVAR BACTERIS GRAM-NEGATIUS I GRAM-POSITIUS EN UN MEDI DE BAIXA CONDUCTIVITAT AMB SULFAT	49
1.2_EFECTE DELS RADICALS HIDROXIL ELECTROGENERATS, DEL CLOR I DE LA MATÈRIA ORGÀNICA EN LA INACTIVACIÓ ELECTROQUÍMICA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA UTILITZANT BDD I ÀNODES DIMENSIONALMENT ESTABLES	63
CAPÍTOL 2_AIGÜA RESIDUAL URBANA.....	75
INACTIVACIÓ DE LA MICROBIOTA DE L'AIGUA RESIDUAL URBANA MITJANÇANT TRACTAMENTS D'ELECTROCOAGULACIÓ I ELECTRO-FENTON APLICATS PER SEPARAT I DE MANERA SEQÜENCIAL	75
CAPÍTOL 3_AIGÜA RESIDUAL INDUSTRIAL.....	89
AVANTATGES DE L'ELECTRO-FENTON SOBRE L'ELECTROCOAGULACIÓ PER A LA DESINFECCIÓ D'AIGÜES RESIDUALS LÀCTIES.....	89
5. DISCUSSIÓ GLOBAL.....	123
6. CONCLUSIONS FINALS.....	137
7. BIBLIOGRAFIA	141
ANNEX 1 – MESURA DEL CARBONI ORGÀNIC TOTAL (TOC).....	153
ANNEX 2 – ALTRES PUBLICACIONS	155



LLISTA D'ABREVIATURES

ATCC – *American Type Culture Collection*

BDD - Diamant dopat amb bor (provinent de l'anglès *Boron-Doped Diamond*)

DSA® – Ànode dimensionalment estable (provinent de l'anglès *Dimensionally Stable Anodes*)

EC - Electrocoagulació

EDAR – Estació Depuradora d'Aigua Residual

EF – Electro-Fenton

EO – Electro-oxidació

ERA – Estació regeneradora d'aigua

FEF – Fotoelectro-Fenton

HCIO – Àcid hipoclorós

LOG – Logaritme

MER - Microscopi Electrònic de Rastreig

MIN - Minuts

•OH – Radical hidroxil

PCM - Paracetamol

PEOA – Procés electroquímic d'oxidació avançada

PPCP – Productes de cura personal i productes farmacèutics (de l'anglès *pharmaceuticals and personal care products.*)

ROS – Espècies oxigenades reactives (de l'anglès *reactive oxygen species*)

SNMC – Sistema Notificació Microbiològica de Catalunya

TOC – Carboni Orgànic Total (de l'anglès *total organic carbon*)

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

En els darrers anys s'han implementat metodologies electroquímiques en el tractament d'aigües, però la majoria d'estudis s'han focalitzat en l'eliminació dels contaminants químics i pocs en la contaminació microbiològica. Algun dels estudis avalua l'ús de l'oxidació electroquímica per mantenir la qualitat microbiològica de les aigües destinades a l'ús recreatiu (spas i piscines), però tenint en compte que les metodologies emprades pel manteniment d'aquestes aigües són marques registrades, i que no està regulat el seu ús en la normativa vigent, es disposa de poca informació relacionada amb l'eficàcia i els resultats del seu ús sobre la inactivació dels microorganismes.

Així mateix, l'electroquímica inclou diferents processos que es poden aplicar de manera individual o bé combinats, dels quals tampoc es disposa d'informació sobre la seva eficàcia en la desinfecció d'aigües, ni en quins punts del cicle de l'aigua és possible aplicar-los per obtenir uns bons resultats, ni si són tant o més eficients que els utilitzats fins ara i per tant podrien substituir-los.

1.1 Els tractaments electroquímics

En aquesta tesi s'han aplicat tractaments electroquímics com a mètodes de desinfecció d'aigües. Aquests mètodes es basen en una sèrie de reaccions químiques, amb despesa d'energia elèctrica, que tenen lloc dins de la cel·la electroquímica on hi ha un procés d'oxidació, a l'elèctrode anomenat ànode, i un de reducció, a l'elèctrode anomenat càtode, tal com es mostra a la figura 1.

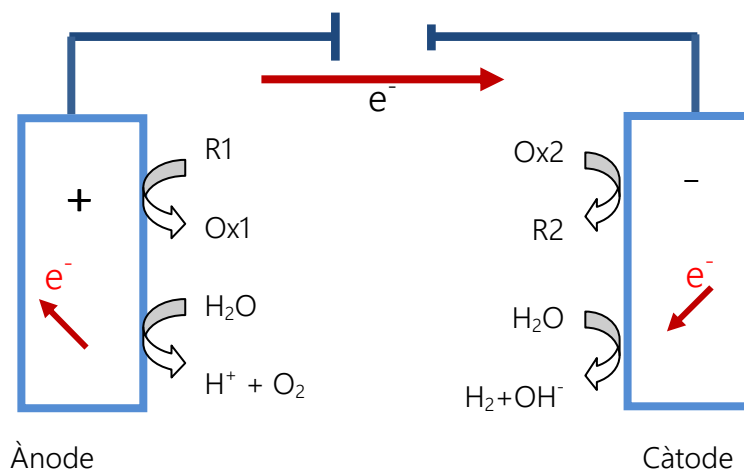


Figura 1: Reaccions químiques d'oxidació (ànode) i de reducció (càtode) que es donen dins la cel·la electroquímica.

Els paràmetres més importants que afecten el procés electroquímic són la composició de la dissolució tractada, la hidrodinàmica del sistema, el tipus de material dels elèctrodes i la densitat de corrent o potencial aplicats (j o E), ja que determinen la distribució d'oxidants i subproductes.

Els processos electroquímics requereixen d'elèctrodes que, normalment, es situen en paral·lel entre ells (amb les cares actives enfrontades), o bé de forma concèntrica, a la cel·la amb una separació, entre ànode i càtode, mínima. Aquesta distància assegura un bon comportament hidrodinàmic i minimitza el voltatge de cel·la o diferència de potencial entre ànode i càtode.

L'ànode és l'elèctrode on es produeix l'oxidació. Té càrrega positiva quan es treballa en una cel·la electrolítica, en la qual s'aplica un corrent o potencial per donar lloc a una sèrie de reaccions químiques. Com a ànodes s'utilitzen materials com Pt, elèctrodes de carboni com el grafit i les fibres de carbó activat, òxids metàl·lics, i diamant dopat amb bor (BDD).

Els ànodes de BDD presenten propietats excel·lents com són una gran resistència a la corrosió en mitjans molt agressius, una finestra molt àmplia d'oxidació/reducció de l'aigua, baixa adsorció del $\cdot\text{OH}$, la formació d' O_2 a potencials molt més positius que en d'altres ànodes i són capaços de mineralitzar completament els contaminants orgànics (Martínez-Huitlè, 2007; Anglada *et al.*, 2009; Sirés *et al.*, 2014). No obstant això, els principals inconvenients de l'ànode BDD són el seu alt cost, la fragilitat elevada en la majoria de casos i la producció simultània d'altres oxidants febles com són l'ozó i l'ió peroxodisulfat ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) en medi sulfat.

Els ànodes formats per òxids metàl·lics inclouen els dimensionalment estables (DSA®) com per exemple IrO_2 , PbO_2 o RuO_2 i d'altres menys estables com SnO_2 o TiO_2 . Presenten bona capacitat catalítica per a la generació d' O_2 (òxids de Ruteni) i Cl_2 (òxids d'Iridi). Presenten menys capacitat de mineralització dels contaminants orgànics que els de BDD i el seu preu és inferior.

D'altra banda, el càtode és l'elèctrode on es produeix la reducció. Té càrrega negativa en cel·les electrolítiques. Els més utilitzats són el d'**Acer** i el càtode de **difusió d'oxigen**. Aquest darrer, està format per una tela circular de C_{black} -PTFE on s'injecta el flux d'oxigen necessari per dur a terme la reducció bieletrònica d' O_2 gas electrogenerant H_2O_2 en el medi.

A la figura 2 es mostra una fotografia del càtode de carbó-tefló de difusió d'oxigen amb totes les parts que el conformen, i a la figura 3 es presenta un esquema del muntatge del mateix càtode de difusió d'oxigen.

És necessari que l'electròlit utilitzat contingui ions capaços de transportar una quantitat suficient de corrent elèctric, així com per a minimitzar la diferència de potencial entre els elèctrodes. Alguns dels utilitzats són: H_2SO_4 , Na_2SO_4 o bé s'afegeix NaCl al medi.

Les cel·les que s'utilitzen en condicions experimentals normalment són còniques amb camisa de termostatització o cilíndriques de vidre, d'un sol compartiment i obertes. Les capacitats volumètriques variaran segons la mida de la cel·la, però són petites de fins a 300 mL. En plantes pre-pilot o pilot, els volums de les cel·les són més grans.

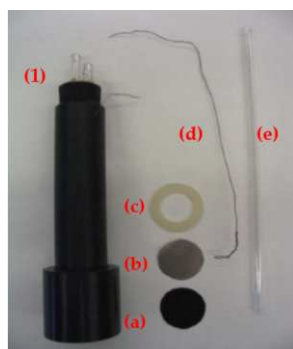


Figura 2: Càtode de carbó-tefló de difusió d'oxigen (1) i parts de què consta: tela de carbó-tefló (a), col·lector de Ni-Cr (b), junta de silicona (c), contacte de Ni-Cr (d) i entrada d'oxigen (e) (Sirés, 2006).

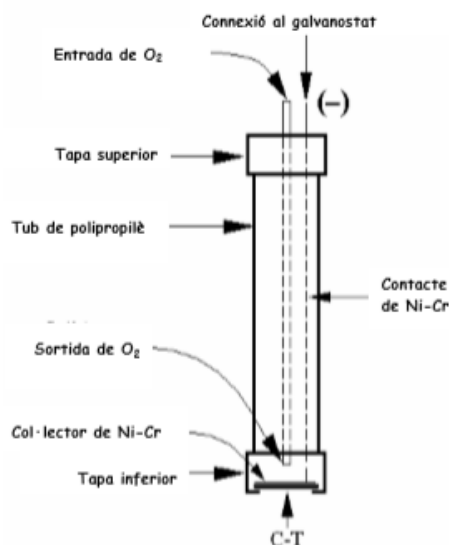


Figura 3 Secció longitudinal del càtode de carbó-tefló (C-T) de difusió d'oxigen (Sirés, 2006).

Per verificar que s'està treballant amb processos amb una gran capacitat de mineralització, es segueix l'evolució del Carboni Orgànic Total (Total Organic Carbon, TOC) seguint la metodologia que es descriu en l'annex 1.

L'electroquímica ambiental ofereix diverses alternatives per al tractament de contaminants en medi aquós. Els tractaments electroquímics més utilitzats en el tractament d'aigües són els **processos electroquímics d'oxidació avançada** i els de **separació de fases**.

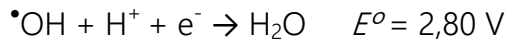
1.1.1 Processos electroquímics d'oxidació avançada

Durant els darrers anys s'ha posat la vista sobre els processos electroquímics d'oxidació avançada (PEOA) per l'eliminació de contaminants orgànics de les aigües residuals (Sirés i Brillas, 2012; El-Ghenymy *et al.*, 2014; Martínez-Huitle *et al.*, 2015), per a la desinfecció d'aigua urbana i industrial (Kraft, 2008; Cañizares *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2010; Rajab *et al.*, 2015) i també per a la desinfecció de piscines i spas (Nakajima *et al.*, 2004) entre d'altres.

Els PEOA són mètodes respectuosos amb el medi ambient perquè el seu reactiu principal és l'electró, que és un reactiu net. A més, les condicions de treball són segures i suaves, i només s'afegeixen petites quantitats d'agents químics quan és necessari (Walsh, 2001).

Mitjançant el tractament electroquímic, els compostos orgànics s'oxiden per la transferència directa d'electrons a la superfície de l'ànode o bé per la producció d'altres espècies oxigenades reactives. La característica comuna de tots els PEOA és la seva

capacitat per produir *in situ* forts oxidants com són les espècies oxigenades reactives (ROS). La més significativa d'aquestes espècies és el radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), un dels agents de major poder oxidant, només superat pel fluor, però que no és tòxic ni corrosiu pels equipaments. En contrapartida, pot ser eliminat per inhibidors naturals presents en les aigües com són els carbonats i bicarbonats. El radical hidroxil té un elevat potencial de reducció estàndard ($E^{\circ} = 2,80 \text{ V / SCE}$) el qual facilita la seva reacció amb molts orgànics fins a la seva mineralització (Sirés *et al.*, 2014; Martínez-Huitle *et al.*, 2015).



A la taula 1 es poden observar els potencials estàndard de reducció dels agents oxidants més habituals, trobant que el radical hidroxil té el doble de potencial que el clor.

Els processos d'oxidació avançada tenen com a objectiu la mineralització total dels contaminants orgànics fins a CO_2 , però també poden donar lloc a productes estables químicament com poden ser els àcids carboxílics de cadena curta, com per exemple l'acètic, el fòrmic o l'oxàlic, els quals hauran de ser degradats posteriorment mitjançant un tractament biològic.

Taula 1: Potencials estàndard de reducció dels agents oxidants més habituals (Hunsberger, 1977).

Agent oxidant	$E^{\circ} / \text{V (25 }^{\circ}\text{C)}$
Fluor	3,03
Radical hidroxil	2,80
Ozó	2,07
Peròxid d'hidrògen	1,78
Ió permanganat	1,68
Diòxid de clor	1,57
Àcid hipoclorós	1,49
Clor	1,36
Oxigen	1,20
Brom	1,09
Iode	0,54

Aquests processos d'oxidació presenten importants avantatges:

- A nivell tecnològic: facilitat d'automatització, versatilitat, alta eficiència i seguretat ja que operen sota condicions moderades.
- Possibilitat de mineralitzar totalment els contaminants orgànics o bé, si no és possible, convertir-los en subproductes més biodegradables que posteriorment podrien ser eliminats amb els processos biològics convencionals.
- Normalment no genera fangs que requereixin d'un tractament posterior per eliminar-los.
- Es poden reduir/eliminar compostos resistents al procés biològic, o bé compostos que podrien afectar-lo per la seva toxicitat; pesticides, fàrmacs, colorants.
- Es poden tractar contaminants a molt baixa concentració.

Els principals tipus de PEOA, i que s'han utilitzat en aquesta tesi, són:

1.1.1.1 Oxidació electroquímica

1.1.1.2 Electro-Fenton

1.1.1.3 Fotoelectro-Fenton

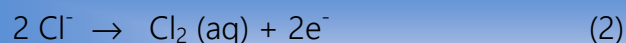
1.1.1.1 Oxidació electroquímica

Un dels PEOA més utilitzats és l'oxidació electroquímica (OE) també anomenada electro-oxidació o oxidació anòdica.

A partir de la descomposició de l'aigua, a la superfície de l'ànode, es produeixen *in situ* radicals hidroxil ($\bullet\text{OH}$) amb gran poder oxidatiu sense que sigui necessària l'addició de productes químics nocius. En solucions lliures de clor, aquests radicals hidroxils fisorbits (és a dir, adsorbts de manera dèbil) ($\text{M}(\bullet\text{OH})$) s'originen com a intermediaris de l' O_2 que es formarà per dissociació de l'aigua a l'ànode M segons la reacció (1) de la manera següent:



Un procés d'electro-oxidació molt més complex té lloc quan hi ha presència d'ions clorur, ja que les molècules orgàniques també podran ser atacades per les espècie de clor actives (Cl_2 / HClO / ClO) produïdes per les reaccions (2,3 i 4) en competència amb $\text{M}(\bullet\text{OH})$.



Segons el pH del medi predominarà una espècie o una altra; fins a pH 3.0, l'espècie predominant és $\text{Cl}_2 (\text{aq})$, a pH entre 3-8 és HClO i a pH > 8,0 és ClO^- .

Per tant, l'EO implica la degradació dels contaminants orgànics a partir d'una solució contaminada continguda a la cel·la electrolítica, bé per oxidació directa a la superfície de l'ànode o per la reacció mediada amb agents oxidants forts. A la figura 4 es representen les principals reaccions que tenen lloc a la cel·la quan en el medi hi ha presència d'ions clor.

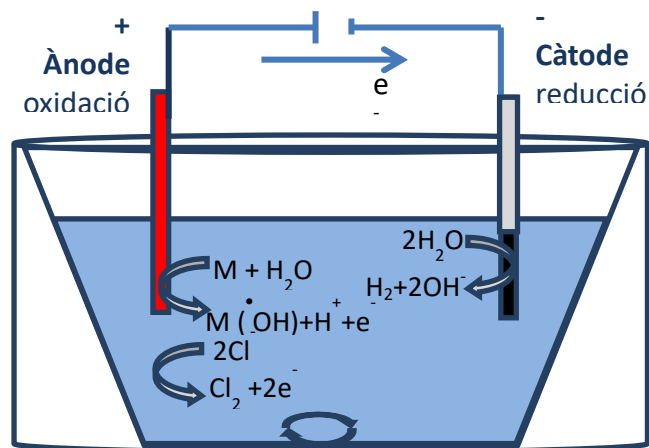
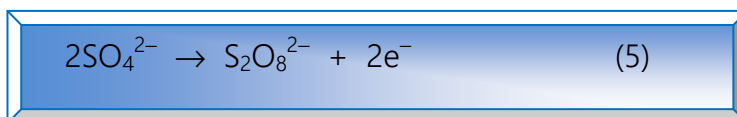


Figura 4: Esquema de les reaccions en una cel·la electroquímica amb un nucli magnètic d'agitació constant quan en el medi hi ha ions clor.

A més d'aquestes reaccions, s'ha constatat que l'aigua residual urbana conté una gran quantitat de SO_4^{2-} i Cl^- (Thiam *et al.*, 2016). Aquests ions es poden oxidar a l'ànode BDD produint altres oxidants com el peroxodisulfat ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) segons la reacció (5) a més del clor actiu (Cl_2 / HClO / ClO) de les reaccions (1 a 3). (Thiam *et al.*, 2015; Steter *et al.*, 2016).



El rendiment de l'electro-oxidació depèn, entre d'altres, del tipus de material anòdic utilitzat. En funció d'això, quan en el medi hi ha presència d'ions clor, es preveu que el clor actiu es produeixi més àmpliament en ànodes de Pt i ànodes dimensionalment estables, més que en BDD, a causa de la seva capacitat electrocatalítica més gran respecte a la reacció (2).

Aquesta tècnica és relativament senzilla d'implantar a nivell industrial i compatible amb el medi ambient (Sirés *et al.*, 2014).

D'altra banda, el tipus de material utilitzat també determinarà que trobem els radicals hidroxils ($\bullet\text{OH}$) fisisorbts o quimisorbts.

En el cas dels $\bullet\text{OH}$ fisisorbts el radical hidroxil es forma en l'ànode i reacciona amb el bacteri, per tant, és més actiu perquè a l'estar menys absorbit és més lliure per reaccionar. Seria el cas dels anomenats ànodes no actius com el PbO_2 , el SnO_2 i el diamant dopat amb bor, que presenten una gran capacitat de degradació de la càrrega orgànica. En concret, els elèctrodes de BDD són els ànodes més potents de l'electro-oxidació, degut a les raons esmentades anteriorment, afavorint així la mineralització completa dels compostos aromàtics i alifàtics lineals

Com a resultat, l'ànode BDD es considera el millor per a l'electro-oxidació, podent mineralitzar la majoria de molècules orgàniques en un medi de sulfat, com per exemple Na_2SO_4 .

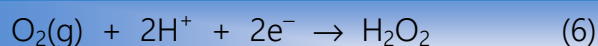
Una altra opció és trobar els $\bullet\text{OH}$ quimisorbits on el radical hidroxil, format a la superfície de l'ànode, passa a formar part de la seva xarxa cristal·lina. En aquest cas no trobem els $\bullet\text{OH}$ lliures sinó que s'han transformat en òxid metàl·lic. En aquest cas la mineralització acostuma a ser baixa ja que el poder d'oxidació és menor. En aquest grup trobem els anomenats ànodes actius, com Pt i els ànodes dimensionalment estables com IrO_2 i RuO_2 .

Molt relacionat amb la destrucció de la matèria orgànica mitjançant l'electro-oxidació, també s'ha investigat l'aplicació d'aquest PEOA en la inactivació de microorganismes patògens presents a l'aigua. Aquesta inactivació es deu principalment a l'elevat poder oxidant del radical hidroxil que provocarà alteracions a nivell de la paret cel·lular i posteriorment provocarà la inactivació d'altres molècules essencials pel bacteri. Malgrat tot, la bibliografia científica que hi ha publicada sobre la capacitat desinfectant d'aquest mètode és mins. Alguns estudis s'havien fet amb elèctrodes de platí amb l'objectiu de desinfectar aigua de consum humà (Kerwick *et al.*, 2005) i s'aconseguia la inactivació d'*E. coli*, després de 60 minuts, però els millors resultats eren amb presència de NaCl al medi. D'altres, fets per Nakajima (2004), tenien com a objectiu desinfectar piscines, i també aconseguien eliminar *E. coli*, després de 5 minuts de tractament amb ànode de Pt-Ir, però també hi havia NaCl al medi i es generava clor arribant a concentracions de 30 ppm de clor lliure. Molts dels estudis de desinfecció estaven focalitzats en *E. coli* com a indicador on també s'utilitzava clor actiu (Drees *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2009).

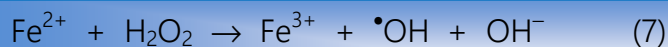
D'altra banda, els ànodes de BDD es consideren els millors per a l'electro-oxidació per a les seves propietats (Martínez-Huitle, 2007; Anglada *et al.*, 2009; Sirés *et al.*, 2014) i perquè s'aconseguia la mineralització de la majoria de contaminants orgànics en medi sulfat (Hamza *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2010; Pipi *et al.*, 2014; Scialdone *et al.*, 2014), però molt pocs estudis de desinfecció utilitzaven ànodes de BDD o d'òxids de ruteni o d'iridi.

1.1.1.2 Electro-Fenton

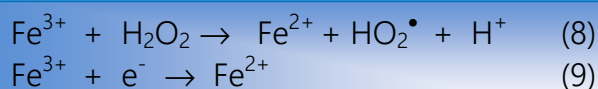
Aquest procés es basa en l'electrogeneració de H_2O_2 en el medi a partir de la reducció bieletrònica d' O_2 gas, en el càtode. S'utilitzarà un elèctrode de difusió d'aire de carboni-politetrafluoroetilè (PTFE) que presenta una gran eficiència i activitat per produir H_2O_2 , a través de la reacció (6) (Sirés *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2017).



Aquest mètode és molt eficaç quan hi ha una petita quantitat de Fe^{2+} al medi (<1 mM) que reacciona amb l' H_2O_2 produint Fe^{3+} i $\bullet\text{OH}$, amb gran poder oxidant, segons la reacció de Fenton (7).



Aquesta reacció és catalítica i es propaga gràcies a la regeneració del Fe^{2+} per la reducció del Fe^{3+} amb H_2O_2 segons la reacció (8) i, més ràpidament sobre el càtode per la reacció (9).



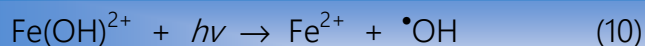
La reacció de Fenton és més efectiva a un pH òptim ca. 3 (El-Ghenymy *et al.*, 2015; Thiam *et al.*, 2015, 2016). Aquesta necessitat d'un pH àcid és el principal inconvenient del procés, primerament perquè s'haurà d'afegir àcid a l'efluent tractat, i en segon lloc perquè requerirà realitzar una neutralització prèvia abans que l'aigua es pugui retornar al medi. Per tant, cal incloure les modificacions que siguin necessàries en aquest mètode, més eficient que l'electro-oxidació (Brillas *et al.*, 2009; Sirés *et al.*, 2012), per minimitzar aquest desavantatge.

Els elèctrodes BDD són els millors ànodes per l'electro-Fenton a causa de l'alta activitat de BDD ($\bullet\text{OH}$) (El-Ghenymy *et al.*, 2015).

La majoria de treballs publicats són per estudiar la mineralització d'herbicides fàrmacs i colorants en dissolucions sintètiques, amb un ànode de BDD i un càtode de difusió, i els resultats mostren que s'ha obtingut una mineralització gairebé total d'aquests productes (Brillas *et al.*, 2009; Garcia-Segura *et al.*, 2012). La literatura científica sobre desinfecció amb electro-Fenton és molt reduïda. Hi ha evidència d'inactivació de coliformes presents en lixiviats mitjançant el mètode d'electro-Fenton però afegint H_2O_2 al medi i no electrogenerant-lo (Aziz *et al.*, 2013).

1.1.1.3 Fotoelectro-Fenton

La capacitat oxidativa de l'Electro-Fenton creix considerablement quan s'aplica el fotoelectro-Fenton perquè a irradiar la dissolució amb llum UV de 180-400 nm, per una banda, augmenta la velocitat de regeneració del Fe^{2+} al fotoreduir-se l'espècie $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ present a la dissolució segons la reacció (10) i d'altra banda, són fotodescarboxilats els complexos formats pel Fe^{3+} i els àcids carboxílics generats, reacció (11), la qual cosa permet una major mineralització dels contaminants.



S'ha vist que el FEF amb BDD o Pt és capaç de degradar totalment contaminants aromàtics en aigües sintètiques (Brillas *et al.*, 2009; Sirés *et al.*, 2012; El-Ghenymy *et al.*, 2013).

1.1.2 Separació de fases

Es basen en la producció electroquímica d'un agent coagulant. Normalment s'empra un ànode de ferro o alumini que genera contínuament al medi ions Fe^{2+} o Al^{3+} . Dins de la separació de fases trobem l'electroflotació, l'electrofloculació i l'electrocoagulació que és la que s'ha utilitzat en aquesta tesi.

1.1.2.1 Electrocoagulació

L'electrocoagulació implica la generació d'agents coagulants, in situ, per oxidació electroquímica d'un ànode soluble.

L'ànode utilitzat (ferro o alumini) es dissol i es va consumint, per la qual cosa se l'anomena ànode de sacrifici, i allibera al medi ions Fe^{2+} o Al^{3+} (reaccions 12 i 13).

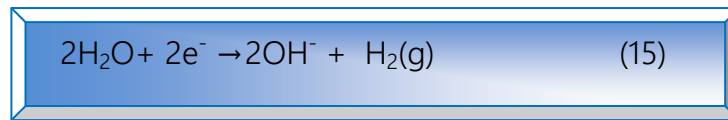


Els ions de metall alliberats es transformen en hidròxids que neutralitzen les càrregues o actuen com a flocs que atrauen els contaminants dissolts agregant-los o bé fent-los precipitar com a fangs. (Gheraout i Gheraout, 2012; Gheraout, 2013).

Quan l'ànode és de Fe, a partir de la reacció (a) es forma Fe^{2+} que en presència de gas O_2 dissolt es converteix en Fe (III) de la Reacció global (14) (Barrera-Díaz *et al.*, 2014; Brillas i Martínez-Huitle, 2015).



En el càtode, i degut a la reducció de l'aigua per la reacció (15) es forma H_2 , que s'allibera en forma de bombolles que pugen a la superfície arrossegant els contaminants. (Kobyia *et al.*, 2006).



Els contaminants suren en la superfície de l'aigua absorbits sobre les bombolles, tant d'O₂ com d'H₂, generades en el procés de descomposició electrolítica de l'aigua que té lloc en els elèctrodes (Valero *et al.*, 2011) tal com es mostra a la figura 5.

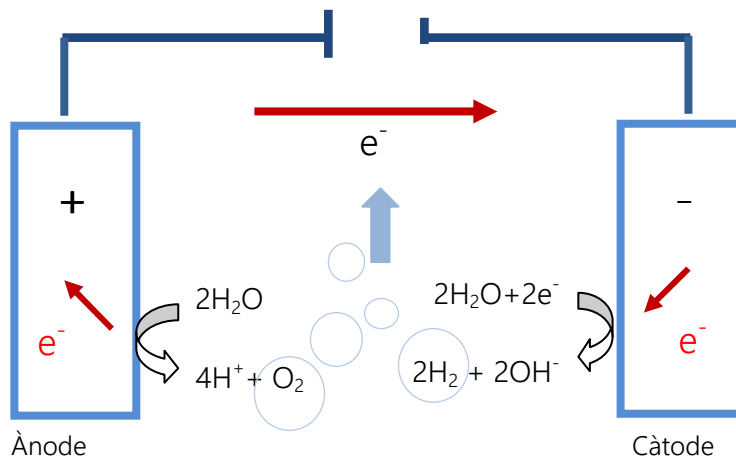


Figura 5: Esquema de les reaccions que tenen lloc durant el procés d'electrocoagulació amb la generació d'O₂ a l'ànode i H₂ al càtode que, en forma de bombolles, pujaran cap a la superfície arrossegant els contaminants del medi.

El Fe(OH)_(s)²⁺ a pH>5,5 i el Fe(OH)_(s)³⁺ a partir de pH>1,0 actuen com: (1) coagulants que eliminen partícules per complexació superficial o atracció electrostàtica i (2) floculants que eliminen partícules per floculació (Ghernaout i Ghernaout, 2012).

Els desavantatges de l'electrocoagulació són; la pèrdua dels elèctrodes de sacrifici, l'elevada concentració de Fe (o Al segons sigui l'elèctrode) en els llots, la formació d'una capa d'òxid en l'ànode que dificulta el pas de corrent elèctrica i per tant disminueix l'efectivitat del sistema.

La formació dels llots està relacionada directament amb el nivell de contaminació de l'aigua residual i de les espècies catòniques dissoltes.

Els precipitats/flòculs tenen capacitat d'absorció d'altres contaminants.

Vist tot això, queda palès que la desinfecció electroquímica pot ser una alternativa interessant perquè és més respectuosa amb el medi ambient i més rendible (Ghernaout

i Ghernaout, 2010), essent l'electrocoagulació (EC) , l'electro-oxidació (EO) i l'electro-Fenton (EF) les tecnologies més prometedores per a aquest propòsit.

Tenint en compte que l'aigua és un recurs limitat, cal fer-ne una gestió sostenible i també ens hem de plantejar nous sistemes de desinfecció aplicables en diferents punts del seu cicle, mitjançant els quals, fins i tot, podem reutilitzar l'aigua per a aquells usos en què no calgui que sigui potable.

1.2 Reutilització de l'aigua

Per a la reutilització directa de l'aigua ens trobem amb una gran varietat de normatives més o menys restrictives que varien segons el país que les ha dictat però que totes tenen com a objectiu preservar la salut pública i el medi ambient per l'exposició a microorganismes patògens i a substàncies tòxiques.

En el rànquing de reutilització d'aigua trobem Florida amb 1.000 Hm³/any seguit de Califòrnia amb 600 Hm³/any. En el cas de Catalunya estariem parlant de 30 Hm³/any.

Aquí, la darrera legislació per a la reutilització de l'aigua és relativament nova, concretament de l'any 2007, quan coincidint amb una època de rigorosa sequera, es va publicar el Reial Decret 1620/2007, de 7 de desembre, que estableix el règim jurídic de la reutilització de les aigües depurades.

Aquesta normativa es basa en un valor màxim admissible dels següents indicadors: nemàtodes intestinals, *E. coli*, terbolesa i sòlids en suspensió. Així mateix, també contempla un apartat d'altres criteris on trobem *Legionella* spp (important tenir-la en compte si hi ha formació d'aerosols), *Salmonella*, *Taenia* i un llistat de contaminants químics per tal d'evitar-ne l'entrada al medi ambient.

Aquesta normativa contempla diferents usos de l'aigua regenerada i els requisits que cal complir per a cadascun d'ells. Si l'aigua que es preveu reutilitzar està destinada a diversos usos, llavors s'hauran d'aplicar els criteris més exigents de tots els usos previstos.

Els usos contemplats són:

- **Urbans** (reg de jardins privats, descàrrega d'aparells sanitaris, reg zones verdes urbanes, neteja de carrers, sistemes contra incendis, neteja industrial de vehicles)
- **Agrícoles** (reg de cultius que permeten el contacte directe de l'aigua regenerada amb les parts comestibles per l'alimentació humana, reg de cultius pel consum d'animals productors de llet o carn, aqüicultura, reg localitzat de cultius llenyosos que no permeten el contacte aigua regenerada amb els fruits consumibles per alimentació humana, reg de cultius de flors ornamentals, vivers, hivernacles sense contacte directe de l'aigua regenerada amb les produccions, reg de cultius industrials, vivers, farratges, cereals i llavors oleaginoses)
- **Industrials** (aigües de procés i neteja, torres de refrigeració i condensadors evaporatius, altres usos industrials)

- **Recreatius** (regs de camps de golf, estanys, masses d'aigua on està prohibit l'accés del públic a l'aigua)
- **Ambientals** (recàrrega aqüífers, reg boscos, zones verdes i d'altres tipus no accessibles al públic, silvicultura, manteniment zones humides, cabals mínims i similars).

Segons les dades del Ministeri d'Agricultura i Pesca, Alimentació i Medi Ambient (MAPAMA), Espanya és el primer país europeu en capacitat de reutilització de l'aigua ja que produeix més de 450 hm³/any d'aigua tractada la qual es dedica principalment al reg. Aquest volum representa gairebé el 10% del total de l'aigua utilitzada per l'abastament urbà.

La reutilització de l'aigua és una pràctica plenament sostenible ja que el volum d'aigua regenerada equival al mateix volum d'aigua que no es sostreu del medi natural. Un altre avantatge també és que es pot disposar d'un recurs independent del convencional ja que es poden utilitzar volums d'aigua reutilitzada per usos on no es necessita que l'aigua sigui potable, la qual cosa contribueix també a preservar les reserves d'aigua potable.

La reutilització d'aigua regenerada permet guanyar molts recursos:

- Recuperar cabals que són abocats al mar.
- Regenerar efluent procedents del tractament secundari d'una EDAR, la qual cosa suposa una millora de qualitat en l'abocament i sobre el medi receptor.
- La recàrrega d'aqüífers amb aigua regenerada permet millorar la qualitat d'aigua emmagatzemada i disposar de més recursos.
- L'aigua regenerada substitueix cabals destinats a usos no potables de l'aigua.

La reutilització d'aigua a Catalunya

El Pla de sanejament de Catalunya s'ha anat orientant a incorporar noves tecnologies que permetin la reutilització de l'aigua regenerada de manera segura. Actualment, tal i com podem veure a la figura 6, Catalunya reutilitza uns 30 hm³ d'aigua a l'any (dades del 2016).

Aquesta aigua prové directament de l'Estació Depuradora d'Aigua Residual (EDAR) sense tractament terciari o bé d'una estació regeneradora d'aigua (ERA). D'aquest total de 30 hm³, la majoria (19,1 hm³) està destinada a l'ús ambiental ja que en el marc del Programa de reutilització d'aigua a Catalunya, es promouen accions de reutilització per millorar els entorns fluvials, conservar els cabals, recarregar els aqüífers i mantenir les zones humides. Gairebé una quarta part del total de l'aigua destinada a l'ús ambiental durant el 2016 es va destinar a usos recreatius (5,2 hm³). Seguidament, i en ordre decreixent, es va destinar a usos industrials (3,9 hm³), agrícoles (2 hm³) i finalment a usos municipals (0,4 hm³).

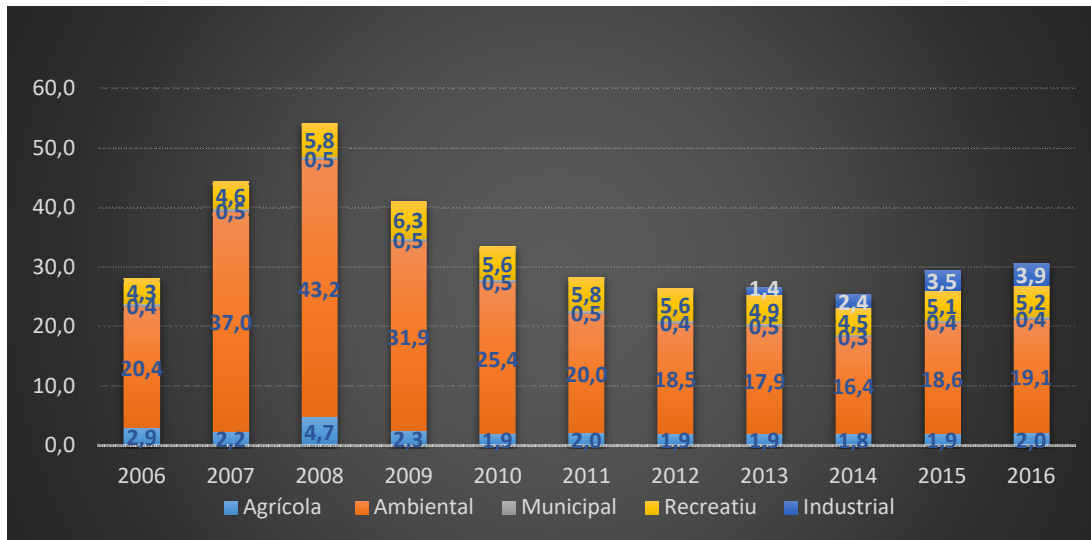


Figura 6: volums (hm^3) i usos de l'aigua reutilitzada a Catalunya durant el període 2006-2016.

A la figura 6, també podem observar que durant els anys 2007 i 2008, i coincidint amb una època de rigorosa sequera, van augmentar els volums d'aigua regenerada a Catalunya amb valors de $44,3 \text{ hm}^3$ i 54 hm^3 respectivament.

Per tant, si la demanda total d'aigua a Catalunya és de $3.123 \text{ hm}^3/\text{any}$ (dades 2008) es reutilitza menys d'un 1 % de l'aigua consumida (1,7 % durant l'any de sequera 2008). Per aquest motiu, també es promou la utilització d'aigua regenerada per a usos que no requereixin de la qualitat d'aigua potable de manera que l'aigua reutilitzada acabi esdevenint així una font substitutòria al recurs natural.

Malgrat tot, per poder-la reutilitzar cal assegurar-nos que no representa un risc ni per a la salut pública ni per al medi ambient. Per tant, en aquest punt cal aplicar tecnologies que permetin eliminar de l'aigua tant els contaminants químics com els biològics, i els tractaments electroquímics es presenten com una alternativa als mètodes convencionals.

1.3 Sostenibilitat del recurs hídric

L'aigua és un recurs limitat que cal preservar. La seva gestió ha de ser sostenible, és a dir, ha de permetre un equilibri entre la demanda existent, i previsible, i la disponibilitat del recurs en el temps, tot garantint el manteniment dels cabals ecològics i la qualitat de l'aigua necessària per al funcionament dels ecosistemes aquàtics. Per tant, a més de fer-ne un ús responsable perquè cada vegada som més habitants i la utilitzem per usos molt diferents hem de retornar-la al medi lliure dels contaminants que ha anat adquirint al llarg del seu cicle d'ús.

A tot això hem d'afegir-hi que, com a conseqüència del canvi climàtic, cada vegada hi ha més episodis de sequera i per tant, creix la importància d'aconseguir sistemes més eficients en la descontaminació de l'aigua perquè aquesta pugui tornar a entrar en un nou cicle d'ús sense que s'hi vagin concentrant contaminants.

Del total de l'aigua que hi ha al planeta, un 97,5 % és salada i només un 2,5 % és aigua dolça (fig. 7). A la vegada, aproximadament un 70 % d'aquesta aigua dolça es troba en glaceres i capes polars, un 29 % és aigua subterrània (aquífers) i menys d'un 1% és aigua dolça superficial. L'aigua dolça superficial i la dels aquífers és la més accessible, per això és la que utilitzem per fer-la apta per al consum humà. La contrapartida és que aquesta proximitat fa que, l'aigua dolça superficial, sigui un recurs fàcilment contaminable. D'aquesta aigua superficial en trobem un 87 % formant llacs, un 11 % pantans i un 2 % rius. Per tant, es calcula que només un 0,007 % de l'aigua que hi ha al nostre planeta es pot destinar al consum humà (Generalitat de Catalunya. Departament de Territori i Sostenibilitat, 2017).

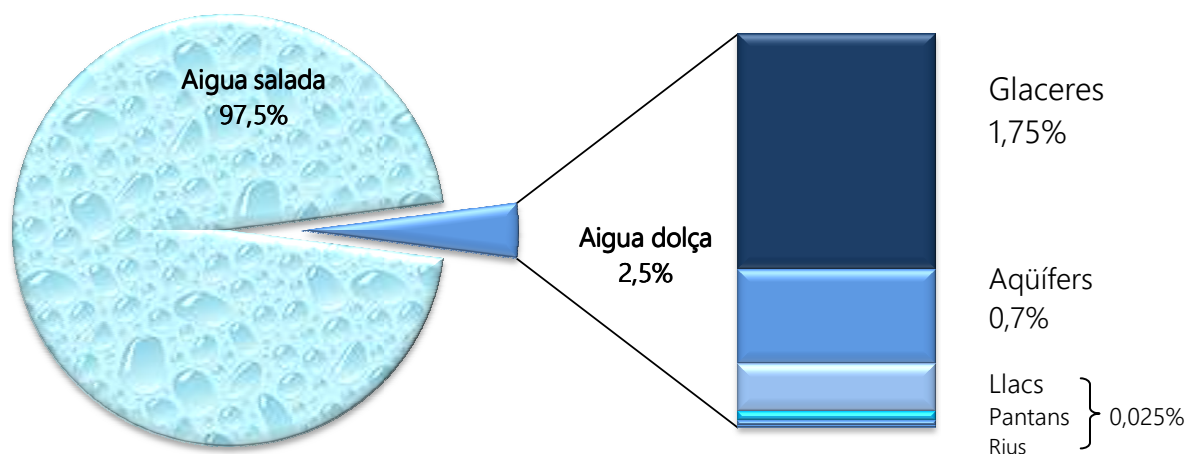


Figura 7: Distribució de la massa d'aigua al planeta

En concret, a Catalunya, el clima mediterrani es caracteritza perquè s'alternen llargs períodes de sequera, i falta de pluges, amb altres episodis de pluges intenses i de curta durada. Això fa que sigui un país amb recursos hídrics limitats i que l'aigua de les conques internes catalanes sigui insuficient. Per exemple, al 2008 la demanda total d'aigua a Catalunya, segons dades de l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA), va ser de 3.123 hm³/any. D'aquest total, un 38 % (1.186 hm³/any) es consumien de les conques internes catalanes, mentre que el restant 62 % (1.937 hm³/any) era demandat des de les conques intercomunitàries. Aquesta manca d'aigua fa que, quan es donen períodes de poca pluja, s'apliquin restriccions que fan que el govern de la Generalitat, mitjançant l'Agència Catalana de l'Aigua, dugui a terme una planificació de l'aigua centrada en una gestió flexible dels recursos hídrics, el foment de la cultura de l'estalvi i la preservació dels nostres ecosistemes aquàtics.

De la demanda total d'aigua per al conjunt de Catalunya durant el 2008, que com s'ha comentat va ser de 3.123 hm³/any, els usos urbans van representar un 27,4 % (856 hm³/any) repartits entre l'ús domèstic i l'ús industrial i, els usos de tipus agrari van representar un 72,6 % (2.267 hm³/any) repartits entre el reg agrícola i el consum ramader, tal i com queda reflectit a la figura 8. Val a dir, que segons l'informe anual de

medi ambient a Catalunya del 2015, que són les darreres dades de què es disposa, aquests percentatges es mantenen (Generalitat de Catalunya. Departament de Territori i Sostenibilitat, 2016).

Amb aquestes dades, deduïm que un percentatge elevat de l'aigua, al final del seu cicle d'ús, presentarà un elevat grau de contaminació degut a l'activitat antropogènica a la que haurà estat exposada i és molt important poder disposar de sistemes eficients de desinfecció/descontaminació perquè, com veurem més endavant, els sistemes actuals presenten mancances per alguns d'aquests contaminants. Per tant, ens cal conèixer quins contaminants hi ha a l'aigua i com els afectarà els mètodes utilitzats.

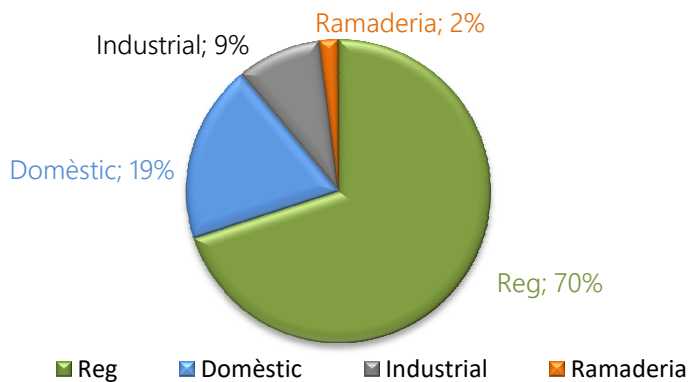


Figura 8: Usos de l'aigua a Catalunya al 2008

1.4 Contaminants de l'aigua

L'aigua, al llarg del seu cicle, va acumulant contaminants físics, químics i/o microbiològics.

A Catalunya, a través del Programa de Sanejament de les Aigües Residuals Industrials (PSARI, 2003), es va establir un nou model de relació entre les administracions i les indústries en l'àmbit dels abocaments tot plantejant la reducció de càrrega contaminant abocada tant a la llera com al sistema de sanejament per tal de no condicionar el bon funcionament de les depuradores públiques. Per aquest motiu, a nivell municipal, existeixen ordenances que regulen els abocaments industrials a la xarxa de clavegueram tot exigint sistemes de pretractament perquè l'abocament compleixi una sèrie de límits i característiques relacionades amb la temperatura, la conductivitat, les matèries en suspensió, la demanda química d'oxigen, el fòsfor total, el ferro i els nitrats entre molts d'altres. Tant els pretractaments de les indústries com els tractaments de les estacions depuradores d'aigües residuals s'apliquen amb l'objectiu d'eliminar qualsevol efecte tòxic, crònic o agut, que pogués afectar al personal de les instal·lacions de sanejament, a la mateixa instal·lació de sanejament, a la llera receptora i a la salut pública en general.

En base a les Directives 91/271/CEE sobre el tractament d'aigües residuals urbanes i la Directiva 2000/60/CE per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües, les estacions depuradores en servei a Catalunya garanteixen un

adequat retorn al medi de les aigües prèviament utilitzades, evitant així el deteriorament de les masses d'aigua que és un principi bàsic de la Directiva marc de l'aigua.

Amb aquest objectiu, es va donar un impuls estratègic al Pla de sanejament per dotar el país de les infraestructures de sanejament necessàries per garantir el tractament correcte de les aigües residuals urbanes. Així, podem parlar del projecte Horitzó 2021 mitjançant el qual a més de les depuradores que ja hi ha en servei i en construcció, l'Agència Catalana de l'Aigua treballa, a través del segon escenari del Pla de gestió de l'aigua a Catalunya (Pla de gestió del districte de conca fluvial 2016-2021), per tancar el cicle i garantir el 100% del tractament de les aigües residuals dels municipis petits o nuclis pendents. En aquest sentit, hi ha previstes prop de 1.000 actuacions (noves depuradores, col·lectors, etc.) que garantiran el sanejament al total de la població de Catalunya.

Actualment, el 97 % de la població catalana rep el correcte tractament de les aigües residuals a través de 516 EDAR que aboquen aproximadament 700 hm³ d'aigua depurada al medi.

La reutilització, de manera directa o indirecta, de l'aigua procedent de les EDAR i abocada al medi permet garantir la qualitat i la quantitat d'aigua disponible sense dependre de l'estacionalitat del recurs.

Com a reutilització indirecta s'entén l'abocament de l'aigua depurada, procedent de l'EDAR, aigües amunt abans del punt de captació. D'aquesta manera, queda diluïda amb l'aigua del riu i, aigües avall tornarà a ser captada per a aprofitaments urbans, agrícoles i/o industrials. Aquesta reutilització indirecta suposa aproximadament el 24 % del volum d'aigua depurada, és a dir, ±160 hm³/any.

La reutilització directa suposa l'ús directe dels efluents de les depuradores sense que hi hagi un abocament al medi o bé una dilució en el curs natural del riu com en el cas anterior, sinó que aquí es fa arribar l'efluent directament al punt d'ús a través de conductes específics. Però per poder reutilitzar aquesta aigua cal que es compleixi amb les exigències de qualitat marcades per normativa mitjançant el Reial Decret 1620/2007, de 7 de desembre, pel qual s'estableix el règim jurídic de la reutilització d'aigües depurades. Aquesta normativa estableix els paràmetres que haurà de complir l'aigua reutilitzada que seran diferents segons l'ús a què estigui destinada. Aquests paràmetres que haurà de complir l'aigua regenerada, seran més o menys restrictius per evitar riscos per a la salut i per assegurar que l'aigua sigui retornada en condicions adients per a la preservació del medi ambient i lliure de contaminants biològics i/o químics que el puguin afectar.

La naturalesa d'aquesta contaminació està lligada a la procedència de l'aigua. A la taula 2 es relaciona la fracció de residu amb els potencials perills per a la salut que té associats.

Per exemple, si només tenim en compte les excretes humanes hi trobem associats només potencials perills biològics, en canvi, en les aigües residuals domèstiques hi associarem potencials perills biològics, físics i químics, com per exemple els

medicaments abocats a la llar. L'aigua residual industrial també té associat un potencial perill químic que inclou també la presència de metalls pesats. Tot i així, cal tenir en compte que la magnitud dels perills potencials associats a les aigües residuals industrials pot variar àmpliament i s'hi poden incloure també perills biològics com són els microorganismes patògens (Thompson *et al.*, 2007).

Taula 2: fraccions de residus i potencials perills per a la salut. Adaptació de l'OMS, 2016 - Planificació de la seguridad del saneamiento: manual para el uso y la disposición seguros de aguas residuales, aguas grises y excretas.

	COMPONENTS DE RESIDUS								
	Potencials perills biològics					Potencials perills químics		Potencials perills físics	
	Virus	Bacteris	Protozous	Helmints	Malalties relacionades amb vectors	Substàncies químiques tòxiques	Metalls pesats	Objectes punxants-tallants	Material inorgànic
Fraccions de residus líquids									
Excretes diluïdes (humanes o animals)	X	X	X	X					
Orina (humana o animal)	X	X	X	X					
Aigües residuals domèstiques	X	X	X	X	X	X		X	X
Aigües de pluja	X	X	X	X	X	X	X	X	
Aigües fluvials	X	X	X	X	X	X	X		
Aigües residuals industrials						X	X		

A més, en general, les aigües residuals de procedència domèstica tenen una composició relativament estable on hi trobarem un alt contingut de matèria orgànica i de sòlids en suspensió a més de fosfats i nitrogen provinents de l'ús de detergents domèstics. En canvi, les aigües residuals industrials presentaran característiques molt diverses segons l'activitat industrial, i fins i tot, segons el moment del dia hi haurà variacions del cabal i de les característiques d'aquest en funció de l'activitat que s'estigui donant a cada moment, com passa, per exemple en una indústria dedicada a la producció de formatges. En aquests tipus d'indústria, es consumeixen grans quantitats d'aigua ja que es generen uns 10 L d'aigua residual per a cada litre de llet processada (Balannec *et al.*, 2005). Així mateix, aquesta aigua residual presentarà concentracions molt elevades de matèria orgànica (sobretot lactosa, proteïnes i greixos), de sals (García-García *et al.*, 2015) i la seva microbiota també serà diferent on predominaran els bacteris de l'àcid làctic, per tant, caldrà aplicar un pretractament abans d'abocar-la a la xarxa de clavegueram.

1.4.1 Contaminació microbiològica a l'aigua

A les aigües residuals urbanes s'hi detecten microorganismes de diferents tipus; bacteris, virus i protozous, així com també metazous. La majoria dels microorganismes

patògens presents en les aigües de rius, llacs i fins i tot aigües marines, com *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium* o *Escherichia coli* enterotoxigènica procedeixen d'aigües residuals amb contaminació fecal d'origen humà o animal. La concentració d'aquests microorganismes estarà en funció del reservori humà o animal, de la seva dilució a l'aigua i de la seva supervivència en el medi. Molts d'ells són patògens que causen malalties a l'ésser humà, que els excreta al medi i, mitjançant la transmissió fecal-oral, podran tornar a infectar un nou individu. Per tant, l'aigua residual urbana pot esdevenir una mostra representativa dels microorganismes circulants per una determinada població. D'altres microorganismes, patògens o no, són presents a l'aigua perquè hi arriben a través del lixiviat dels sòls, arrossegats per l'aigua de pluja, perquè són abocats per la indústria o bé perquè formen part de la microbiota humana.

Els microorganismes que són excretats per la població presenten patrons similars de concentració a l'aigua residual. A la taula 3 queden reflectides les concentracions mitjanes d'aquests organismes que trobem en 1 litre d'aigua residual. Les concentracions més altes de bacteris les trobem en els coliformes termotolerants que presenten una concentració d'entre 10^8 i 10^{10} ufc/L, i en el cas dels virus, els més nombrosos són els virus entèrics amb concentracions de 10^5 - 10^6 unitats infectives per litre.

Taula 3: Concentració de microorganismes excretats a l'aigua residual urbana (per litre) i concentració estimada de patògens en femta d'individus infectats (per gram). Font: OMS 2006.

Organisme	Concentració en aigua residual (per litre)	Concentració en femta d'individus infectats (per gram)
Bacteris		
Coliformes termotolerants	10^8 - 10^{10}	10^5 - 10^{11}
<i>Campylobacter jejuni</i>	10 - 10^4	10^6 - 10^9
<i>Salmonella</i> spp	1 - 10^5	10^4 - 10^8
<i>Shigella</i> spp	10 - 10^4	10^7
<i>Vibrio cholerae</i>	10^2 - 10^5	10^7
Helmints		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 - 10^3	1 - 10^5
<i>Ancylostoma duodenale</i> / <i>Necator americanus</i>	1 - 10^3	ND*
<i>Trichuris trichiura</i>	1 - 10^2	10^3 - 10^4
Protozous		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1 - 10^4	10^7 - 10^8
<i>Entamoeba histolytica</i>	1 - 10^2	10^5 - 10^8
<i>Giardia intestinalis</i>	10^2 - 10^5	10^5 - 10^8
Virus		
Virus entèrics	10^5 - 10^6	10^4 - 10^9
Rotavirus	10^2 - 10^5	10^7 - 10^{11}

*ND, no hi ha dades

En aquesta mateixa taula també trobem la concentració estimada de patògens que hi ha en cada gram de femta quan els individus estan infectats (OMS, 2006).

Així mateix, s'ha observat certa estacionalitat per part d'alguns d'aquests microorganismes com per exemple els rotavirus, que presenten un pic a l'hivern (Parashar *et al.*, 1998).

A banda dels microorganismes patògens d'origen humà, a l'aigua residual, també en podem trobar d'altres que hi poden haver arribat per altres vies, que no estan associats a la contaminació fecal de l'aigua, però que també poden causar malalties a la població. Així, a l'aigua també s'hi troben microorganismes autòctons com *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Aeromonas*, *Microcystis* i protozous com *Cryptosporidium*, o *Acanthamoeba* que poden ser infecciosos o toxigènics. Les aportacions de matèria orgànica o els canvis de temperatura o de pH causats per les aportacions d'aigües residuals poden afavorir la seva multiplicació i la seva capacitat d'infectar, de produir toxines o de transportar bacteris patògens.

En aigües residuals industrials poden existir altres substàncies i/o microorganismes a una concentració suficientment elevada per poder modificar significativament la composició de l'aigua residual en comparació amb la que habitualment arriba a l'Estació d'Aigua Residual Urbana.

Conseqüències de la contaminació microbiològica de l'aigua per a la salut pública

Actualment, al món, 3 de cada 10 persones (2100 milions de persones) no tenen aigua potable disponible a casa seva i 6 de cada 10 (4500 milions) no disposen d'un sanejament segur. Aquestes dades són extretes de l'informe de l'OMS i la UNICEF que porta per títol "Progressos en matèria d'aigua potable, sanejament i higiene: informe d'actualització de 2017 i avaluació dels Objectius de Desenvolupament Sostenible" que presenta la primera avaluació mundial dels serveis d'aigua potable i sanejament gestionats de "forma segura".

Com a conseqüència d'aquesta contaminació, en tot el món, es donen uns 1700 milions de casos de malalties diarreiques infantils anuals, que ocasionen la mort de 525.000 nens i per tant, representen la segona major causa de mort en nens menors de cinc anys (OMS – fitxa de malalties diarreiques. Actualitzada el 2 de maig de 2017). Aquestes morts es podrien prevenir mitjançant l'accés a l'aigua potable i a adequats serveis de sanejament i higiene.

A la taula 4 es fa referència a la mitjana mundial d'incidència de malaltia diarreica, i veiem que en la primera franja d'edat, de 0 a 4 anys, és on trobem una major incidència. La taula també ens mostra que la malaltia diarreica també té incidència en les regions desenvolupades, encara que aquesta és més baixa que la que trobem en les regions en desenvolupament.

Taula 4: Incidència de la malaltia diarreica per persona i per any al 2000, per regió i per edats. WHO 2006.

Regió	Incidència malaltia diarreica 0-80+ anys	Incidència malaltia diarreica 0-4 anys	Incidència malaltia diarreica 5-80+ anys
Regions desenvolupades	0,2	0,2-1,7	0,1-0,2
Regions en desenvolupament	0,8-1,3	2,4-5,2	0,4-0,6
Mitjana mundial	0,7	3,7	0,4

Tot i que a Catalunya tenim accés a l'aigua potable i disposem d'un sistema de sanejament adequat, durant el 2015, es van declarar 8.705 casos d'enteritis provocats per microorganismes (taula 5), tot i que a la taula no s'especifica si la font d'infecció va ser l'aigua, els aliments o bé va ser una transmissió persona a persona.

Taula 5: Microorganismes notificats al SNMC durant l'any 2015 causants d'enteritis per sexe i grup d'edat (Ciruela *et al.*, 2017).

Entitat clínica/ Microorganisme	Total	Sexe			Grup d'edat											
	Núm. casos	♂	♀	NC	< 1mes	1-11 mesos	1-4 anys	5-9 anys	10-14 anys	15-19 anys	20-19 Anys	30-39 anys	40-49 anys	50-59 anys	>60 anys	NC
Enteritis	8.705	4.896	3.804	5	52	1.297	3.723	1.101	400	136	286	271	262	242	915	20
Adenovirus	418	238	179	1	5	114	250	34	6	4	2	0	0	0	2	1
<i>Campylobacter coli</i>	203	113	90	0	0	16	53	27	12	4	13	16	9	9	44	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	3.788	2.185	1.603	0	15	473	1.593	521	197	91	150	113	120	112	395	8
<i>Campylobacter</i> (altres espècies/NC)	243	140	103	0	0	19	93	40	17	3	9	3	12	12	34	1
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigènica	44	22	22	0	0	0	7	0	2	2	5	13	5	5	5	0
Rotavirus	1.709	954	752	3	31	581	951	64	14	6	5	8	9	4	29	7
<i>Salmonella</i> no tifòdica	2.164	1.144	1.019	1	1	92	765	400	148	25	72	84	84	95	395	3
<i>Shigella flexneri</i>	56	49	7	0	0	0	2	3	0	1	15	14	15	1	5	0
<i>Shigella sonnei</i>	51	32	19	0	0	0	3	7	2	0	11	17	7	2	2	0
<i>Shigella</i> (altres espècies/NC)	14	12	2	0	0	0	2	2	0	0	3	3	0	2	2	0
<i>Vibrio cholerae</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	3	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10	5	5	0	0	2	3	3	1	0	0	0	1	0	0	0

Aquestes declaracions es van fer a través del sistema de notificació microbiològica de Catalunya (SNMC), que era voluntari i que va passar a ser obligatori amb la publicació del Decret 203/2015, de 15 de setembre, pel qual es crea la Xarxa de Vigilància Epidemiològica i es regulen els sistemes de notificació de malalties de declaració obligatòria i brots epidèmics. Actualment, el L'SNMC recull les declaracions dels microorganismes que tenen transcendència en salut pública.

Durant el 2015, les entitats clíniques declarades més freqüents van ser les infeccions de vies respiratòries (35,5 %) seguides de les enteritis (32,6 %) (Ciruela *et al.*, 2017).

Entre els microorganismes declarats dins del grup de les enteritis notificades a Catalunya durant aquest any 2015, trobem en els primers llocs (i per ordre de casos); *Campylobacter* (4.234 casos), *Salmonella* (2.164 casos) i Rotavirus (1.709 casos). Aquests tres gèneres representen el 93% del total d'enteritis declarades. Tal com podem observar en la taula 5, els nens són els més afectats per les enteritis, sobretot el grup d'edat d'1 a 4 anys on s'hi concentren el 42,76% del total dels casos d'enteritis declarats durant l'any 2015. Percentatge que augmenta fins al 58,26% quan es té en compte el grup d'edat comprès entre 0 i 4 anys.

El Servei de Prevenció i Control de Malalties Emergents, depenent de la Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, publica anualment un informe sobre els microorganismes declarats pel SNMC a Catalunya. Per a cada entitat clínica es tenen en compte els microorganismes estudiats i se n'analitzen les variables següents: edat, sexe, setmana epidemiològica del diagnòstic, detall del microorganisme (espècie, serogrup, serotip), mostres i tècniques diagnòstiques. Les darreres dades publicades són les de l'any 2015 i inclouen un gràfic d'evolució anual, des del 1996 fins al 2015, de la incidència de cada microorganisme. L'evolució durant aquests anys per *Campylobacter*, *Salmonella* i Rotavirus es mostra a la figura 9.

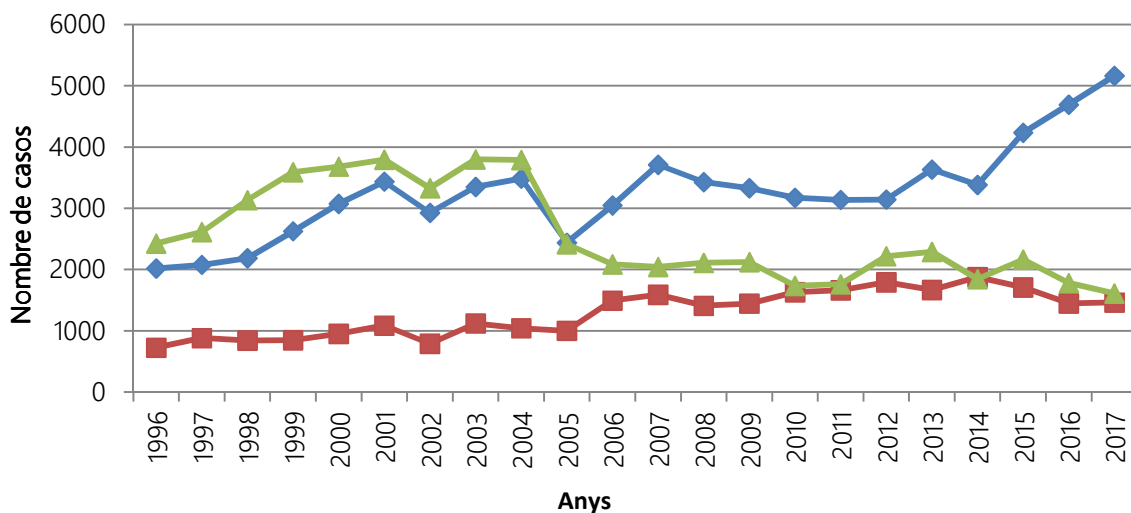


Figura 9: Evolució anual 1996-2017 per *Campylobacter* ◆, Rotavirus ■ i *Salmonella* ▲ causants d'enteritis a Catalunya. Adaptació segons les dades de l'Informe sobre els microorganismes declarats durant l'any 2015 del Servei de Prevenció i Control de Malalties Emergents i el Butlletí Epidemiològic de Catalunya (Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública).

A diferència del què trobem a Catalunya, l'Organització Mundial de la Salut especifica que les dues causes més freqüents de diarrea moderada o greu en països de baixos ingressos són els Rotavirus i *Escherichia coli*, tot i que altres patògens com *Cryptosporidium* i *Shigella* poden ser importants. Per tant, s'han de tenir en compte etiologies específiques de cada lloc.

Els microorganismes índex i els indicadors de procés

Tots aquests microorganismes són biològicament i estructuralment diferents i, per tant, l'efectivitat de la seva inactivació dependrà del tractament que els apliquem (Cervero-Arago *et al.*, 2015). De la mateixa manera, també haurem de tenir en compte aquestes diferències a l'hora d'escollir els microorganismes índex o indicadors de procés més adequats per poder monitoritzar la qualitat de l'aigua segons la tècnica aplicada.

La presència a l'aigua d'un microorganisme índex, ens indica que també podem trobar-hi microorganismes patògens amb els quals està relacionat ecològicament. Però, per poder validar una determinada metodologia hem d'utilitzar microorganismes indicadors que estan relacionats amb el procés i posen de manifest possibles deficiències en aquest. És a dir, podem valorar la qualitat d'una aigua tenint en compte grups de microorganismes com els coliformes fecals, però només mirant aquests indicadors, no podem assegurar-ne la seva qualitat pel què fa a virus, protozous o bacteris no fecals (Ashbolt *et al.*, 2001; Figueras i Borrego, 2010; Payment i Locas, 2011). Això ens ha de fer veure que és discutible valorar la qualitat microbiològica de l'aigua sense tenir-los en compte a tots, i un clar exemple és el brot de gastroenteritis per norovirus en aigua andorrana embotellada de la que hem parlat anteriorment.

Així mateix, altres indicadors tals com els bacteris heteròtrofs, enterococs, bacteriòfags i adenovirus també s'haurien de tenir en compte segons el procés.

El fet que les normatives estatals aplicables a l'aigua potable com el Real Decret 140/2003, de 7 de febrer (modificat actualment pel RD 902/2018, de 20 de juliol) només incloguin *E. coli*, enterococs i clostridis com a paràmetres microbiològics indicadors fa que s'estigui subestimant el risc biològic de l'aigua al no detectar la presència de determinats microorganismes patògens (Carter *et al.* 2005, Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Costán-Longares *et al.* 2008, Agulló-Barceló *et al.* 2013) com ara *Shigella*, *Cryptosporidium* o els norovirus causants d'importants brots com s'ha comentat anteriorment.

Malauradament, no hi ha un organisme índex perfecte per a les aigües residuals que ens indiqui la presència de patògens bacterians no fecals, virus i protozous ja que les concentracions dels indicadors fecals sovint no es corresponen amb les concentracions de tots aquests organismes. Per tant, hauríem de tendir a determinar microorganismes indicadors de procés que ens avaluin l'efectivitat de cada pas tot tenint en compte el mètode utilitzat.

Els microorganismes patògens que trobem més freqüentment en les aigües residuals pertanyen als 4 grups principals: bacteris, virus, protozous i helmints per tant, aquests microorganismes són els que tindrem en compte a l'hora d'avaluar nous sistemes de desinfecció de l'aigua residual.

1.4.1.1 Bacteris patògens a l'aigua

Alguns dels bacteris patògens que trobem a l'aigua formen part de la microbiota intestinal, per tant, seran excretats a les aigües residuals urbanes. La concentració d'aquests patògens en les aigües residuals estarà relacionat amb la salut de la població. El mateix passarà amb els virus. La taula 6 mostra els principals bacteris patògens presents a les aigües.

Tal com hem comentat, *Campylobacter* i *Salmonella* són els principals causants d'enteritis a Catalunya sumant, entre ambdós microorganismes, gairebé el 70 % de les enteritis declarades a Catalunya durant el 2017.

Taula 6: Principals bacteris patògens presents en l'aigua, les malalties que causen, la seva importància en salut (tenint en compte la gravetat de l'impacte i la seva associació amb brots) i la persistència en aigua referida al període de detecció de l'estadi infecció en aigua (Curta = fins a 1 setmana; Moderada = d'1 setmana a 1 mes; Llarga; més d'1 mes) (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

Bacteri patògen	Malaltia associada	Importància en la salut	Persistència en aigua
<i>Campylobacter</i> spp <i>Campylobacter jejuni</i>	Diarrea, gastroenteritis	Alta	Moderada
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Diarrea, artritis reactiva	Alta	Llarga
<i>E. coli</i> , en particular enterohemorràgica i altres com enteropatògena, enterotoxigènica i enteroinvasiva.	Diarrea aguda, diarrea sanguinolenta i gastroenteritis	Alta	Moderada
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis	Alta	Es pot multiplicar
<i>Legionella pneumophila</i> i bacteris relacionats	Malaltia respiratòria aguda, pneumònia (legionel·losis)	Alta	Es pot multiplicar
Mycobacteria no-tuberculosa	Malaltia pulmonar, infecció de pell	Baixa	Es pot multiplicar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infeccions sobre els pulmons, les vies urinàries i els ronyons. Pot causar inflamació i sèpsia.	Moderada	Es pot multiplicar
<i>Salmonella enterica</i> serotip Typhi	Febre tifoidea, paratifoidea i altres salmonel·losis	Alta	Moderada
Altres salmonel·les	Gastroenteritis, artritis reactiva	Alta	Es pot multiplicar
<i>Shigella</i> spp	Disenteria bacil·lar o shigel·losis	Alta	Curta
<i>Vibrio cholerae</i>	Gastroenteritis, còlera	Alta	De curta a llarga
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis crònica, malaltia ulcerosa i càncer gàstric	Baixa	Moderada

Altres microorganismes, com *Shigella*, s'han vist implicats en brots puntuals, però amb un gran nombre d'afectats, com el que va tenir lloc a l'agost de 2002 a Santa Maria de Palautordera. Hi va haver 756 afectats per gastroenteritis aguda i en 181 dels casos es va

poder confirmar que l'agent causant era *Shigella sonnei*. Tot i que no es va poder esbrinar exactament com va passar, està clar que les aigües de la captació es van barrejar amb aigües residuals. Tot això va coincidir amb un episodi de pluges intenses amb un augment de la terbolesa de l'aigua que va fer ineficient el sistema de cloració, i tenint en compte que estava contaminada, va aparèixer el brot (Arias *et al.*, 2006).

En general, els bacteris heteròtrofs que creixen a l'aigua de consum humà són més resistents a la desinfecció en comparació amb les soques bacterianes de laboratori com *E. coli*. Apart d'això, certs bacteris, mostren una alta resistència al clor lliure. *Bacillus* i *Clostridium* per exemple, són gèneres bacterians altament resistents al clor especialment quan es troben disseminats en forma d'espores així com *Mycobacterium* i *Nocardia* (Norton *et al.* 2004). Apart d'aquests, un estudi va demostrar que, en general, els bacteris Gram positius, eren més resistents a l'efecte del clor que els Gram negatius degut a la composició de la seva paret cel·lular (LeChevallier *et al.* 2004).

D'altra banda, també cal tenir en compte la càrrega bacteriana de les aigües residuals provinents de la indústria alimentària, la qual serà més o menys perillosa en funció de l'activitat de l'empresa. En concret, l'aigua residual de la indústria formatgera presentarà una concentració elevada de bacteris làctics i heteròtrofs totals així com un alt contingut en matèria orgànica, presència d'olis i greixos i una elevada conductivitat per la presència del NaCl utilitzat per salar el formatge.

1.4.1.2 Virus a l'aigua

S'ha de tenir en compte que els virus humans majoritàriament tenen una ruta de transmissió fecal-oral i que les seves dosis infeccioses són generalment baixes. En aigües residuals s'ha trobat presència de virus entèrics que poden ser excretats per la femta i per l'orina tant d'individus sans com malalts (Fong i Lipp, 2005) i en períodes d'infecció aguda, la seva concentració en femta oscil·la entre 10^8 a 10^{11} partícules víriques per gram (Lee *et al.*, 2007).

La taula 7 mostra els principals virus patògens transmesos per l'aigua. Tots ells tenen una alta importància en salut degut al seu impacte i la seva associació amb brots. Així mateix, tenen una llarga persistència a l'aigua.

El problema d'aquests virus és que poden persistir als processos d'inactivació de les EDAR i que són relativament estables en el medi ambient sense que els afecti la temperatura ambiental o la radiació solar, i per tant, aquests processos habituals no són suficients per eliminar-los (Carter, 2005).

Els principals causants de gastroenteritis són rotavirus i norovirus, que a més, poden causar infecció a una mateixa persona diverses vegades al llarg de la vida.

Actualment, els norovirus són els principals agents de gastroenteritis aguda a Europa. És la segona causa més freqüent, després del rotavirus, de gastroenteritis greu en infants de menys de 5 anys, tant en països en vies de desenvolupament com en països desenvolupats. Els norovirus es propaguen a través dels aliments, principalment a través

de l'aigua, potable o no, contaminada. A destacar el brot de gastroenteritis transmès per consum d'aigua envasada, d'una deu d'Andorra, que va tenir lloc a l'abril de 2016 a Catalunya i que va afectar 4.136 persones (Blanco *et al.*, 2017).

Taula 7: Principals virus patògens presents en l'aigua, les malalties que causen, la seva importància en salut (tenint en compte la gravetat de l'impacte i la seva associació amb brots) i la persistència en aigua referida al període de detecció de l'estadi infecciosos en aigua (Curta = fins a 1 setmana; Moderada = d'1 setmana a 1 mes; Llarga; més d'1 mes) (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

Virus patògen	Malaltia associada	Importància en la salut	Persistència a l'aigua
Adenovirus	Gastroenteritis	Alta	Llarga
Enterovirus	Gastroenteritis	Alta	Llarga
Virus Hepatitis A	Hepatitis	Alta	Llarga
Virus Hepatitis E	Hepatitis infecciosa; avortament i mort	Alta	Llarga
Rotavirus	Gastroenteritis	Alta	Llarga
Sapovirus	Gastroenteritis viral aguda	Alta	Llarga
Astrovirus	Diarrea	Alta	Llarga
Norovirus	Gastroenteritis	Alta	Llarga

1.4.1.3 Protozous i helmints a l'aigua

L'aigua residual també conté una gran varietat de protozous patògens per a l'ésser humà (taula 8). Els patògens més freqüents són *Cryptosporidium*, *Giardia* i *Entamoeba histolytica*. Els agents infecciosos d'aquests paràsits són quists amb gran resistència a la desinfecció amb clor i als tractaments convencionals de l'aigua residual.

Un exemple és el brot massiu de criptosporidiosi que es va declarar a Milwaukee al 1993 amb 403.000 afectats i 69 morts per consum d'aigua contaminada. Els brots de transmissió hídrica poden afectar un gran nombre de persones. Després d'una forta precipitació es van concentrar una gran quantitat d'oocists de *Cryptosporidium* en la zona de captació d'aigua. Aquests oocists van superar el sistema de filtració d'una de les plantes de tractament d'aigua de la ciutat i van resistir al tractament amb clor de l'aigua. S'estima que la concentració d'oocists va ser de 6,7 a 13,2 oocists/100L (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Els brots de criptosporidiosi s'han relacionat, majoritàriament, amb beure o nedar en aigües contaminades. Un altre exemple és el brot notificat l'any 2003 en un hotel de Mallorca on 214 turistes britànics van quedar afectats per la contaminació de l'aigua de la piscina (Galmes *et al.*, 2003).

Taula 8: Principals protozous i helmints patògens presents en l'aigua, les malalties que causen, la seva importància en salut (tenint en compte la gravetat de l'impacte i la seva associació amb brots) i la persistència en aigua referida al període de detecció de l'estadi infecció en aigua (Curta = fins a 1 setmana; Moderada = d'1 setmana a 1 mes; Llarga; més d'1 mes). (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

Protozou patògen	Malaltia associada	Importància en la salut	Persistència a l'aigua
<i>Acanthamoeba</i> spp	Meningoencefalitis amèbica, queratitis, encefalitis	Alta	Es pot multiplicar
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiosi, diarrea	Alta	Llarga
<i>Cryptosporidium cayetanensis</i>	Diarrea	Alta	Llarga
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disenteria amèbica	Alta	Moderada
<i>Giardia intestinalis</i>	Diarrea	Alta	Moderada
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis amèbica primària	Alta	Es pot multiplicar en aigua tèbia
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosi, avortament, malformacions congènites	Alta	Llarga

En els darrers anys, també han augmentat molt els casos de queratitis provocades per amebes de vida lliure del gènere *Acanthamoeba*. Les amebes de vida lliure són patògens emergents que causen encefalitis mortals i queratitis sobretot en usuaris de lents de contacte (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

A banda de la patogenicitat d'algunes espècies d'amebes, també cal tenir present que, a més, moltes amebes poden establir relacions amb altres microorganismes, com els bacteris, proporcionant-los una major protecció respecte a les formes lliures. Un exemple seria la interacció que s'estableix entre *Legionella* i amebes de vida lliure que determinen una major resistència dels bacteris als tractaments amb clor o quan se'ls sotmet a temperatures elevades (Cervero-Aragó *et al.*, 2015).

A l'aigua residual també podem trobar-hi helmints, "cucs intestinals", com *Ascaris lumbricoidea*, *Trichuris trichuira*, *Ancylostoma duodenale* i *Necator americanus*. En aquest cas, tant els ous com les larves poden sobreviure al procés de tractament de l'aigua residual.

1.4.2 Contaminació química.

L'aigua també pot contenir contaminació química. Aquesta contaminació prové, principalment, de l'activitat industrial, agrícola i urbana. S'hi inclouen fàrmacs (com per exemple els antibiòtics), colorants, pesticides i una àmplia gama de productes industrials utilitzats en diferents sectors. A més, cal destacar els compostos organoclorats com a subproductes de la cloració de l'aigua de consum humà. Molts

dels contaminants orgànics són disruptors endocrins que poden tenir un efecte per a la salut a llarg termini però que al ser considerats contaminants emergents no tenen regulada la seva presència. A més de tots aquests contaminants, la contaminació química també pot fer referència a la presència d'anions inorgànics tòxics (com el nitrat) o cations de metalls pesants.

En el cas dels fàrmacs, per exemple, molts són excretats pels individus que els prenen i introduïts a la xarxa d'aigua residual a través de l'orina o la femta. D'altres hi arriben com a conseqüència d'una inapropiada eliminació dels medicaments quan, a la llar, aquests són abocats directament al clavegueram. També hem de tenir en compte els fàrmacs utilitzats en el bestiar que arriben a la xarxa d'aigua residual urbana.

L'impacte, tant a nivell ambiental com de salut pública, dels productes farmacèutics i dels productes de cura personal és tan gran que fins i tot formen part d'un grup anomenat PPCPs de l'anglès *pharmaceuticals and personal care products* (Kolpin *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2009). Els PPCPs inclouen: medicaments usats en medicina humana i/o animal, fragàncies, cosmètics, protectors solars, preparats nutricionals (com vitamines i vigoritzants) i agents de diagnòstic, majoritàriament, que poden arribar a l'aigua a través de les excrecions, dels residus hospitalaris i dels residus de fabricació de productes farmacèutics.

Tot i que els PPCPs s'han detectat en les masses d'aigua, no es coneixen amb detall els efectes que poden tenir aquestes substàncies en el medi ambient i en els éssers humans.

Per tant, a l'aigua podem trobar diversos tipus de contaminació: microbiològica, física (inclouria els canvis de T^a) i química.

1.5 Tractament d'aigües residuals

El sanejament de les aigües és un procés clau per garantir la qualitat de l'aigua, i disminuir riscos potencials per a humans, animals i ecosistemes a causa de la presència de contaminants químics i microbiològics, per tant, és important retornar al medi, i en condicions òptimes, l'aigua que hem utilitzat. S'ha de tenir en compte que l'aigua residual urbana i l'aigua residual industrial poden tenir una càrrega molt diferent que dependrà de la tipologia de la indústria.

Clàssicament, quan parlem de plantes de tractament d'aigua residual ens referim a l'aigua residual urbana. Aquestes plantes de tractament consten de diferents passos (figura 10). Habitualment segueixen un primer pretractament físic que consta de dos processos principals: un procés de desbast i filtració on l'aigua es fa passar per diverses reixes amb l'objectiu de separar els sòlids (troncs, pedres, ampolles, animals morts, draps, papers, taps, fulles) que arriben arrossegats per la pluja o tempestes. I seguidament es fa una decantació primària on l'aigua es deixa reposar perquè es dipositin les graves i sorres al mateix temps que els olis i greixos es concentren a la superfície des d'on es podran extreure. Per millorar les dues separacions simultànies

aquest procés és airejat. En aquest primer pas l'eliminació de microorganismes de l'aigua és molt baixa.

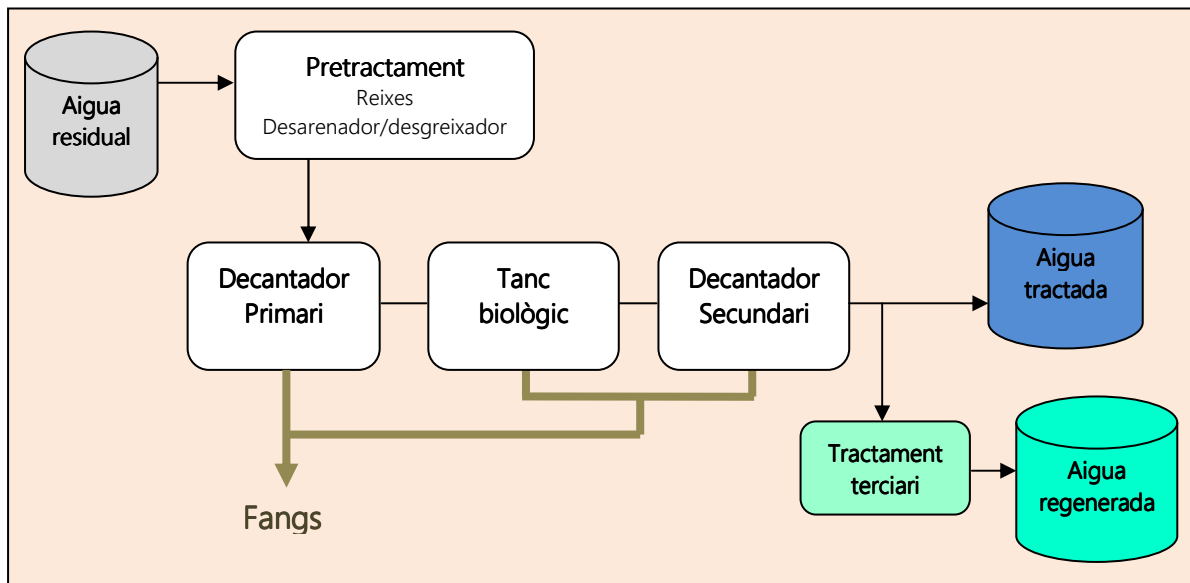


Figura 10: Esquema d'una planta depuradora d'aigua residual urbana (EDAR).

A continuació, es fa un tractament primari. En aquest pas, el material sòlid que no ha quedat retingut en el pretractament i la matèria orgànica sedimentable es disposen al fons i entren en la línia de fangs que tindrà un tractament específic per a la seva eliminació. Aquesta decantació natural de la matèria en suspensió es pot completar amb l'addició de coagulants químics que afavoriran la formació de flocs.

Posteriorment tindrà lloc el tractament secundari, un procés biològic semblant al que es donaria en el medi natural consistent en eliminar la matèria orgànica mitjançant una població específica de microorganismes (fangs actius). Normalment és un procés aerobi que té lloc en bioreactors airejats. Sovint, aquest tractament requereix grans àrees i temps de residència llargs. Posteriorment, l'aigua passa per un decantador. Els fangs són retornats cap al reactor biològic, tot i que una part és enviada cap a la línia de fangs per evitar l'augment de la biomassa i l'envelliment d'aquesta.

Línia de fangs. Els fangs recollits en els decantadors primari i secundari segueixen un procés d'espessiment abans d'entrar al digester anaeròbic per eliminar la matèria orgànica present. Aquest procés comporta la formació de gas metà, i d'altra banda, el fang digerit passarà per un procés de deshidratació. El destí definitiu pot ser a la construcció, l'agricultura o la jardineria.

En una EDAR, els PPCPs poden mineralitzar-se, no degradar-se, retenir-se parcialment en els fangs produïts o transformar-se en compostos intermedis que acabaran formant part de les masses d'aigua i/o dels sediments perquè els productes farmacèutics són un grup divers de productes químics, amb diferents propietats físiques i químiques que poden arribar a determinar l'eficàcia del tractament a què siguin sotmesos (Jelic *et al.*, 2011) per tant, el tractament d'eliminació pot variar significativament entre les diferents

estacions de tractament i fins i tot, podem trobar variacions dins d'una mateixa planta en períodes de temps diferents. (Vieno *et al.*, 2007).

S'ha de tenir en compte que el tractament que es porta a terme en una EDAR està ideat per a un tipus d'aigua residual; la d'origen urbà. En canvi, l'aigua residual de determinades indústries, tal i com ja s'ha comentat, requereix d'un tractament previ a l'abocament amb l'objectiu d'assimilar-se a l'aigua residual urbana, ja que en aquest punt, al tractar-se d'un procés biològic és on pot haver-hi alguna afectació al sistema segons els contaminants químics i orgànics que hi hagi a l'aigua. Aquest tractament previ podria ser electroquímic.

A tot això, cal afegir-hi que les aigües també poden contenir bacteris resistents als antibiòtics. En aquesta línia, els estudis de Rodríguez-Mozaz *et al.* (2015) posen en evidència que les EDAR no poden eliminar totalment els antibiòtics dels efluent urbans i, per tant, aquests són alliberats al medi ambient. L'activitat antropogènica afavoreix la presència d'antibiòtics a l'aigua de manera continuada, per la qual cosa, els ecosistemes aquàtics esdevenen un escenari ideal per a l'adquisició i propagació de gens de resistència a antibiòtics. Per tant, és necessari desenvolupar i implementar nous tractaments d'aigua residual que siguin capaços d'eliminar més eficientment aquests contaminants.

Actualment, les depuradores d'aigües residuals urbanes (EDAR) redueixen substancialment els contaminants des d'influent, produint efluent que són descarregats a rius o a mars. No obstant això, l'escassetat d'aigua juntament amb l'augment de la població i la intensificació de les activitats agrícoles i industrials han desencadenat el desenvolupament de mètodes eficients per obtenir aigua depurada o regenerada segura per a regs de cultiu, recàrrega d'aqüífers i producció d'aigua potable (Fernandez-Cassi *et al.*, 2016).

Processos de regeneració de l'aigua

Amb el tractament descrit l'aigua residual urbana es depura, però els tractaments terciaris s'apliquen amb l'objectiu de regenerar i reutilitzar les aigües de la depuradora. Per aquest motiu, s'ha de mantenir en bones condicions l'EDAR per garantir la qualitat de l'aigua d'entrada als sistemes de regeneració. El tractament terciari és un procés de desinfecció i eliminació de nutrients com ara nitrats i fosfats. Fins ara, el tractament terciari ha implicat majoritàriament mètodes de desinfecció com la cloració o la irradiació UV (Martinez-Huile i Brillas, 2008; Montemayor *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2013) seguits d'altres sistemes més naturals. Segons els usos a què es vulgui destinar l'aigua es seleccionaran unes tecnologies de tractament o bé unes altres.

Mitjançant la desinfecció, es redueix el nombre de microorganismes patògens fins a nivells prou baixos com per assegurar que no provocaran cap malaltia, però aquesta desinfecció, també ha d'ésser respectuosa amb el medi ambient. Actualment, la desinfecció més utilitzada és la cloració, però aquesta implica diversos inconvenients

com són l'emmagatzematge del Cl_2 i la formació de derivats del clor en l'aigua. Per solucionar aquest problema, s'han desenvolupat altres mètodes alternatius, per a la desinfecció de l'aigua, com són l'ozonització, la radiació ultra-violada i l'electroquímica (Gheraout and Gheraout, 2010).

- **Clor.** El clor és el biocida més utilitzat i conegut. La forma més activa és l'àcid hipoclorós que provoca alteracions físiques, químiques i bioquímiques a la paret cel·lular dels microorganismes. Pot travessar la paret cel·lular provocant canvis en la permeabilitat de la membrana. Una vegada destruïda aquesta, afecta a les funcions vitals de la cèl·lula causant-li la mort; interromp la fosforilació oxidativa, provoca canvis en l'activitat enzimàtica ja que oxida els grups sulfhidrils d'alguns enzims i afecta el DNA bacterià (McDonnell *et al.*, 1999). Un dels seus desavantatges, a més dels perills que suposa el seu emmagatzematge, és la formació de compostos organoclorats com a subproductes de la desinfecció com, per exemple, els trihalometans amb gran poder nociu tant pel medi ambient com per a la salut degut a les seves propietats cancerígenes (relacionades amb el càncer de bufeta) així com per determinats defectes de naixement en nadons de mares exposades. D'altra banda, si s'utilitza el seu principal derivat, l'hipoclorit sòdic, s'ha de tenir en compte que aquest es degrada amb el temps, quan es sotmet a la llum i que la seva efectivitat està relacionada directament amb el pH del medi, essent menys efectiu a pHs alts. Tampoc hem d'oblidar el mal gust i olor que confereix a l'aigua. El seu major avantatge és que és l'únic desinfectant que presenta propietats residuals que perduren al llarg del temps.
- **Ozó.** La inactivació per ozó s'atribueix a una reacció d'oxidació. En bacteris, el primer lloc que queda afectat és l'embolcall bacterià ja sigui a través de les glicoproteïnes o glicolípid. A més, l'ozó interromp l'activitat enzimàtica dels bacteris actuant sobre els grups sulfhidril de determinats enzims. Més enllà de la membrana cel·lular i la paret cel·lular, l'ozó pot actuar sobre el material nuclear dins de la cèl·lula. En el cas dels virus, el mecanisme és similar; l'ozó ataca primer la proteïna de la càpside, allibera l'àcid nucleic i inactiva l'ADN o ARN. En el cas de quistos de protozous, l'ozó inicialment afecta la paret fent-la més permeable, posteriorment, l'ozó aquós penetra en el quist i danya les membranes plasmàtiques, la penetració addicional de l'ozó eventualment afecta el nucli, els ribosomes i altres components ultraestructurals (USEPA, 1999)
La seva utilització és més cara que el clor, ha de ser generat in situ, desapareix ràpidament de l'aigua, sobretot si el pH i/o la T^a són elevats, i no queda residual a la xarxa. Com a avantatge, es pot dir que és més efectiu, que el clor en la inactivació de virus, *Cryptosporidium* i *Giardia* i que no forma subproductes halogenats (excepte quan hi ha presència de bromurs).
- **Radiació UV.** La radiació ultraviolada és absorbida pels nucleòtids i promou la formació d'unions entre nucleòtids adjacents creant molècules dobles o dímers

que impedeixen la duplicació de l'ADN i ARN (Jagger, 1967). Suposa costos elevats tant de capital inicial com d'energia. No hi ha acció residual. La seva eficiència depèn de la terbolesa i de la duresa de l'aigua. Per contra, no necessita emmagatzematge ni es produeixen subproductes potencialment perillosos.

- **Sistemes naturals: Llacunatge i aiguamolls.** Aquests sistemes es basen en les interaccions biològiques, químiques i físiques, que tenen lloc de manera natural en els ecosistemes aquàtics per eliminar, o transformar, microorganismes patògens, matèria orgànica, nutrients i sòlids en suspensió, entre d'altres.

Els sistemes de llacunatge, normalment estan constituïts per diversos tipus de llacunes segons l'oxigen de la massa d'aigua. L'ordre habitual comença en una llacuna anaeròbica, passant per una de facultativa i acabant en les llacunes de maduració que són aeròbiques. La depuració té lloc de manera natural mitjançant l'activitat metabòlica dels microorganismes i les algues (ACA, 2000). També hi ha eliminació dels microcontaminants orgànics a causa dels llargs temps de residència hidràulics. El principal inconvenient d'aquest mètode és l'espai físic del que requereix i també el temps de permanència de l'aigua (dies). L'avantatge és que no consumeix energia artificial, només necessiten energia natural: llum del sol i vent. Les llacunes artificials on es subministra oxigen si que requereixen d'energia artificial. Un exemple seria l'EDAR Reus on s'aplica aquest tractament terciari esdevenint una Estació Regeneradora d'Aigües residuals (ERA). L'aigua regenerada obtinguda és utilitzada per ús agrícola per la comunitat de regants del Molinet.

En el cas dels aiguamolls, la matèria orgànica es degrada per acció dels bacteris heteròtrofs, mentre que l'oxidació del nitrogen amoniacal a nitrats i nitrits la porten a terme bacteris nitrificants autòtrofs. Aquesta població bacteriana es desenvolupa en les zones aeròbiques que estan situades al voltant de les arrels i els rizomes. Aquests bacteris són els mateixos que es troben en els sistemes de depuració convencionals. En condicions anòxiques, i mitjançant bacteris heteròtrofs anaeròbics, es produeix la degradació anaeròbica i els nitrats es transformen a N_2 .

A aquests processos n'hi podriem afegir d'altres com: Processos de membrana controlats per la pressió: Microfiltració, Ultramicrofiltració, Nanofiltració i Òsmosi inversa. Adsorció en carbó actiu. Filtració amb llits de sorra, com per exemple la infiltració-percolació modificada. Tractaments electroquímics.

A la taula 9 es compara l'efectivitat en l'eliminació de coliformes fecals, virus i helmints entre un tractament de fangs actius i diversos sistemes terciaris. Com podem observar, els sistemes terciaris són més efectius, tot i que alguns dels tractaments requereixen de molt d'espai.

Taula 9: Efectivitat de diferents sistemes de tractament d'aigües residuals en l'eliminació de diversos microorganismes. (OMS, 2006)

Microorg.	Fangs actius	Llacunatge	Infiltració percolació modificada	Zones humides	Osmosi inversa/nanofiltració
Coliformes fecals	+	+++	+++	+++	+++
Virus	++	+++	+++	++	+++
Helmints	++	+++	+++	+++	+++

Per tant, al llarg del cicle de l'aigua haurem d'utilitzar mètodes de desinfecció que minimitzin els perills que representen, per a la salut pública i el medi natural, els contaminants de l'aigua. I aquests mètodes, a més de ser eficaços, hauran de ser respectuosos amb el medi ambient. En aquesta línia darrerament s'han començat a aplicar tractaments electroquímics pel manteniment de l'aigua de les piscines on s'afegeix NaCl.

Els experiments fets fins ara en desinfecció electroquímica, inclouen gran varietat d'elèctrodes, tant pel material amb què s'han fabricat com per la mida d'aquests, la qual cosa fa que els coneixements previs siguin poc clars. Per exemple, els estudis fets per Drees *et al.*, 2003, van donar com a resultat una taxa d'inactivació entre 2,1 i 4,3 vegades més gran pels bacteris *E. coli* i *P. aeruginosa* respecte a la inactivació de bacteriòfags MS2 quan treballava amb elèctrodes de Platí a 5 mA i 5 V. En canvi, els estudis de Kerwich *et al.*, 2005 conclouen que els bacteriòfags MS2 eren més sensibles al tractament electroquímic que no pas *E. coli* quan treballaven amb elèctrodes de Platí de 522 cm² a 5 V i en absència de clor.

Altres estudis també treballen en desinfecció d'aigües però amb presència de clor al medi com per exemple Nakajima *et al.*, 2004. En aquest cas, treballen amb aigua sintètica on s'ha afegit *P. aeruginosa*, *E. coli*, *L. pneumophila* o *S. aureus* i aconseguen la seva desinfecció després de 5 minuts a 30 mA amb ànode Pt-Ir i amb generació de 30 ppm de clor actiu. Aquest mateix autor, també va treballar amb espores de *B. subtilis*, i en aquest cas eren necessaris 30 minuts a 50 mA per inactivar una concentració inicial de 10⁶. Rajab *et al.*, 2015 també utilitza aigua sintètica amb *P. aeruginosa* i aconseguix una reducció de 6 log després de 5 min de tractament electroquímic amb dos elèctrodes de BDD amb 167 mA cm⁻² i amb generació de 20 ppm de clor actiu.

També Cano *et al.*, 2011 treballen amb una combinació de BDD/acer de 78 cm² de superfície i obtenen 3 log de reducció d'*E. coli* després de 120 minuts amb 1,3 A m⁻² o bé Polcaro *et al.*, 2007 que també aconseguix una reducció de 3 ordres d'*E. coli* després de 60 segons aplicant 10 mA a un volum de 250 mL i sense presència de clor.

Existeix poca bibliografia on es combinin diferents mètodes electroquímics. Un dels pocs exemples és la inactivació de coliformes en aigües urbanes utilitzant la combinació d'electro-coagulació amb electro-oxidació (Cotillas *et al.*, 2013) que treballa comparant els resultats dels ànodes de BDD i DSA en l'eliminació *E. coli* del medi. L'efectivitat d'un tractament seqüencial EC / EF només s'ha experimentat per a eliminar matèria orgànica,

terbolesa i sòlids suspesos d'aigües residuals tant sintètiques com urbanes (Daghrir i Drogui, 2013; Thiam *et al.*, 2014).

El treball d'aquesta tesi, s'ha desenvolupat en col·laboració amb el Dr. Enric Brillas i el Dr. Ignasi Sirés del Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona.

2. OBJECTIUS

Els mètodes electroquímics s'estan estudiant com a mètodes alternatius pel tractament de l'aigua amb la finalitat d'eliminar-ne els contaminants, tant els microbiològics com els químics, en qualsevol punt del cicle de l'aigua; abans d'entrar a una EDAR, de reutilitzar-la o bé de retornar-la al medi, ja que les tècniques de sanejament habituals tenen algunes mancances en aquest aspecte.

Centrant-nos en l'eliminació de contaminants microbiològics, l'**objectiu principal** d'aquesta tesi és contribuir a l'estudi de desinfecció d'aigües residuals, urbanes i industrials, mitjançant mètodes electroquímics individuals o combinats tot utilitzant ànodes de BDD, d'òxids de ruteni o d'òxids d'iridi i càtodes de difusió d'oxigen.

Per tal d'assolir l'objectiu principal el treball s'ha dividit en dues parts diferenciades on primer s'ha treballat amb aigua sintètica dopada amb bacteris i sota condicions controlades i en la segona part s'ha treballat amb dos tipus d'aigües residuals reals; una d'origen urbà i l'altra de la indústria de producció de formatge, els **objectius específics** que se'n deriven són els següents:

- Provar l'efecte de l'oxidació electroquímica en dissolucions sintètiques dopades amb una concentració coneguda de bacteris; estudiar la cinètica d'inactivació d'aquests bacteris tenint en compte la seva paret cel·lular i morfologia; i, comparar l'eficiència, en la desinfecció, de diferents elèctrodes com són els ànodes de BDD, d'òxid de ruteni i d'òxid d'iridi.
- Avaluar la inactivació bacteriana mitjançant l'oxidació electroquímica en presència o absència de producció d'espècies de clor actives, i en presència de matèria orgànica en el medi.
- Observar, mitjançant el microscopi electrònic de rastreig (MER), els bacteris abans i després del tractament d'oxidació electroquímica per veure'n els efectes sobre la morfologia cel·lular.
- Avaluar l'efecte dels tractaments electroquímics d'aigües residuals reals aplicant l'electrocoagulació i processos d'oxidació avançada, com ara, EF i FEF, aplicant diferents elèctrodes, per establir la combinació més adequada d'aquests processos i aconseguir la depuració de dos tipus d'aigües residuals reals, una d'origen urbà i l'altra d'una indústria de producció de formatge.
- Prioritzar els processos amb el mínim impacte perjudicial sobre el medi ambient.

3. INFORME DELS ARTICLES

3.1 Llista d'articles inclosos a la tesi

En el transcurs d'aquesta tesi, i amb els resultats obtinguts, s'han publicat els següents articles en els quals s'ha fonamentat la mateixa.

- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M. J., Brillas, E. & Araujo, R. M. (2016). **The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium.** Chemosphere, 163, 516-524.
- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Brillas, E. & Araujo, R. M. (2017). **Effect of electrogenerated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes.** Separation and Purification Technology, 178, 224-231.
- Anfruns-Estrada, E., Bruguera-Casamada, C., Salvadó, H., Brillas, E., Sirés, I. & Araujo R.M. (2017). **Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments.** Water Research 126 (2017), 450-459.
- Bruguera-Casamada, C., Araujo, R.M., Brillas, E. & Sirés, I. (2018). **Advantages of electro-Fenton over electrocoagulation for disinfection of dairy wastewater.** *Sotmès a Chemical Engineering Journal.*

3.2 Informe de coautoria

- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M. J., Brillas, E. & Araujo, R. M. (2016). **The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium.** Chemosphere, 163, 516-524.

El present article s'emmarca dintre el projecte CTQ2013-48897-C2-1-R del Ministeri d'Economia, Indústria i Competitivitat (MINECO, FEDER, EU).

La doctoranda ha participat activament en el disseny experimental juntament amb la resta de coautors, ha elaborat els protocols de treball i s'ha encarregat de tota la part experimental; des de la preparació dels cultius dels bacteris a estudiar, els reactius,... fins a la sembra i recompte dels bacteris abans i després de passar pel procés d'electrodesinfecció. Així mateix, ha realitzat la pre-preparació de les mostres pel seu anàlisi al microscopi electrònic i, n'ha analitzat els resultats juntament amb el segon i tercer autors, i la directora. Finalment, ha analitzat les dades i ha redactat el manuscrit de l'article sota la supervisió i revisió de la directora i la resta de coautors.

- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Brillas, E. & Araujo, R. M. (2017). **Effect of electrogenerated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the**

electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes. Separation and Purification Technology, 178, 224-231.

El present article s'emmarca dintre el projecte CTQ2013-48897-C2-1-R del Ministeri d'Economia, Indústria i Competitivitat (MINECO, FEDER, EU).

La doctoranda ha participat activament en el disseny experimental juntament amb la resta de coautors i s'ha encarregat de tota la part experimental; des de la preparació dels cultius dels bacteris a estudiar, els reactius,... fins a la sembra i recompte dels bacteris abans i després de passar pel procés d'electrodesinfecció. Finalment, ha analitzat les dades i ha redactat el manuscrit de l'article sota la supervisió i revisió de la directora i la resta de coautors.

- Anfruns-Estrada, E., Bruguera-Casamada, C., Salvadó, H., Brillas, E., Sirés, I. & Araujo R.M. (2017). **Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments.** Water Research 126 (2017), 450-459.

El present article s'emmarca dintre dels projectes CTQ2013-48897-C2-1-R i CTQ2016-78616-R del Ministeri d'Economia, Indústria i Competitivitat (AEI/FEDER, EU).

La doctoranda ha participat activament en el disseny experimental, juntament amb la resta de coautors, i també ha participat de la part experimental. Finalment, ha redactat totes les parts del manuscrit de l'article (excepte els resultats redactats pel primer autor i els paràgrafs relatius als protozous obra del tercer autor) sota la supervisió i revisió dels coautors quart i cinquè i de la directora.

- Bruguera-Casamada, C., Araujo, R.M., Brillas, E. & Sirés, I. (2018). **Advantages of electro-Fenton over electrocoagulation for disinfection of dairy wastewater.** Sotmès a Chemical Engineering Journal.

El present article s'emmarca dintre dels projectes CTQ2013-48897-C2-1-R i CTQ2016-78616-R del Ministeri d'Economia, Indústria i Competitivitat (AEI/FEDER, EU).

La doctoranda ha participat activament en el disseny experimental juntament amb la resta de coautors i s'ha encarregat de tota la part experimental. Finalment, ha analitzat les dades i ha redactat el manuscrit de l'article sota la supervisió i revisió de la directora i la resta de coautors.

3.3 Informe sobre el factor d'impacte

Els articles, que formen part d'aquesta tesi doctoral, s'han publicat (o s'han sotmès a publicació) en revistes científiques rellevants per a la línia de recerca en la qual la doctoranda ha col·laborat durant els anys de preparació de l'actual tesi doctoral.

L'article **The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium** es va publicar a la revista Chemosphere al 2016. L'índex d'impacte d'aquesta revista va ser de 4,208 durant el 2016.

L'article **Effect of electrogenerated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes** es va publicar a la revista Separation and Purification Technology al 2017. L'índex d'impacte d'aquesta revista va ser de 3,927 durant el 2017.

L'article **Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments** es va publicar a la revista Water Research al 2017. L'índex d'impacte d'aquesta revista va ser de 7,051 durant el 2017.

L'article **Advantages of electro-Fenton over electrocoagulation for disinfection of dairy wastewater** s'ha sotmès a la revista Chemical Engineering Journal. L'índex d'impacte d'aquesta revista va ser de 6,735 durant el 2017.

Signat,

Dra. Rosa Ma Araujo Boira
Barcelona, setembre 2018

4. PUBLICACIONES

Capítol 1_Aigües sintètiques

1.1_ La capacitat de l'oxidació electroquímica amb un ànode de BDD per inactivar bacteris Gram-negatius i Gram-positius en un medi de baixa conductivitat amb sulfat

Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M. J., Brillas, E., & Araujo, R. M. *Chemosphere*, 163 (2016), 516-524.

Resum

L'oxidació electroquímica (o electro-oxidació) és un procés electroquímic d'oxidació avançada (PEOA) que, degut a la transferència d'electrons entre els elèctrodes, es produeixen espècies oxigenades reactives (ROS), "in situ", que són forts oxidants. L'espècie més significativa que es forma és el radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), una espècie molt reactiva que reacciona de forma no específica amb les molècules orgàniques. El rendiment de l'electro-oxidació es veu afectat per diferents paràmetres. Un d'ells és el tipus de material de l'ànode. Els ànodes de diamant dopat amb bor (BDD) presenten, entre d'altres propietats, la formació d' O_2 en quantitats superiors que altres ànodes, una baixa adsorció dels radicals hidroxil i una gran resistència a la corrosió, la qual cosa fa que s'hagi escollit per testar la inactivació dels bacteris.

En aquest treball es va estudiar, sota condicions controlades i utilitzant un ànode de BDD, l'efecte de l'electro-oxidació en la inactivació de cinc bacteris, amb diferents tipus de parets cel·lulars i morfologia. Es van testar dos bacteris Gram-negatius; *Escherichia coli* ATCC 10536 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, i tres Gram-positius; *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (dipositat prèviament com a *Bacillus subtilis* var. niger), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Enterococcus hirae* ATCC 10541. Es van escollir aquestes cinc soques perquè són les de referència per a les proves bactericides segons la norma AENOR (UNE EN 1040) i perquè són representants dels patògens bacterians trobats habitualment al medi aquàtic.

Els elèctrodes utilitzats tenien una superfície de 3 cm^2 i van ser sotmesos a una densitat de corrent constant de 100 mA la qual cosa correspon a $33,3\text{ mA cm}^{-2}$. L'ànode utilitzat va ser de BDD i el càtode d'acer inoxidable. La cel·la electroquímica contenia 100 ml d'aigua sintètica; aigua MilliQ i sals. Com a electròlit es va utilitzar Na_2SO_4 7 mM perquè proporcionava un medi de baixa conductivitat però suficient per portar a terme l'electro-oxidació, no incorporava ions clor al medi i era l'adequat per mantenir la concentració osmòtica requerida pels bacteris sense afectar-los. Les proves es van fer en medi àcid $\text{pH} \sim 3$ i en medi neutre $\text{pH} \sim 7$. Totes les soques es van sotmetre a l'electro-oxidació amb un ànode de BDD de forma individual en aigua sintètica durant 60 minuts.

Després del tractament amb electro-oxidació de 60 minuts, totes les soques van presentar una reducció de cèl·lules viables cultivables de més de 5 log, superior al 99,999%, que s'atribueix principalment a l'acció dels radicals $\bullet\text{OH}$ formats per l'oxidació

anòdica de l'aigua a més d'altres espècies oxigenades reactives. Els microorganismes van presentar diferents cinètiques d'inactivació. Als 45 minuts de tractament, els tres bacteris amb formes bacil·lifformes havien disminuït 6 log o més, tant en medi àcid com neutre, mentre que pels bacteris amb forma coccoide, la disminució va ser de 4,5 log quan el medi era neutre, mentre que en medi àcid, es va trobar que *S. aureus*, a l'igual que els bacils, va disminuir 6 log i, en canvi, *E. hirae* només va disminuir 5 log. Els resultats, també van evidenciar que mentre els bacils, indistintament de si eren Gram+ o Gram-, quedaven inactivats després de 60 minuts de tractament, no passava el mateix amb els cocs, tots Gram +, que encara presentaven algunes cèl·lules cultivables (excepte en el cas de *S. aureus* a pH~ 3). Les diferències observades en funció d'aquests dos pH no van ser estadísticament significatives d'acord amb el test de Kolmogorov-Smirnov.

A partir dels resultats es va establir un model logístic d'inactivació per a cadascun dels bacteris i es van classificar els cinc bacteris en tres grups segons la cinètica d'inactivació que presentaven. Aquests tres grups són:

- Els bacils Gram -, *E. coli* i *P. aeruginosa*, amb taxes d'inactivació similars, varen presentar un primer replà on l'eliminació de cèl·lules viables cultivables era lenta i va continuar amb una pendent pronunciada on l'eliminació dels bacteris era més ràpida fins a la seva inactivació.
- Els cocs Gram +, *E. hirae* i *S. aureus*, varen ser els microorganismes més resistents a aquest tipus de tractament. En aquest cas, també observem un replà seguit d'una pendent pronunciada d'eliminació que acaba en una cua, és a dir, no s'arriba a la total inactivació dels bacteris. Per aquest motiu, s'haurien de tenir en compte i utilitzar-los com a indicadors en aquests tipus de tractaments.
- El bacil Gram +, *B. atropheus*, va resultar el més afectat per la tècnica. En aquest cas no s'observa el replà inicial, sinó que hi ha una inactivació pronunciada i continuada fins a la seva ràpida eliminació. S'ha de tenir en compte que, tot i que aquest bacteri té la capacitat de formar espores, els experiments es van fer amb les formes vegetatives.

A partir dels models obtinguts per la cinètica d'inactivació, es va calcular, per a cada bacteri, el temps necessari de tractament per reduir la seva concentració en 1 logaritme. En tots els bacteris, excepte *B. atropheus*, el temps necessari per aconseguir la inactivació del 90% (T90) va ser el més llarg i es va establir entre els 11,6 minuts d' *E. hirae* i els 19,1 minuts d' *E. coli*. A partir d'aquí es van observar 2 patrons; un amb temps més curts, < 5 minuts, amb intervals de l'ordre de 3,1 a 4,8 minuts i l'altre amb temps més llargs, > 5 minuts, amb intervals entre 5,8 i 8,2 minuts. Els bacils Gram -, *E. coli* i *P. aeruginosa*, presentaven intervals curts (< 5 m) per augmentar un logaritme la seva reducció, mentre que *S. aureus* requeria dels intervals més llargs (> 5 m) per obtenir aquesta reducció d'una unitat logarítmica addicional. *E. hirae*, presentava ambdós patrons. És a dir, en les primeres reduccions logarítmiques, de T90 fins a T 99,99 els intervals eren similars als obtinguts amb els bacils mentre que l'interval de temps que es requeria per passar de T 99,99 a T 99,999 era més llarg i s'assemblava més al que

presentava *S. aureus*. Per últim, el bacil Gram +, *B. atrophaeus*, va presentar intervals < 5 m en tot el seu procés d'inactivació.

Les mostres recollides a diferents temps es van preparar per poder ser analitzades mitjançant el Microscopi Electrònic de Rastreig (MER). A les mostres corresponents a l'estadi inicial s'observaven les cèl·lules íntegres, amb la seva morfologia típica, i els filtres es veien nets de qualsevol resta cel·lular. Per contra, després de 45 minuts d'electro-oxidació, la seva morfologia es veia alterada i s'observava rugositat en tota la superfície cel·lular. Així mateix, els filtres es veien plens de restes cel·lulars sense estructura definida ja que al sotmetre els bacteris al tractament electroquímic es produïen espècies oxigenades reactives que afectaven la paret bacteriana i produïen la degeneració de les proteïnes citoplasmàtiques. De nou, els bacteris Gram – van mostrar més alteració dels embolcalls que no pas els Gram +, la qual cosa es podia explicar per la composició molecular dels mateixos.

En conclusió, podem dir que l'electro-oxidació amb ànode de BDD i en absència de clor es pot considerar un tractament adequat de desinfecció. Tot i que la inactivació és més efectiva a pH ~ 3 que a pH ~ 7, no s'observen diferències significatives entre ambdós pH.

S'han aconseguit definir els diferents models logístics per descriure la cinètica d'inactivació dels cinc bacteris estudiats. Tenint en compte que els bacteris més resistents van ser els cocs Gram-positiu, *S. aureus* i *E. hirae*, s'haurien d'utilitzar aquests cocs com a indicadors més adequats per al tractament electro-oxidatiu amb BDD.

L'observació amb microscòpia d'escombratge va mostrar una transició des de cèl·lules amb morfologia estàndard cap a cèl·lules molt alterades, i amb presència de residus cel·lulars en el filtre, després del tractament. S'observa un major dany en els microorganismes Gram-negatius, a causa de la seva particular estructura de paret cel·lular.



The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium



Carmina Bruguera-Casamada ^a, Ignasi Sirés ^{b,*}, María J. Prieto ^a, Enric Brillas ^b, Rosa M. Araujo ^{a,**}

^a Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- Electrochemical disinfection using BDD anode: effect on Gram-negative and Gram-positive bacteria.
- Rapid and total inactivation of bacilli *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus atrophaeus*.
- Slower but almost total inactivation of cocci *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus hirae*.
- Description of all inactivation kinetics using a logistic model.
- Significant surface damage found in all inactivated cells as observed by SEM.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2016

Received in revised form

4 August 2016

Accepted 8 August 2016

Handling editor: Shane Snyder

Keywords:

Bacillus atrophaeus

Electrochemical disinfection

Enterococcus hirae

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

ABSTRACT

The disinfection of 100 mL of synthetic water containing 7 mM Na₂SO₄ with 10⁶ CFU mL⁻¹ of either Gram-negative or Gram-positive bacteria has been studied by electrochemical oxidation. The electrolytic cell was a stirred tank reactor equipped with a boron-doped diamond (BDD) anode and a stainless steel cathode and the trials were performed at acidic and neutral pH, at 33.3 mA cm⁻² and 25 °C. Reactive oxygen species, pre-eminently hydroxyl radicals, were efficiently produced in both media from water oxidation at the BDD anode and the bacteria concentration was reduced by ≥ 5 log units after 60 min of electrolysis, thus constituting a good chlorine-free disinfection treatment. All the inactivation kinetics were described by a logistic model, with no significant statistical differences between acidic and neutral suspensions. The electrochemical disinfection with BDD was very effective for Gram-negative bacilli like *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive ones like *Bacillus atrophaeus*, whereas the Gram-positive cocci *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus hirae* were more resistant. Thus, the latter organisms are a better choice than *E. coli* as process indicators. Scanning electron microscopy highlighted a transition from initial cells with standard morphology supported on clean filters to inactivated cells with a highly altered morphology lying on dirty filters with plenty of cellular debris. Larger damage was observed for Gram-negative cells compared to Gram-positive ones. The inactivation effect could then be related to the chemical composition of the outer layers of the cell structure along with the modification of the transmembrane potentials upon current passage.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The production of safe water in areas with increasing number of people and scarcity of water is a need. Disinfection is used to reduce the number of pathogenic microorganisms to a low enough level to ensure healthy conditions (WHO, 2015), and must prioritize

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: i.sires@ub.edu (I. Sirés), raujo@ub.edu (R.M. Araujo).

environmentally friendly methods. Chlorination is the most commonly used disinfection procedure, but it entails several drawbacks such as Cl_2 accumulation and formation of hazardous chloroderivatives. To solve these problems, other alternative methods including ozonation, UV light irradiation and electrochemical disinfection have been developed (Gheraout and Gheraout, 2010). To apply electrochemical disinfection as a green technology, its effect on different types of microorganisms under controlled conditions has to be tested.

Electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) have recently received increasing attention for both, removal of organic pollutants from wastewater (Ciriaco et al., 2009; Panizza and Cerisola, 2009; Sirés and Brillas, 2012; El-Ghenymy et al., 2014; Martínez-Huitle et al., 2015) and disinfection of urban and industrial water (Kraft, 2008; Cañizares et al., 2009; Rodrigo et al., 2010; Werschkun et al., 2012; Rajab et al., 2015), including swimming pools (Nakajima et al., 2004). Electrochemical oxidation (EO) is the most common EAOP utilized for electrochemical disinfection. It is characterized by easy and mild operation conditions (Sirés et al., 2014) and possesses environmental compatibility due to the in situ production of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) from water discharge at the anode surface, without requiring the addition of noxious chemicals (Martínez-Huitle and Brillas, 2008; Oturan et al., 2012; Thiam et al., 2015a, b). The most important parameters affecting the disinfection process are the water composition, the hydrodynamics of the system, the kind of anode material and the applied current density (j), since they determine the distribution of oxidants and by-products (Mascia et al., 2012, 2013; Long et al., 2015). Metals like Pt (Nakajima et al., 2004; Kerwick et al., 2005; Jeong et al., 2007; Delaedt et al., 2008), carbon electrodes like graphite and activated carbon fiber (Shang et al., 2013), mixed metal oxides of IrO_2 , PbO_2 , SnO_2 , and/or TiO_2 (Martínez-Huitle and Brillas, 2008; Panizza and Cerisola, 2008), and conductive boron-doped-diamond (BDD) (Furuta et al., 2004) have been used as anodes. The BDD electrode has excellent properties including large resistance to corrosion in very harsh media, large potential window, low adsorption of $\cdot\text{OH}$ and organics and higher O_2 overpotential than other anodes (Martínez-Huitle, 2007; Anglada et al., 2009; Sirés et al., 2014). As a result, the BDD anode is considered the best one for EO, being able to mineralize most organic molecules in sulfate medium (Hamza et al., 2009; Rodrigo et al., 2010; Pipi et al., 2014; Scialdone et al., 2014).

It has been found that the direct electrolysis with conventional anodes such as Pt and RuO_2 only yields a large disinfection when the treated liquid contains chloride ions (Polcaro et al., 2007). This is due to the oxidation of Cl^- with formation of active chlorine species (Cl_2 , HClO and/or ClO^-) that attack the bacterial cell. For example, Nakajima et al. (2004) reported the inactivation of all tested bacteria in 5 min upon generation of 30 mg L^{-1} active chlorine using a Pt-Ir anode at 30 mA. In contrast, the BDD anode produces a more active $\cdot\text{OH}$, highly suitable for environmental application. The BDD anode is then very effective in the absence of Cl^- ion, thus preventing the accumulation of active chlorine and the possible formation of toxic organochlorinated products, chloramines, ClO_3^- and ClO_4^- (Vacca et al., 2013; Sirés et al., 2014; Martínez-Huitle et al., 2015). In electrochemical disinfection, $\cdot\text{OH}$ is expected to exhibit a superior inactivation performance compared to active chlorine because of its much stronger oxidation ability (Cong et al., 2008). The most common supporting electrolyte to investigate the role of $\cdot\text{OH}$ produced at BDD is Na_2SO_4 , which presents enough conductivity, maintains a correct osmotic potential for the bacterial cells and is chlorine-free.

Some bactericidal mechanisms have been proposed to explain the action of EO with various electrodes under different experimental conditions. However, most of these studies have been

focused on *Escherichia coli* as process indicator and use chlorine-containing media for the mediated oxidation by active chlorine (Drees et al., 2003; Kerwick et al., 2005; Jeong et al., 2009). *E. coli* is an indicator microorganism for sanitary water quality and has been widely used as a model organism due to its easy growth under laboratory conditions. Using a BDD electrode in non-chloride media, Polcaro et al. (2007) reported a reduction of three orders of magnitude of this bacterium in 60 s and Jeong et al. (2009) described an inactivation of 2.4 log units in 3 min. In 0.10% Cl^- suspensions, Yao et al. (2011) found that the use of the BDD anode was able to yield overall inactivation in a longer time of 30 min.

Other bacteria, with a different morphology and wall structure compared to *E. coli*, should be comparatively tested in order to determine the actual disinfection ability of electrochemical processes, as well as to validate *E. coli* as the right process indicator. To do this, we have undertaken a study on the EO treatment of different Gram-positive and Gram-negative strains that are the benchmark for the bactericidal tests according to the AENOR standard.

This paper reports the results obtained for the electrochemical inactivation of five bacteria with different cell walls and morphology, representatives of the bacterial pathogens found in the aquatic environment. Two Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and three Gram-positive ones, *Bacillus atrophaeus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus hirae*, were treated by EO with a BDD anode in Na_2SO_4 medium under acidic and neutral conditions. The inactivation results of the five organisms were modelled and compared to establish the most appropriate indicators for the EO process. The changes in the outer structure of the cell walls were examined by scanning electron spectroscopy (SEM).

2. Materials and methods

2.1. Tested bacteria and culture preparation

Strains of two rod-shaped Gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Escherichia coli* ATCC 10536, one rod-shaped Gram-positive bacterium, *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (deposited as *Bacillus subtilis* var. *niger*), and two Gram-positive cocci, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus hirae* ATCC 10541, were used. The bacteria were cultured in Trypticasein Soy Agar (TSA) plates, supplied by Laboratorio Conda, at 37°C for 24 h. Further, the cells were spiked in 2 mL of 7 mM Na_2SO_4 (analytical grade from Panreac) and centrifuged at 14,000 rpm for 2 min. After washing twice with 1 mL of 7 mM Na_2SO_4 , the resulting pellet was resuspended in 1 mL of the same electrolyte giving rise to an optical density at 600 nm (O.D. 600) of 0.7 ± 0.1 , corresponding to about 10^8 colony-forming units per mL (CFU mL^{-1}).

2.2. Electrolytic system

All the EO trials were performed in a one-compartment, two-electrode cylindrical glass tank reactor of 150 mL capacity. The cell was surrounded with a jacket to keep the treated suspension at 25°C under circulation of external thermostated water. The anode was a BDD thin-film electrode purchased from NeoCoat and the cathode was a stainless steel (AISI 304) sheet, both of 3 cm^2 area. The interelectrode gap was near 1 cm. Electrolytic trials were carried out at a low constant current density of 33.3 mA cm^{-2} to show the disinfection power of EO with a BDD anode and under vigorous stirring with a magnetic bar at 800 rpm for ensuring mixing and the transport of bacteria and cytoplasmic residues toward the anode. Before the assays, the anode surface was cleaned via polarization in a 50 mM Na_2SO_4 solution at 100 mA cm^{-2} for 180 min.

2.3. EO assays

For each disinfection experiment, 100 mL of aqueous solutions with 7 mM Na₂SO₄ were prepared with ultrapure water of resistivity >18 MΩ cm obtained from a Millipore Milli-Q system. The solution was then spiked with a single bacterial strain (10⁸ CFU mL⁻¹) to obtain a suspension with 10⁶ CFU mL⁻¹. The influence of pH on bacterial inactivation was studied at acidic pH~3 by adding analytical grade H₂SO₄ from Panreac and at neutral pH~7 by adding NaOH. The results were compared using the Kolmogorov-Smirnov statistical test.

After each treatment, the tank reactor was cleaned with 150 mL of a mixture composed of 100 mL of 33% (w/v) H₂O₂ (analytical grade from Panreac Química) and 100 mL of 96% H₂SO₄ (analytical grade from Panreac Química) in 1 L of Milli-Q water for 10 min under vigorous stirring. Afterwards, it was rinsed with ultrapure water and dried in an oven at 80 °C. The electrodes were cleaned by immersion in ultrapure water at 100 °C for 10 min and, subsequently, they were dried using an air stream.

2.4. Instruments and analytical methods

The O.D. 600 was measured with a Camspec M108 spectrophotometer. The pH and electrical conductance of bacterial suspensions were determined with a Crison GLP 22 pH-meter and a Metrohm 644 conductometer, respectively. For electrolysis, the constant current was provided by an Amel 2053 potentiostat-galvanostat, using a Demestres 601BR digital multimeter for the instantaneous measurement of cell voltage. TOC analysis of samples withdrawn from electrolyzed suspensions was carried out using a Shimadzu TOC-VCNS analyzer. Reproducible TOC values with an accuracy of ±1% were found by injecting 50 μL aliquots into the analyzer.

Aliquots of 1 mL were withdrawn at regular times for 60–90 min of electrolysis. These samples were diluted and cultured in duplicate on TSA plates and incubated at 37 °C for 24 h. Inactivation was determined from the reduction of culturability as log units reduction, i.e., $\log(N_t/N_0)$, where N_t is the CFU value at given time and N_0 is the initial CFU value. The theoretical detection limit was 1 bacterium per mL. All the EO trials were made thrice (independent experiments).

The surface structure and morphological changes of each bacterium during EO disinfection were analyzed by SEM (Gu et al., 2001; Diao et al., 2004). In each case, two samples were collected at initial time and after 45 min of electrolysis. Each bacterial suspension was filtered through a 0.2 μm polycarbonate membrane filter from Millipore. The filter was then immersed for 30 min in a 2.5% glutaraldehyde solution buffered with 0.1 M cacodylate at pH 7.4. Further, it was preserved at 4 °C before being processed as follows: The filter was post-fixed in 1% OsO₄, washed with 0.2 M sodium cacodylate and dehydrated with a graded series of ethanol solutions from 30 to 100%, with 10% increments up to 80% and 5% up to 100%. After dehydration, samples were dried with critical point drying and coated with gold before observation. SEM images were obtained with a JEOL JSM-7001F equipment at 15 kV.

3. Results and discussion

3.1. Operation conditions during EO disinfection

The change in TOC, conductivity, cell voltage and pH for 100 mL of suspensions containing 7 mM Na₂SO₄ and the single bacteria strains at a concentration of 10⁶ CFU mL⁻¹ was determined after 60–90 min of EO treatment at 33.3 mA cm⁻² to know the characteristics of the disinfection process. TOC analysis is an alternative

way to monitor the degradation of the organic matter generated during the lysis of cells. An average TOC value of 2.55 ± 1.50 mg C L⁻¹ was found for the initial bacterial suspensions, which arose from the bacteria content plus compounds remaining upon culture preparation. TOC was only reduced to 2.25 ± 0.90 mg C L⁻¹ in average at the end of EO. These findings point to a very small mineralization of the organic matter, either the culture compounds or the spread cell wall and cytoplasm, during the disinfection process. This suggests that the main action of the electric field and the •OH formed at the BDD surface during the electrolysis is the inactivation of the bacterial strains. Similarly, the conductivity of 1.59 ± 0.1 mS cm⁻¹ of the untreated suspensions with 7 mM Na₂SO₄ only increased slightly up to 1.70 ± 0.1 mS cm⁻¹, as expected if only small amounts of cytoplasmic salts were released during the process. Regarding the average cell voltage of the BDD/stainless steel tank reactor, it also underwent a small decay from 16.5 ± 1.6 V to 15.8 ± 1.5 V during electrolysis, which can be related to the small increase in conductivity. In the case of solution pH, no significant variation was observed during the EO treatments. Thus, the pH of acidic solutions varied from 3.2 ± 0.3 to 3.4 ± 0.5 , whereas the pH of neutral solutions changed from 7.1 ± 0.2 to 7.6 ± 0.6 . This indicates that, under our experimental conditions with an undivided tank reactor, the H⁺ formation from water oxidation at the BDD anode was counterbalanced either by its reduction at the cathode under acidic conditions or, preferentially, by OH⁻ production at the cathode in neutral medium (Cho et al., 2004; Sirés et al., 2014).

All the aforementioned results bring to consider that the EO treatments of all bacteria suspensions occurred under quasi-steady conditions and thus, the main effects were at cellular and subcellular level but did not alter the macroscopic properties of the suspensions.

3.2. Effect of pH on bacteria inactivation

A first series of experiments was carried out to assess the stability of the different bacteria in suspensions at pH near 3 and 7 before EO treatment. The acidic medium was chosen to further check in future the viability of other EAOPs like electro-Fenton and photoelectro-Fenton that operate at optimum pH close to 3 (Sirés and Brillas, 2012; Thiam et al., 2015c). The two Gram-negative microorganisms, *P. aeruginosa* and *E. coli*, as well as the Gram-positive cocci *S. aureus* and *E. hirae*, did not undergo any kind of inactivation in the two tested media. In contrast, the content of the Gram-positive bacterium *B. atrophaeus* was not stable in none of the sulfate media since it was reduced by two log units at pH~3 and half log unit at pH~7 after 60 min of stirring. Note that Geveke and Kozempel (2003) have also reported that acidification of *E. coli* suspensions did not cause any inactivation of this bacterium.

According to the above results, the suspensions of all the bacteria in 7 mM Na₂SO₄ were prepared just before their EO treatment at 33.3 mA cm⁻² to obtain comparable inactivation data. Fig. 1 depicts the gradual reduction of $\log(N_t/N_0)$ with electrolysis time for the five bacteria in the two tested media. As can be seen, the content of all strains diminished more than 5 log units upon electrolysis, although with different inactivation kinetics.

Fig. 1 shows that the inactivation was already quantitative at 45 min, since at pH~3 the $\log(N_t/N_0)$ values of all the bacteria diminished about 6 units, except in the case of *E. hirae* since it decayed near 5 log units. Similarly, the results at pH~7 showed that the rod-shape bacteria decreased 6 log units or more, whereas the cocci dropped about 4.5 log units. At the end of the EO treatment, Fig. 1 evidences that the two Gram-negative as well as the Gram-positive bacilli were totally inactivated, whereas in the case of Gram-positive cocci, *S. aureus* and *E. hirae*, some few cells still survived, except in the case of *S. aureus* at pH~3. Despite the

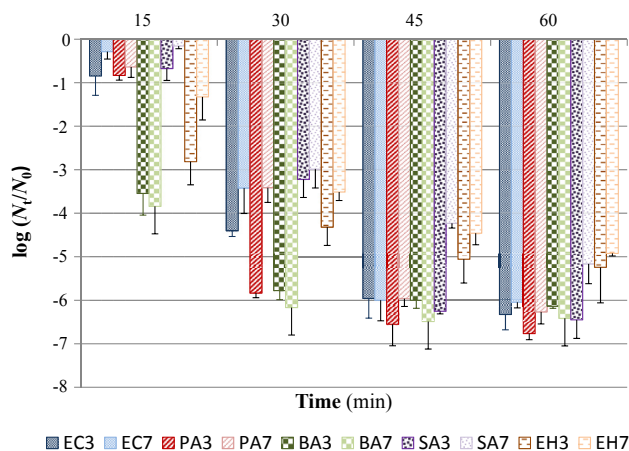


Fig. 1. Logarithmic reduction of bacterium content with electrolysis time for the electrochemical oxidation (EO) treatment of 100 mL of aqueous suspensions with 7 mM Na₂SO₄ and 10⁶ CFU mL⁻¹ of a given bacterium using a BDD/stainless steel cell at 33.3 mA cm⁻² and 25 °C. Bacterium: *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Bacillus atrophaeus* (BA), *Staphylococcus aureus* (SA) and *Enterococcus hirae* (EH). The number 3 or 7 in each acronym accounts for the initial solution pH, i.e., 3.0 or 7.0, respectively.

differences observed for the electrochemical disinfection at pH near 3 and 7, it can be concluded that the effect of pH was not statistically significant according to the Kolmogorov-Smirnov test, as will be discussed below.

The five strains suspended in synthetic water with 7 mM Na₂SO₄ at both pH values tested then showed a reduction of ≥ 5 log (N_t/N_0) units in 60 min by EO with a BDD anode at a current density of 33.3 mA cm⁻². This significant bacterial inactivation, greater than 99.999%, was mainly achieved by the action of the physisorbed BDD(•OH) radicals formed at the BDD surface from the anodic oxidation of water (Martínez-Huitle and Brillas, 2008; Panizza and Cerisola, 2009). Under comparable conditions, our results highlight that the most resistant bacteria were the cocci *S. aureus* and *E. hirae*, whereas the most fragile microorganism was the bacillus *B. atrophaeus*, being all Gram-positive. Based on the electrochemical inactivation found, one can divide the tested bacteria into three groups:

- (i) The two Gram-negative bacilli, *E. coli* and *P. aeruginosa*, with a very similar inactivation rate.
- (ii) The two Gram-positive cocci, *S. aureus* and *E. hirae*, which were the most resistant microorganisms to this kind of treatment, and
- (iii) finally, the Gram-positive bacillum, *B. atrophaeus*, was the most fragile, which can be at least partly linked to its sensitivity to pH variations during EO.

It should be noted that *B. atrophaeus* has been called *B. subtilis* var. *niger* in previously published literature and, consequently, much information about its inactivation is given elsewhere, especially when it is in its sporulated form that largely increases its resistance (Yoon et al., 2007). However, when survival studies were performed with vegetative cells, as in our case (disinfection is only related to vegetative forms), it has simply been reported that *B. subtilis* declined more rapidly than other Gram-positive bacteria like *P. fluorescens* in soils (Van Elsas et al., 1986).

Other authors have also compared the inactivation of several bacteria by EO with a BDD anode, showing similar trends to those found by us. Thus, Polcaro et al. (2007) reported a reduction of the content of *E. coli*, coliforms and enterococci from 10³ CFU mL⁻¹ to

their detection limit after 60, 100 and 300 s of electrolysis, respectively, using 1 mM Na₂SO₄ at 10 mA cm⁻². On the other hand, Heim et al. (2015) described fast bacterial reduction rates, close to 5 log units, for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. faecium* up to a specific charge consumption of 75 mAh L⁻¹, followed by a continuous but much slower inactivation.

It must be mentioned that, apart from the strong physisorbed oxidant BDD(•OH) generated at the BDD surface, this anode can also form other weaker reactive oxygen species (ROS) from water oxidation such as atomic oxygen (•O), H₂O₂ and O₃ (Polcaro et al., 2007; Martínez-Huitle and Brillas, 2008). Furthermore, other weaker oxidants can be produced from the oxidation of the supporting electrolyte, like persulfate (S₂O₈²⁻) ion from the oxidation of SO₄²⁻ ion (Sirés et al., 2014). All these oxidizing species are helpful for disinfection because they can damage the cell membranes, therefore altering their permeability and finally leading to their rupture (Diao et al., 2004). This point will be discussed below from SEM analysis of the untreated and inactivated bacteria.

3.3. Modelling inactivation kinetics

Numerous models have been proposed to describe bacterial survival curves, some of them including terms that account for shoulder and tailing phenomena. The logarithmic inactivation data for each bacteria shown in Fig. 1 were adjusted to a modified logistic model based on Kamau et al. (1990), expressed as follows:

$$\log(N_t/N_0) = \frac{I}{1 + a \exp(i t)} \quad (1)$$

where I denotes the theoretical maximum log reduction achieved upon the EO treatment, a is a parameter of adjustment related to the shape of the first shoulder, i is the inactivation rate (in min⁻¹) and t is the electrolysis time (in min). It should be mentioned that ideal mixing is assumed here, thus ensuring the maximum mass transport toward/from the electrodes. Therefore, the existence of poor hydrodynamic conditions in our laboratory cell can be discarded. In contrast, Mascia et al. (2012) reported the significant effect of flow pattern inside the disinfection unit when treating larger volumes using a filter-press cell, owing to the dispersion phenomena, stagnant zones and bypass flows. When Eq. (1) was applied, it was observed that the second shoulder or tail was highly influenced by the detection limit of the processed volume and the initial concentration of the studied bacteria. Since the fittings were very similar at pH close to 3 and 7, a unique pH-independent plot has been represented from the independent trials made for each bacterium. Fig. 2a–e depicts the graphs thus obtained for the five bacteria, along with the corresponding curves (upper and lower dashed lines) related to 95% confidence intervals on these fits. Table 1 summarizes the fitting parameters of Eq. (1) found in each case, along with the square of their regression coefficients (R^2). The latter values corroborate the goodness of Eq. (1) to describe the inactivation trends of all the tested bacteria.

As expected, a first look to Fig. 2 confirms that *S. aureus* was the most resistant strain, whereas *B. atrophaeus* was the most sensitive one. No significant differences can be observed between the intermediate inactivation values of the other bacteria. For example, *S. aureus* reached a 4 log reduction after 38 min of EO treatment, whereas 30 min were required for *E. coli*, 28 min for *P. aeruginosa*, 23 min for *E. hirae* and only 14 min for *B. atrophaeus*. Total inactivation of the latter one with a decrease of 6 log units was already reached in 30 min. A similar drop of more than 6 log units for *E. coli* and *P. aeruginosa* was found after 60 min of electrolysis, whereas *S. aureus* and *E. hirae* required longer time to attain their total inactivation. For *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. hirae*, a first

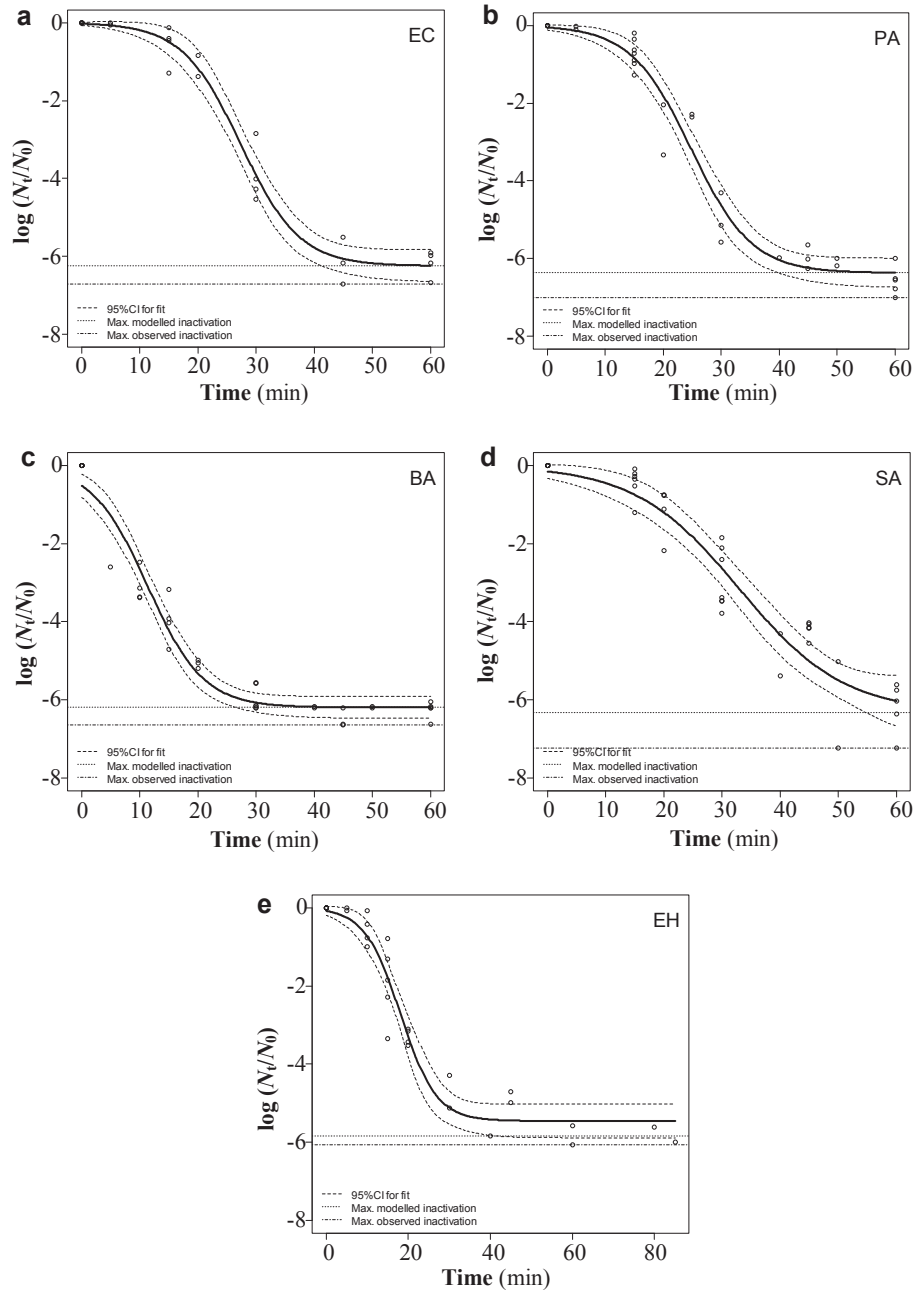


Fig. 2. Logistic model applied to the electrochemical inactivation kinetics of: (a) *E. coli* (b) *P. aeruginosa*, (c) *B. atrophaeus*, (d) *S. aureus* and (e) *E. hirae* during the EO trials shown in Fig. 1. The dashed lines represent the 95% confidence intervals on these fits.

Table 1

Parameters and goodness of fit for the logistic model curves of Fig. 2 for each bacterium.

Parameter	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. atrophaeus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. hirae</i>
<i>l</i>	-6.243	-6.369	-6.192	-6.327	-5.453
<i>a</i>	228.958	115.509	10.810	39.166	63.981
<i>i</i>	-0.198	-0.192	-0.2092	-0.111	-0.229
<i>R</i> ²	0.979	0.971	0.964	0.942	0.955

shoulder at short time can be seen in Fig. 2a, b, d and e, respectively, whereupon the $\log(N_t/N_0)$ values decayed up to reach overall disinfection, although for *E. hirae*, the inactivation rate seemed to

become drastically reduced once reached a 5 log reduction. The presence of the initial shoulder could be related with the existence of more resistant cells within the whole bacteria populations. This trend was not valid for *B. atrophaeus*, which underwent a much quicker inactivation from the beginning of the electrolysis. Therefore, the classification mentioned in Section 3.2 is now verified:

- (i) The two Gram-negative bacilli, *E. coli* and *P. aeruginosa*, presented a first shoulder in the $\log(N_t/N_0)$ -*t* plot, followed by a rapid steep decay to end in their total inactivation.
- (ii) The two Gram-positive cocci, *S. aureus* and *E. hirae*, presented a first shoulder in the $\log(N_t/N_0)$ -*t* plot as well, followed by a less pronounced drop than in case (i) to end in a tail. This

behavior evidences the need of longer time to reach their total inactivation, and

- (iii) finally, the Gram-positive bacillum, *B. atrophaeus*, was rapidly inactivated with no shoulder appearing during the treatment.

To better compare the EO disinfection of bacterial suspensions, the times for 1 log reduction or 90% of inactivation ratio (T_{90}), 2 log or 99% (T_{99}), 3 log or 99.9% ($T_{99.9}$), 4 log or 99.99% ($T_{99.99}$) and 5 log or 99.999% ($T_{99.999}$) were determined considering the kinetic relationship given by Eq. (1). The data obtained are summarized in Table 2. As can be seen, *B. atrophaeus*, a rod-shaped Gram-positive bacterium, required shorter times for inactivation compared to the others, regardless of the considered inactivation ratio. For both rod-shaped Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* and *E. coli*, $T_{99.99}$ was between 28 and 30 min and $T_{99.999}$ between 32 and 35 min. In contrast, the Gram-positive cocci needed longer times to reach a given inactivation ratio, in agreement with their higher resistance. While in the case of *E. hirae*, $T_{99.99}$ was similar to that found for Gram-negative bacteria, *S. aureus* presented a higher value. As for $T_{99.999}$ values, the difference was larger than 11 and 27 min compared to the Gram-negative and Gram-positive bacilli, respectively. For example, the differences between *E. coli* and *S. aureus* were of 7 and 11 min for $T_{99.99}$ and $T_{99.999}$, respectively, and up to 23 and 27 min in the case of *B. atrophaeus* vs. *S. aureus* to reach those inactivation ratios.

Interestingly, once reached an inactivation ratio of 90%, the three bacilli, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. atrophaeus*, needed similar time intervals to ensure an additional log unit reduction, ranging between 3.1 and 4.8 min, whereas *S. aureus* required longer intervals (between 5.8 and 8.2 min). In the case of *E. hirae*, the time intervals up to $T_{99.9}$ were similar to those of bacilli (3.1–4.8 min), but from $T_{99.99}$ to $T_{99.999}$ the intervals became longer, being analogous to those of *S. aureus*. For most bacteria, the time intervals between T_{99} and $T_{99.9}$ and between $T_{99.9}$ and $T_{99.99}$ were then shorter than the initial interval from T_{90} to T_{99} and the last interval to $T_{99.999}$. This behavior was also verified for *E. hirae* but only up to $T_{99.9}$.

Our results agree with those from other authors that pointed out that, in general, big cells tend to be more susceptible to an electric field than small and oval ones, which may justify the significantly slower inactivation of cocci compared to bacilli (Machado et al., 2010; Guillemes Peira, 2014). On the other hand, it has been reported that the Gram-negative bacteria are more sensitive than the Gram-positive ones to pulsed electric fields (Barsotti and Cheftel, 1999; Jeyamkondan et al., 1999). This has also been found in the present study, except in the case of *B. atrophaeus*.

3.4. SEM analysis during disinfection trials

SEM micrographs of the cells of the different bacterial strains were obtained before electrolysis and after 45 min of their EO treatments with a BDD anode at 33.3 mA cm^{-2} , as depicted in Fig. 3a–e. Before treatment, the cells showed their standard morphology, three bacillary forms of similar size and two coccoid forms, and the filters were clean. In contrast, their morphology was largely altered upon EO disinfection, becoming the cell surface of all the bacteria much rougher. Moreover, the filters became dirty with a great deal of cellular debris, probably because large amounts of cellular material were released from the inactivated cells. *E. coli* (see Fig. 3a) and *P. aeruginosa* (see Fig. 3b), both with a Gram-negative cell wall, underwent the most significant surface modification, which was less evident in the case of the bacteria with a Gram-positive wall, like the bacillus *B. atrophaeus* (see Fig. 3c) and the cocci *S. aureus* (see Fig. 3d) and *E. hirae* (see Fig. 3e). However, it

Table 2

Time required for selected inactivation ratios expressed in percentage for each bacterium using the logistic model of Eq. (1).

Bacterium	Time for inactivation ratios (min)				
	T_{90}	T_{99}	$T_{99.9}$	$T_{99.99}$	$T_{99.999}$
<i>E. coli</i>	19.1	23.6	27.1	30.4	34.5
<i>P. aeruginosa</i>	15.9	20.7	24.1	27.5	31.5
<i>B. atrophaeus</i>	3.5	7.8	11.1	14.2	18.2
<i>S. aureus</i>	17.9	26.1	32.1	37.9	45.0
<i>E. hirae</i>	11.6	15.7	19.0	22.6	28.6

seems that the cell appearance of the latter two organisms pointed to some shrinkage.

The inactivation kinetics of the tested strains and their morphological changes can then be related to the attack of ROS, like BDD($\cdot\text{OH}$) and O_3 , produced in situ by EO on their cellular walls having different structure. The effect of these oxidants can be explained from other disinfection techniques. It has been described that they diffuse toward the outer layers of the bacterial cells and then infiltrate into the membrane and cytoplasm, reacting with proteins and unsaturated lipids. Consequently, the cell walls may be broken by lysis, causing the leakage of inner compounds to the reaction medium and, simultaneously, the radicals can penetrate into the cytoplasm and affect the enzymes and DNA molecules (Hunt and Mariñas, 1999). Accordingly, our SEM results show that the ROS generated by BDD caused changes in the cell envelope, which became rougher, especially in the Gram-negative bacilli. The vast majority of the cells, after 45 min of electrolysis, lost their growth ability, despite the apparently unaffected morphology of most of them, as also claimed by other authors (Machado et al., 2010). Hunt and Mariñas (1999) explained that chemical reactions between O_3 and biomolecules continue after loss of inactivation until the disinfectant is exhausted or the biomolecules are completely oxidized. Thus, the generated ROS in EO directly affect the cell walls causing their membrane cleavage (Diao et al., 2004). Other authors have also reported that the EO treatment of *E. coli* in sulfate medium induces damage to the cell membrane. The generated chemicals attack the membrane proteins and modify the K^+ balances, which affects the cell division and the synthesis of cellular ATP until causing the bacterial inactivation (Polcaro et al., 2007; Jeong et al., 2009). Long et al. (2015) also observed lipid peroxidation during electrochemical disinfection with a BDD anode.

According to our SEM observations, bacteria with Gram-positive wall preserve their cell structure better than the Gram-negative ones. This could be explained by the molecular composition of the outer layers, since the Gram-positive cells have a thick peptidoglycan layer, whereas the Gram-negative ones only have a phospholipid bilayer with lipopolysaccharide molecules and proteins under which there is a much thinner peptidoglycan layer. Some studies have shown that the phospholipid membrane is hardly oxidizable, whereas the proteins are easier to destroy under the direct effect of the electric current (Linley et al., 2012). There is less information about the relationship between ROS and the outer membrane of Gram-positive cells, but our results suggest that their outer layer was quite resistant during inactivation, maintaining the initial structure despite the slight size reduction observed in the case of both cocci. It is also noteworthy that electrogenerated H_2O_2 and O_3 can go through the membranes and reach the vital centre of the cells (Drogué et al., 2001).

An additional significant difference observed upon EO treatment was the appearance of cellular debris, also described elsewhere. For example, Diao et al. (2004) observed substantial intracellular materials leaked out from the cells after

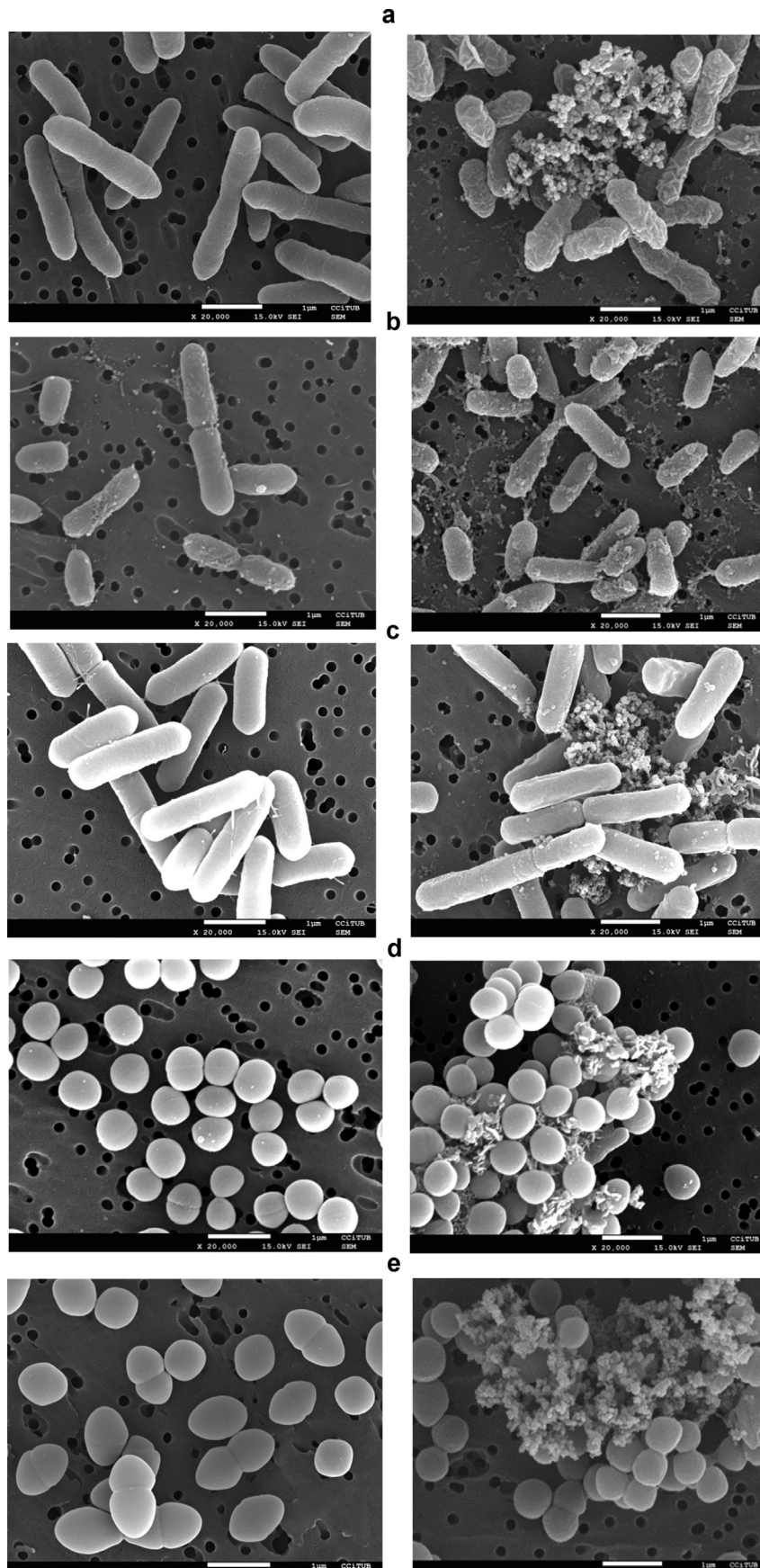


Fig. 3. SEM images for: (a) *E. coli* (b) *P. aeruginosa*, (c) *B. atrophaeus*, (d) *S. aureus* and (e) *E. hirae* supported on polycarbonate membrane filters. Samples correspond to bacteria suspensions in 7 mM Na_2SO_4 at pH 7.0, before (left) and after (right) 45 min of EO treatment with a BDD/stainless steel cell at 33.3 mA cm^{-2} and 25°C .

electrochemical disinfection of *E. coli* suspensions using dimensionally stable anodes, which was ascribed to the oxidation of the membranes by electrogenerated ROS such as peroxides, $\cdot\text{OH}$ and ozone. Finally, note that in the EO assays the cell membranes might undergo large modifications of their transmembrane potentials due to the concomitant electric field of ca. 16.5 V cm^{-1} in the BDD/stainless steel tank reactor. It has been reported that, if the resulting transmembrane potential value ranges between 0.2 and 1 V, reversible pore formation in the membrane (electroporation or electropermeabilization) may occur. Greater values lead to the cell death (Weaver and Chizmadzhev, 1996; Machado et al., 2010), therefore contributing to their inactivation. Since critical electric fields in the kV cm^{-1} range would be necessary to promote irreversible electroporation (García et al., 2016), its contribution in the present study seems rather insignificant.

4. Conclusions

It has been shown that the five tested bacterial strains, two Gram-negative and three Gram-positive, suspended at 10^6 CFU mL^{-1} in synthetic water with 7 mM Na_2SO_4 , experienced a significant reduction of at least 5 log units within 60 min of EO with a BDD anode at 33.3 mA cm^{-2} . This method can then be considered a suitable chlorine-free disinfection treatment. ROS, pre-eminently hydroxyl radicals, generated at the BDD surface were very efficient under acidic and neutral conditions. Although apparently the inactivation seemed more effective at pH~3, no relevant statistical differences were found at pH~7. A modified logistic model has been used to describe the inactivation kinetics in all cases. The electrochemical disinfection with BDD was very effective for the bacilli *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. atrophaeus*, being the latter one much more sensitive. In contrast, the Gram-positive cocci *S. aureus* and *E. hirae* were more resistant and, consequently, they should be chosen as more appropriate indicators than *E. coli* for the EO treatment. The SEM micrographs of all bacteria showed a transition from cells with standard morphology supported on clean filters to cells with a highly altered morphology lying on dirty filters with plenty of cellular debris due to their lysis. These observations revealed a greater damage in the case of the Gram-negative organisms, due to their particular cell wall structure. The overall inactivation effect can then be explained not only on the basis of oxidizing electrogenerated ROS but also from the different chemical composition of the outer cell layers and the large modifications of the transmembrane potentials upon application of the electric current.

Acknowledgements

The authors thank financial support under project CTQ2013-48897-C2-1-R (MINECO, FEDER, EU), and from the “Grups de recerca reconeguts” (Generalitat de Catalunya) 2014 SGR 83 and 2014 SGR 914. Technical support from CCIUTUB (Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona) is also acknowledged.

References

Anglada, A., Urtiaga, A., Ortiz, I., 2009. Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: fundamentals and review of applications. *J. Chem. Technol. Biotech.* 84 (12), 1747–1755.

Barsotti, L., Chefftel, J.C., 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Rev. Int.* 15 (2), 181–213.

Cañizares, P., Hernández, M., Rodrigo, M.A., Saez, C., Barrera, C.E., Roa, G., 2009. Electrooxidation of brown-colored molasses wastewater. Effect of the electrolyte salt on the process efficiency. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (3), 1298–1301.

Cho, M., Chung, H., Choi, W., Yoon, J., 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection. *Water Res.* 38 (4), 1069–1077.

Ciriaco, L., Anjo, C., Correia, J., Pacheco, M.J., Lopes, A., 2009. Electrochemical degradation of ibuprofen on Ti/Pt/PbO₂ and Si/BDD electrodes. *Electrochim. Acta* 54 (5), 1464–1472.

Cong, Y., Wu, Z., Li, Y., 2008. Electrochemical inactivation of coliforms by in-situ generated hydroxyl radicals. *Korean J. Chem. Eng.* 25 (4), 727–731.

Delaedt, Y., Daneels, A., Declercq, P., Behets, J., Ryckbeoer, J., Peters, E., Ollevier, F., 2008. The impact of electrochemical disinfection on *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* in tap water. *Microbiol. Res.* 163 (2), 192–199.

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 Biochem.* 39 (11), 1421–1426.

Drees, K.P., Abbaszadegan, M., Maier, R.M., 2003. Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage. *Water Res.* 37 (10), 2291–2300.

Drogui, P., Elmeh, S., Rumeau, M., Bernard, C., Rambaud, A., 2001. Oxidising and disinfecting by hydrogen peroxide produced in a two-electrode cell. *Water Res.* 35 (13), 3235–3241.

El-Ghenymy, A., Centellas, F., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Sirés, I., Cabot, P.L., Brillas, E., 2014. Decolorization and mineralization of Orange G azo dye solutions by anodic oxidation with a boron-doped diamond anode in divided and undivided tank reactors. *Electrochim. Acta* 130, 568–576.

Furuta, T., Tanaka, H., Nishiki, Y., Pupunat, L., Haenni, W., Rychen, Ph., 2004. *Legionella* inactivation with diamond electrodes. *Diam. Rel. Mater.* 13 (11–12), 2016–2019.

García, P.A., Ge, Z., Moran, J.L., Buie, C.R., 2016. Microfluidic screening of electric fields for electroporation. *Sci. Rep.* 6, 21238.

Geveke, D.J., Kozempel, M.F., 2003. Pulsed electric field effects on bacteria and yeast cells. *J. Food Process. Preserv.* 27 (1), 65–72.

Ghernaout, D., Ghernaout, B., 2010. From chemical disinfection to electro-disinfection: the obligatory itinerary? *Desalin. Water Treat.* 16 (1–3), 156–175.

Gu, J., Belay, B., Mitchell, R., 2001. Protection of catheter surfaces from adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* by a combination of silver ions and lectins. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2), 173–179.

Guillemes Peira, A., 2014. Aplicación de la oxidación avanzada en la desinfección de aguas residuales. *Ing. Hidráulica Ambient.* 35 (3), 60–72.

Hamza, M., Abdelhedi, R., Brillas, E., Sirés, I., 2009. Comparative electrochemical degradation of the triphenylmethane dye Methyl Violet with boron-doped diamond and Pt anodes. *J. Electroanal. Chem.* 627 (1–2), 41–50.

Heim, C., Ureña de Vivanco, M., Rajab, M., Müller, E., Letzel, T., Helmreich, B., 2015. Rapid inactivation of waterborne bacteria using boron-doped diamond electrodes. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12 (10), 3061–3070.

Hunt, N.K., Mariñas, B.J., 1999. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Res.* 33 (11), 2633–2641.

Jeong, J., Kim, J.Y., Cho, M., Choi, W., Yoon, J., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* in the electrochemical disinfection process using a Pt anode. *Chemosphere* 67 (4), 652–659.

Jeong, J., Kim, C., Yoon, J., 2009. The effect of electrode material on the generation of oxidants and microbial inactivation in the electrochemical disinfection processes. *Water Res.* 43 (4), 895–901.

Jeyamkondan, S., Jayas, D.S., Holley, R.A., 1999. Pulsed electric field processing of foods: a review. *J. Food Prot.* 62 (9), 1088–1096.

Kamau, D.N., Doores, S., Pruitt, K.M., 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (9), 2711–2716.

Kerwick, M.I., Reddy, S.M., Chamberlain, A.H.L., Holt, D.M., 2005. Electrochemical disinfection, an environmentally acceptable method of drinking water disinfection? *Electrochim. Acta* 50 (25–26), 5270–5277.

Kraft, A., 2008. Electrochemical water disinfection: a short review. *Platin. Mater. Rev.* 52 (3), 177–185.

Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C., Maillard, J.Y., 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (7), 1589–1596.

Long, Y., Ni, J., Wang, Z., 2015. Subcellular mechanism of *Escherichia coli* inactivation during electrochemical disinfection with boron-doped diamond anode: a comparative study of three electrolytes. *Water Res.* 84, 198–206.

Machado, L.F., Pereira, R.N., Martins, R.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *J. Food Eng.* 96 (4), 520–527.

Martínez-Huitle, C.A., 2007. Conductive diamond electrodes for water purification. *Mater. Res.* 10 (4), 419–424.

Martínez-Huitle, C.A., Brillas, E., 2008. Electrochemical alternatives for drinking water disinfection. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (11), 1998–2005.

Martínez-Huitle, C.A., Rodrigo, M.A., Sirés, I., Scialdone, O., 2015. Single and coupled electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: a critical review. *Chem. Rev.* 115 (24), 13362–13407.

Mascia, M., Vacca, A., Palmas, S., 2012. Fixed bed reactors with three dimensional electrodes for electrochemical treatment of waters for disinfection. *Chem. Eng. J.* 211–212, 479–487.

Mascia, M., Vacca, A., Palmas, S., 2013. Electrochemical treatment as a pre-oxidative step for algae removal using *Chlorella vulgaris* as a model organism and BDD anodes. *Chem. Eng. J.* 219, 512–519.

Nakajima, N., Nakano, T., Harada, F., Taniguchi, H., Yokoyama, I., Hirose, J., Daikoku, E., Sano, K., 2004. Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis. *J. Microbiol. Methods* 57 (2), 163–173.

- Oturan, N., Brillas, E., Oturan, M.A., 2012. Unprecedented total mineralization of atrazine and cyanuric acid by anodic oxidation and electro-Fenton with a boron-doped diamond anode. *Environ. Chem. Lett.* 10 (2), 165–170.
- Panizza, M., Cerisola, G., 2008. Electrochemical degradation of methyl red using BDD and PbO₂ anodes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 (18), 6816–6820.
- Panizza, M., Cerisola, G., 2009. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chem. Rev.* 109 (12), 6541–6569.
- Pipi, A.R.F., De Andrade, A., Brillas, E., Sirés, I., 2014. Total removal of alachlor from water by electrochemical processes. *Sep. Purif. Technol.* 132, 674–683.
- Polcaro, A.M., Vacca, A., Mascia, M., Palmas, S., Pompei, R., Laconi, S., 2007. Characterization of a stirred tank electrochemical cell for water disinfection processes. *Electrochim. Acta* 52 (7), 2595–2602.
- Rajab, M., Heim, C., Letzel, T., Drewes, J.E., Helmreich, B., 2015. Electrochemical disinfection using boron-doped diamond electrode –The synergetic effects of in situ ozone and free chlorine generation. *Chemosphere* 121, 47–53.
- Rodrigo, M.A., Cañizares, P., Sánchez-Carretero, A., Sáez, C., 2010. Use of conductive-diamond electrochemical oxidation for wastewater treatment. *Catal. Today* 151 (1–2), 173–177.
- Scialdone, O., Corrado, E., Galia, A., Sirés, I., 2014. Electrochemical processes in macro and microfluidic cells for the abatement of chloroacetic acid from water. *Electrochim. Acta* 132, 15–24.
- Shang, K., Qiao, Z., Sun, B., Fan, X., Ai, S., 2013. An efficient electrochemical disinfection of *E. coli* and *S. aureus* in drinking water using ferrocene–PAMAM–multiwalled carbon nanotubes–chitosan nanocomposite modified pyrolytic graphite electrode. *J. Solid State Electrochem* 17 (6), 1685–1691.
- Sirés, I., Brillas, E., 2012. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review. *Environ. Int.* 40 (1), 212–229.
- Sirés, I., Brillas, E., Oturan, M.A., Rodrigo, M.A., Panizza, M., 2014. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (14), 8336–8367.
- Thiam, A., Brillas, E., Centellas, F., Cabot, P.L., Sirés, I., 2015a. Electrochemical reactivity of Ponceau 4R (food additive E124) in different electrolytes and batch cells. *Electrochim. Acta* 173, 523–533.
- Thiam, A., Sirés, I., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Brillas, E., 2015b. Effect of anions on electrochemical degradation of azo dye Carmoisine (Acid Red 14) using a BDD anode and air-diffusion cathode. *Sep. Purif. Technol.* 140, 43–52.
- Thiam, A., Brillas, E., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Sirés, I., 2015c. Routes for the electrochemical degradation of the artificial food azo-colour Ponceau 4R by advanced oxidation processes. *Appl. Catal. B Environ.* 180, 227–236.
- Vacca, A., Mascia, M., Palmas, S., Mais, L., Rizzardini, S., 2013. On the formation of bromate and chlorate ions during electrolysis with boron doped diamond anode for seawater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (12), 2244–2251.
- Van Elsas, J.D., Dijkstra, A.F., Govaert, J.M., Van Veen, J.A., 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2 (3), 151–160.
- Weaver, J.C., Chizmadzhev, Y.A., 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41 (2), 135–160.
- Werschkun, B., Sommer, Y., Banerji, S., 2012. Disinfection by-products in ballast water treatment: an evaluation of regulatory data. *Water Res.* 46 (16), 4884–4901.
- World Health Organization (WHO), 2015. Drinking-water. Fact Sheet, No 391. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/> (Accessed April 06.04.16).
- Yao, Y., Kubota, Y., Murakami, T., Ochiai, T., Ishiguro, H., Nakata, K., Fujishima, A., 2011. Electrochemical inactivation kinetics of boron-doped diamond electrode on waterborne pathogens. *J. Water Health* 9 (3), 534–543.
- Yoon, K.Y., Byeon, J.H., Park, J.H., Hwang, J., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 373 (2), 572–575.

1.2_Efecte dels radicals hidroxil electrogenerats, del clor i de la matèria orgànica en la inactivació electroquímica de *Pseudomonas aeruginosa* utilitzant BDD i ànodes dimensionalment estables

Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Brillas, E., & Araujo, R. M.

Separation and Purification Technology, 178 (2017), 224-231.

Resum

En aquest treball vàrem estudiar els efectes, sobre *Pseudomonas aeruginosa*, dels ions hidroxil generats per tres tipus diferents d'ànodes. L'estudi va incloure dues variables més; la presència de clor i la presència de matèria orgànica en el medi.

En els tractament d'electro-oxidació, s'utilitzen ànodes amb un elevat sobrepotencial d'oxigen que, per descomposició, generen "in situ" espècies de gran capacitat oxidativa. A partir de la descomposició de l'aigua, a la superfície de l'ànode, es generen radicals hidroxil ($\bullet\text{OH}$) classificats com a espècies oxigenades reactives, així mateix, quan en el medi hi ha ions clorur, també es formen espècies de clor actives (Cl_2 , HClO i ClO^-) que igualment presenten una gran capacitat oxidativa. Segons el pH del medi, predominarà una espècie o bé una altra. Quan el pH del medi està entre 3 i 8, pH de l'experiment, l'espècie de clor actiu predominant és l'àcid hipoclorós (HClO).

A més dels ions presents en la medi, el material de l'ànode també és un factor a tenir en compte en l'electro-oxidació perquè està relacionat amb la quantitat i activitat de les espècies oxidants generades. Es preveu que el clor actiu es produeixi en més quantitat en ànodes dimensionalment estables (DSA®), que no pas en ànodes de diamant dopat amb bor (BDD), a causa de la seva capacitat electrocatalítica més gran respecte a la reacció $2\text{Cl}^- \rightarrow \text{Cl}_2(\text{aq}) + 2\text{e}^-$. En canvi, els $\bullet\text{OH}$ generats en un ànode de BDD seran més actius perquè estan menys adsorbits i més lliures en el medi.

Les espècies oxigenades reactives formades en l'electro-oxidació poden reaccionar tant amb els bacteris com amb qualsevol altre tipus de matèria orgànica present en el medi. En aquest cas, caldrà veure si hi ha un consum competitiu d'oxidants i, per tant, quin efecte té la presència de matèria orgànica en el medi en la inactivació dels bacteris. Per esbrinar-ho es van utilitzar diferents concentracions de paracetamol (PCM) com a matèria orgànica. Es va escollir el paracetamol perquè és un fàrmac àmpliament utilitzat, tant en medicina humana com en veterinària, del qual se n'ha detectat la seva presència en les plantes depuradores d'aigües residuals (EDAR), i perquè hi ha estudis que demostren la seva mineralització efectiva quan s'aplica un tractament d'electro-oxidació en solucions de sulfat i amb un ànode de diamant dopat en bor .

Els experiments es van fer utilitzant *P. aeruginosa*, un bacteri patogen oportunista, present en ambients molt diversos. Aquest bacteri preocupa especialment pel gradual augment de la seva resistència als antibiòtics. Es va treballar amb solucions sintètiques, amb un pH proper a 5,8, de Na_2SO_4 7mM únicament i d'altres on s'havien afegit diferents concentracions, entre 1 i 7 mM, de NaCl . Es van utilitzar tres tipus d'ànodes;

BDD, IrO₂ i RuO₂ (aquests dos darrers són ànodes dimensionalment estables) i es va comparar la seva capacitat bactericida en les diferents solucions; sense clor i en presència de clor. En les solucions on el clor era present, també es va mesurar el clor actiu electrogenerat per l'electro-oxidació. Finalment, també es va avaluar la influència, sobre la inactivació dels bacteris en el medi sulfat, de diferents concentracions de paracetamol com a matèria orgànica.

Utilitzant una solució aquosa de Na₂SO₄ 7 mM amb una concentració de 10⁶ ufc/mL de *P. aeruginosa*, als 60 minuts s'arribava a la total inactivació independentment de l'ànode utilitzat. Als 15 min s'observava una disminució de menys d'1 logaritme quan l'ànode utilitzat era BDD i en canvi era de 4,5 logaritmes amb IrO₂ i de 5,3 logaritmes amb RuO₂. Per tant, els resultats mostraven que per una inactivació de >99,999% eren necessaris 15 minuts d'electròlisi amb RuO₂, 30 minuts amb IrO₂ i 45 minuts amb BDD. Aquesta superior potència bactericida dels ànodes dimensionalment estables (IrO₂ i RuO₂) es podia atribuir a una major adsorció de cèl·lules a la seva superfície en comparació amb la que es produeix en BDD, afavorint així l'atac de les espècies oxidants adsorbides sobre la seva estructura, i finalment, potenciar notablement la seva inactivació.

Quan la mostra contenia NaCl, la inactivació dels bacteris va ser molt més ràpida perquè l'electro-oxidació afavoria la generació d'espècies de clor actiu (HClO) a més de les espècies oxigenades reactives (•OH). Amb una concentració 1mM NaCl, es requeria un temps de 5 minuts per a la inactivació de *P. aeruginosa* amb RuO₂ i IrO₂ i de gairebé 30 minuts quan s'utilitzava BDD. Així mateix, quan s'incrementava la concentració de NaCl, també s'incrementava la formació d'espècies de clor actiu i es reduïa el temps necessari per a la inactivació del bacteri. Amb l'ànode de BDD també es van provar dues intensitats de corrent diferents amb una mateixa concentració de 7mM NaCl obtenint la inactivació del bacteri als 2 minuts del tractament d'electro-oxidació en ambdós casos.

Finalment, es va afegir al medi una concentració coneguda de paracetamol per estudiar la competitivitat, entre aquest compost orgànic i els bacteris, per les espècies oxigenades reactives i veure com podia afectar a la inactivació d'aquests darrers. Utilitzant l'ànode de BDD es va poder observar que la taxa de desinfecció de la soca bacteriana era més baixa en presència de paracetamol al medi. Aquest resultat suggeria que, en concentracions de 27 ppm, hi havia un predomini de les espècies oxidants sobre la destrucció del paracetamol i els seus subproductes, mentre que a concentracions més baixes, 11 ppm, les espècies oxidants atacaven preminentment les cèl·lules per la qual cosa trobàvem taxes d'inactivació més grans. En el cas de concentracions de paracetamol d'entre 39 i 157 ppm, trobàvem taxes d'inactivació més elevades que les observades en concentracions de 27 ppm la qual cosa s'explicaria per la formació d'hydroquinona tòxica, p-benzoquinona i els seus subproductes durant el procés d'electro-oxidació, que podrien participar en l'acceleració de la desinfecció bacteriana. D'altra banda, quan s'utilitzava un ànode basat en IrO₂ s'assolia, en absència de matèria orgànica, una desinfecció total als 30 minuts, mentre que es necessitaven 60 minuts per a tota la resta de suspensions que contenien fins a 157 ppm de

paracetamol, la qual cosa feia que el procés d'inactivació fos més eficient que amb BDD. Així mateix, s'observa menys efecte dels subproductes tòxics formats ja que aquest ànode presenta menys poder d'oxidació per a mineralitzar els subproductes orgànics.

Podem concloure que la soca de *P. aeruginosa* a una concentració de 10^6 ufc mL⁻¹ en un medi aquós lliure de clor a pH 5,8 queda inactivada després d'un tractament d'electrooxidació. La inactivació es va aconseguir als 60 minuts de tractament amb un ànode BDD. El procés va ser molt més ràpid utilitzant ànodes DSA® ja que presenten major adsorció dels microorganismes a la seva superfície, aconseguint una inactivació completa als 30 minuts.

En presència de NaCl, la formació d'àcid hipoclorós (HClO) provoca una inactivació molt ràpida que requereix de 5 min per a la inactivació completa amb ànodes DSA® i menys de 30 min quan l'ànode és de BDD, a 33.3 mA cm^{-2} . Quanta més concentració de NaCl hi ha en el medi, més elevat és el rendiment del sistema de desinfecció. El millor rendiment es dona en $7 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4 + 7 \text{ mM NaCl}$ a $8,3 \text{ mA cm}^{-2}$, amb desinfecció completa en només 2 minuts i consum d'energia tan baix com $0,059 \text{ kW h m}^{-3}$.

L'addició de paracetamol en un medi aquós va revelar la destrucció preferent d'aquest compost a partir de 27 mg L^{-1} utilitzant un ànode BDD, encara que la inactivació també es va elevar a causa de les quantitats gradualment més grans de subproductes tòxics. Amb l'ànode IrO₂, l'adsorció cel·lular es va inhibir al principi de l'electròlisi, però la inactivació es va accelerar amb el pas del temps per la formació de subproductes tòxics.



Effect of electrogenerated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes



Carmina Bruguera-Casamada^a, Ignasi Sirés^{b,*}, Enric Brillas^b, Rosa M. Araujo^{a,*}

^aSec. Microbiologia, Virologia i Biotecnologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^bLaboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 21 January 2017

Available online 23 January 2017

Keywords:

Active chlorine

Electrochemical disinfection

Hydroxyl radical

Paracetamol

Pseudomonas aeruginosa

ABSTRACT

In this work, the disinfection of 100 mL of 10^6 CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* suspensions at pH 5.8 by electrochemical oxidation at 33.3 mA cm⁻² is reported. The undivided electrolytic cell was equipped with either a boron-doped diamond (BDD) or an IrO₂-based or RuO₂-based dimensionally stable anode and a stainless steel cathode. Physisorbed hydroxyl radicals M(·OH) formed from anodic water oxidation and active chlorine generated from anodic Cl⁻ oxidation were the main oxidizing species in pure Na₂SO₄ medium and in the presence of NaCl, respectively. A faster inactivation was always found using the dimensionally stable anodes. In 7 mM Na₂SO₄, this behavior was associated to the much larger adsorption of the bacteria onto the anode, which accelerated the M(·OH)-mediated oxidation and inactivation of the cells. The inactivation rate was strongly enhanced in 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl due to the larger oxidation power of active chlorine compared to that of M(·OH). The effect of NaCl concentration and current density on the disinfection process was examined with BDD and the best performance was obtained in 7 mM Na₂SO₄ + 7 mM NaCl at 8.3 mA cm⁻², with total inactivation in 2 min and energy consumption of 0.059 kW h m⁻³. The addition of paracetamol in 7 mM Na₂SO₄ medium inhibited the disinfection at short electrolysis time regardless of the anode, owing to the preferential action of M(·OH) on this pollutant. For BDD, the inactivation rate rose over time at higher drug content due to the generation of greater amounts of toxic by-products. For the IrO₂-based anode, the progressive formation of toxic and less adsorbable by-products enhanced the process over time, giving rise again to a quicker total disinfection compared to that with BDD.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last fifteen years, the effective removal of many toxic and recalcitrant organic pollutants from wastewater by electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) has been exhaustively examined [1–6]. The EAOPs are environmentally friendly methods because the main reactant is the electron, which is a clean reagent, and no additional species or just small amounts of innocuous ones are further needed. These methods present important technological advantages such as ease of automation, versatility, high efficiency and safety since they operate under mild conditions. The common feature of all EAOPs is their ability to produce strong oxidants like reactive oxygen species (ROS) on site. The

most significant ROS is the hydroxyl radical (·OH), which has a high standard reduction potential ($E^\circ = 2.80$ V/SCE) that facilitates its reaction with many organics up to their mineralization [3–6].

The most developed EAOP is electrochemical oxidation (EO), also called electro-oxidation or anodic oxidation [1,5]. It involves the degradation of organic pollutants from a contaminated solution contained in the electrolytic cell either by direct oxidation at the anode surface or by mediated reaction with strong oxidizing agents generated on site. In chloride-free solutions, physisorbed hydroxyl radicals (M(·OH)) are produced as intermediate of O₂ evolution from water discharge at the anode M as follows [1,7]:



The performance of EO depends on the kind of anodic material tested. For the so-called active anodes, such as Pt and dimensionally stable anodes like IrO₂ and RuO₂, the mineralization

* Corresponding authors.

E-mail addresses: i.sires@ub.edu (I. Sirés), raaraju@ub.edu (R.M. Araujo).

of organics is usually low because most of the physisorbed $M(\cdot OH)$ are converted into the chemisorbed “superoxide” MO with poor oxidization power [8,9]. This transformation is minimized in the so-called non-active anodes like PbO_2 , SnO_2 and boron-doped diamond (BDD), which present a large ability to degrade the organic load [1,5,6]. It has been found that BDD thin-film electrodes are the most powerful anodes in EO because they exhibit the highest O_2 -overtoltage and a very weak interaction with $\cdot OH$ and organics, thus favoring the complete mineralization of aromatics and linear aliphatic compounds [10–18]. Nevertheless, the main drawbacks of the BDD anode are its high cost and the simultaneous production of other weaker oxidants like ozone and peroxodisulfate ($S_2O_8^{2-}$) ion in sulfate medium [7,19].

A much more complex EO process takes place in the presence of chloride ions, since the organic molecules can be attacked by active chlorine ($Cl_2/HClO/ClO^-$) produced via reactions (2)–(4), in competition with $M(\cdot OH)$ [2,3,20–22].



The predominant species is $Cl_{2(aq)}$ ($E^\circ = 1.36$ V/SHE) up to pH 3.0, $HClO$ ($E^\circ = 1.49$ V/SHE) at pH 3–8 and ClO^- ($E^\circ = 0.89$ V/SHE) at pH > 8.0. Consequently, $HClO$ is the most powerful active chlorine species and thus, the most successful mediated oxidation of organics in such medium is likely to occur under slightly acidic and neutral conditions. Active chlorine is expected to be more extensively produced at dimensionally stable anodes, rather than at BDD, because of its larger electrocatalytic ability regarding reaction (2) [2,3].

Closely related to the destruction of organic matter by EO, the application of this EAOP to the inactivation of pathogenic microorganisms present in water has been investigated as well. This mainly occurs by the oxidation of the compounds of the cell wall, which damages them and subsequently causes the inactivation of other essential molecules of the bacteria [23–25]. The electrochemical disinfection has been successful for the treatment of urban wastewater, pools and spas, among others [26–28]. The inactivation ability of EO depends on the nature of the anode and the ions contained in solution. The antimicrobial action of physisorbed BDD($\cdot OH$) originated from reaction (1) in chloride-free medium has been well proven [25,29–33]. A quicker disinfection is usually achieved in the presence of chloride ions because of the rapid attack of active chlorine species, being Pt and dimensionally stable anodes more efficient than BDD [26,27,34–37]. However, most of the studies have been focused on the inactivation of *Escherichia coli* as process indicator [31,33,36], with much less attention on other hazardous bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas* are aerobic, rod-shaped Gram-negative bacteria, which are distinguished by their versatile metabolism. *Pseudomonas aeruginosa* is ubiquitous in water and soil, also detected in plants and animals. It is an opportunistic pathogen, related to external otitis, keratitis, dermatitis and even pneumonia. It is also the cause of infections in burned people and cystic fibrosis patients, being the fifth most frequent cause of nosocomial infections, especially due to surgical interventions and septicemia among immunocompromised or traumed people [38,39]. Nonetheless, most of the infections by *Pseudomonas* result from contact with contaminated water, either in natural environments or in aquatic facilities such as swimming pools or hot tubs, where they often form biofilms that act as a reservoir [40]. Currently, major concerns arise from the gradually greater resistance of these bacteria to antibiotics. On the other hand, it is well known that

pharmaceuticals in water can exert toxic effects on aquatic organisms and consumers [2], but there is scarce information on their interaction with bacteria resulting from competitive consumption of oxidants during inactivation treatments [36]. A common anti-inflammatory and analgesic pharmaceutical widely consumed in human and veterinary medicine is paracetamol (PCM, *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide, $C_8H_9NO_2$). This drug has been detected in sewage wastewater treatment plants up to $6 \mu g L^{-1}$ and its effective mineralization by EO in sulfate and chloride solutions with a BDD anode has been reported elsewhere [41,42].

This paper aims to clarify the electrochemical disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* suspensions in sulfate and mixed sulfate + chloride media at natural pH near 5.8. The bactericidal ability of electrogenerated $M(\cdot OH)$ and active chlorine in EO was examined using BDD, IrO_2 -based and RuO_2 -based anodes under analogous conditions. The influence of several PCM contents on bacteria inactivation in sulfate medium was also assessed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Paracetamol (>99% purity) was supplied by Merck. Sodium chloride and sodium sulfate used for the electrolytic experiments were of analytical grade purchased from Panreac Química. All the solutions were prepared with high-purity water from a Millipore Milli-Q system with resistivity >18 $M\Omega$ cm.

2.2. Bacteria and culture

Strains of the rod-shaped Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 15442 have been employed in this work. Bacteria were cultured in Trypticasein Soy Agar (TSA) plates, purchased from Laboratorio Conda, at 37 °C for 24 h. The cells were subsequently spiked in 2 mL of 7 mM Na_2SO_4 , centrifuged at 14,000 rpm for 2 min and washed twice with 1 mL of 7 mM Na_2SO_4 . The resulting pellet was resuspended in 1 mL of the same electrolyte so as to give an optical density at 600 nm (O.D. 600) of 0.7 ± 0.1 , related to about 10^8 colony-forming units per mL (CFU mL^{-1}).

2.3. Electrolytic trials

An undivided, two-electrode cylindrical tank reactor of 150 mL capacity was used for all electrolytic trials. The cell was surrounded with a jacket for circulation of thermostated water to keep the solution temperature at 25 °C. The anode was either a BDD thin-film electrode purchased from NeoCoat (La-Chaux-de-Fonds, Switzerland), a Ti/RuO_2 -based plate or a Ti/IrO_2 -based plate, both supplied by NMT Electrodes (Pinetown, South Africa). In all the assays, the cathode was a stainless steel (AISI 304) sheet. The area of all electrodes was 3 cm^2 and the interelectrode gap was close to 1 cm. All experiments were performed under galvanostatic conditions, using an Amel 2053 potentiostat-galvanostat to set the current density (j) and a Demestres 601BR digital multimeter to measure the cell voltage. Before the assays, the surface of all anodes was cleaned by polarization in 50 mM Na_2SO_4 at $j = 100$ $mA\ cm^{-2}$ for 180 min.

The disinfection assays were carried out with 100 mL of aqueous solutions containing 7 mM Na_2SO_4 alone or in the presence of 1, 3 or 7 mM NaCl at ca. pH 5.8, always under vigorous stirring at 800 rpm with a magnetic PTFE bar. In the former medium, PCM contents up to 157 $mg\ L^{-1}$ (100 $mg\ L^{-1}$ TOC) were added in some cases to check the influence of organic matter. Each solution was spiked with a concentrated bacterial suspension of 10^8 CFU mL^{-1}

to obtain a suspension with 10^6 CFU mL⁻¹. Before each trial, the cell was cleaned with a H₂O₂:H₂SO₄ mixture for 10 min, rinsed with ultrapure water and dried in an oven at 80 °C. The electrodes were immersed in ultrapure water at 100 °C for 10 min, followed by air drying.

2.4. Analytical methods

The O.D. 600, pH and electrical conductance of bacterial suspensions were determined with a Camspec M108 spectrophotometer, a Crison GLP 22 pH-meter and a Metrohm 644 conductometer, respectively. Total organic carbon (TOC) of initial and final electrolyzed suspensions was obtained by injecting 50 µL aliquots into a Shimadzu TOC-VCSN. Reproducible TOC values with an accuracy of ±1% were always found. Active chlorine was determined by the N,N-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) colorimetric method using a Shimadzu 1800 UV/Vis spectrophotometer selected at $\lambda = 515$ nm [43].

The inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* strains was followed by withdrawing aliquots (1 mL) at different time periods for 30–60 min of electrolysis. Samples obtained from sulfate medium were diluted in 7 mM Na₂SO₄, whereas those of mixed media were diluted in 7 mM Na₂SO₄ + 3% Na₂S₂O₃ solution immediately after collection to neutralize the bactericidal effect of residual active chlorine. In both cases, the samples were cultured in duplicate on TSA plates and incubated at 37 °C for 24 h. The reduction of culturability was measured as $\log(N_t/N_0)$, being N_t the CFU value at time t and N_0 the initial CFU content. The theoretical detection limit was 1 bacterium per mL. All the trials were made in triplicate and average values of log unit reduction are presented in figures, along with the error bars related to a 95% confidence interval.

3. Results and discussion

3.1. Electrochemical inactivation in sulfate medium

A first study on the disinfection of 100 mL of a 10^6 CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* suspension by EO was performed in 7 mM Na₂SO₄ using a BDD, RuO₂-based or IrO₂-based anode and a SS cathode at $j = 33.3$ mA cm⁻² for 60 min. In these comparative assays, the cell voltage was about 16.9 V for the former anode and about 15.6 V for the latter ones, with only a change of ±0.5 V as maximal during the trials. The low conductivity of the starting solution was about 1.8 mS cm⁻¹ and remained practically invariant, whereas the initial pH ~ 5.8 and initial TOC close to 3.1 mg L⁻¹ underwent slight decays of 0.5 units and 0.8 mg L⁻¹ as maximal, respectively. All these quite stable parameters suggest that the mineralization of bacterial cells during the EO treatment was not significant. Moreover, a preliminary test informed about the poor inactivation attained for bacterial suspensions in 7 mM Na₂SO₄ in the absence of current supply.

Fig. 1 depicts a gradual reduction of $\log(N_t/N_0)$ with electrolysis time in all cases, attaining total inactivation (i.e., 7 log-unit decay) after 60 min. At 15 min, however, a very poor drop of less than 1 log-unit was achieved for the BDD anode, whereas the $\log(N_t/N_0)$ was reduced by 4.5 units using the IrO₂-based one and by a slightly higher value of 5.3 units using the RuO₂-based one. The inactivation rate was so high for the two dimensionally stable anodes that they led to a reduction of 7 log-units at 30 min, but the use of the BDD anode only allowed the removal of 4.6 log units at that time. Note that the accuracy of the $\log(N_t/N_0)$ decay is limited by the sensitivity of the analytical method used to determine *Pseudomonas aeruginosa*, thus yielding a plateau at too low bacteria content. The results of Fig. 1 reveal that EO at $j = 33.3$ mA cm⁻² yielded >99.999% of inactivation (>5 log-unit destruction) after

15, 30 and 45 min of electrolysis with a RuO₂-based, IrO₂-based and BDD anode, respectively. Under these conditions, the disinfection process involves pre-eminently the action of physisorbed M (\cdot OH) formed from reaction (1), along with other ROS such as H₂O₂, O₃ and O₂⁻ [25,29,30] for all anodes, and other weak oxidants like S₂O₈²⁻ ion for BDD [1,3]. These oxidizing species damage the cell membranes, altering their permeability and finally affecting other essential molecules of the bacteria [23,33]. Our results could seem rather unexpected because it is well known that the BDD electrode is a non-active anode with low adsorption ability that produces much greater amounts of (\cdot OH) compared to the two active dimensionally stable materials [1,3,4]. The superior bactericidal power of the latter anodes (see Fig. 1) can then be ascribed to a much larger adsorption of the cells onto their surface compared to that occurring on BDD, thus favoring the attack of the adsorbed oxidizing species over their structure and eventually enhancing their inactivation very remarkably.

3.2. Electrochemical disinfection in mixed sulfate + chloride media

Once examined the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in suspensions with a pure sulfate salt, the effect of electrogenerated active chlorine was investigated employing a mixed medium containing 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl. This solution presented a conductivity of about 1.9 mS cm⁻¹ and pH ca. 5.8, which are similar values to those obtained after 30 min of electrolysis at $j = 33.3$ mA cm⁻² regardless of the anode used.

First, the ability of the different electrolytic systems to generate active chlorine (mainly in the form of HClO under the current experimental conditions) in the bulk in the absence of the bacterial suspension was assessed for 15 min of electrolysis. Fig. 2 shows a progressive rise in active chlorine concentration for all the anodes tested, attaining final values close to 0.3, 1.4 and 5.2 mg L⁻¹ for EO with a BDD, IrO₂-based and RuO₂-based anode, respectively. The superiority of the latter anode can be related to its larger electrocatalytic ability to oxidize Cl⁻ ion from reaction (2) under the tested conditions. This agrees with previous results by Jeong et al. [34], who reported that the accumulation rate of active chlorine using dimensionally stable anodes such as RuO₂, IrO₂ and Pt-IrO₂ was much higher than that with BDD. The low contents of this species achieved up to 5 min (see Fig. 2) can be explained by the existence of parasitic reactions, as for example the formation of chlorate and perchlorate from HClO oxidation, which are particularly important in the case of the BDD anode [2–4,24]. The determination of active chlorine by the DPD method was not made in the presence of bacteria since a large variability was expected depending on its consumption upon attack over the cells in the solution bulk [24,27,36].

Fig. 3 highlights the comparative $\log(N_t/N_0)$ decay with electrolysis time for the EO treatment of 100 mL of 10^6 CFU mL⁻¹ bacterial suspensions in 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl using the three types of anode at $j = 33.3$ mA cm⁻². Total inactivation with a 7-log reduction was rapidly obtained after only 5 min of treatment for both, IrO₂-based and RuO₂-based anodes, meaning that the active chlorine content generated under such conditions was high enough to oxidize and alter the wall of all the cells within a very short time. In contrast, the use of BDD yielded a much slower inactivation rate and >15 min were needed to inhibit the culturability of all the bacteria in suspension. Comparison of Figs. 1 and 3 allows inferring a much quicker decay of $\log(N_t/N_0)$ in the mixed solution than in the pure sulfate medium. For example, the CFU content in 7 mM Na₂SO₄ decreased by 0.8, 4.5 and 5.3 log units in 15 min using BDD, IrO₂-based and RuO₂-based anodes, whereas it experienced a much larger drop of 4.7 log units for the former anode and near 7 log units for the two latter ones in 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl. This means that electrogenerated active chlorine possesses

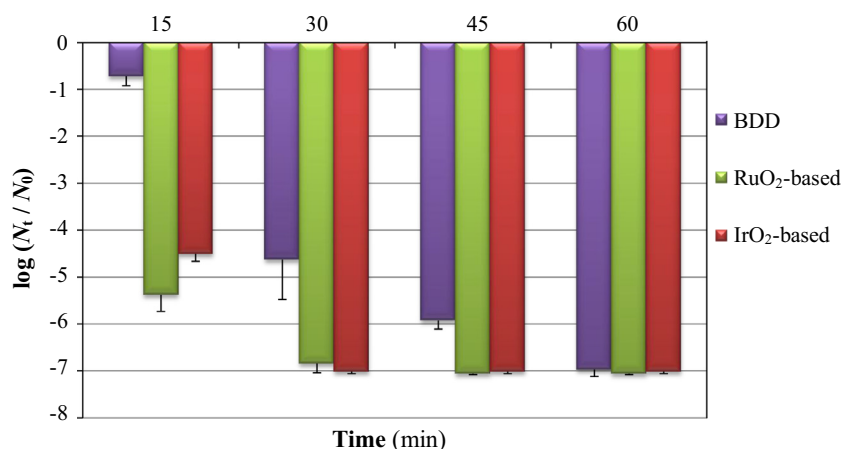


Fig. 1. Logarithmic reduction of 10^6 CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* with electrolysis time for the electrochemical oxidation (EO) of 100 mL of an aqueous suspension with 7 mM Na₂SO₄ at pH 5.8 using an undivided cell with a boron-doped diamond (BDD), RuO₂-based or IrO₂-based anode and a stainless steel (SS) cathode, all of 3 cm² area, at current density (j) of 33.3 mA cm⁻² and 25 °C.

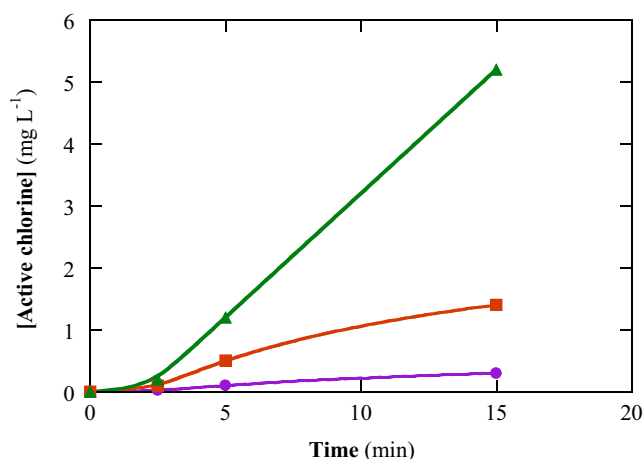
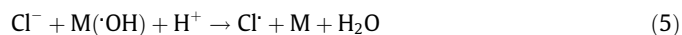


Fig. 2. Change of active chlorine concentration with time for the electrolysis of 100 mL of 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl at pH 5.8 in an undivided cell with a: (●) BDD, (▲) RuO₂-based and (■) IrO₂-based anode and a SS cathode at $j = 33.3$ mA cm⁻² and 25 °C.

much larger oxidation power and, consequently, much larger disinfection ability than ROS generated as unique oxidants in pure sulfate medium. In the latter case, the bacterial adsorption onto the

anode surface played a crucial role on inactivation trends because the M(·OH) only acts in the anode vicinity, whereas active chlorine mainly acts in the whole bulk. Worth noting, Cl⁻ ion is detrimental for M(·OH) formation due to the following parasitic destruction reaction [16]:



Therefore, in chlorinated media, apart from the generation of active chlorine as main oxidant, other chloro radicals like Cl[·], ClOH⁻ and Cl₂⁻ can contribute to bacterial inactivation [16].

The aforementioned findings bring to consider that Cl⁻ concentration and j can be key parameters to disinfect the *Pseudomonas aeruginosa* suspensions by EO. To corroborate this, mixed solutions of 7 mM Na₂SO₄ with 1, 3 or 7 mM NaCl were comparatively electrolyzed at $j = 33.3$ mA cm⁻², and the 7 mM Na₂SO₄ + 7 mM NaCl solution was also treated at $j = 8.3$ mA cm⁻². These assays were carried out with the BDD/SS system, despite its lower oxidation power, aiming to better observe the influence of such parameters. The cell voltage decreased from ca. 15.1 to 13.2 V for the mixed solutions at increasing NaCl concentration from 1 to 7 mM due to the gradually higher conductivity (from 1.9 to 2.4 mS cm⁻¹). No significant variation of cell voltage, conductivity, pH (near 5.8) and TOC (close to 3.1 mg L⁻¹) was found during the 30-min treatments at 33.3 mA cm⁻². The same behavior was observed for the experiment at $j = 8.3$ mA cm⁻², with a cell voltage of 7.1 V.

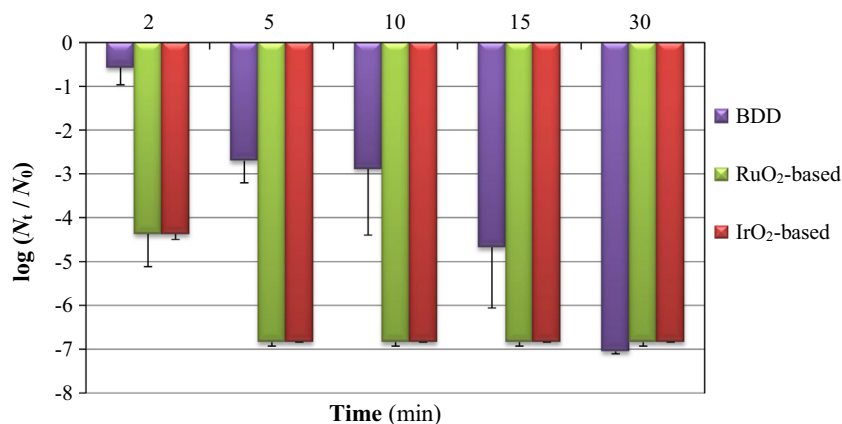


Fig. 3. Logarithmic reduction vs. electrolysis time for the EO treatment of 100 mL of 10^6 CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* suspensions with 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl at pH 5.8 in an undivided cell with a BDD, RuO₂-based or IrO₂-based anode and a SS cathode at $j = 33.3$ mA cm⁻² and 25 °C.

Fig. 4a and b exemplify the accumulation of active chlorine up to 15 min of electrolysis for the above conditions but in the absence of bacteria. A growing final content of 0.29, 0.37 and 15.8 mg L⁻¹ of this species was accumulated in the bulk using the mixed solution with 1, 3 and 7 mM NaCl, respectively, always operating at $j = 33.3 \text{ mA cm}^{-2}$. The large upgrade of active chlorine production when using 7 mM instead of 3 mM NaCl can be ascribed to a high increase in rate of reaction (2) favoring the generation of HClO from reaction (3), plausibly due to the concomitant decay in cell voltage of the system. This behavior was confirmed by the high accumulation (i.e., 10.4 mg L⁻¹ active chlorine) also found for the mixed solution with 7 mM NaCl when a lower j of 8.3 mA cm⁻² was used, as can be seen in Fig. 4a. All these findings suggest that this medium with much higher active chlorine accumulation should yield faster inactivation of the 10⁶ CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* suspension upon EO treatment. This assumption was corroborated when the corresponding $\log(N_t/N_0)$ decays were measured.

Fig. 5 depicts a complete inactivation of the strain in only 2 min using the 7 mM Na₂SO₄ + 7 mM NaCl medium, regardless of the j value applied, as a result of the excessive active chlorine content generated. In contrast, the process was slower for 3 mM NaCl and 7 log units were reduced at 10 min of electrolysis due to lower production of active chlorine. The use of the smallest NaCl concentration (1 mM NaCl) led to a slower destruction of the cell walls and a time as long as ~30 min was required for total inactivation.

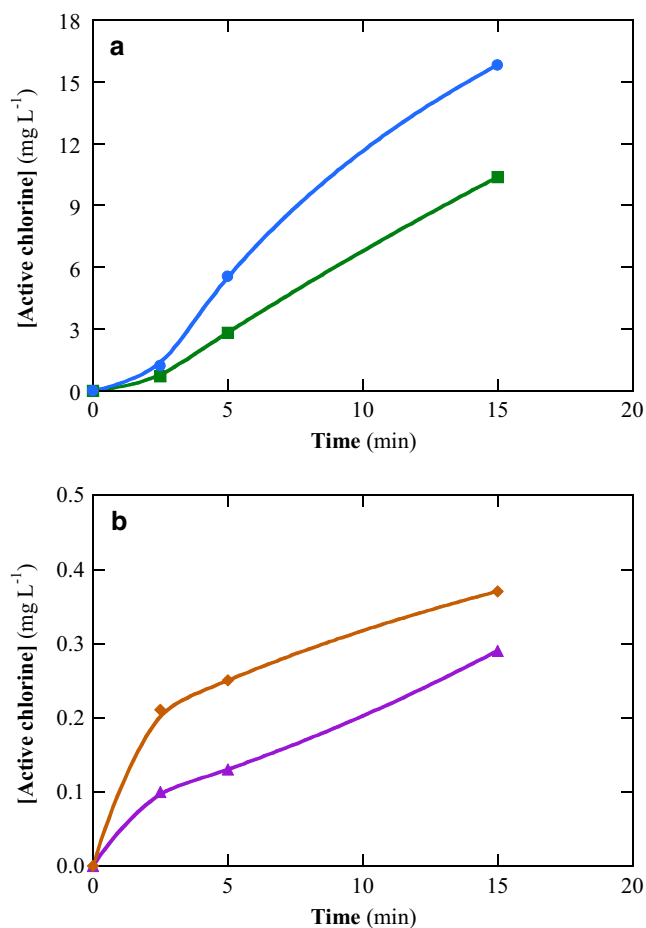


Fig. 4. Variation of active chlorine concentration with electrolysis time for the EO treatment of 100 mL of 7 mM Na₂SO₄ with different NaCl contents at pH 5.8 in an undivided BDD/SS tank reactor at several j values and 25 °C. (a) 7 mM NaCl at j of (■) 8.3 mA cm⁻² and (●) 33.3 mA cm⁻². (b) (▲) 1 mM and (◆) 3 mM NaCl at $j = 33.3 \text{ mA cm}^{-2}$.

These results indicate that the NaCl concentration is the main parameter that determines the performance of the EO disinfection process, rather than j since a very similar tendency was obtained at 33.3 and 8.3 mA cm⁻² when 7 mM NaCl was utilized with a BDD anode. This decrease in j entailed a strong drop of the required energy consumption for complete inactivation, from 0.440 to 0.059 kW h m⁻³, which is a very interesting feature for practical application of this technology. Even lower energy consumption could be achieved with a powerful, dimensionally stable anode. This can be deduced from the fact that, in 7 mM Na₂SO₄ + 1 mM NaCl, this parameter was 0.983 kW h m⁻³ when using the best anode (i.e., the RuO₂-based one) as a result of a cell voltage of 11.8 V at $j = 33.3 \text{ mA cm}^{-2}$. This value was much lower than 7.55 kW h m⁻³ obtained with the BDD one under the same conditions (see Fig. 3).

Interestingly, the disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* suspensions by EO has been previously reported only with BDD/BDD flow systems, which found great difficulty to promote the inactivation. The authors assumed that BDD was the best electrode to generate oxidizing species to attack the microorganism, which does not agree with the results of our work since dimensionally stable anodes show a best performance in both, chloride-free and chlorinated solutions. Thus, Griessler et al. [32] described reduction of near 4 log units of culturability starting from a 10⁶ CFU mL⁻¹ bacterial suspension in tap water containing 7.8 mg L⁻¹ SO₄²⁻ + 7.0 mg L⁻¹ Cl⁻ after 30 min of electrolysis. A high j of 140 mA cm⁻² was applied, resulting in an enormous cell voltage of 230 V owing to the extremely low conductivity of the medium. More recently, Rajab et al. [37] described the disinfection of 10 L of 10⁷–10⁸ CFU mL⁻¹ bacterial suspensions under recirculation at 1.2 L h⁻¹. In pure water, a $\log(N_t/N_0)$ removal of 3.2 log units was obtained operating at 42 mA cm⁻² for 60 min, whereas total inactivation was obtained in 15 min at 167 mA cm⁻². Better results were found upon addition of 20 mg L⁻¹ Cl⁻ (5.6 mM) to the solution, reaching culturability reductions of ~6 log units after 60 and 5 min at 42 and 167 mA cm⁻², respectively. Our results have also shown such an improved inactivation with the BDD anode in the presence of Cl⁻ ion (see Figs. 1 and 3).

3.3. Effect of organic matter on the electrochemical disinfection process

In most real cases, the microorganisms are present in water along with organic matter, including emerging pollutants like pharmaceuticals. Hence, the influence of such a potential oxidant scavenger on the competitive consumption of ROS was assessed by selecting PCM as model organic compound. Preliminary control experiments of suspensions with 10⁶ CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* and 157 mg L⁻¹ PCM (corresponding to 100 mg L⁻¹ TOC) in 7 mM Na₂SO₄ at ca. pH 5.8 did not show any decrease in culturability over 60 min, thereby evidencing the innocuous character of PCM for the tested bacterial strain. EO experiments were then performed with different PCM concentrations using a BDD or an IrO₂-based dimensionally stable anode at $j = 33.3 \text{ mA cm}^{-2}$ for 60 min. The assays were not made in chloride medium since the expected much faster bacterial inactivation would prevent a good evaluation of the effect of organics.

Fig. 6a highlights the slower disinfection of the bacterial suspensions in the presence of PCM as compared to the EO in its absence, using a BDD anode, as expected from the non-selective attack of the electrogenerated oxidants (ROS and S₂O₈²⁻ ion) over both, the microorganisms and the organic matter. However, it is noticeable that the $\log(N_t/N_0)$ removal was enhanced when the PCM content rose from 27 to 157 mg L⁻¹ or when it decreased from 27 to 0 mg L⁻¹. In other words, the inactivation rate profile showed a minimum at 27 mg L⁻¹ PCM. At 45 min, for example, an

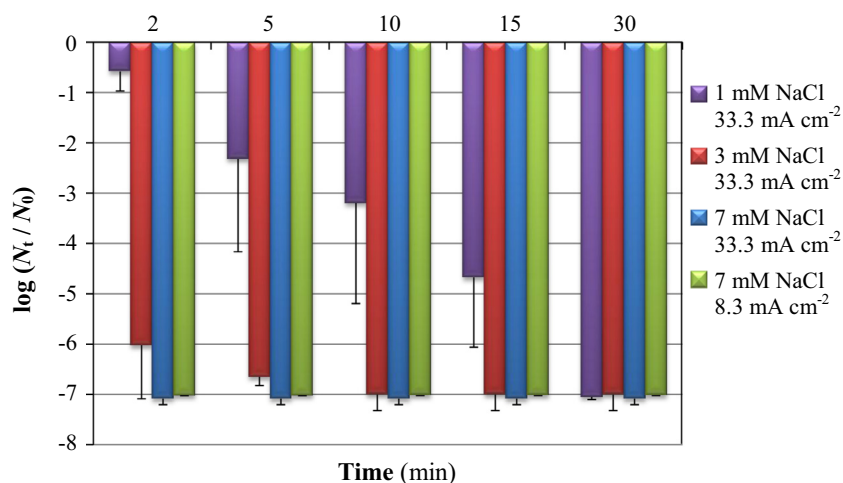


Fig. 5. Logarithmic reduction of 10^6 CFU mL⁻¹ *Pseudomonas aeruginosa* over electrolysis time for the EO of 100 mL of aqueous bacterial suspensions under the conditions of Fig. 4.

inactivation of 5.8, 4.0, 1.7, 2.8, 4.6 and 5.2 log units was obtained at 0, 11, 27, 39, 79 and 157 mg L⁻¹ PCM, respectively. This trend suggests that the action of the oxidizing species was gradually more focused on PCM and its by-products when increasing the content up to 27 mg L⁻¹, thus yielding a slower inactivation. Since a similar amount of oxidants is expected to be produced at the same j of 33.3 mA cm⁻², the subsequent progressive disinfection enhancement from 27 to 157 mg L⁻¹ PCM at a given time can be related to the formation of more toxic organic by-products, which inactivate the cells to a gradually larger extent. In this way, at 60 min of electrolysis, total disinfection was achieved in the

absence of organics as well as with the highest PCM concentration. All the other solutions attained >6 log-unit reduction, except that with 27 mg L⁻¹ that only reached a 5-log decay due to the smaller generation of toxic by-products. The formation of toxic hydroquinone and *p*-benzoquinone during the EO treatment of PCM has been reported by some of us elsewhere [41], and such by-products could be responsible for the acceleration of the bacterial disinfection. Our results also agree with the progressively greater abatement of solution TOC, being 1.2, 2.6, 3.5, 8.8 and 19.6 mg L⁻¹ at rising PCM contents of 11, 27, 39, 79 and 157 mg L⁻¹, respectively. This tendency can be accounted for by the larger efficiency

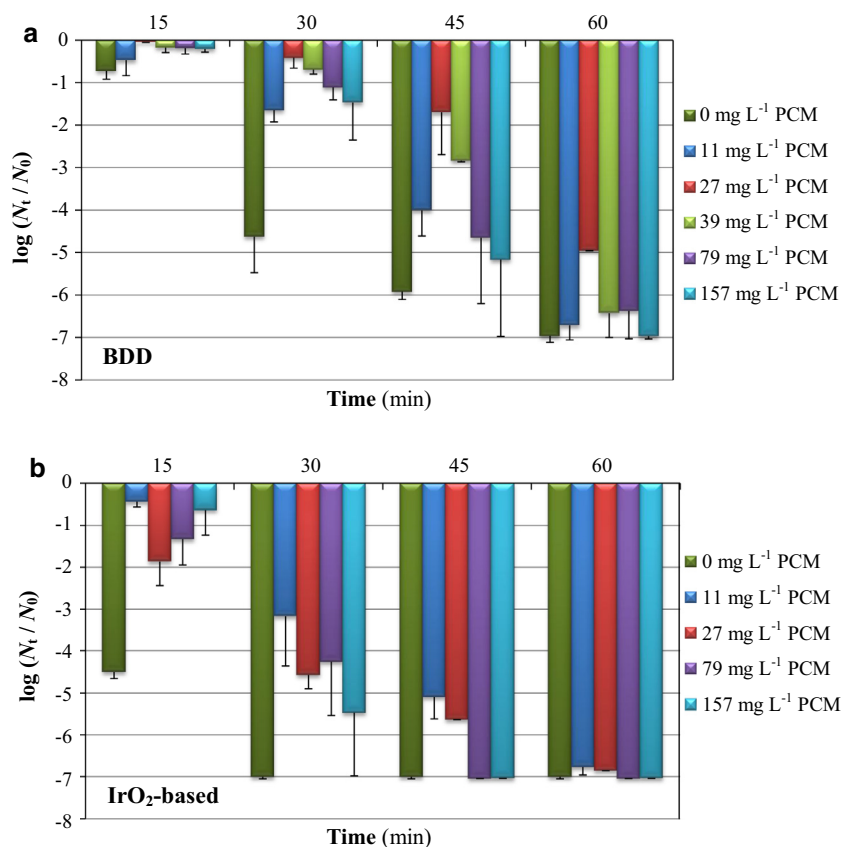


Fig. 6. Effect of paracetamol concentration on the logarithmic reduction of *Pseudomonas aeruginosa* with electrolysis time for the EO treatment of 100 mL of aqueous bacterial suspensions with 10^6 CFU mL⁻¹ in 7 mM Na₂SO₄ at pH 5.8 using an undivided cell with a: (a) BDD or (b) IrO₂-based anode, and a SS cathode at $j = 33.3$ mA cm⁻² and 25 °C.

of oxidants to destroy the organic pollutants, thanks to the concomitant deceleration of their parasitic reactions [2–4,41].

The comparative results using an IrO₂-based anode are presented in Fig. 6b, and they differ significantly from those obtained with BDD (see Fig. 6a). Total disinfection for the former anode was already achieved at 30 min in the absence of organic matter and at 60 min for all the other suspensions containing up to 157 mg L⁻¹ PCM, making the inactivation process more efficient than that with BDD. Nevertheless, a smaller formation of toxic by-products is expected due to its lower oxidation ability to mineralize the organic by-products since TOC was reduced by less than 2 mg L⁻¹ in all cases. As stated above, the faster inactivation attained with the IrO₂-based anode compared to BDD can be associated with the better adsorption of the cells onto its surface that favors the oxidation of their walls with M(OH). The lower inactivation rate in the presence of PCM could then be related to the simultaneous reaction between M(OH) and either the adsorbed cells, PCM or its by-products. Results of Fig. 6b suggest the pre-eminent oxidation of adsorbed PCM at a short electrolysis time of 15 min, which hampered the disinfection process in all cases. In contrast, the gradual production of larger amounts of less adsorbable by-products over time with increasing PCM content favored the bacterial adsorption, thereby enhancing the inactivation rate when going from 11 to 157 mg L⁻¹, as can be observed at 30 and 45 min of electrolysis. Furthermore, the concomitant larger toxicity of reaction by-products was beneficial, favoring the disinfection of the bacterial suspensions. Such toxic organics can be gradually degraded under the action of M(OH), ending in a total disinfection along with a quantitative decontamination of the water.

4. Conclusions

It has been shown that a *Pseudomonas aeruginosa* strain spiked at 10⁶ CFU mL⁻¹ in a chloride-free aqueous medium at pH 5.8 can be inactivated by EO at different rates depending on the anodic material. Total inactivation was achieved in 60 min using a BDD anode due to the oxidation and damage of the cell wall pre-eminently by electrogenerated physisorbed M(OH). The process became much faster using IrO₂- or RuO₂-based anodes since the greater adsorption of microorganisms onto their surface enhanced their reaction with M(OH), attaining complete inactivation in 30 min. In the presence of NaCl, HClO caused a much rapid disinfection, requiring 5 and <30 min for complete inactivation with both dimensionally stable anodes and BDD, respectively, at 33.3 mA cm⁻². With the BDD/SS system, the concentration of active chlorine grew at higher NaCl content from 1 to 7 mM and *j* from 8.3 to 33.3 mA cm⁻². The best performance was found in 7 mM Na₂SO₄ + 7 mM NaCl at 8.3 mA cm⁻², with complete disinfection in only 2 min and energy consumption as low as 0.059 kW h m⁻³. The inactivation was always more favorable using a dimensionally stable anode. The addition of PCM in Na₂SO₄ medium revealed the preferential destruction of this compound from 27 mg L⁻¹ using a BDD anode, although the inactivation also rose due to the gradually larger amounts of toxic by-products. With the IrO₂-based anode, the cell adsorption was inhibited at the beginning of the electrolysis, but the inactivation was further accelerated over time by the formation of less adsorbable toxic by-products, ending in total disinfection.

Acknowledgements

The authors thank financial support under project CTQ2013-48897-C2-1-R (MINECO, FEDER, EU) and from the “Grups de recerca reconeguts” 2014SGR83 and 2014SGR914 (Generalitat de

Catalunya). Technical support from Dr. Javier Méndez (Universitat de Barcelona) is also acknowledged.

References

- [1] M. Panizza, G. Cerisola, Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants, *Chem. Rev.* 109 (2009) 6541–6569.
- [2] I. Sirés, E. Brillas, Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review, *Environ. Int.* 40 (2012) 212–229.
- [3] I. Sirés, E. Brillas, M.A. Oturan, M.A. Rodrigo, M. Panizza, Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8336–8367.
- [4] C.A. Martínez-Huitle, M.A. Rodrigo, I. Sirés, O. Scialdone, Single and coupled electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: a critical review, *Chem. Rev.* 115 (2015) 13362–13407.
- [5] H. Särkkä, A. Bhatnagar, M. Sillanpää, Recent developments of electro-oxidation in water treatment – a review, *J. Electroanal. Chem.* 754 (2015) 46–56.
- [6] F.C. Moreira, R.A.R. Boaventura, E. Brillas, V.J.P. Vilar, Electrochemical advanced oxidation processes: a review on their application to synthetic and real wastewaters, *Appl. Catal. B: Environ.* 202 (2017) 217–261.
- [7] B. Marselli, J. Garcia-Gomez, P.A. Michaud, M.A. Rodrigo, Ch. Cominellis, Electrogeneration of hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) D79–D83.
- [8] R. Chaiyont, C. Badoe, C. Ponce de León, J.L. Nava, F.J. Recio, I. Sirés, P. Herrasti, F.C. Walsh, Decolorization of Methyl Orange dye at IrO₂-SnO₂-Sb₂O₅ coated titanium anodes, *Chem. Eng. Technol.* 36 (2013) 123–129.
- [9] G. Coria, I. Sirés, E. Brillas, J.L. Nava, Influence of the anode material on the degradation of naproxen by Fenton-based electrochemical processes, *Chem. Eng. J.* 304 (2016) 817–825.
- [10] M. Haidar, A. Dirany, I. Sirés, N. Oturan, M.A. Oturan, Electrochemical degradation of the antibiotic sulfachloropyridazine by hydroxyl radicals generated at a BDD anode, *Chemosphere* 91 (2013) 1304–1309.
- [11] E.B. Cavalcanti, S. Garcia-Segura, F. Centellas, E. Brillas, Electrochemical incineration of omeprazole in neutral aqueous medium using a platinum or boron-doped diamond. Degradation kinetics and oxidation products, *Water Res.* 47 (2013) 1803–1815.
- [12] L. Feng, N. Oturan, E.D. van Hullebusch, G. Esposito, M.A. Oturan, Degradation of anti-inflammatory drug ketoprofen by electro-oxidation: comparison of electro-Fenton and anodic oxidation processes, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8406–8416.
- [13] A. El-Ghenymy, F. Centellas, J.A. Garrido, R.M. Rodríguez, I. Sirés, P.L. Cabot, E. Brillas, Decolorization and mineralization of Orange G azo dye solutions by anodic oxidation with a boron-doped diamond anode in divided and undivided tank reactors, *Electrochim. Acta* 130 (2014) 568–576.
- [14] H. Olvera-Vargas, N. Oturan, C.T. Aravindakumar, M.M. Sunil Paul, V.K. Sharma, M.A. Oturan, Electro-oxidation of the dye azure B: kinetics, mechanism, and by-products, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8379–8386.
- [15] X. Florenza, A.M.S. Solano, F. Centellas, C.A. Martínez-Huitle, E. Brillas, S. Garcia-Segura, Degradation of the azo dye Acid Red 1 by anodic oxidation and indirect electrochemical processes based on Fenton's reaction chemistry. Relationship between decolorization, mineralization and products, *Electrochim. Acta* 142 (2014) 276–288.
- [16] A. Thiam, I. Sirés, J.A. Garrido, R.M. Rodríguez, E. Brillas, Effect of anions on electrochemical degradation of azo dye Carmoisine (Acid Red 14) using a BDD anode and air-diffusion cathode, *Sep. Purif. Technol.* 140 (2015) 43–52.
- [17] H. Olvera-Vargas, N. Oturan, D. Buisson, E.D. van Hullebusch, M.A. Oturan, Electro-oxidation of the pharmaceutical furusemide: kinetics, mechanism, and by-products, *Clean* 43 (2015) 1455–1463.
- [18] A. Thiam, E. Brillas, J.A. Garrido, R.M. Rodríguez, I. Sirés, Routes for the electrochemical degradation of the artificial food azo-colour Ponceau 4R by advanced oxidation processes, *Appl. Catal. B: Environ.* 180 (2016) 227–236.
- [19] C. Flox, P.L. Cabot, F. Centellas, J.A. Garrido, R.M. Rodríguez, C. Arias, E. Brillas, Electrochemical combustion of herbicide mecoprop in aqueous medium using a flow reactor with a boron-doped diamond anode, *Chemosphere* 64 (2006) 892–902.
- [20] A.M. Polcaro, A. Vacca, M. Mascia, S. Palmas, F. Ferrara, J. Rodríguez Ruiz, Selective oxidation of phenolic compounds at BDD and DSA anodes, *J. Environ. Eng. Manage.* 18 (2008) 213–220.
- [21] V.S. Antonin, M.C. Santos, S. Garcia-Segura, E. Brillas, Electrochemical incineration of the antibiotic ciprofloxacin in sulfate medium and synthetic urine matrix, *Water Res.* 83 (2015) 31–41.
- [22] A. Thiam, E. Brillas, F. Centellas, P.L. Cabot, I. Sirés, Electrochemical reactivity of Ponceau 4R (food additive E124) in different electrolytes and batch cells, *Electrochim. Acta* 173 (2015) 523–533.
- [23] H.F. Diao, X.Y. Li, J.D. Gu, H.C. Shi, Z.M. Xie, Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction, *Process Biochem.* 39 (2004) 1421–1426.
- [24] M.E.H. Bergmann, A.S. Kopalal, Studies on electrochemical disinfectant production using anodes containing RuO₂, *J. Appl. Electrochem.* 35 (2005) 1321–1329.
- [25] C.A. Martínez-Huitle, E. Brillas, Electrochemical alternatives for drinking water disinfection, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 1998–2005.

- [26] E. Lacasa, E. Tsolaki, Z. Sbokou, M.A. Rodrigo, D. Mantzavinos, E. Diamadopoulos, Electrochemical disinfection of simulated ballast water on conductive diamond electrodes, *Chem. Eng. J.* 223 (2013) 516–523.
- [27] C.E. Schaefer, C. Andaya, A. Urtiaga, Assessment of disinfection and by-product formation during electrochemical treatment of surface water using a Ti/IrO₂ anode, *Chem. Eng. J.* 264 (2015) 411–416.
- [28] X. Huang, Y. Qu, C.A. Cid, C. Finke, M.R. Hoffmann, K. Lim, S.C. Jiang, Electrochemical disinfection of toilet wastewater using wastewater electrolysis cell, *Water Res.* 92 (2016) 164–172.
- [29] J. Jeong, J.Y. Kim, J. Yoon, The role of reactive oxygen species in the electrochemical inactivation of microorganisms, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6117–6122.
- [30] A.M. Polcaro, A. Vacca, M. Mascia, S. Palmas, R. Pompei, S. Laconi, Characterization of a stirred tank electrochemical cell for water disinfection processes, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 2595–2602.
- [31] I.C.C.P. Gusmão, P.B. Moraes, E.D. Bidoia, Studies on the electrochemical disinfection of water containing *Escherichia coli* using a dimensionally stable anode, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (2010) 1235–1244.
- [32] M. Griessler, S. Knetsch, E. Schimpf, A. Schmidhuber, B. Schrammel, W. Wesner, R. Sommer, A.K.T. Kirschner, Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in electrochemical advanced oxidation process with diamond electrodes, *Water Sci. Technol.* 63 (2011) 2010–2016.
- [33] C. Bruguera-Casamada, I. Sirés, M.J. Prieto, E. Brillas, R.M. Araujo, The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium, *Chemosphere* 163 (2016) 516–524.
- [34] J. Jeong, C. Kim, J. Yoon, The effect of electrode material on the generation of oxidants and microbial inactivation in the electrochemical disinfection processes, *Water Res.* 43 (2009) 895–901.
- [35] F. Liu, G. He, M. Zhao, L. Huang, M. Qu, Study on the wastewater disinfection at the boron-doped diamond film electrode, *Procedia Environ. Sci.* 12 (2012) 116–121.
- [36] F. López-Gálvez, G.D. Posada-Izquierdo, M.V. Selma, F. Pérez-Rodríguez, J. Gobet, M.I. Gil, A. Allende, Electrochemical disinfection: an efficient treatment to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in process wash water containing organic matter, *Food Microbiol.* 30 (2012) 146–156.
- [37] M. Rajab, C. Heim, T. Letzel, J.E. Drewes, B. Helmreich, Electrochemical disinfection using boron-doped diamond electrode – the synergetic effects of in situ ozone and free chlorine generation, *Chemosphere* 121 (2015) 47–53.
- [38] H.P. Loveday, J.A. Wilson, K. Kerr, R. Pitchers, J.T. Walker, J. Browne, Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review, *J. Hosp. Infect.* 86 (2014) 7–15.
- [39] L. Dembry, M.J. Zervos, W.J. Hierbolzer, Nosocomial bacterial infections, in: E. A. Brachman (Ed.), *Bacterial Infection in Humans*, Plenum Publishing Corp, New York, 1998, pp. 501–528.
- [40] K.D. Mena, C.P. Gerba, Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201 (2009) 71–115.
- [41] E. Brillas, I. Sirés, C. Arias, P.L. Cabot, F. Centellas, R.M. Rodríguez, J.A. Garrido, Mineralization of paracetamol in aqueous medium by anodic oxidation with a boron-doped diamond electrode, *Chemosphere* 58 (2005) 399–406.
- [42] J. Boudreau, D. Bejan, N. Bunce, Competition between electrochemical advanced oxidation and electrochemical hypochlorination of acetaminophen at boron-doped diamond and ruthenium dioxide based anodes, *Can. J. Chem.* 88 (2010) 418–425.
- [43] APWA, AWWA, WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Method number 4500-Cl Chlorine (residual)–G. DPD Colorimetric Method, American Public Health Association, Washington D.C., 2005, pp. 4–67 to 4–68.

Capítol 2_Aigua residual urbana

Inactivació de la microbiota de l'aigua residual urbana mitjançant tractaments d'electrocoagulació i electro-Fenton aplicats per separat i de manera seqüencial

Anfruns-Estrada, E., Bruguera-Casamada, C., Salvadó, H., Brillas, E., Sirés, I., & Araujo R.M.

Water Research 126 (2017), 450-459

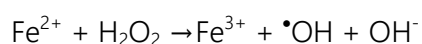
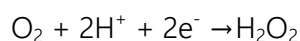
Resum

La normativa vigent permet utilitzar aigua regenerada per a diversos usos, la qual cosa ha fet incrementar-ne la demanada, i amb ella, l'aparició de més tractaments, majoritàriament terciaris, per poder reutilitzar aquestes aigües de les EDAR que per a cadascun dels usos previstos se'ls exigeix una qualitat determinada.

En aquest treball es van testar dos tipus de tractaments electroquímics; un de separació de fases i un altre d'oxidació avançada amb l'objectiu d'inactivar la microbiota present en l'aigua residual urbana.

Com a mètode de separació de fases es va aplicar l'electrocoagulació (EC) on s'utilitzen ànodes anomenats de "sacrifici" que alliberen ions metàl·lics en el medi els quals es converteixen en els hidròxids corresponents. En el nostre cas, a l'utilitzar ànodes de Ferro, s'alliberava Fe^{2+} al medi. Aquests hidròxids s'adhereixen a les partícules suspeses en el medi provocant la coagulació (fangs) que parcialment precipiten. Així mateix, l'hidrogen alliberat, en el càtode, per l'electròlisi de l'aigua s'adhereix a aquests flòculs i els arrossega cap a la superfície. D'aquesta manera, separant els precipitats i les escumes es disminueix la càrrega orgànica del medi.

Com a tractament electroquímic d'oxidació avançada es va aplicar l'electro-Fenton (EF) basat en la reacció química de Fenton on es subministra H_2O_2 al medi (1) que, a la vegada, reaccionarà amb el Fe^{2+} produint radicals hidroxil (2).



Es va comparar l'efecte d'aquests dos tipus de tecnologies electroquímiques; l'electrocoagulació i l'electro-Fenton, tant de forma separada com seqüencial EC/EF, en la desinfecció dels efluents primari i secundari provinents d'una estació de tractament d'aigua residual urbana. Es van escollir indicadors de tipologies diferents per avaluar l'efecte dels tractaments en ambdós efluents. Aquest indicadors eren els bacteris heteròtrofs, *E. coli*, enterococs, espores de *C. perfringens*, colifags somàtics i eucariotes.

Cadascuna de les mostres dels efluents es van sotmetre, primerament, a un tractament d'electrocoagulació, utilitzant elèctrodes Fe/Fe, durant 90 minuts. Els resultats mostraven que els colifags somàtics eren els microorganismes més sensibles i que després de 20 minuts de tractament ja no es detectaven en cap dels dos efluents. Els eucariotes, als 20 minuts, encara es detectaven en ambdós efluents, però ja no als 60 minuts. En canvi, els bacteris heteròtrofs disminuïen fins a concentracions de 103 ufc/ml en 90 minuts, la qual cosa corresponia a reduccions de l'ordre de 3,66 unitats logarítmiques de reducció per l'efluent primari i 2,81 unitats logarítmiques de reducció per l'efluent secundari. Resultats semblants, amb disminucions més grans en l'efluent primari que en el secundari, es van obtenir per a la resta de bacteris segurament degut a la presència de més microbiota i de més quantitat de matèria orgànica amb capacitat de coagulació i absorció de microorganismes. En el cas d'*E. coli*, s'observava una reducció gairebé completa després de 90 minuts de tractament mentre que en els enterococs aquesta reducció era menor. Per últim, les espores de *C. perfringens* van ser les més resistents amb una reducció de 0,80 unitats logarítmiques per l'efluent primari i de 0,61 unitats logarítmiques per l'efluent secundari.

Altres anàlisis efectuades en els fangs i els flocs formats durant els tractaments d'electrocoagulació van confirmar la presència de microorganismes actius que hi estaven adherits.

D'altra banda, les mostres també es van sotmetre directament a un tractament d'electro-Fenton tant a pH 3, que és l'ídoni perquè funcioni la reacció de Fenton, com també es va fer sense variar el pH natural de la mostra, proper a 7, evitant així l'acidificació ja que "in situ", els efluents hauran d'acabar essent abocats al medi. En ambdós casos es va afegir Fe^{2+} necessari per a la reacció de Fenton.

Tot i que la reacció de Fenton a pH 3 és més eficient, la quantitat d'espècies oxidants i de clor actiu que es generaven a pH neutre era suficient per inactivar els microorganismes estudiats. En ambdós casos quedava demostrat l'excel·lent poder de desinfecció d'electro-Fenton. Una vegada més, segons els resultats, els bacteriòfags i els enterococs van ser els microorganismes més sensibles mentre que les espores de *C. perfringens* van ser les més resistents. En ambdós casos, els bacteris heteròtrofs van persistir fins al final del tractament. D'altra banda, es va observar que la microbiota de l'efluent secundari desapareixia en menys temps, segurament degut a que presentava una concentració inicial més baixa en comparació amb l'efluent primari.

Tots els resultats indicaven que l'electro-Fenton al pH natural dels efluents podia ser eficaç per a la desinfecció d'aigües residuals urbanes, especialment per a efluents secundaris.

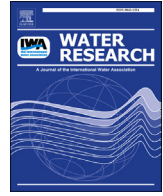
A partir d'aquí es va estudiar l'eficàcia de combinar els dos mètodes testats i sotmetre la mostra a una electrocoagulació de 30 minuts seguida d'un tractament d'electro-Fenton, també de 30 minuts, sense canviar el pH del medi. Els millors resultats es van obtenir amb aquesta combinació d'ambdós mètodes ja que l'electrocoagulació té més capacitat d'eliminar la matèria orgànica mentre que l'electro-Fenton és més eficaç a l'hora d'inactivar els microorganismes dels efluents. Les membranes bacterianes es van

debilitar per l'interacció amb Fe(OH) en el tractament d'electrocoagulació i posteriorment, van ser ràpidament afectades pels oxidants generats amb la reacció electro-Fenton, per la qual cosa, la major part de la microbiota activa es va inactivar després dels 30 minuts d'electro-Fenton, fins i tot les espores de *C. perfringens*.

Com a conclusions podem afirmar que l'electrocoagulació realitzada en una cel·la amb elèctrodes Fe / Fe a 20 mA cm^{-2} durant 90 minuts va provocar poca disminució del carboni orgànic total (TOC) i una baixa inactivació de la microbiota dels efluent de les aigües residuals urbanes. Els flocs de Fe(OH)_n es podien separar en forma de fang on s'havien absorbit els microorganismes tot i que estaven encara actius. Els bacteris heterotròfics, *E. coli*, enterococci i *C. perfringens* van ser els organismes més persistents en el tractament d'electrocoagulació.

La disminució més elevada de microorganismes es va aconseguir mitjançant l'electro-Fenton amb ànode de BDD i càtode de difusió d'aire a pH 3,0 i una densitat de corrent constant de $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$, tot i que només produïa un reduït descens de TOC.

L'aplicació seqüencial dels passos d'electrocoagulació seguit de l'electro-Fenton durant 30 minuts cadascun va ser el millor tractament per a la desinfecció de les aigües residuals urbanes. La majoria de la microbiota activa es va inactivar en 30 minuts de tractament electro-Fenton, fins i tot les espores. Durant el tractament d'electrocoagulació, les membranes bacterianes es van debilitar per l'interacció amb el coagulant Fe(OH) i els microorganismes van quedar retinguts en els flocs. Posteriorment, amb la reacció de Fenton, els microorganismes presents al medi van ésser ràpidament afectats pels oxidants generats.



Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments



Eduard Anfruns-Estrada ^a, Carmina Bruguera-Casamada ^a, Humbert Salvadó ^{a, b},
Enric Brillas ^c, Ignasi Sirés ^{c, *}, Rosa M. Araujo ^{a, **}

^a Sec. Microbiologia, Virologia i Biotecnologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Laboratori de Protistologia, Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^c Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2017

Received in revised form

27 September 2017

Accepted 28 September 2017

Available online 29 September 2017

Keywords:

Indicator bacteria

Electrochemical disinfection

Electrocoagulation

Electro-Fenton

Sequential water treatment

Urban wastewater

ABSTRACT

This work aims at comparing the ability of two kinds of electrochemical technologies, namely electrocoagulation (EC) and electro-Fenton (EF), to disinfect primary and secondary effluents from municipal wastewater treatment plants. Heterotrophic bacteria, *Escherichia coli*, enterococci, *Clostridium perfringens* spores, somatic coliphages and eukaryotes (amoebae, flagellates, ciliates and metazoa) were tested as indicator microorganisms. EC with an Fe/Fe cell at 200 A m⁻² and natural pH allowed >5 log unit removal of *E. coli* and final concentration below 1 bacteria mL⁻¹ of coliphages and eukaryotes from both effluents in ca. 60 min, whereas heterotrophic bacteria, enterococci and spores were more resistant. A larger removal was obtained for the primary effluent, probably because the flocs remove higher amount of total organic carbon (TOC), entrapping more easily the microbiota. EF with a boron-doped diamond (BDD) anode and an air-diffusion cathode that produces H₂O₂ on site was first performed at pH 3.0, with large or even total inactivation of microorganisms within 30 min. A more effective microorganism removal was attained as compared to EC thanks to •OH formed from Fenton's reaction. A quicker disinfection was observed for the secondary effluent owing to its lower TOC content, allowing the attack of greater quantities of electrogenerated oxidants on microorganisms. Wastewater disinfection by EF was also feasible at natural pH (~7), showing similar abatement of active microorganisms as a result of the synergistic action of generated oxidants like active chlorine and coagulation with iron hydroxides. A sequential EC/EF treatment (30 min each) was more effective for a combined decontamination and disinfection of urban wastewater.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Wastewater disposal through direct discharge into the aquatic environment entails potential risks for humans, animals and ecosystems due to the presence of chemical and microbiological contaminants. Among the challenges and priorities to 2030, the Sustainable Development Goals of United Nations (2015) include the improvement of water quality by eliminating dumping and minimizing release of hazardous chemicals and materials, halving

the proportion of untreated wastewater and considerably increasing safe reuse globally. Nowadays, municipal wastewater treatment plants (WWTPs) substantially reduce the contaminants from influents, yielding effluents that are discharged to rivers or seas. However, water scarcity along with increasing population and intensification of agricultural and industrial activities have triggered the development of efficient methods to obtain safe reclaimed water for crop irrigation, aquifer recharge and drinking water production (Fernandez-Cassi et al., 2016).

Bacteria, viruses, protozoa and metazoa have been detected in urban wastewater and many of them are pathogens that cause diseases to living beings. These microorganisms are biologically and structurally different and hence, their inactivation depends on the

* Corresponding author.

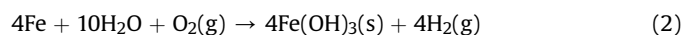
** Corresponding author.

E-mail addresses: i.sires@ub.edu (I. Sirés), raarajo@ub.edu (R.M. Araujo).

applied treatment (Hijnen et al., 2006; Cervero-Aragó et al., 2015). The microbiological quality of treated water is normally assessed with indicators like fecal coliforms, but its validity to ensure the effectiveness of water treatment over viruses, protozoa or non-fecal bacteria is rather arguable (Ashbolt et al., 2001; Figueras and Borrego, 2010; Payment and Locas, 2011). Other indicators such as heterotrophic bacteria, enterococci, bacteriophages and adenovirus have been also considered. For example, Agulló-Barceló et al. (2013) proposed the spores of sulfite-reducing clostridia as indicators of *Cryptosporidium* total oocysts. Quality requirements of reclaimed water are usually regulated by national environmental protection agencies. In Spain, for example, 100 colony-forming unit (CFU) per 100 mL is the maximal content of *Escherichia coli* permitted for reuse in food crops, whereas 200 CFU per 100 mL is the limit for urban unrestricted reuse (Real Decreto 1620, 7 December 2007).

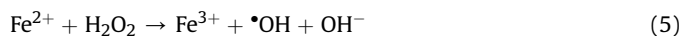
Urban effluents reaching WWTPs are typically conveyed through a multistep process comprising: (i) a primary treatment to remove solid material, (ii) a secondary treatment to minimize the content of organic matter (OM) and microorganisms and (iii) a tertiary process for disinfection and destruction of trace organics. Often, the secondary treatment consists of a biological method that requires large areas and long residence times, whereas the tertiary treatment involves chlorination or UV irradiation (Martínez-Huitle and Brillas, 2008; Montemayor et al., 2008; Souza et al., 2013). Electrochemical disinfection can be an interesting alternative because it is more eco-friendly and cost-effective (Ghernaout and Ghernaout, 2010), being electrocoagulation (EC) and electro-Fenton (EF) two of the most promising technologies for this purpose.

EC involves the *in situ* generation of coagulants by electrochemical oxidation of a sacrificial anode (iron or aluminum) in an undivided cell. The released metal ions are further transformed into hydroxides that neutralize charges or act as sweep flocs with large surface areas and hence, they foster their aggregation or precipitate as a sludge, adsorbing the dissolved pollutants (Ghernaout and Ghernaout, 2012; Ghernaout, 2013). Using Fe as the anode, for example, Fe²⁺ is formed from Reaction (1) and in the presence of dissolved O₂ gas it is converted into Fe(III) from the global Reaction (2) (Barrera-Díaz et al., 2014; Brillas and Martínez-Huitle, 2015). H₂ is formed at the cathode from water reduction by Reaction (3). Fe(OH)₂(s) at pH > 5.5 and Fe(OH)₃(s) from pH > 1.0 act as: (1) coagulants that remove particles by surface complexation or electrostatic attraction and (2) flocculants that eliminate particles by sweep flocculation (Ghernaout and Ghernaout, 2012).

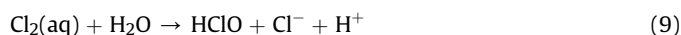


The EF process is based on the electrogeneration of H₂O₂ by two-electron reduction of O₂ gas at a carbonaceous cathode like a carbon-polytetrafluoroethylene (PTFE) air-diffusion electrode (Sirés et al., 2014; Moreira et al., 2017), via Reaction (4). This method is very effective when a small quantity of Fe²⁺ (<1 mM) is added to the effluent to react with H₂O₂ yielding Fe³⁺ and •OH from Fenton's Reaction (5) at optimum pH ca. 3 (El-Ghenymy et al., 2015; Thiam et al., 2015, 2016). •OH is a very strong oxidant with ability to mineralize most organics (Sirés et al., 2014). Additionally, in an undivided cell at high current, organics and microorganisms are also destroyed by physisorbed hydroxyl radical M(•OH) produced from water oxidation at the surface of a large O₂-overvoltage anode M such as boron-doped diamond (BDD) by Reaction (6). BDD thin-

film electrodes are the best anodes for EF due to the high activity of BDD(•OH) (El-Ghenymy et al., 2015; Bruguera-Casamada et al., 2016, 2017).



Urban wastewater contains a large amount of SO₄²⁻ and Cl⁻ (Thiam et al., 2016). These ions can be oxidized at the BDD anode to yield other oxidants like peroxodisulfate (S₂O₈²⁻) from Reaction (7) and active chlorine (Cl₂/HClO/ClO⁻) from Reactions (8)–(10) (Thiam et al., 2015; Steter et al., 2016). Recent work has shown that active chlorine can be formed during EC treatments (Ghernaout et al., 2011; Bocos et al., 2016), which may cause the formation of toxic disinfection by-products (DBPs).



Several authors have applied EC with Fe or Al anodes to disinfect urban effluents from WWTPs, finding a total removal (>99.99%) of *E. coli* (Ghernaout et al., 2008; Cotillas et al., 2013; Llanos et al., 2017), total coliforms (Elazzouzi et al., 2017; Makwana and Ahammed, 2017) or *S. aureus* (Valero et al., 2017). Durán Moreno et al. (2004) also found an overall removal of total coliforms, *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella* spp. from municipal wastewater at the end of EC with H₂O₂ addition, so-called EF by these authors. However, an exhaustive study on the evolution of urban wastewater microbiota during EC or EF has not been reported so far. Furthermore, the feasibility of a sequential EC/EF treatment has only been explored to remove organic matter, turbidity and total suspended solids from synthetic and urban wastewater (Daghrir and Drogui, 2013; Thiam et al., 2014).

This paper aims to assess the ability of EC with an Fe/Fe cell, EF with a BDD/air-diffusion cell and a sequential EC/EF process to inactivate microorganisms contained in real urban wastewater collected from primary and secondary WWTP clarifiers. Considering the microbiological complexity of both effluents, heterotrophic bacteria, *E. coli*, enterococci, *C. perfringens* spores, somatic coliphages and eukaryotes were selected as indicators. The decay of microorganism content over electrolysis time was determined at constant current density (*j*) to clarify if the sequential EC/EF treatment is potentially beneficial to disinfect urban wastewater.

2. Materials and methods

2.1. Urban wastewater

Urban effluents were obtained from a WWTP located in Reus (Spain). Several sets of fresh samples were collected on different days from the primary treatment effluent as well as from the secondary treatment (i.e., activated sludge) effluent. These effluents were selected to assess the influence of different OM content on microorganism abatement in the EC, EF and sequential EC/EF processes tested. They were introduced in sterile containers, transported to the laboratory in larger isothermal containers at 4 °C,

microbiologically characterized within 24–48 h after collection and stored at 4 °C. Tests revealed the presence of bacteria, bacteriophages, spores and protozoa. To ensure the detection of protozoa, the secondary effluent sample was doped with 5% of the treatment plant sludge, which did not alter substantially the number of bacteria and bacteriophages.

2.2. Microbial enumeration

In EC, microbiota concentrations were determined after separation of the sludge formed, whereas no filtration was required in EF. Heterotrophic bacteria were quantified upon 10-fold dilution with ¼-strength Ringer's solution and culture by duplicate on Plate Count Agar (PCA) from Scharlab (Spain) at 37 °C for 48 h (Serrano-Suárez et al., 2013), according to ISO 9308-2:2012. The theoretical detection limit was 1 CFU mL⁻¹. *E. coli* and enterococci were quantified by most probably number (MPN) using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG)/EC and 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside (MUD)/SF Kit 96-well microplates from Bio-Rad Laboratories, respectively, both incubated at 42 °C for 48 h, following ISO 9308-2:2012. The theoretical detection limit was 0.35–1.35 bacteria mL⁻¹. Spores of *Clostridium perfringens* (sulfite-reducing clostridia) were quantified after heating the sample at 80 °C for 10 min, followed by mixing with liquefied sulphite polymyxin sulphadiazine (SPS) Agar from Scharlab. Samples were incubated at 44 °C for 24 h, following ISO 7939. The theoretical detection limit was 1 spore mL⁻¹. Somatic coliphages were quantified by cell lysis using a double-layer counting method with *E. coli* WG5, according to ISO 10705-2. The theoretical detection limit was 1 lysis calve per mL.

Eukaryotes were analyzed by microscopy using a Leitz Dialux20 microscope. Two Eppendorf tubes with 1 mL sample were centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Supernatants were discharged and the pellets (about 200 μL each) were analyzed by microscopy. Abundance of active protozoa (such as amoebae, flagellates and ciliates) and metazoa was counted from 100 μL samples by successive 25 μL replicates in vivo at 100 × magnification. When small flagellates (<20 μm) and amoebae (<20 μm) were abundant enough, they were counted at 400 × magnification and, for each replicate, 30 microscopic fields on the coverslip (20 mm × 20 mm) were taken. The counts were carried out using well-homogenized samples. Protozoan species were identified at different levels: ciliates were determined as species level (Foissner et al., 1994; Curds et al., 2008), whereas flagellates (Lee et al., 2000) and amoebae (Page, 1988) were grouped according to their size and morphology. Note that the groups of amoebae cannot be considered as taxa since they might be composed of several amoebae belonging to diverse lineages (Page, 1988).

2.3. Electrochemical systems

The EC assays were carried out in an undivided cylindrical tank reactor containing 200 mL of primary or secondary effluent kept at 25 °C thanks to a thermostatically-controlled water bath. The anode and cathode were 10 cm² Fe plates separated 1 cm. In these trials, a $j = 200 \text{ A m}^{-2}$ was always applied. The EF experiments were conducted in a similar undivided cell with 100 mL of each wastewater after addition of 0.25 mM FeSO₄·7H₂O (>99% purity, Sigma-Aldrich), except in EC/EF runs. The cell was equipped with a 3 cm² BDD thin-film electrode over Si substrate from NeoCoat (Le-Chaux-de-Fonds, Switzerland) and a 3 cm² carbon-PTFE air-diffusion electrode from Sainergy Fuel Cell (Chennai, India), separated about 1 cm. The cathode was mounted as described elsewhere (El-Ghenymy et al., 2015) and was fed with air flowing at 1 L min⁻¹ to produce H₂O₂. A $j = 333 \text{ A m}^{-2}$ was employed for all the EF runs.

The wastewater was always vigorously stirred at 800 rpm with a magnetic PTFE bar. The constant current in all the electrolyses was provided by an Amel 2053 potentiostat-galvanostat, using a Demestres 601BR digital multimeter for the direct measurement of the cell voltage. Before the EC assays, the Fe surfaces were mechanically abraded using SiC paper, followed by cleaning with 0.1 M H₂SO₄ solution and final ultrasonic cleaning in Milli-Q water. Before the EF runs, the BDD surface was cleaned and the air-diffusion cathode was activated by polarization in 0.050 M Na₂SO₄ at $j = 1000 \text{ A m}^{-2}$ for 180 min.

After each trial, the cell was cleaned with a H₂O₂:H₂SO₄ mixture for 10 min, rinsed with Milli-Q water and dried in an oven at 80 °C. The Fe and BDD electrodes were immersed in Milli-Q water at 100 °C for 10 min and dried under an air stream. The air-diffusion cathode was cleaned with a 1:3 (v/v) H₂O:HCl mixture and rinsed with Milli-Q water followed by air-drying. For EF at pH 3.0, HClO₄ was used to adjust the pH in order to maintain the content of reactive SO₄²⁻ and Cl⁻ ions in the urban effluents. Samples withdrawn from the treated effluents were adjusted to pH near 7 by adding 1 M NaOH solution to minimize the effect of low pH during microorganism culture. The pH was adjusted to about 7 with 1 M H₂SO₄ after the EC step prior to the sequential treatment with EF.

2.4. Analytical methods

The solution pH was measured with a Crison GLP 22 pH-meter and the electrical conductance was determined with a Metrohm 644 conductometer. Total organic carbon (TOC) analysis of samples was carried out with a Shimadzu TOC-VCNS analyzer. Reproducible values with an accuracy of ±1% were found by injecting 50 μL aliquots, which were previously filtered with 0.45 μm filters from Whatman, into the analyzer.

The inactivation profiles for all microorganisms were determined from the decay of their log (N_t/N_0), where N_t and N_0 denote their concentration at time t and 0, respectively. The microorganism content is given as the mean value from two independent trials, and the graphs also show the error bars that account for a 95% confidence interval.

3. Results and discussion

3.1. Electrocoagulation

The EC assays were performed with 200 mL of the primary and secondary effluents using a stirred Fe/Fe tank reactor at $j = 200 \text{ A m}^{-2}$ for 90 min. The initial pH of 7.54 ± 0.16 rose continuously up to a final value of 9.08 ± 0.27 , whereas the conductivity remained practically unchanged, varying between 2.50 and 2.04 mS cm⁻¹.

Fig. 1a and b highlights an uneven disappearance of the different microorganisms during the treatment of both wastewater samples. Somatic coliphages were the less persistent organisms, being undetectable after 20 min in both matrices, followed by the eukaryotes, whose content decreased substantially at that time with total disappearance at 60 min. In contrast, the concentration of heterotrophic bacteria decayed to $\sim 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ in 90 min, corresponding to a reduction of 3.66 and 2.81 log units for the primary and secondary effluents, respectively. Fig. S1 reveals a quick removal of such bacteria in both matrices during the first 10 min of EC, followed by a slower concentration decay until the end of the electrolysis. A similar trend was found for all the other bacteria analyzed. In all cases, a larger content reduction was obtained for the primary effluent compared to the second one, probably because of its higher amount of microbiota and the presence of a larger amount of organic matter with ability to be coagulated and adsorb microorganisms. The removal process was usually stabilized after

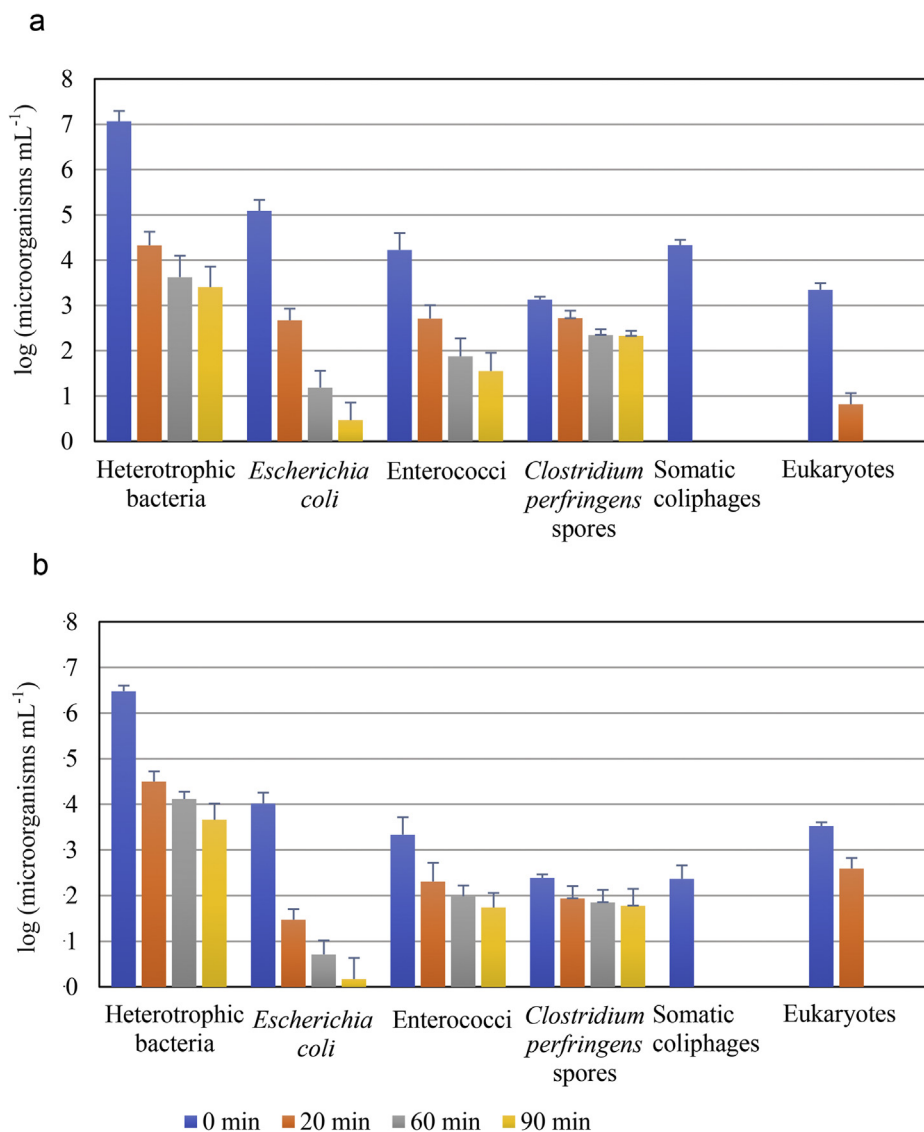


Fig. 1. Variation of the logarithm of concentration of heterotrophic bacteria, *Escherichia coli*, enterococci, *Clostridium perfringens* spores, somatic coliphages and eukaryotes with electrolysis time upon electrocoagulation (EC) of 200 mL of (a) primary and (b) secondary effluents using an undivided Fe/Fe cell (electrodes with 10 cm² area) at current density (j) of 200 A m⁻² and 25 °C.

30–40 min of electrolysis, whereupon no further microorganism abatement was achieved.

On the other hand, almost complete abatement of *E. coli* was attained, with a strong reduction of 4.62 log units in the primary effluent and 3.84 log units in the secondary effluent. It was the less persistent bacterium to EC among those tested. Much poorer decay of 2.68 and 1.60 log units in such media was found for enterococci. Worth noting, *C. perfringens* spores became the most resistant target, with a decay as low as 0.80 and 0.61 log units in the primary and secondary effluents, respectively. Finally, the large influence of EC on the eukaryotic community, as depicted in Table 1, is also noticeable, with no apparent activity of all these microorganisms after 60 min of electrolysis. The presence of eukaryotes was somewhat longer when treating the secondary effluents. At 5 min, only some flagellated volvocales could not be removed from the primary effluent, whereas all kinds of eukaryotes still remained in the second one despite their strong content drop. At 20 min, only amoebae could not be abated substantially in the latter effluent.

Despite the large disappearance of all the microbiota under

study, TOC content underwent a rather discrete removal for both kinds of wastewater upon EC treatment. Fig. 2 shows that TOC decayed 17.6 mg L⁻¹ (24.6% of the initial 71.4 mg L⁻¹) for the primary effluent and 5.5 mg L⁻¹ (35.2% of the initial 15.6 mg L⁻¹) for the secondary one. The relatively larger decontamination of the latter wastewater can be related to its smaller organic load, which is pre-eminently removed by precipitation over the Fe(OH)_n flocs originated during the treatment at the same j value.

Additional analyses were made with the sludge collected during the EC treatments, confirming that a small proportion of coagulated microorganisms were still active. This suggests their adhesion with encapsulation on the flocs formed, as recently reported by Delaire et al. (2016). The successful disinfection of sewage water samples is in accordance with the results obtained by other authors using EC with different anodes at other applied currents. For example, Ghernaout et al. (2008) described a large abatement of *E. coli* and algae from surface water with aluminum, stainless steel and common steel anodes. Bacteria removal in surface water (Ricordel et al., 2010) and in model solutions (Ricordel et al., 2014) using aluminum

Table 1
Time course of eukaryotic community (in microorganisms mL⁻¹) during the treatment of primary and secondary effluents by electrocoagulation (EC) and electro-Fenton (EF). EC was carried out in an undivided Fe/Fe cell with electrodes of 10 cm² area at $j = 200 \text{ A m}^{-2}$, whereas EF was performed at pH 3.0 or close to 7 (natural pH) using an undivided BDD/air-diffusion cell with electrodes of 3 cm² area at $j = 333 \text{ A m}^{-2}$. Temperature was kept at 25 °C in all trials.

Eukaryote	Primary effluent				Secondary effluent			
	0 min	5 min	20 min	60 min	0 min	5 min	20 min	60 min
<i>EC</i>								
Amoebae	70	<1	<1	<1	597	296	101	<1
Flagellates	2190	362	4	<1	1540	48	<1	<1
Ciliates	34	<1	<1	<1	798	467	1	<1
Metazoa	2	<1	<1	<1	29	10	5	<1
<i>EF pH 3.0</i>	Raw	0 min	10 min	30 min	Raw	0 min	10 min	30 min
Amoebae	3	1	<1	<1	3540	20	<1	<1
Flagellates	100	<1	<1	<1	13,800	3480	<1	<1
Ciliates	17	3	3	<1	476	131	<1	<1
Metazoa	2	1	<1	<1	12	4	<1	<1
<i>EF natural pH</i>	0 min	5 min	10 min	30 min	0 min	5 min	10 min	30 min
Amoebae	3	3	<1	<1	30	<1	<1	<1
Flagellates	640	620	<1	<1	220	<1	<1	<1
Ciliates	8	<1	<1	<1	64	<1	<1	<1
Metazoa	40	40	30	<1	14	<1	<1	<1

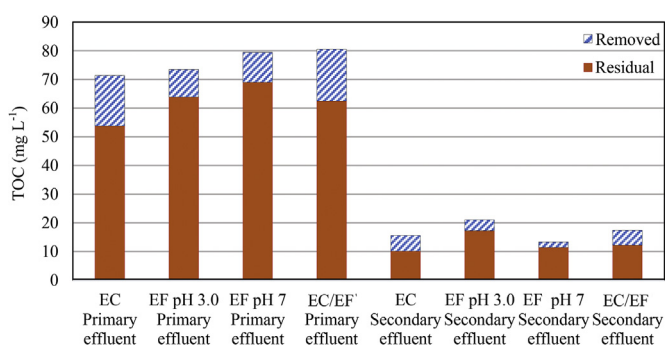


Fig. 2. TOC removed and residual upon different treatments: EC of 200 mL of primary and secondary effluents at $j = 200 \text{ A m}^{-2}$ for 90 min; electro-Fenton (EF) of 100 mL of the same wastewater samples at pH 3.0 and pH-7 using an undivided BDD/air-diffusion cell (electrodes with 3 cm² area) at $j = 333 \text{ A m}^{-2}$ and 25 °C for 30 min; two-step EC/EF processes for 30 min each.

anode has been reported as well. The quick reduction for somatic coliphages agrees with the results of Zhu et al. (2005) for MS2, a kind of coliphage, spiked into simulated natural water and treated by EC and membrane microfiltration.

3.2. Electro-Fenton at pH 3.0

Urban wastewater was then treated by a technology of transformation like EF, firstly at its theoretically optimum pH of 3.0, with addition of 0.25 mM Fe²⁺. To do this, the pH of the primary and secondary effluents was adjusted with an inert acid like HClO₄ to preserve the content of reactive SO₄²⁻ and Cl⁻ ions. The assays were made with 100 mL of each effluent using a stirred BDD/air-diffusion cell at $j = 333 \text{ A m}^{-2}$ for 30 min. Microbial quantifications were carried out for the raw samples before acidification as well as for conditioned ones (pH = 3.0 and Fe²⁺ addition) to discard any substantial effect of pre-electrolysis steps. In these trials, the pH of both kinds of wastewater dropped up to 2.79 ± 0.13 , suggesting the formation of acidic products from organic matter (Sirés et al., 2014). However, Fig. 2 illustrates the occurrence of a very low TOC abatement of 9.6 mg L⁻¹ (13.1% of the initial 73.5 mg L⁻¹) for the primary effluent and 3.8 mg L⁻¹ (18.0% of the initial 21.1 mg L⁻¹) for the secondary effluent. A lower decontamination was then achieved by EF compared to EC, where the organic matter was separated from the effluent by

entrapment on iron hydroxides. This means that urban wastewater contained very recalcitrant organic pollutants that were very slowly destroyed and mineralized by oxidants like H₂O₂, BDD(•OH), •OH, S₂O₈²⁻ and active chlorine formed from Reactions (4)–(9).

Fig. 3a and b shows the decrease of microbiota concentration by EF at pH 3.0 in both aqueous matrices, which became much more effective than the corresponding EC treatments (see Fig. 1a and b). This can be related to the different inactivation mechanisms in both processes, involving the lysis of the cell walls caused by the attack of the generated oxidizing species in EF (Bruguera-Casamada et al., 2016, 2017) instead of the entrapment of cells onto the flocs produced in the previous EC device. Note that direct killing of cells by the electrical field applied is also feasible (Ghernaut, 2017). Note also that under EF conditions at pH 3.0, no flocs of iron hydroxides are formed and no microbiota coagulation takes place. After 30 min of EF, for example, the concentration of heterotrophic bacteria was below 10 CFU mL⁻¹, with decays of 3.62 and 3.97 log units for the primary and secondary effluent, respectively. Fig. S2 highlights certain effect of acidic conditions (pH 3.0) on heterotrophic bacteria since control tests without current supply showed an inactivation of about 1.20 ± 0.06 log units for both samples. This value was much lower than the one reached in EF process, thus corroborating the important role of inactivation with generated oxidants. In contrast to the apparently analogous behavior of microorganisms in both water matrices found in EC (see Fig. S1), Fig. S2 shows a quicker disappearance of heterotrophic bacteria in the secondary effluent. This trend can be accounted for by the smaller organic load of that wastewater, which therefore enhances the attack of oxidizing species over the microbiota since they are produced at similar rate in both samples operating at the same $j = 333 \text{ A m}^{-2}$.

Fig. 3a and b depicts the total inactivation of enterococci and somatic coliphages, always in less than 10 min. Similarly, *E. coli* was completely inactivated in the secondary effluent, whereas it persisted longer time in the primary one although it was already inactive at 30 min. As in the case of EC, the most resistant microorganisms were the *C. perfringens* spores in both EF trials. Worth noting, greater decays of 2.10 and 1.60 log units were obtained for the treatment of primary and secondary effluents, respectively.

The above trends agree with those described by Durán Moreno et al. (2004) for the inactivation of *E. coli* by EF using sewage water. Nevertheless, our results are better to those reported by Aziz et al. (2013), who only found a 3-log units drop of coliform content from landfill leachate by EF.

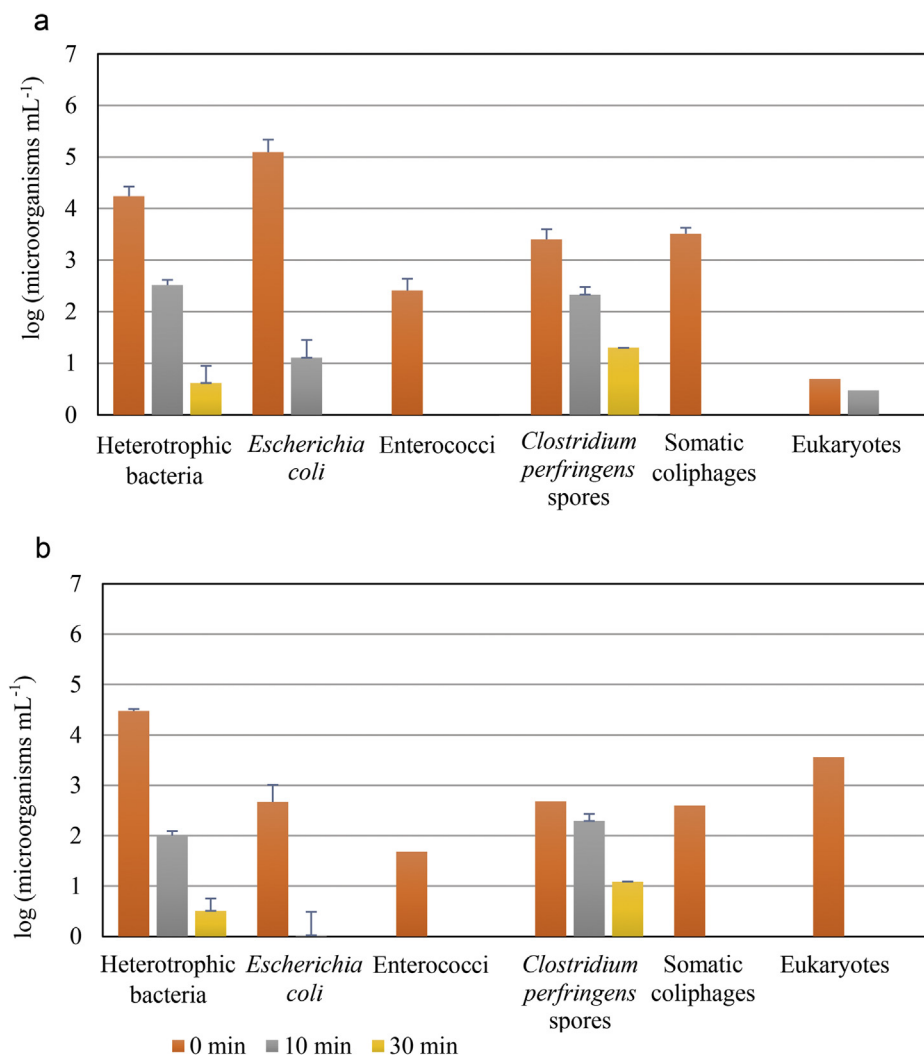


Fig. 3. Change of the logarithm of the concentration of the same microorganisms of Fig. 1 along 30 min of EF treatment of 100 mL of (a) primary and (b) secondary effluents at pH 3.0 and $j = 333 \text{ A m}^{-2}$.

On the other hand, a look at Table 1 allows inferring a very substantial effect of acidic pH on the eukaryotic community. A comparison between the two raw effluents and the two conditioned ones informs about a survival <50% in all cases. Among ciliates, only *Peritrichia* belonging to the genera *Opercularia* and *Vorticellides* survived, whereas persistent metazoa were rotifers belonging to different groups present in the control with *Philodinidae* in the primary effluent and some *Lecanidae* in the secondary one. Finally, a drastic inactivation of all eukaryotes after 10 min of EF can be observed in Table 1, with the exception of the ciliate *Opercularia microdiscum*. Note that this microorganism belongs to a genus of ciliates with high resistance to stress conditions caused by toxics in activated sludge processes (Madoni, 1994).

3.3. Electro-Fenton at natural pH

The EF process is expected to be optimal at pH 3.0 because it produces the highest quantity of the strong oxidant $\cdot\text{OH}$ from Fenton's Reaction (5) (Sirés et al., 2014; Brillas and Martínez-Huitile, 2015). Nevertheless, although a lower amount of $\cdot\text{OH}$ is generated at eco-friendly near-neutral pH, the disinfection role of the other oxidants like H_2O_2 , $\text{BDD}(\cdot\text{OH})$, $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ and active chlorine, along with iron hydroxides formed at pH~7, may be sufficient. The main

aim of this approach was to draw conclusions for further use of the process in a two-step treatment of urban wastewater, as will be discussed in section 3.4.

The EF treatments of 100 mL of the primary and secondary effluents were carried out at natural pH under the same conditions described at pH 3.0, i.e., after addition of 0.25 mM Fe^{2+} in a stirred BDD/air-diffusion cell operated at $j = 333 \text{ A m}^{-2}$ for 30 min. In these cases, the Fe^{2+} content was hardly soluble at the initial pH of 7.18 ± 0.07 , which slightly increased up to 7.39 ± 0.19 . No substantial variation in conductivity of $2.70 \pm 0.25 \text{ mS cm}^{-1}$ was observed. The data of Fig. 2 corroborate the decontamination ability of EF at near-neutral pH, with final TOC removal of 10.5 mg L^{-1} (13.2% of the initial 79.5 mg L^{-1}) for the primary effluent and 1.9 mg L^{-1} (14.2% of the initial 13.3 mg L^{-1}) for the secondary one. Similar TOC abatement was then achieved at pH 3.0 and neutral pH, suggesting that oxidants like active chlorine can play an important role in EF regardless of the solution pH (Thiam et al., 2015; Steter et al., 2016).

Fig. 4a and b depicts the excellent disinfection power of EF at neutral pH, giving rise to a remarkable decrease of the content of all microorganisms contained in the two wastewater samples. After 30 min of treatment, the heterotrophic bacteria concentration diminished 4.12 log units in the primary effluent and 3.20 log units

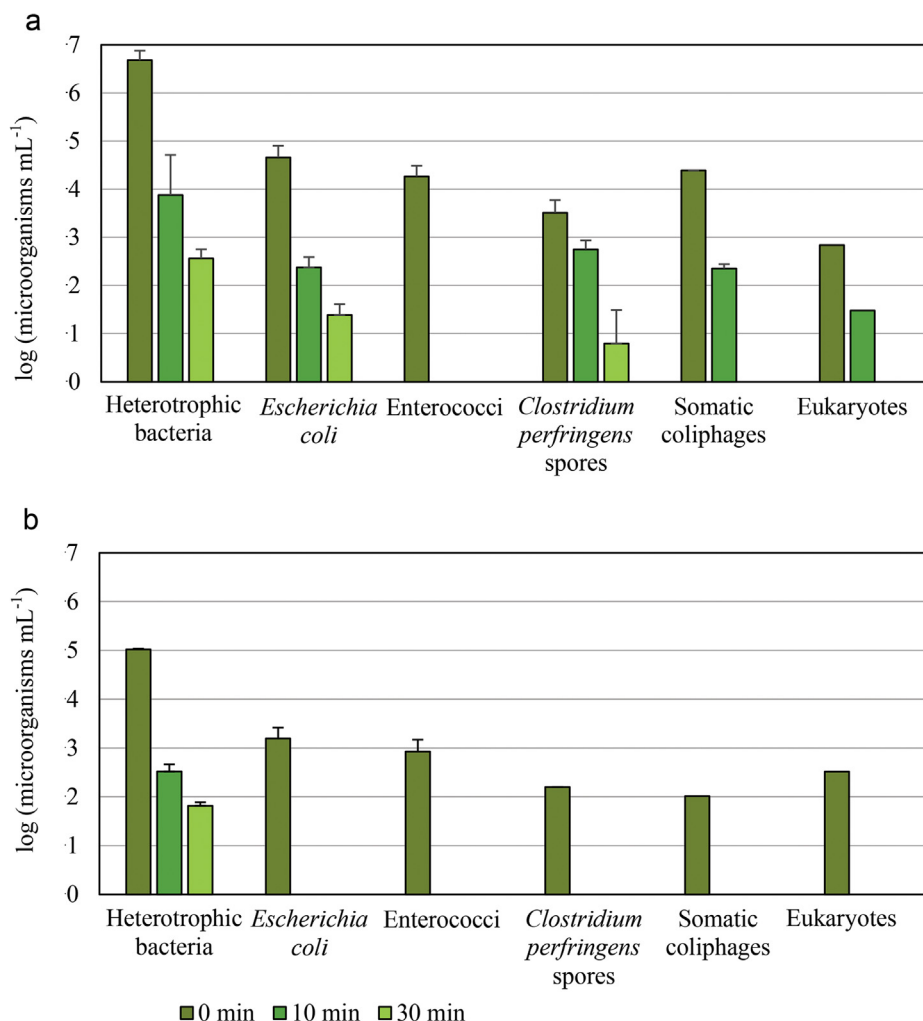


Fig. 4. Variation of the logarithm of the concentration of the same microorganisms shown in Fig. 1 upon EF treatment of 100 mL of (a) primary and (b) secondary effluents at neutral pH (-7) and $j = 333 \text{ A m}^{-2}$.

in the secondary one. Note that in the former case, the decay was even superior to that obtained by EC and EF at pH 3.0. The decay profile of these bacteria shown in Fig. S3 demonstrates the large effect of the electrolysis during the first 10 min, whereupon the disappearance was strongly decelerated. The enhanced abatement found in the primary wastewater matrix is noteworthy since it is contrary to the behavior obtained in EF at pH 3.0 (see Fig. S2). This behavior suggests that, apart from the important oxidative action of active chlorine that accounts for a large inactivation, as pointed out above, the formation of iron hydroxides at neutral pH has a key role as well. As mentioned in section 3.1, coagulation with such hydroxides is more effective for the primary wastewater due to the larger TOC content, with ability to be precipitated and entrap the microorganisms. The formation of such precipitate counteracts the lower generation of $\cdot\text{OH}$, leading to a superior performance of EF at pH-7 compared to that at pH 3.0.

Fig. 4a also shows the rapid and total disappearance of enterococci and somatic coliphages in the primary effluent, being the most sensitive microbiota as found in EC and EF at pH 3.0. In contrast, *E. coli* and the spores of sulfite-reducing bacteria persisted at the end of EF at near-neutral pH, as occurs with heterotrophic bacteria, with reductions of 3.27 and 2.72 log units, respectively. A different behavior can be observed in Fig. 4b for the secondary wastewater, where all the microbiota tested completely

disappeared in less than 10 min, probably because of their much lower concentration compared to that in the primary effluent. These results were much better than those found by EC (see Fig. 1b) and EF at pH 3.0 (see Fig. 3b).

The data of Table 1 for EF at near-neutral pH reveal a total decay of the eukaryotic community in less of 5 min for the secondary effluent. In contrast, most of the eukaryote bacteria persisted until 5–10 min for the primary one. In particular, high contents of flagellates were detected at 5 min, which belonged to two groups of *Euglenozoa*, the *euglenidae* and *bodonidae*. In the case of metazoa, the nematodes were the most resistant for 10 min, but they were undetectable at 30 min.

All the above findings indicate that EF at natural pH can be effective for the disinfection of urban wastewater, particularly for secondary effluents. From this, the performance of a sequential EC/EF process was investigated for both effluents, as discussed below.

3.4. Electrocoagulation/electro-Fenton without pH adjustment

As shown above, EC has greater ability than EF to remove organic matter, whereas EF is superior to disinfect both effluents. Since the maximum microbial removal observed in EC trials was already attained at 20–60 min, the sequential treatment was performed by selecting a duration of 30 min for the initial EC step,

which was performed with 200 mL samples using a stirred Fe/Fe cell at $j = 200 \text{ A m}^{-2}$. The subsequent EF treatment of 100 mL of the supernatant liquid, which already contained soluble iron ions formed in EC, usually $<3 \text{ mg L}^{-1}$ (Thiam et al., 2014), was performed for 30 min as well, using a stirred BDD/air-diffusion tank reactor at $j = 333 \text{ A m}^{-2}$. In the former step, the pH of both wastewater samples increased from 7.37 ± 0.04 to 8.78 ± 0.09 , which was adjusted to 7 with H_2SO_4 in order to apply EF, ending in a $\text{pH} = 6.54 \pm 0.17$. The conductivity of both effluents changed slightly during the sequential treatment, from $2.55 \pm 0.15 \text{ mS cm}^{-1}$ to a final value of $2.72 \pm 0.14 \text{ mS cm}^{-1}$. Somatic coliphages and eukaryotes were not analyzed in these assays because they were the most sensitive microbiota to EC, becoming undetectable at the end of such treatment (see Fig. 1a and b, and Table 1).

As expected from single treatments discussed above, Fig. 2 evidences a quite poor TOC removal for the sequential EC/EF, with an abatement of 18.1 mg L^{-1} (22.5% of the initial 80.6 mg L^{-1}) in the primary effluent and 5.2 mg L^{-1} (29.9% of the initial 17.4 mg L^{-1}) in the second one. These values differ from those reported by Lucena et al. (2004), who described a very high TOC abatement of about 90% for a secondary treatment of urban wastewater with conventional activated sludge, although they reached a very weak disappearance (1.5–2.4 log units) of bacterial indicators.

Fig. 5a and b illustrates the decay of bacteria concentration at

different times of the sequential treatment in both wastewater samples. As can be seen, heterotrophic bacteria, *E. coli*, enterococci and *C. perfringens* spores still presented some activity at the end of the EC step, but the microorganisms were rapidly inactivated by EF demonstrating that the lysis of cell walls by generated oxidizing species (H_2O_2 , $\text{BDD}(\cdot\text{OH})$, $\cdot\text{OH}$, $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ and active chlorine) became much more effective for bacterial removal than their adhesion to the iron hydroxides originated in EC. It can be noticed that when the pH of the EC supernatant was adjusted to 7, the content of all the microorganisms seemed to slightly increase, as shown in Fig. 5a and b, as well as in Fig. S4. This behavior confirms the survival of a certain number of bacteria adsorbed onto the sludge, as stated above, being resuspended in the solutions during the acidification process prior to the EF step. In the overall process for the primary and secondary wastewater, reductions of 5.17 and 4.37 log units for heterotrophic bacteria, 5.06 and 3.91 log units for *E. coli*, 4.61 and 3.60 log units for enterococci, and 3.33 and 2.79 log units for the spores of *C. perfringens* were obtained, respectively. The three latter were not detected at 30 min of EF, whereas a small content of ca. 100 CFU mL^{-1} of the former bacteria was determined as maximal after the treatment. Fig. S4 reveals a fast inactivation of heterotrophic bacteria during the 30 min of the EF step, despite the slight concentration increase upon pH adjustment to 7 after the EC step. These findings allow concluding that the sequential EC/EF process

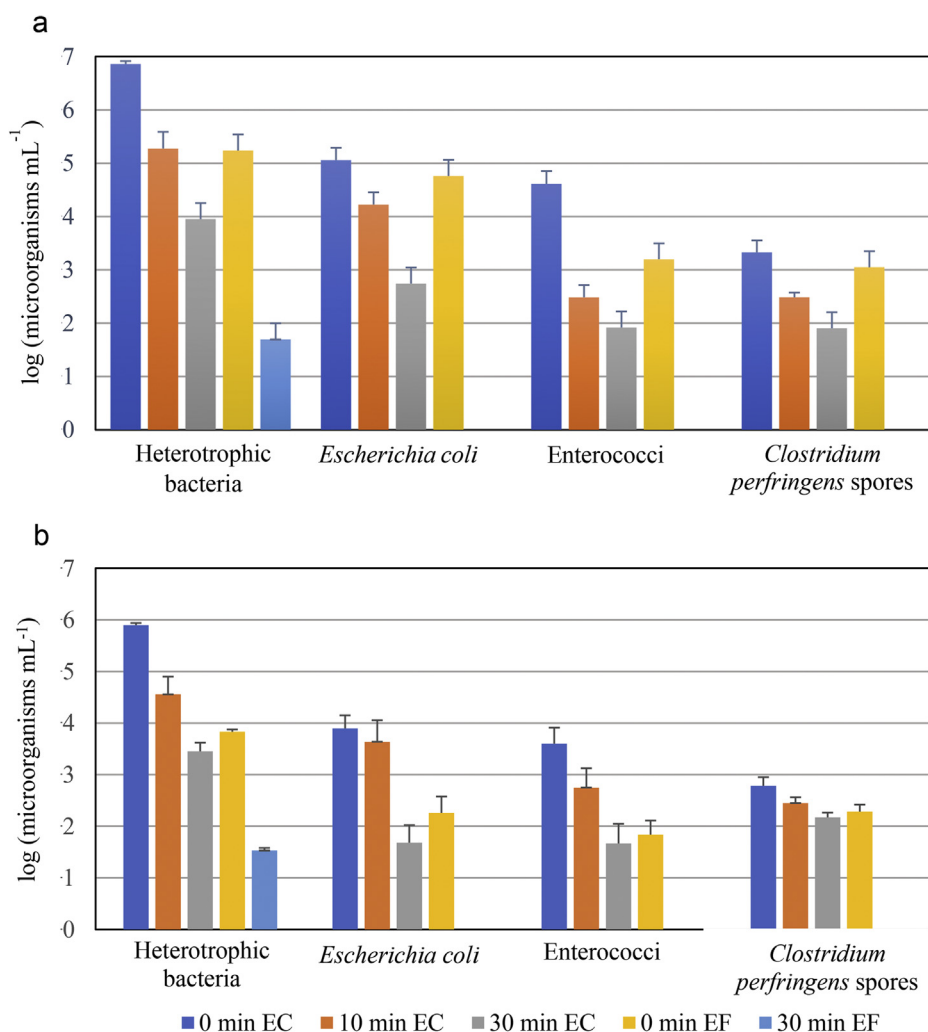


Fig. 5. Change of the logarithm of the concentration of the microorganisms upon sequential EC/EF treatment (30 min each). The EC step was applied to 200 mL of (a) primary and (b) secondary effluents at $j = 200 \text{ A m}^{-2}$ and $25 \text{ }^\circ\text{C}$, being followed by the EF step with 100 mL of the resulting solution, at $\text{pH} \sim 7$ and $j = 333 \text{ A m}^{-2}$.

is more effective for disinfection of urban wastewater than single EC and EF at circumneutral pH, since almost complete inactivation of all the bacteria tested can be attained. The enhancement of the disinfection power of EF after EC suggests that during EC treatment the bacteria membranes are weakened by interaction with the $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs and the action of oxidants like active chlorine, further favoring the attack of oxidants in EF.

Comparison of the effectiveness of the sequential EC/EF treatment for urban wastewater disinfection with other coupled techniques is difficult due to the different systems and experimental conditions reported in the literature. Cotillas et al. (2013) described an integrated electrodisinfection/EC cell with ability to reduce at least 4 log units of fecal coliforms from urban wastewater, similarly to our results. In contrast, Barrera-Díaz et al. (2015) integrated EC with Cu anode and electrochemically generated H_2O_2 processes to achieve a discrete reduction of 2 log units of heterotrophic bacteria and *E. coli*. For a single biological tertiary treatment, Fernandez-Cassi et al. (2016) showed removals of 0.49 log units of heterotrophic bacteria, 2.58 log units of *E. coli* and 1.65 log units of enterococci for a secondary effluent of a lagooning system, which are poorer results than those reported in our study. More contaminant and/or expensive treatments based on chlorine and/or UV irradiation also offer excellent inactivation rates for most microbiota contained in urban wastewater (Montemayor et al., 2008; Souza et al., 2013).

4. Conclusions

EC performed with a Fe/Fe cell at 200 A m^{-2} for 90 min caused a slow removal of organic load and abatement of microbiota from urban wastewater treatment plant effluents. The $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs adsorbed organics and microorganisms, being separated as a sludge where some of those organisms seemed to be still active. Heterotrophic bacteria, *E. coli*, enterococci and *C. perfringens* spores were the most persistent organisms. Higher decrease of microbial content was achieved by EF with a BDD/air-diffusion cell at pH 3.0 and $j = 333 \text{ A m}^{-2}$, only yielding a very poor TOC abatement. The generated oxidants affected the bacteria walls, causing a large or even total inactivation of all the microbiota in both matrices. EF at circumneutral pH yielded similar results, with heterotrophic bacteria persisting at the end of electrolysis. The sequential application of EC and EF steps for 30 min each was the best treatment for the disinfection of urban wastewater. All the active microbiota (except the heterotrophic bacteria) were inactivated within 30 min of EF, including the spores. Bacteria membranes were weakened by interaction with $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs and oxidants in the EC step, further being rapidly affected by the generated oxidants in EF. As the next step, integration of electrochemical technology in current plant units should be made to demonstrate the techno-economic feasibility.

Acknowledgments

The authors thank financial support under projects CTQ2013-48897-C2-1-R and CTQ2016-78616-R (AEI/FEDER, EU), and from the "Grups de recerca reconeguts" (Generalitat de Catalunya) 2014 SGR 83 and 2014 SGR 914. Support provided by Jaume Cabré plant manager in Aiguës de Reus is also acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.056>.

References

- Agulló-Barceló, M., Oliva, F., Lucena, F., 2013. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (7), 4448–4454.
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. In: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health: Assessment of Risk and Risk Management for Water-related Infectious Disease*. TJ International (Ltd), Padstow, Cornwall, UK (Chapter 13).
- 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 Manage.* 33 (2), 396–400.
- Barrera-Díaz, C.E., Frontana-Urbe, B.A., Roa-Morales, G., Bilyeu, B.W., 2015. Reduction of pollutants and disinfection of industrial wastewater by an integrated system of copper electrocoagulation and electrochemically generated hydrogen peroxide. *J. Environ. Sci. Health A* 50 (4), 406–413.
- Barrera-Díaz, C.E., Roa-Morales, G., Balderas Hernández, P., Fernández-Marchante, P.M., Rodrigo, M.A., 2014. Enhanced electrocoagulation: new approaches to improve the electrochemical process. *J. Electrochem. Sci. Eng.* 4 (4), 285–296.
- Bocos, E., Brillas, E., Sanromán, M.A., Sirés, I., 2016. Electrocoagulation: simply a phase separation technology? The case of bronopol compared to its treatment by EAOPs. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7679–7686.
- Brillas, E., Martínez-Huitle, C.A., 2015. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. *Appl. Catal. B: Environ.* 166–167, 603–643.
- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Brillas, E., Araujo, R.M., 2017. Effect of electro-generated hydroxyl radicals, active chlorine and organic matter on the electrochemical inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using BDD and dimensionally stable anodes. *Sep. Purif. Technol.* 178, 224–231.
- Bruguera-Casamada, C., Sirés, I., Prieto, M.J., Brillas, E., Araujo, R.M., 2016. The ability of electrochemical oxidation with a BDD anode to inactivate Gram-negative and Gram-positive bacteria in low conductivity sulfate medium. *Chemosphere* 163, 516–524.
- Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., Araujo, R.M., Katila, M., Etienne, J., 2015. Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free legionella and amoebae-associated legionella. *PLoS One* 10 (8), e0134726.
- Cotillas, S., Llanos, J., Cañizares, P., Mateo, S., Rodrigo, M.A., 2013. Optimization of an integrated electrodisinfection/electrocoagulation process with Al bipolar electrodes for urban wastewater reclamation. *Water Res.* 47 (5), 1741–1750.
- Curds, C.R., Warren, A., Salvadó, H., Roberts, D., 2008. An atlas of ciliated Protozoa commonly found in aerobic sewage-treatment processes. *An Aid to Monitor Treatment-Plant Performance*. *Nat. Hist. Mus. Lond.* 46 (10), 3334.
- Daghri, R., Drogui, P., 2013. Coupled electrocoagulation-electro-Fenton for efficient domestic wastewater treatment. *Environ. Chem. Lett.* 11 (2), 151–156.
- Delaire, C., van Genuchten, C.M., Amrose, S.E., Gadgil, A.J., 2016. Bacteria attenuation by iron electrocoagulation governed by interactions between bacterial phosphate groups and Fe(III) precipitates. *Water Res.* 103, 74–82.
- Durán Moreno, A., Frontana-Urbe, B.A., Ramírez Zamora, R.M., 2004. Electro-Fenton as a feasible advanced treatment process to produce reclaimed water. *Water Sci. Technol.* 50 (2), 83–90.
- El-Ghenymy, A., Centellas, F., Rodríguez, R.M., Cabot, P.L., Garrido, J.A., Sirés, I., Brillas, E., 2015. Comparative use of anodic oxidation, electro-Fenton and photoelectro-Fenton with Pt or boron-doped diamond anode to decolorize and mineralize Malachite Green oxalate dye. *Electrochim. Acta* 182, 247–256.
- Elazouzi, M., Haboubi, Kh, Elyoubi, M.S., 2017. Electrocoagulation-flocculation as a low-cost process for pollutants removal from urban wastewater. *Chem. Eng. Res. Des.* 117, 614–626.
- Fernandez-Cassi, X., Silvera, C., Cervero-Aragó, S., Rusiñol, M., Latif-Eugeni, F., Bruguera-Casamada, C., Civit, S., Araujo, R.M., Figueras, M.J., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2016. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (16), 16816–16833.
- Figueras, M.J., Borrego, J.J., 2010. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7 (12), 4179–4202.
- Foissner, W., Berger, H., Blatterer, H., Kohmann, F., 1994. *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems. Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida*. Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München, Germany.
- Ghernaout, D., 2013. Advanced oxidation phenomena in electrocoagulation process: a myth or a reality? *Desalination Water Treat.* 51 (40–42), 7536–7554.
- Ghernaout, D., 2017. Microorganisms' electrochemical disinfection phenomena. *EC Microbiol.* 9 (4), 160–169.
- Ghernaout, D., Badis, A., Ghernaout, B., Kellil, A., 2008. Application of electrocoagulation in *Escherichia Coli* culture and two surface waters. *Desalination* 219 (1–3), 118–125.
- Ghernaout, D., Ghernaout, B., 2010. From chemical disinfection to electro-disinfection: the obligatory itinerary? *Desalination Water Treat.* 16 (1–3), 156–175.
- Ghernaout, D., Ghernaout, B., 2012. Sweep flocculation as a second form of charge neutralisation – a review. *Desalination Water Treat.* 44 (1–3), 15–28.
- Ghernaout, D., Naceur, M.W., Aouabed, A., 2011. On the dependence of chlorine by-products generated species formation of the electrode material and applied

- charge during electrochemical water treatment. *Desalination* 270 (1–3), 9–22.
- 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 Res.* 40 (1), 3–22.
- Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P.C., 2000. *An Illustrated Guide to the Protozoa: Organisms Traditionally Referred to as Protozoa, or Newly Discovered Groups*, second ed. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, USA.
- Lucena, F., Duran, A.E., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Gantzer, C., Skrabber, S., Jofre, J., 2004. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J. Appl. Microbiol.* 97 (5), 1069–1076.
- Llanos, J., Cotillas, S., Cañizares, P., Rodrigo, M.A., 2017. Electrocoagulation as a key technique in the integrated urban water cycle - a case study in the centre of Spain. *Urban Water J.* 14 (6), 650–654.
- Madoni, P., 1994. A Sludge Biotic Index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Res.* 28 (1), 67–75.
- Makwana, A.R., Ahammed, M.M., 2017. Electrocoagulation process for the post-treatment of anaerobically treated urban wastewater. *Sep. Purif. Technol.* 52 (8), 1412–1422.
- Martínez-Huitle, C.A., Brillas, E., 2008. Electrochemical alternatives for drinking water disinfection. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (11), 1998–2005.
- Montemayor, M., Costan, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R., Sala, L., 2008. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* 57 (6), 935–940.
- Moreira, F.C., Boaventura, R.A.R., Brillas, E., Vilar, V.J.P., 2017. Electrochemical advanced oxidation processes: a review on their application to synthetic and real wastewaters. *Appl. Catal. B: Environ.* 202, 217–261.
- Page, F.C., 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae: with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, England.
- Payment, P., Locas, A., 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49 (1), 4–11.
- Ricordel, C., Darchen, A., Hadjiev, D., 2010. Electrocoagulation–electroflotation as a surface water treatment for industrial uses. *Sep. Purif. Technol.* 74 (3), 342–347.
- Ricordel, C., Miramon, C., Hadjiev, D., Darchen, A., 2014. Investigations of the mechanism and efficiency of bacteria abatement during electrocoagulation using aluminum electrode. *Desalination Water Treat.* 52 (28–30), 5380–5389.
- Serrano-Suárez, A., Dellundé, J., Salvadó, H., Cervero-Aragó, S., Méndez, J., Canals, O., Blanco, S., Arcas, A., Araujo, R., 2013. Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (8), 5534–5544.
- Sirés, I., Brillas, E., Oturan, M.A., Rodrigo, M.A., Panizza, M., 2014. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (14), 8336–8367.
- Souza, B.S., Dantas, R.F., Agulló-Barceló, M., Lucena, F., Sans, C., Esplugas, S., Dezotti, M., 2013. Evaluation of UV/H₂O₂ for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (9), 1697–1706.
- Steter, J.R., Brillas, E., Sirés, I., 2016. On the selection of the anode material for the electrochemical removal of methylparaben from different aqueous media. *Electrochim. Acta* 222, 1464–1474.
- Thiam, A., Brillas, E., Centellas, F., Cabot, P.L., Sirés, I., 2015. Electrochemical reactivity of Ponceau 4R (food additive E124) in different electrolytes and batch cells. *Electrochim. Acta* 173, 523–533.
- Thiam, A., Brillas, E., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Sirés, I., 2016. Routes for the electrochemical degradation of the artificial food azo-colour Ponceau 4R by advanced oxidation processes. *Appl. Catal. B: Environ.* 180, 227–236.
- Thiam, A., Zhou, M., Brillas, E., Sirés, I., 2014. Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes. *Appl. Catal. B: Environ.* 150–151, 116–125.
- United Nations, 2015. *Transforming Our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development*. Resolution A/RES/70/1, Adopted by the General Assembly on 25 September 2015.
- Valero, P., Verbel, M., Silva-Agrejo, J., Mosteo, R., Ormad, M.P., Torres-Palma, R.A., 2017. Electrochemical advanced oxidation processes for *Staphylococcus aureus* disinfection in municipal WWTP effluents. *J. Environ. Manage* 198 (1), 256–265.
- Zhu, B., Clifford, D.A., Chellam, S., 2005. Comparison of electrocoagulation and chemical coagulation pretreatment for enhanced virus removal using micro-filtration membranes. *Water Res.* 39 (13), 3098–3108.

Capítol 3_Aigua residual industrial

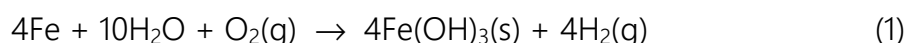
Avantatges de l'electro-Fenton sobre l'electrocoagulació per a la desinfecció d'aigües residuals làcties

Bruguera-Casamada, C., Araujo, R.M., Brillas, E. & Sirés, I.
(*Sotmès a Chemical Engineering Journal al juny de 2018*)

Resum

Algunes indústries alimentàries utilitzen grans quantitats d'aigua en els seus processos d'elaboració. Un exemple són les indústries productores de formatges que poden arribar a utilitzar 10 litres d'aigua per cada litre de llet processat. Aquesta gran quantitat d'aigua, una vegada acabat el procés, conté grans quantitats de proteïnes, sals, microorganismes i matèria orgànica en general i cal reduir-ne la seva càrrega abans d'abocar-la al clavegueram.

Els processos electroquímics de separació de fases i d'oxidació avançada s'han d'avaluar com a un nou mètode per tractar aquesta aigua residual. L'electrocoagulació (EC) és un procés de separació de fases mitjançant el qual s'incorporen ions Fe^{2+} al medi mitjançant ànodes de sacrifici. Aquests, en presència d'oxigen es converteixen en $\text{Fe}(\text{OH})_3$ mitjançant la reacció (1) i, en el càtode, mitjançant la reacció (2) es forma H_2 gas.



Els ions hidròxids formaran flòculs que retindran els contaminants de l'aigua que precipitaran en forma de fangs. Així mateix, les bombolles de H_2 gas formades al càtode fan surar alguns contaminants facilitant el procés de separació. A la bibliografia es troben referències de processos d'electrocoagulació relacionades amb algunes soques bacterianes o que mesuren l'eliminació de la demanda química d'oxigen (COD). No obstant això, no s'han trobat estudis previs sobre l'eliminació dels bacteris de la llet o del xerigot.

D'altra banda, també són importants els processos electroquímics d'oxidació avançada basats en la reacció química de Fenton, com són l'electro-Fenton (EF) i el fotoelectro-Fenton (FEF), per retirar els contaminants de l'aigua residual. En ambdós processos es generen radicals hidroxil ($\bullet\text{OH}$) en el medi mitjançant la reacció (3). La presència de Fe^{2+} s'aconsegueix amb una electrocoagulació prèvia o bé afegint ions Fe al medi. Amb el càtode de carbó-tefló de difusió d'oxigen s'aconsegueix la generació contínua d' H_2O_2 en el medi necessari per portar a terme la reacció 3.



En el cas de FEF, a més, es formaran radicals $\bullet\text{OH}$ com a conseqüència de la fotoreducció de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ i altres espècies fotoactives.

En aquest treball es van testar ambdós tipus de tractament electroquímic; separació de fases i oxidació avançada, tant junts com per separat, amb l'objectiu d'inactivar la microbiota present en l'aigua residual d'una indústria lletera.

Aquesta microbiota inicial contenia, de mitjana: $4,3 \times 10^6$ ufc/mL de bacteris heteròtrofs; $3,4 \times 10^5$ ufc/mL de bacteris de l'àcid làctic; $2,6 \times 10^5$ ufc/mL *E. coli*; $1,2 \times 10^6$ ufc/mL de coliforms totals; $2,5 \times 10^2$ ufc/mL de *Staphylococcus* i $1,8 \times 10^5$ ufc/mL de llevats i fongs.

En tots els experiments es van monitoritzar els canvis de paràmetres com pH, conductivitat i TOC. En el cas del TOC, aquest experimentava una major disminució quan l'ànode utilitzat era BDD ja que presenta una capacitat superior per destruir matèria orgànica que no pas el d'òxid de ruteni.

Com a mètode de separació de fases, es va aplicar l'EC amb elèctrodes de Fe/Fe, a 200 mA durant 60 minuts a un volum de 175 mL de mostra que presentava un pH de 5,7 aconseguint la inactivació de gairebé 1 log tant dels bacteris heteròtrofs com dels bacteris de l'àcid làctic. Per contrapartida, es generaven flòculs que precipitaven en forma de fangs els quals contenien microorganismes encara actius; $3,2 \times 10^5$ ufc/mL de bacteris heteròtrofs.

Després de 45 min d'EC a 200 mA es va afegir un tractament d'oxidació avançada, EF o FEF, durant 120 min a 100 mA utilitzant dos tipus d'ànodes; d'òxid de ruteni i de BDD. Després de 60 min d'EF i de 30 min de FEF, es va aconseguir la inactivació de la totalitat de bacteris heteròtrofs i dels bacteris de l'àcid làctic independentment de l'ànode utilitzat. La inactivació més ràpida aconseguida amb FEF s'atribueix a la radiació UV que és responsable d'una major producció de $\bullet\text{OH}$ juntament amb l'acció fotolítica sobre els àcids nucleics de les cèl·lules.

Un altre dels mètodes que varem testar va ser l'aplicació del tractament d'EC seguit de l'EF tant a pH=3, l'òptim perquè es porti a terme la reacció de Fenton, com sense variar el pH natural de la mostra. En ambdós casos, es van obtenir bons resultats d'inactivació, per la qual cosa, s'evitaven els inconvenients d'obtenir un residu àcid després del procés d'electroquímica.

Finalment, es va aplicar l'EF a la mostra d'aigua residual i sense variar el seu pH inicial. En aquest cas es va haver d'afegir 0,25 mM Fe^{2+} a la mostra. Es va utilitzar un càtode de difusió d'oxigen i es van aplicar 100 mA durant 120 min. Es van comparar els resultats obtinguts amb els dos ànodes. A l'anàlisi, a més dels bacteris heteròtrofs i dels bacteris de l'àcid làctic, també es va determinar la concentració d'*E.coli* i d'enterococs. Els resultats van mostrar que el grup dels bacteris heteròtrofs era el més resistent a la inactivació, ja que després de 120 min de tractament, d'una concentració inicial de bacteris heteròtrofs propera a $5,4 \times 10^7$ ufc/mL, encara sobreviuen alguns dels bacteris heteròtrofs amb valors de 131 ufc/mL en el cas de BDD i 9,5 ufc/mL en el cas de RuO_2 . S'ha de tenir en compte que l'ànode de RuO_2 , és més eficient en la formació de clor que el de BDD, i aquestes espècies de clor formades juguen un paper més important en la inactivació que no pas els $\bullet\text{OH}$ generats. La resta de bacteris analitzats, es van inactivar més ràpidament. En el cas dels bacteris de l'àcid làctic, amb una concentració inicial de $2,0 \times 10^7$ ufc/mL, als 60 min ja no se'n va trobar cap d'actiu amb l'ànode RuO_2 o

als 120 min amb BDD. Finalment, la inactivació d'*E.coli* i enterococs va ser molt més ràpida essent inactivats totalment als 30 min (RuO₂) o als 60 min (BDD). En ambdós casos, la concentració inicial d'*E. coli* era de $8,29 \times 10^5$ ufc/mL i la dels enterococs variava entre els $4,32 \times 10^5$ ufc/mL inicials amb l'ànode de BDD i els $5,7 \times 10^4$ inicials amb l'ànode de DSA.

Amb aquests experiments podem concloure que, després del tractament d'EC, s'obtenien millors resultats d'inactivació quan al tractament d'EF s'hi afegia radiació UV, donant lloc al procés de FEF, perquè la inactivació bacteriana es veia incrementada per aquesta radiació UV.

També es va veure que l'aplicació directa del procés d'EF amb un ànode de RuO₂, sense necessitat de canviar el pH inicial de la mostra, era un mètode adequat per a la desinfecció de l'aigua residual industrial perquè s'aconseguia la inactivació total dels bacteris heteròtrofs, dels bacteris de l'àcid làctic, d' *E.coli* i dels enterococs, evitant la generació de fangs que comporta l'aplicació de l'EC.

Advantages of electro-Fenton over electrocoagulation for disinfection of dairy wastewater

Carmina Bruguera-Casamada^a, Rosa M. Araujo^a, Enric Brillas^b, Ignasi Sirés^b

^a *Sec. Microbiologia, Virologia i Biotecnologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

Abstract

This study is focused on the disinfection of raw dairy wastewater by means of a sequential treatment including an electrocoagulation (EC) step with an Fe|Fe cell followed by electro-Fenton (EF) or UVA-assisted photoelectro-Fenton (PEF). The two latter methods were run with an air-diffusion cathode for H₂O₂ generation and either a boron-doped diamond (BDD) or a RuO₂-based anode. The inactivation of heterotrophic and lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and enterococci was assessed. Low removal of organic load was found in all cases, whereas the bacteria were poorly removed by the flocs formed in EC but largely inactivated in EF and PEF. EF was also advantageous because it prevented the formation of harmful sludge containing active bacteria, in contrast to EC. Heterotrophs were the most stable bacteria, whereas the others were totally inactivated in most cases. In the sequential EC/EF process involving a BDD anode in the latter step, the inactivation rate for the lactic acid bacteria was higher at circumneutral pH, due to the great ability of produced active chlorine to oxidize the molecules of the cell walls. The use of a RuO₂-based anode also led to a quick inactivation at pH 3.0. A better performance was achieved when PEF replaced EF, regardless of the anode, owing to the enhanced bacterial inactivation by UVA radiation. The raw dairy wastewater at natural pH 5.7 treated by single EF step with a RuO₂-anode also yielded a faster removal of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and enterococci as compared to BDD, always remaining small contents of active heterotrophs in solution.

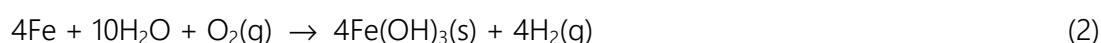
Keywords: Dairy wastewater; Electrocoagulation; Electro-Fenton; Heterotrophic bacteria;

Lactic acid bacteria; Photoelectro-Fenton

1. Introduction

Milk processing in caseiculture consumes large quantities of water, producing about 10 L of wastewater per liter of processed milk [1]. Dairy wastewater is composed of high concentrations of organic matter, salts and bacteria, and its management is difficult because of its variable composition. In general, it contains different proportions of process water, non-valorized cheese whey and cleaning water [2]. As a result, it contains milk and whey proteins, along with other components such as sodium, calcium, chloride or lactic acid [3]. Before its discharge into the sewer system, it is necessary to reduce both, bacterial content and organic matter load. Lactose ($0.18\text{-}45\text{ g L}^{-1}$), proteins ($1.8\text{-}34\text{ g L}^{-1}$) and fat ($0.08\text{-}6\text{ g L}^{-1}$) account for the largest part of chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD) [4,5]. The whey proteins are globular and are composed of 60% β -lactoglobulin, 22% α -lactalbumin, 9% immunoglobulins and 5.5% bovine serum albumin.

Electrocoagulation (EC) and Fenton-based treatments seem the most promising technologies to remove the bacteria and organic matter from dairy wastewater [5,6]. EC is an efficient, environmentally friendly phase-separation method based on the release of Fe^{2+} or Al^{3+} ions from sacrificial Fe and Al anodes [7-10]. Reaction (1) causes the dissolution of the Fe anode. The released Fe^{2+} can then be converted into $\text{Fe}(\text{OH})_3$ in the presence of O_2 by reaction (2). At the cathode, OH^- ion and H_2 gas is formed from reaction (3).



Iron hydroxides ($\text{Fe}(\text{OH})_2$ and $\text{Fe}(\text{OH})_3$) are relatively non-toxic and form flocs that allow pollutant removal, yielding a sludge that may precipitate [11]. The flocs entrap colloidal particles

by surface complexation or electrostatic attraction and by sweep flocculation [12]. Additionally, the H₂ gas bubbles generated at the cathode cause the flotation of some pollutants and, consequently, the separation process is facilitated [13]. As a conventional electrochemical method, EC requires simple equipment and is easy to operate. The periodic replacement of the sacrificial anodes, their passivation and the electricity cost have been reported as the main drawbacks of this technology.

Several authors used EC for disinfection in urban wastewater treatment facilities (WWTFs), describing total inactivation (> 99.99%) of *Escherichia coli* [14-16], total coliforms [17,18] or *Staphylococcus aureus* [19]. EC has also been applied to minimize the organic load of dye and textile wastewater [13,20-23], urban wastewater [24], olive oil mill wastewater [25] and cheese whey or dairy wastewater [3,26-29]. For a synthetic whey solution, Un et al. [3] described a maximum COD removal of 86.4% using a reactor in continuous with Fe electrodes and proposed a mathematic model to explain the abatement based on response surface methodology. Similarly, for a deproteinated whey wastewater, Guven et al. [26] found a maximum COD decay of 53.3% after 8 h of EC with Fe electrodes at a cell voltage of 11.3 V. Fayad et al. [28] obtained total removal of whey proteins from wastewater of pH 4 using Al electrodes in batch mode at 4.5 A. However, no previous studies about bacterial removal from whey and dairy wastewater have been reported in the literature.

Electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) based on Fenton's reaction chemistry like electro-Fenton (EF) and photoelectro-Fenton (PEF) are also becoming interesting approaches for the removal of organic pollutants from wastewater [30-33]. In EF, the strong oxidant hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) is generated in the bulk solution from Fenton's reaction (4). The most characteristic feature is the cathodic H₂O₂ electrogeneration from the two-electron reduction of injected O₂ at Fenton's optimum pH \approx 3. Suitable cathodes for H₂O₂ production

are carbon felt [34-37] and carbon-polytetrafluoroethylene (PTFE) coated on air-diffusion substrates [38-41]. The PEF process involves additional illumination of the solution with UVA light ($\lambda = 365$ nm), producing $\bullet\text{OH}$ from the photoreduction of $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, the photoactive species of aqueous Fe(III) ion, by reaction (5). Moreover, the incident photons can also photolyze oxidation products, like Fe(III)-carboxylate complexes by reaction (6) [38,39]. Note that UVA radiation does not photolyze H_2O_2 to $\bullet\text{OH}$, a reaction that requires a more powerful radiation like UVC ($\lambda = 254$ nm).



Apart from homogeneous $\bullet\text{OH}$, other oxidizing agents can be generated in an undivided cell, depending on the electrolyte and anode nature [30-32]. In non-chlorinated medium, the heterogeneous $\text{M}(\bullet\text{OH})$ is formed as main species at the anode M from water discharge via reaction (7). Boron-doped diamond (BDD) thin-films are the most convenient anodes for this, since they produce great amounts of oxidant BDD($\bullet\text{OH}$) [31,40]. In chloride medium, active chlorine species ($\text{Cl}_2/\text{HClO}/\text{ClO}^-$) are also formed, thus competing with $\text{M}(\bullet\text{OH})$ and $\bullet\text{OH}$ to destroy the organics or microorganisms. Chloride is anodically oxidized to Cl_2 via reaction (8), which is hydrolyzed to hypochlorous acid (HClO) via reaction (9) [8]. Cl_2 predominates at $\text{pH} < 3$ and has lower oxidation power than HClO, the most abundant species from $\text{pH} 3$ to 8. At higher pH , HClO is dissociated to ClO^- . The oxidation of Cl^- is enhanced at dimensionally stable anodes (DSA[®]) like RuO_2 , but with low ability to produce adsorbed hydroxyl radicals ($\text{RuO}_2(\bullet\text{OH})$) [33,40].





A limited number of papers has been devoted to explore the disinfection power of EF in real wastewater matrices [42,43]. For example, Durán Moreno et al. [42] found that this process allowed the overall inactivation of total coliforms, *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella sp.* from municipal wastewater. In earlier work [24], we reported that a sequential EC/EF treatment of primary and secondary WWTF effluents allowed the complete removal of all the active microbiota, namely *E. coli*, enterococci, *C. perfringens* spores, somatic coliphages and eukaryotes, with partial inactivation of the heterotrophic (HT) bacteria. Worth mentioning, the PEF process has not been tested for disinfection.

This work aims to compare the ability of single EC with Fe|Fe cell with that of EF and sequential EC/EF and EC/PEF processes to inactivate the microorganisms contained in a real dairy wastewater sample. EF and PEF were comparatively performed with a BDD/air-diffusion or RuO₂-based/air-diffusion cell to assess the role of generated oxidants. Considering the microbiological complexity of this wastewater, HT and lactic acid (LA) bacteria, *E.coli* and enterococci were selected as indicators to monitor the disinfection.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Analytical grade heptahydrate Fe(II) sulfate was purchased from Sigma-Aldrich. The EF and PEF assays after the EC-pre-treated wastewater were made after adjusting the pH at 3.0 with analytical grade H₂SO₄ or HClO₄ supplied by Merck. Analytical solutions were prepared with ultrapure water (Millipore Milli-Q, resistivity >18.2 MΩ cm), whereas reagents and organic solvents were of HPLC or analytical grade supplied by Merck, Panreac and Sigma-Aldrich.

2.2. Sample of dairy wastewater

Fresh dairy wastewater was treated in all the assays. The raw wastewater was obtained from a small dairy industry located in Lliçà d'Amunt (northeastern Spain). Samples were collected in polyethylene bottles and stored at 4 °C before usage in 24-48 h. The main average physicochemical characteristics were: pH 5.7 ± 0.2 , conductivity 2.95 ± 0.12 mS cm⁻¹, 1416 ± 24 mg C L⁻¹ of total organic carbon (TOC), 850 ± 17 mg L⁻¹ of K⁺, 115 ± 9 mg L⁻¹ of Na⁺, 1345 ± 28 mg L⁻¹ of Cl⁻, 98 ± 5 mg L⁻¹ of SO₄²⁻ and 0.045 ± 0.002 mg L⁻¹ of Fe²⁺.

2.3. Microbial enumeration

LA and HT bacteria were quantified after 10-fold dilution with ¼-strength Ringer's solution and culture, respectively, by duplicate on Plate Count Agar (PCA) and Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS), purchased from Scharlab. The incubation for HT was made at 30 °C for 48 h and that of LA, at 30°C for 4 d, according to ISO 9308-2:2012. The theoretical detection limit was 1 colony-forming units per mL (CFU mL⁻¹). *E. coli* and enterococci were quantified by most probably number (MPN) using MUG/EC and MUD/SF Kit 96-well microplates supplied by Bio-Rad Laboratories. Both bacteria were incubated at 42 °C for 48 h, following ISO 9308-2:2012, with detection limit of 0.35-1.35 CFU mL⁻¹.

2.4. Electrolytic systems

All the electrolytic assays were performed with an open, undivided, jacketed, cylindrical cell. The temperature of the treated wastewater was kept at 25 °C by thermostated water and it was always vigorously stirred at 800 rpm with a magnetic PTFE bar. After each trial and before the next, the cell was cleaned with a H₂O₂/H₂SO₄ mixture for 10 min, rinsed with ultrapure water and dried in an oven at 80 °C.

In EC, 175 mL of raw dairy wastewater were electrolyzed with two 10-cm² Fe (mild carbon steel) plates as the anode and cathode, separated about 1 cm. A constant current was applied

provided by an Amel 2053 potentiostat-galvanostat. Before each EC run, the surface of both Fe electrodes was mechanically abraded with SiC paper, chemically cleaned with 0.1 M H₂SO₄ and ultrasonically cleaned in ultrapure water, followed by drying with an air stream.

The subsequent EF and PEF assays were carried out at constant current provided by the above potentiostat-galvanostat with 120 mL of the supernatant liquid, which already contained soluble iron ions formed in the EC treatment of the wastewater. In some cases, the pH was adjusted to 3.0 with HClO₄ in order to maintain the same SO₄²⁻ and Cl⁻ ions content in the sample. The EF runs of the raw dairy wastewater at natural pH were conducted with 150 mL of sample after addition of 0.25 mM Fe²⁺. The anode was either a BDD thin-film electrode over Si substrate purchased from NeoCoat or a RuO₂-based plate supplied by NMT Electrodes. The cathode was a carbon-PTFE air-diffusion electrode purchased from Sainergy Fuel Cell. The immersed area of all electrodes was 3 cm² and the interelectrode gap of about 1 cm. The cathode produced H₂O₂ upon injecting compressed air at 1 L min⁻¹, as described elsewhere [39]. In the PEF treatments, the wastewater was illuminated with UVA light (300-420 nm, λ_{max}= 360 nm) emitted by a Philips TL/6W/08 fluorescent black light blue tube that was placed at 6 cm above the solution. The UVA irradiance of this tube was 5 W m⁻². Prior to the initial EF run, the surface of the BDD and RuO₂-based anodes were cleaned in 0.050 M Na₂SO₄ at 300 mA for 180 min. Under these conditions, the air-diffusion cathode was activated as well. Before each further EF or PEF experiment, the BDD and RuO₂-based anodes were immersed in ultrapure water at 100 °C for 10 min and dried under an air stream, whereas the air-diffusion cathode was cleaned with a 1:3 (v/v) H₂O/HCl mixture and rinsed with ultrapure water, followed by air-drying.

2.5. Analytical methods

The pH was measured with a Crison GLP 22 pH-meter. The conductivity was determined on a Metrohm 644 conductometer. TOC analysis was carried out with a Shimadzu TOC-VCNS

analyzer, with an accuracy of $\pm 1\%$ by injecting 50 μL aliquots previously filtered with 0.45 μm filters purchased from Whatman. The concentrations of cations and anions was determined following the procedures above reported [25].

The inactivation profiles for all the microorganisms were monitored from the decay of the logarithm of their concentration N (in CFU mL^{-1}). For each experimental condition, at least two independent tests were made, and the average $\log N$ value is given in the graphs along with the standard deviation (95% confidence interval).

3. Results and discussion

3.1. Microbiological characterization of the dairy wastewater

The samples of the dairy wastewater showed certain variability of pH with time and for this reason, they were processed within 24 h and treated before 48 h as maximal. The microscopic vision evidenced the presence of filamentous fungi, fat, yeasts and bacteria. Protozoa were not observed, at least in detectable quantity. The initial microbiological analysis of the samples gave, in average, the following results: $(4.3 \pm 0.3) \times 10^6$ CFU mL^{-1} of HT, $(3.4 \pm 0.1) \times 10^5$ CFU mL^{-1} of LA, $(2.6 \pm 0.2) \times 10^5$ CFU mL^{-1} of *E. coli*, $(1.2 \pm 0.1) \times 10^6$ CFU mL^{-1} of total coliforms, $(2.5 \pm 0.1) \times 10^2$ CFU mL^{-1} of *Staphylococcus* and $(1.8 \pm 0.1) \times 10^5$ CFU mL^{-1} of yeast and fungi.

3.2. Electrocoagulation with Fe|Fe cell

The EC of the dairy wastewater was performed with a Fe anode since its dissolution provided the amount of iron ions required for EF and PEF post-treatments [22,25]. First assays were made with 175 mL of the wastewater at natural pH 5.7 using a stirred Fe|Fe tank reactor and by applying 100 and 200 mA (current density of 10 and 20 mA cm^{-2} , respectively) for 60 min to assess the effect of increasing amounts of generated coagulants over disinfection. Under

these conditions, a consumption of 1.93 electrons per Fe atom was determined from the anode weight loss [25], in good agreement with the expected two-electron Fe oxidation (reaction (1)).

Fig. 1 depicts the low drop of $\log N$ for HA and LA bacteria in the above trials. HA was poorly inactivated at 100 mA, only in the order of 0.6 log units, whereas a slightly superior inactivation close to 1.0 log units was found at 200 mA. It is then apparent that the increase of current yielded a quicker disappearance of both bacteria that remained entrapped in the major amounts of $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs and sludge formed. In the EC process, a gradual clarification of the wastewater samples was observed, changing from initial white to final dark-green color. This transition can be mainly related to the presence of iron ions and iron hydroxide flocs in suspension that give such dark-greenish coloration. The accumulation of released iron ions was also confirmed from the increase of the conductivity from 2.95 to 4.4 mS cm^{-1} at the end of the run at 200 mA. It is noticeable that the wastewater was alkalized during the EC treatment because of the continuous uncompensated production of OH^- ion from reaction (3), since the Fe anode was dissolved according to reaction (1) without significant H^+ generation from H_2O oxidation. This is in contrast to that occurring when using insoluble anodes like BDD and RuO_2 [8,30-33]. For example, after 60 min at 200 mA, the pH rose from 5.7 to 7.8.

A poor loss of TOC of 185 and 255 mg C L^{-1} (13% and 18% of initial value) after 60 min of EC at 100 and 200 mA, respectively, was found as well. This reveals a low ability of the $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs to coagulate the high amounts of pollutant molecules contained in the dairy wastewater, except whey proteins. Since the isoelectric point of these proteins is of 5.2 for β -lactoglobulin, 4.2-4.5 for α -lactalbumin, 5.5-6.8 for immunoglobulins and 4.7-4.9 for bovine serum albumin, it is expected that they were rather removed by the flocs due to its low solubility under our experimental conditions [44]. In contrast, it has been shown that soluble molecules such as lactose, glucose and fatty acids cannot be removed by EC with Fe anode [20,21,27]. The large

presence of the latter molecules in the organic load of dairy wastewater could explain its very low TOC removal achieved by this treatment. Also worth highlighting, a low specific energy consumption of 2.3 and 8.2 kWh m⁻³ was obtained for the EC treatment at 100 and 200 mA, respectively.

To corroborate that the microorganisms were retained on the dark-reddish sludge formed by the Fe(OH)_n flocs, the remaining wastewater from a 200 mA trial was decanted to be separated from the sludge and its flocs were subsequently collected by filtration. Analysis of these wastes showed the existence of a higher content of heterotrophs still actives in the flocs (3.2×10⁵ CFU mL⁻¹) than in the sediment (8.3×10² CFU mL⁻¹). For a whey wastewater, Un and Kandemir [29] reported the presence of hematite (Fe₂O₃) and magnetite (Fe₃O₄) phases in the dried sludge obtained through EC with Fe anode. They proposed that part of this sludge could be used as an iron source in other applications and its excess could be used as a fertilizer or incinerated if it is very toxic. Our results for the sludge produced from dairy wastewater reveal the retention of an important content of active bacteria, meaning that it should be incinerated to avoid their infection in living beings.

3.3. Sequential EC/EF with BDD at pH 3.0 and circumneutral pH

Next, the sequential assays were carried out for 60 min in EC and 120 min in EF. The EC step was firstly performed as explained in section 3.2, i.e., 175 mL of sample at natural pH with Fe|Fe cell at 200 mA. Once ended, the wastewater was filtered and 120 mL of the transparent and greenish supernatant liquid were introduced in a rinsed and cleaned cell to be post-treated by EF. The pH of this liquid was adjusted to pH 3.0 with H₂SO₄ (optimum acidity for EF) and it already contained enough soluble iron ions from the previous EC process (about 3 mg L⁻¹ [22]), to generate homogeneous •OH upon optimum conditions of Fenton's reaction (4). The EF process was then run after introducing a BDD anode and an air-diffusion cathode in the stirred

cell and by applying a current of 100 mA (current density of 33.3 mA cm^{-2}) for 120 min. No significant change in pH was found during this post-treatment.

Fig. 2 shows the evolution of $\log N$ for HT and LA bacteria in the above sequential EC/EF treatment. Worth mentioning, after filtration of the resulting wastewater from EC and adjustment to pH 3.0 before EF, the initial concentration of both microorganism was reduced by about 2 log units, resulting average values of $8.75 \times 10^2 \text{ CFU mL}^{-1}$ for HT bacteria and $4.76 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ for LA bacteria. The decay of the former bacteria could be related to two effects: (i) the retention of the microorganisms onto the flocs that remain in the filter and (ii) their larger inactivation at the acidic pH of the wastewater. However, the latter explanation seems not valid for the LA bacteria, which are acid tolerant and can survive between pH 3.2 to 9.6, with optimum growth in the pH range 4.0-4.5 [45]. This bacterial group is composed of a large variety of microorganisms, cocci or rods, with common Gram-positive, anaerobic, microaerophilic or aerotolerant, non-spore-forming, non-pathogens, non-toxigenic, and negative oxidase, catalase and benzidine characteristics, and lactic acid production as the major end by-product of the fermentation of carbohydrates [46,47].

Fig. 2 shows that in the EF step, the HT bacteria underwent a loss of 2.3 log units, which remained invariable between 60 and 120 min of electrolysis, whereas the LA bacteria were inactivated gradually to larger extent up to 3.3 log units. The greater LA reduction would be related to its higher initial concentration in the wastewater. It seems unreasonable to explain the decay on the basis of the toxicity produced by the electrogenerated H_2O_2 , because this bacteria group, especially the rod-shaped lactobacilli, in presence of O_2 already produces certain amount of H_2O_2 that is chemically and enzymatically transformed into oxygen radicals with more potent antimicrobial activity than H_2O_2 itself [48,49]. The inactivation of HT and LA bacteria in EF can then be associated to the action of strong oxidizing agents generated,

including $\bullet\text{OH}$ from Fenton's reaction (4), BDD($\bullet\text{OH}$) from reaction (7) and active chlorine (Cl_2/HClO) from reactions (8) and (9), as established elsewhere [50,51]. These strong oxidants are expected to attack the molecules of the cell walls causing the lysis and death of bacteria [24,52]. In contrast, the weaker oxidant H_2O_2 is expected to contribute to the disinfection to a much smaller extent [48,49], being rather inactive for LA bacteria, as stated above.

Unlike the EC step where the pH and conductivity of the treated dairy wastewater underwent large variations, the subsequent EF process at pH 3.0 showed a good stability of both parameters. After 120 min of EF, the pH decayed slightly to 2.6, suggesting the formation of acidic by-products, and the initial conductivity of 6.4 mS cm^{-1} (due to H_2SO_4 addition for pH adjustment) rose up to 7.0 mS cm^{-1} . Moreover, the sequential EC/EF treatment only yielded a small TOC reduction of 385 mg C L^{-1} (27% of the initial 1416 mg C L^{-1}), indicating not only the low ability of the $\text{Fe}(\text{OH})_n$ flocs for organic coagulation in EC, as stated above, but also the low oxidizing power of $\bullet\text{OH}$, BDD($\bullet\text{OH}$) and active chlorine to mineralize them in EF. It is also noticeable that the dark-green wastewater obtained after EC was clarified upon acid addition before EF and at the end of this treatment, it reached a clear yellow-brown color due to the removal of suspended solids and the presence of iron ions.

To assess the disinfection power of the generated oxidizing agents under non-optimum conditions of Fenton's reaction (4), another sequential EC/EF treatment of the raw dairy wastewater was made, but without varying the pH of the filtered supernatant liquid obtained by EC to be treated by EF. Thus, the EC step with Fe|Fe cell was carried out by applying 200 mA for 30 min, where the pH increased from 5.7 to 7.5. The subsequent EF with BDD at 100 mA was carried out for 60 min, showing a pH decay from 7.5 to 6.8. The conductivity also rose up to 4 mS cm^{-1} in the former case, remaining practically unchanged in the second one. Moreover, about 20% of the initial TOC was removed in this sequential EC/EF process, corroborating again

the low ability of the species formed in each step to coagulate/mineralize the organic matter of the wastewater.

For the aforementioned experiment, Fig. 3 reveals a little drop of 0.8 log units in the concentration of both HT and LA bacteria after 30 min of EC. After filtration of the liquid supernatant, the content of these groups of bacteria were reduced by 2.3 log and 2.8 log units, respectively. It should be noteworthy the large inactivation achieved after 60 min of EF, where 15 CFU mL⁻¹ were only detected for HT, whereas the LA bacteria disappeared completely. Compared with the results of Fig. 2, one can infer that the oxidizing agents formed at circumneutral pH were more effective to disinfect the wastewater than those produced at pH 3.0, although with a slightly lower inactivation power over the HT bacteria. This indicates that the disinfection of the sequential EC/EF process over dairy wastewater is so good operating at circumneutral pH that it is not necessary to regulate the optimum pH 3.0 for the EF post-treatment. At circumneutral pH, active chlorine is mainly in the form of HClO, which is more powerful than Cl₂ that is also present at pH 3.0 [31-33]. The specific energy consumption for this assay was 19.5 kWh m⁻³, arising from 4.1 kWh m⁻³ (21%) of EC plus 15.4 kWh m⁻³ (79%) of EF. Although the EF post-treatment was much more efficient for disinfection, it demanded greater energy consumption than the EC step.

3.4. Comparative sequential EC/EF and EC/PEF with BDD and RuO₂-based at pH 3.0

A series of comparative trials was made to check the influence of the anode, BDD or RuO₂-based, over the disinfection power of the EF post-treatment, as well as considering that of the incident UVA light using the PEF one. The EC step was performed again with 175 mL of a sample of dairy wastewater in a stirred Fe|Fe cell at 200 mA for 45 min. The EF or PEF steps were carried out with 120 mL of the filtered supernatant liquid once adjusted at pH 3.0 with HClO₄ (to no

alter the Cl^- and SO_4^{2-} content of the samples) and by applying 100 mA, for 120 min as maximal.

As expected, the initial pH of 5.7 and conductivity of 2.9 mS cm^{-1} of the raw wastewater rose up to 7.8 and 4.4 mS cm^{-1} , respectively, after the EC pretreatment. In contrast, no significant change of pH close to 3 and conductivity of about 6.4 mS cm^{-1} was observed after the EF and PEF post-treatments. For the latter steps, the use of a BDD anode always caused a higher TOC abatement than that of RuO_2 -based. The initial TOC was reduced by 25% and 28% for EC/EF and EC/PEF with BDD, respectively, and to lesser extent of 21% and 24% for the analogous runs with RuO_2 -based. In all cases, the EC step yielded the higher TOC removal of about 17%-18%. These findings agree with the superior ability of BDD($\bullet\text{OH}$) compared to RuO_2 ($\bullet\text{OH}$) to destroy the organic matter [31-33], thereby confirming the important oxidative role of the former radical. The enhancement of TOC removal by PEF can be accounted for by the oxidation action of UVA light that can photolyze photoactive intermediates, e.g. from reaction (6), and originate more amounts of $\bullet\text{OH}$ from reaction (5) and photo-excitation of active chlorine [53].

A different trend can be observed in Fig. 4a and b for the inactivation of HT and LA bacteria by the above trials. An important and similar loss of bacterial concentration of 3-4 log units always occurred after conditioning the supernatant liquid of EC at pH 3.0 with HClO_4 (probably more toxic than H_2SO_4), whereas both groups of bacteria disappeared rapidly after 60 min of EF and 30 min of PEF, regardless the anode used. This means that the disinfection process in EF takes place thanks to $\bullet\text{OH}$ and active chlorine as the most efficient oxidants for lysing the cells. The quicker inactivation attained by PEF is due to the additional excess of $\bullet\text{OH}$ produced under the 6 W UVA radiation that facilitates their lysing, along with its photolytic action over the nucleic acids (DNA and RNA) of the cells [54]. Despite the PEF post-treatment produces faster

disinfection and larger TOC abatement of the dairy wastewaters, the high energy spent by the UVA lamp prevents their use in practice and the alternative EF step seems more useful for such purposes.

3.5. EF treatment at natural pH

Last experiments were made to assess the disinfection performance of EF over the dairy wastewater. To do this, 0.25 mM Fe^{2+} were added to 150 mL of sample at natural pH for further electrolysis in stirred BDD/air-diffusion and RuO_2 -based/air-diffusion cells at 100 mA for 120 min. No substantial change of the initial conductivity of 2.8 mS cm^{-1} was found for these trials, whereas the initial pH of 5.8 rose slightly up to 6.6 at the end of electrolysis, regardless the anode used. A slight decay of the initial TOC of 10% for BDD and 13% for RuO_2 -based was determined as well, corroborating the very low ability of the oxidizing agents generated to mineralize the complex organic molecules of the dairy wastewater.

Fig. 5a and b depict the change of $\log N$ of HT and LA bacteria, *E.coli* and enterococci with time for EF with BDD and RuO_2 -based anodes, respectively. As can be seen, the complex group of heterotrophs were the most resistant at inactivation. Its concentration profile showed a quicker removal within the first 30 min of electrolysis, with reductions of 2.7 log units for BDD and greater of 5.7 log units for RuO_2 -based. The loss of efficiency at longer time was due to the lower bacterial concentration. After 120 min of EF treatment, 131 and 9.5 CFU mL^{-1} of these bacteria using BDD and RuO_2 -based still survived. The faster inactivation achieved by RuO_2 -based suggests that active chlorine, formed to greater extent from this anode than from BDD, plays a more relevant role to remove the bacteria than hydroxyl radicals. However, the contribution of $\bullet\text{OH}$ formed from Fenton's reaction (4) was confirmed by performing electro-oxidation trials where the air-diffusion cathode was replaced by a stainless steel plate, leading to a slower removal by 1 log unit.

A similar disinfection trend for both anodes can be observed in Fig. 5a and b for the other bacteria, which were more quickly inactivated. In the case of LA bacteria, the concentration diminished 2.14 log units for BDD and 5.5 log units for RuO₂-based at 30 min, disappearing after 120 and 60 min of electrolysis, respectively. The inactivation of *E. coli* and enterococci was even much faster, since they were completely removed at 60 and 30 min using BDD and RuO₂-based, respectively.

The above results are similar to the large disinfection reported in earlier work for the EF treatment with BDD anode of primary and secondary effluents at neutral pH [24]. They are also consistent with the removal of 99.95% coliform bacteria from landfill leachate achieved using this technology [43]. Although EF is optimal at pH near 3 where more •OH is generated from Fenton's reaction (4), the combined oxidation ability of this radical and active chlorine to inactivate the microorganisms not only makes feasible its application at natural pH, but also favors the use of a RuO₂-based anode, much cheaper than the BDD. The EF with RuO₂-based can then be envisaged as more useful in practice than any sequential EC/EF process to largely disinfect dairy wastewater since it avoids the sludge produced in the EC step, which needs further treatment to prevent infections from the active bacteria retained in it.

4. Conclusions

The iron hydroxide flocs formed during EC with an Fe|Fe cell were able to remove only small TOC contents (up to 18%) and HT and LA bacteria concentrations (< 1.0 log units) from raw dairy wastewater. Furthermore, it was shown that the sludge retained active bacteria. A poor abatement of the organic matter was also found in single EF and PEF with BDD or RuO₂-based anodes, as well as in sequential treatments, indicating the low oxidation ability of hydroxyl radicals and active chlorine to attack the complex molecules of such wastewater. In

contrast, the application of these EAOPs yielded a large inactivation of all bacteria. Heterotrophs were the most hardly inactivated microorganisms, whereas LA bacteria, *E.coli* and enterococci were more rapidly removed and even completely inactivated. In the sequential process involving the EF step with BDD, a quick inactivation of LA bacteria was found at circumneutral pH, revealing the pre-eminent oxidation role of active chlorine over the molecules of the cell walls. This was corroborated by the quick inactivation of both bacteria using a RuO₂-based anode at pH 3.0, since this material promoted the active chlorine production. With PEF as post-treatment, total disinfection was rapidly achieved due to the additional bacterial inactivation induced by UVA light. Direct EF treatment of dairy wastewater at natural pH also led to faster inactivation of all bacteria using the RuO₂-anode, which was complete for LA bacteria, *E. coli* and enterococci. This method is thus preferred for dairy wastewater disinfection because it avoids the need of sludge management from EC, although it is more energy-intensive than EC.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support under projects CTQ2013-48897-C2-1-R and CTQ2016-78616-R (AEI/FEDER, EU) and from the "Grups de recerca reconeguts" 2014SGR83 and 2014SGR914 (Generalitat de Catalunya). The microscopic analysis of samples by Prof. Humbert Salvadó is also acknowledged.

References

- [1] B. Balanec, M. Vourch, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration, *Sep. Purif. Technol.* 42 (2005) 195-200.

-
- [2] A. García-García, V. Martínez-Miranda, I.G. Martínez-Cienfuegos, P.T. Almazán-Sánchez, M. Castañeda-Juárez, I. Linares-Hernández, Industrial wastewater treatment by electrocoagulation-electrooxidation processes powered by solar cells, *Fuel* 149 (2015) 46-54.
- [3] U.T. Un, A. Kandemir, N. Erginel, S.E. Ocal, Continuous electrocoagulation of cheese whey wastewater: An application of response surface methodology, *J. Environ. Manage.* 146 (2014) 245-250.
- [4] F. Carvalho, A.R. Prazeres, J. Rivas, Cheese whey wastewater: characterization and treatment, *Sci. Total Environ.* 445-446 (2013) 385-396.
- [5] A.R. Prazeres, F. Carvalho, J. Rivas, Fenton-like application to pretreated cheese whey wastewater, *J. Environ. Manage.* 129 (2013) 199-205.
- [6] D. Ghernaout, B. Ghernaout, From chemical disinfection to electrodisinfection: the obligatory itinerary?, *Desalin. Water Treat.* 16 (2010) 156-175.
- [7] C.E. Barrera-Díaz, G. Roa-Morales, P. Balderas-Hernández, P.M. Fernandez-Marchante, M.A. Rodrigo, Enhanced electrocoagulation: new approaches to improve the electrochemical process, *J. Electrochem. Sci. Eng.* 4 (2014) 285-296.
- [8] E. Brillas, C.A. Martínez-Huitle, Decontamination of wastewater containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review, *Appl. Catal. B: Environ.* 166-167 (2015) 603-643.
- [9] A. Pirkarami, M.E. Olya, S. Tabibian, Treatment of colored and real industrial effluents through electrocoagulation using solar energy, *J. Environ. Sci. Health A: Toxicol. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 48 (2013) 1243-1252.

- [10] A. Pirkarami, M.E. Olya, Removal of dye from industrial wastewater with an emphasis on improving economic efficiency and degradation mechanism, *J. Saudi Chem. Soc.* 21 (2017) S179-S186.
- [11] J.N. Hakizimana, B. Gourich, M. Chafi, Y. Stiriba, C. Vial, P. Drogui, J. Naja, Electrocoagulation process in water treatment: a review of electrocoagulation modeling approaches, *Desalination* 404 (2017) 1-21.
- [12] D. Ghernaout, B. Ghernaout, Sweep flocculation as a second form of charge neutralization – a review, *Desalin. Water Treat.* 44 (2012) 15-28.
- [13] M. Kobyas, O.T. Can, M. Bayramoglu, Treatment of textile wastewaters by electrocoagulation using iron and aluminum electrodes, *J. Hazard. Mater.* 100 (2003) 163-178.
- [14] S. Cotillas, J. Llanos, P. Cañizares, S. Mateo, M.A. Rodrigo, Optimization of an integrated electrodisinfection/electrocoagulation process with Al bipolar electrodes for urban wastewater reclamation, *Water Res.* 47 (2013) 1741-1750.
- [15] C. Delaire, C.M. van Genuchten, S.E. Amrose, A.J. Gadgil AJ, Bacteria attenuation by iron electrocoagulation governed by interactions between bacterial phosphate groups and Fe(III) precipitates, *Water Res.* 103 (2016) 74-82.
- [16] J. Llanos, S. Cotillas, P. Cañizares, M.A. Rodrigo, Electrocoagulation as a key technique in the integrated urban water cycle- a case study in the centre of Spain, *Urban Water J.* 14 (2017) 650-654.
- [17] M. Elazzouri, Kh. Haboubi, M.S. Elyoubi, Electrocoagulation-flocculation as a low-cost process for pollutants removal from urban wastewater, *Chem. Eng. Res. Des.* 117 (2017) 614-626.

- [18] A.R. Makwana, M.M. Ahammed, Electrocoagulation process for the post-treatment of anaerobically treated urban wastewater, *Sep. Purif. Technol.* 52 (2017) 1412-1422.
- [19] P. Valero, M. Verbel, J. Silva-Agredo, R. Mosteo, M.P. Ormad, R.A. Torres-Palma, Electrochemical advanced oxidation processes for *Staphylococcus aureus* disinfection in municipal WWTP effluents, *J. Environ. Manage.* 198 (2017) 256-265.
- [20] A. Dalvand, M. Gholami, A. Joneidi, N.M. Mahmoodi, Dye removal, energy consumption and operating cost of electrocoagulation of textile wastewater as a clean process. *Clean-Soil, Air, Water* 39 (2011) 665-672.
- [21] V. Khandegar, A.K. Saroha, Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent: a review, *J. Environ. Manage.* 128 (2013) 949-963.
- [22] A. Thiam, M. Zhou, E. Brillas, I. Sirés, Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes, *Appl. Catal. B: Environ.* 150-151 (2014) 116-125.
- [23] N.M.A. Ghalwa, A.M. Saqer, N.B. Farhat, Removal of reactive red 24 dye by clean electrocoagulation process using iron and aluminum electrodes, *J. Appl. Chem. Res.* 10 (2016) 117-132.
- [24] E. Anfruns-Estrada, C. Bruguera-Casamada, H. Salvadó, E. Brillas, I. Sirés, R.M. Araujo, Inactivation of microbiota from urban wastewater by single and sequential electrocoagulation and electro-Fenton treatments, *Water Res.* 126 (2017) 450-459.
- [25] N. Flores, E. Brillas, F. Centellas, R.M. Rodríguez, P.L. Cabot, J.A. Garrido, I. Sirés, Treatment of olive oil mill wastewater by single electrocoagulation with different electrodes and sequential electrocoagulation/electrochemical Fenton-based processes, *J. Hazard. Mater.* 347 (2018) 58-66.

- [26] G. Guven, A. Perendeci, A. Tanylac, Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology, *J. Hazard. Mater.* 15 (2008) 69-78.
- [27] S. Tchamango, C.P. Nanseu-Njiki, E. Ngameni, D. Hadjiev, A. Darchen, Treatment of dairy effluents by electrocoagulation using aluminum electrodes, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 947-952.
- [28] N.A. Fayad, T. Yehyta, F. Audonnet, Ch. Vial, Elimination of whey proteins by electrocoagulation: Investigation of some key operational parameters and modeling. *Desalin. Water Treat.* 68 (2017) 143-152.
- [29] U.T. Un, A. Kandemir, Treatment of whey wastewater by electrocoagulation and electro-Fenton methods in batch mode, *Desalin. Water Treat.* 95 (2017) 88-95.
- [30] E. Brillas, I. Sirés I, M.A. Oturan, Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry, *Chem. Rev.* 109 (2009) 6570-6631.
- [31] I. Sirés, E. Brillas, Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review, *Environ. Int.* 40 (2012) 212-229.
- [32] I. Sirés, E. Brillas, M.A. Oturan, M.A. Rodrigo, M. Panizza, Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8336-8367.
- [33] C.A. Martínez-Huitle, M.A. Rodrigo, I. Sirés, O. Scialdone, Single and coupled electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: a critical review, *Chem. Rev.* 115 (2015) 13362-13407.

- [34] A. Dirany, I. Sirés, N. Oturan, A. Özcan, M.A. Oturan, Electrochemical treatment of the antibiotic sulfachloropyridazine: Kinetics, reaction pathways, and toxicity evolution, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 4074-4082.
- [35] A. El-Ghenymy, R.M. Rodríguez, E. Brillas, N. Oturan, M.A. Oturan, Electro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide with Pt/carbon-felt and BDD/carbon-felt cells. Kinetics, reaction intermediates, and toxicity assessment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 8368-8378.
- [36] A. Abdessalem, N. Oturan, N. Bellakhal, M.A. Oturan, M. Dachraoui, M. Remediation of water contaminated with pesticides by indirect electrochemical oxidation process electro-Fenton, *J. Adv. Oxid. Technol.* 11 (2016) 276-282.
- [37] O. Ganzenko, N. Oturan, I. Sirés, D. Huguenot, E.D. van Hullebusch, G. Esposito, M.A. Oturan, Fast and complete removal of the 5-fluorouracil drug from water by electro-Fenton oxidation, *Environ. Chem. Lett.* 16 (2018) 281-286.
- [38] A. El-Ghenymy, N. Oturan, M.A. Oturan, J.A. Garrido, P.L. Cabot, F. Centellas, R.M. Rodríguez, E. Brillas, Comparative electro-Fenton and UVA photoelectro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide using a stirred BDD/air-diffusion tank reactor, *Chem. Eng. J.* 234 (2013) 115-123.
- [39] A. El-Ghenymy, F. Centellas, R.M. Rodríguez, P.L. Cabot, J.A. Garrido, I. Sirés, E. Brillas, Comparative use of anodic oxidation, electro-Fenton and photoelectro-Fenton with Pt or boron-doped diamond anode to decolorize and mineralize Malachite Green oxalate dye, *Electrochim. Acta* 182 (2015) 247-256.
- [40] A. Thiam, E. Brillas, F. Centellas, P.L. Cabot, I. Sirés, Electrochemical reactivity of Ponceau 4R (food additive E124) in different electrolytes and batch cells, *Electrochim. Acta* 173 (2015) 523-533.

- [41] S. Lanzalaco, I. Sirés, M.A. Sabatino, C. Dispenza, O. Scialdone, A. Galia, Synthesis of polymer nanogels by electro-Fenton process: investigation of the effect of main operation parameters, *Electrochim. Acta* 246 (2017) 812-822.
- [42] A. Duran Moreno, B.A. Frontana-Urbe, R.M. Ramírez Zamora, Electro-Fenton as a feasible advanced treatment process to produce reclaimed water, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 83-90.
- [43] H.A. Aziz, O.M. Othman, S.S.A. Amr, The performance of Electro-Fenton oxidation in the removal of coliform bacteria from landfill leachate, *Waste Manage.* 33 (2013) 396-400.
- [44] A.L.F. Cavallieri, A.P. Costa-Netto, M. Menossi, R.L. Da Cunha, Whey protein interactions in acidic cold-set gels at different pH values, *Lait* 87 (2007) 535-554.
- [45] F.J. Carr, D. Chill, N. Maida, The lactic acid bacteria: a literature survey, *Crit. Rev. Microbiol.* 28 (2002) 281-370.
- [46] R. Crittender, Incorporating probiotics into foods, in: Y.K. Lee, S. Salminen (eds), *Handbook of probiotics and prebiotics*, 2nd ed. 2009, NJ, USA, pp. 58-75.
- [47] A. Vásquez, T.C. Olofsson, The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread, *J. Apic. Res.* 48 (2009) 189-195.
- [48] A. Berstad, J. Raa, T. Midtvedt, J. Valeur, Probiotic lactic acid bacteria- the fledgling cuckoos of the gut?, *Microb. Ecol. Health Dis.* 27 (2016) 10.3402/mehd.v27.31557.
- [49] A. Di Cerbo, B. Palmieri, M. Aponte, J.C. Morales-Medina, T. Iannitti, Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli, *J. Clin. Pathol.* Mar. 69 (2016) 187-203.
- [50] J.R. Steter, E. Brillas, I. Sirés, On the selection of the anode material for the electrochemical removal of methylparaben from different aqueous media, *Electrochim. Acta* 222 (2016) 1464-1474.

-
- [51] Z.G. Aguilar, E. Brillas, M. Salazar, J.L. Nava, I. Sirés, Evidence of Fenton-like reaction with active chlorine during the electrocatalytic oxidation of Acid Yellow 36 azo dye with Ir-Sn-Sb oxide anode in the presence of iron ion, *Appl. Catal. B: Environ.* 206 (2017) 44-52.
- [52] D. Aguayo, N. Pacheco, E.H. Morales, B. Collao, R. Luraschi, C. Cabezas, P. Calderon, F. González-Nilo, F. Gil, I.L. Calderón, Hydrogen peroxide and hypochlorous acid influx through the major *S. typhimurium* porin OmpD is affected by substitution of key residues of the channel, *Arch. Biochem. Biophys.* 568 (2015) 38-45.
- [53] M.J. Watts, K.G. Linden, Chlorine photolysis and subsequent OH radical production during UV treatment of chlorinated water, *Water Res.* 41 (2007) 2871-2878.
- [54] A.M. Zyara, E. Torvinen, A.M. Veijalainen, H. Heinonen-Tanski, The effect of UV and combined chlorine/UV treatment on coliphages in drinking water disinfection, *Water* 130 (2016), doi:10.3390/w8040130.

Figure captions

Fig. 1. Variation of logarithm of the concentration of heterotrophic (HT) and lactic acid (LA) bacteria with electrolysis time upon electrocoagulation (EC) of 175 mL of dairy wastewater at natural pH using an undivided Fe|Fe cell (10 cm² electrode area) at a current of 100 or 200 mA and 25 °C.

Fig. 2. Change of the logarithm of the concentration of heterotrophic and lactic acid bacteria with time for a sequential EC/EF treatment performed for 60 and 120 min, respectively. In the EC step, 175 mL of dairy wastewater at natural pH were treated in an undivided Fe|Fe cell at 200 mA. The following EF step was carried out with 120 mL of the supernatant solution adjusted to pH 3.0 using a BDD/air-diffusion cell (3 cm² electrode area) at 100 mA. Temperature: 25 °C.

Fig. 3. Variation of the logarithm of the concentration of heterotrophic and lactic acid bacteria in a sequential EC/EF treatment performed for 30 and 60 min, respectively. The EC and EF steps were made under the same conditions as in Fig. 2, but the initial pH of the supernatant liquid in EF was ca. 7.5, the value obtained at the end of EC.

Fig. 4. Change of the logarithm of the concentration of heterotrophic and lactic acid bacteria with time in sequential (a) EC/EF and (b) EC/PEF treatments. In both cases, the first process (EC) was performed with 175 mL of dairy wastewater at natural pH in an undivided Fe|Fe cell at 200 mA for 45 min. The subsequent EF or PEF treatment was made with 120 mL of the supernatant solution at pH 3.0 using a BDD/air-diffusion or RuO₂-based/air diffusion cell at 100 mA for 120 min. In PEF, the solution was irradiated with a 6 W UVA lamp. Temperature: 25 °C.

Fig. 5. Variation of logarithm of the concentration of heterotrophic and lactic acid bacteria, *E. coli* and enterococci along 120 min of EF treatment of 150 mL of dairy wastewater at natural pH with 0.25 mM Fe²⁺ using (a) BDD/air-diffusion and (b) RuO₂-based/air-diffusion cells at 100 mA and 25 °C.

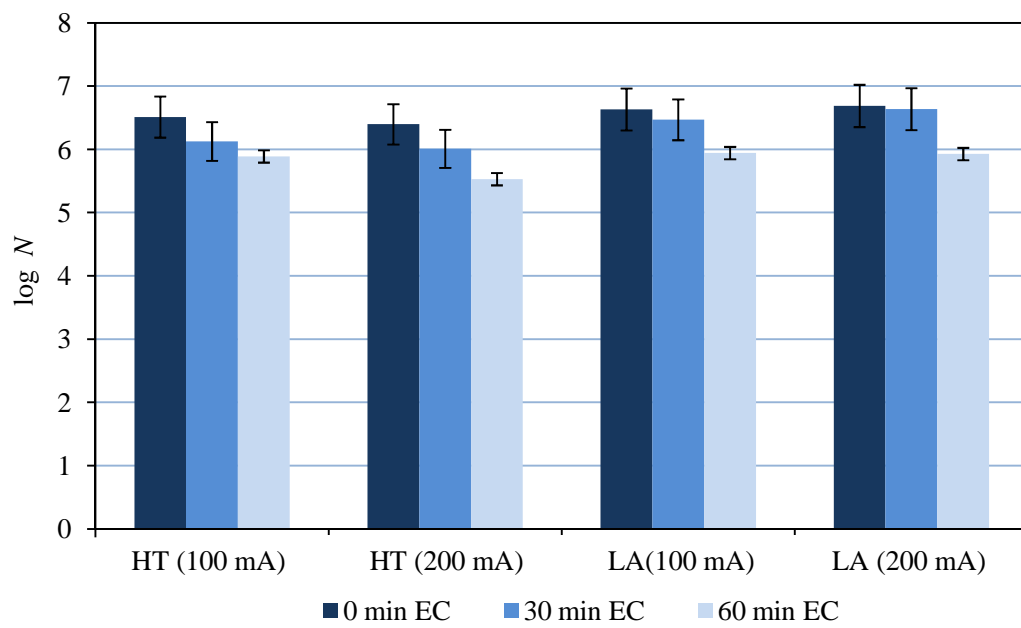


Fig. 1

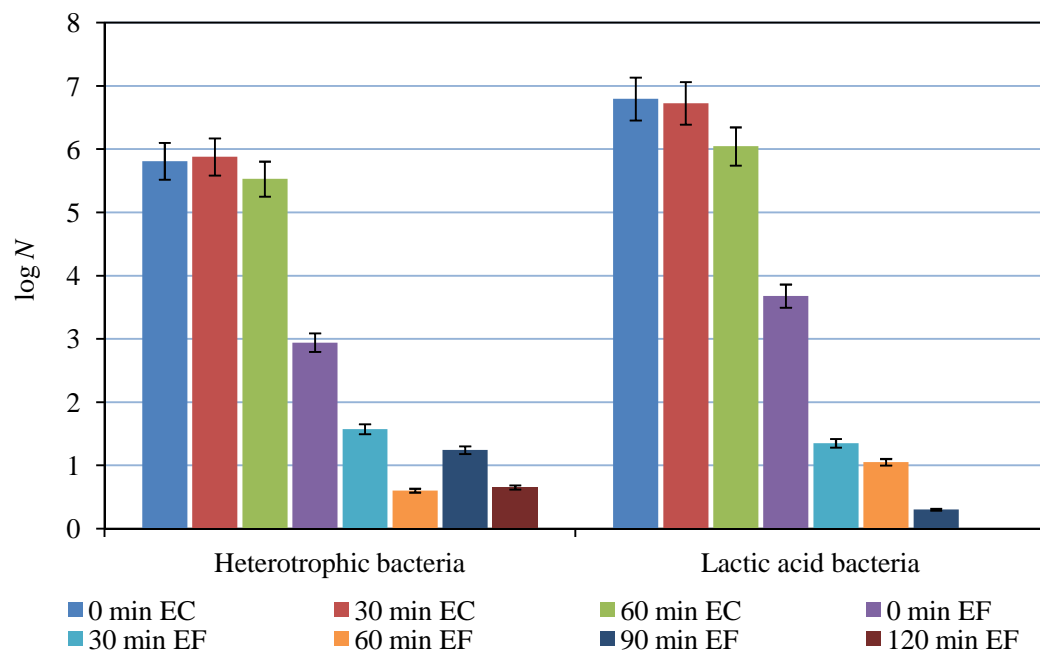


Fig. 2

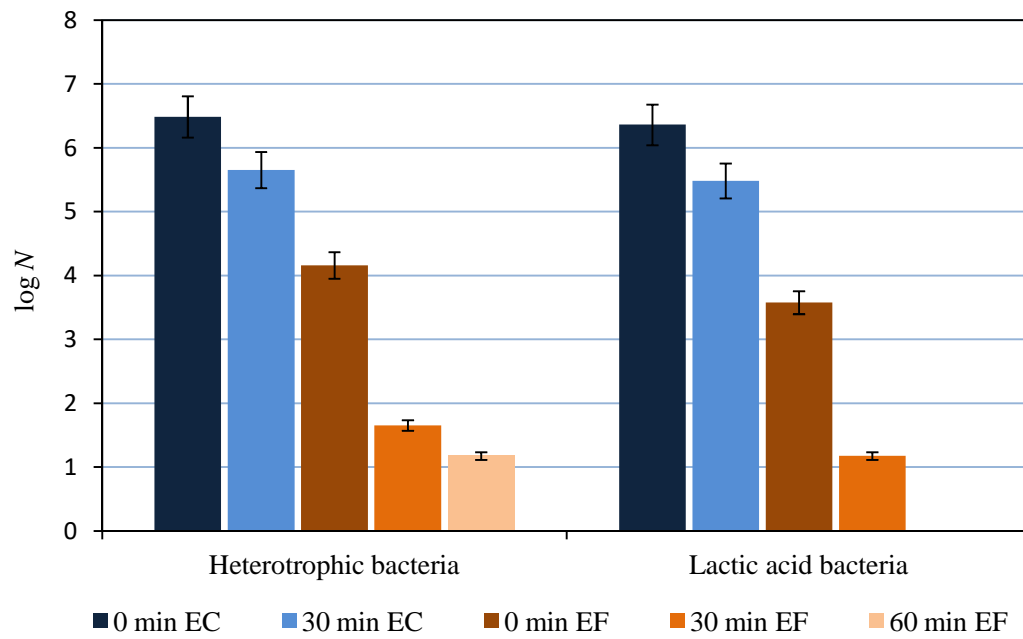


Fig. 3

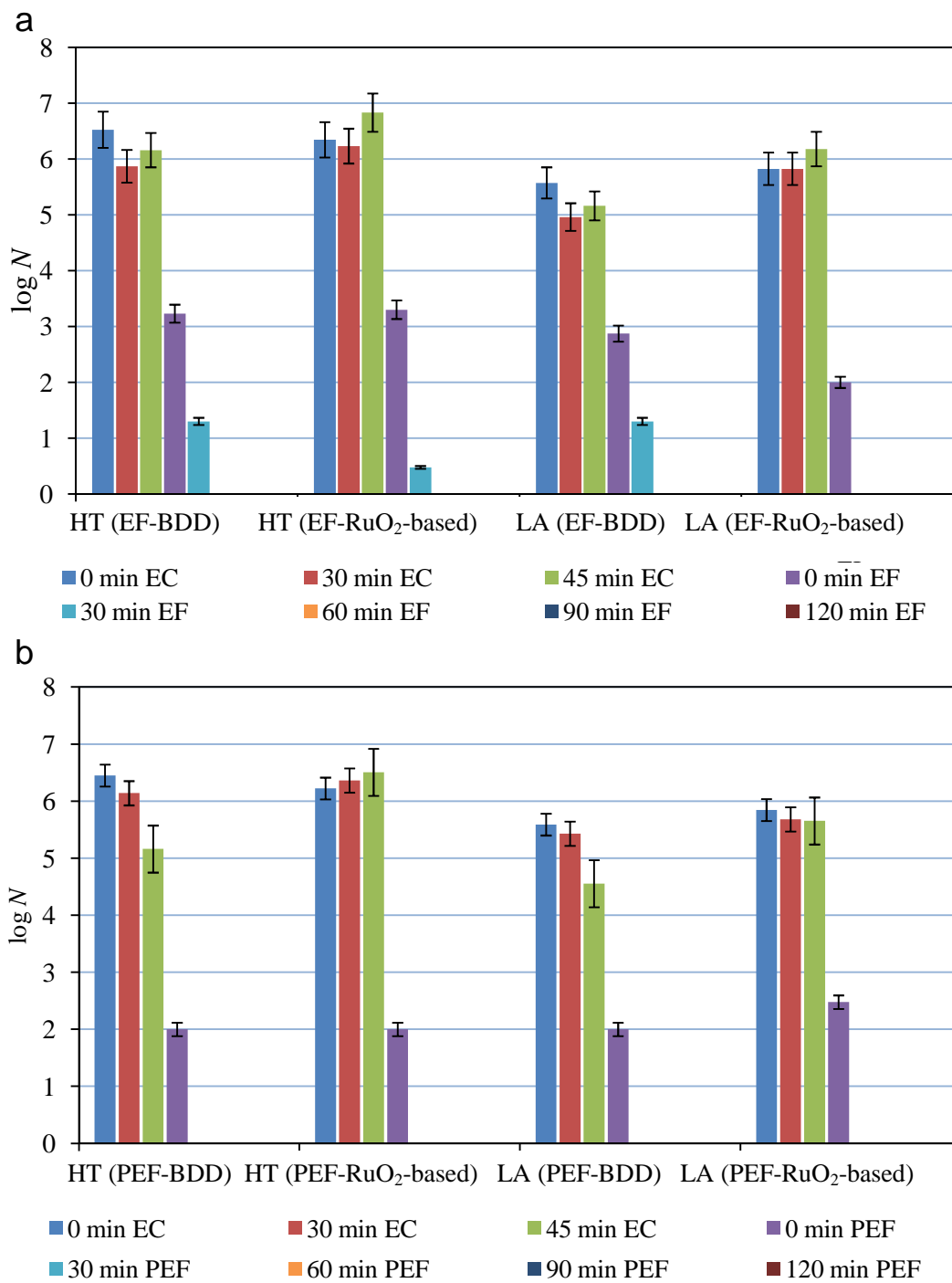


Fig. 4

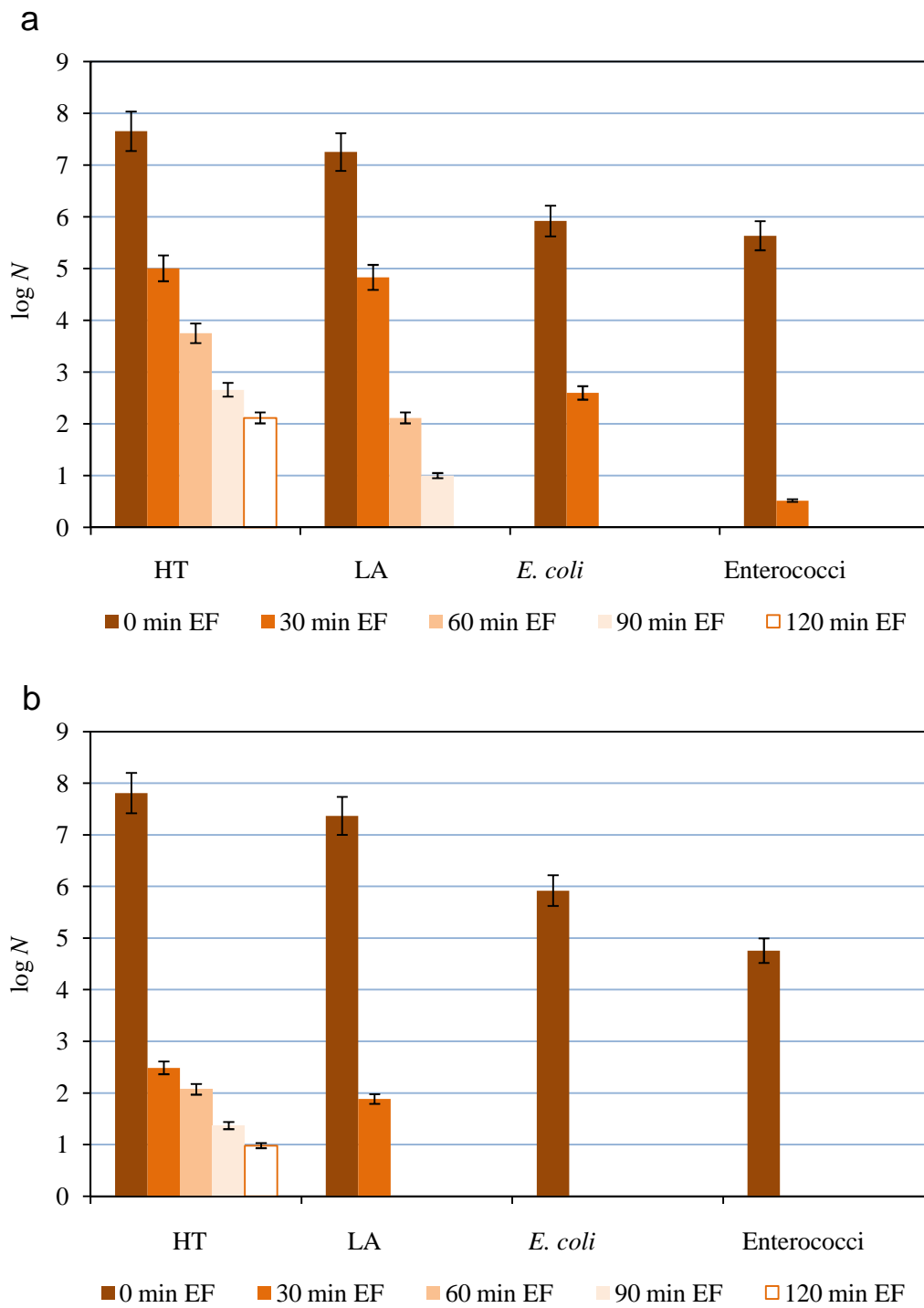


Fig. 5

5. Discussió global

Els Objectius de Desenvolupament Sostenible de les Nacions Unides (2015) tenen com a reptes i prioritats, d'ara i fins al 2030, millorar la qualitat de l'aigua mitjançant la reducció de la contaminació, eliminant els abocaments i minimitzant l'alliberament de productes químics i materials perillosos, reduint a la meitat el percentatge d'aigües residuals sense tractar i augmentant considerablement el reciclatge i la reutilització sense riscos a nivell mundial.

En aquesta línia, al febrer de 2018, el Ministeri d'Agricultura i Pesca, Alimentació i Medi Ambient (MAPAMA) ha publicat l'esborrany de l'estratègia espanyola d'economia circular que fixa un marc nacional que permet desplegar les mesures necessàries per afavorir que l'economia sigui circular i, per tant, plenament sostenible i competitiva en el marc internacional del 2030. El pla d'acció previst pel 2018-2020 compta amb cinc línies principals d'actuació: producció, consum, gestió de residus, matèries primeres secundàries i reutilització de l'aigua. Aquest primer pla d'acció inclou 70 actuacions identificades pels diferents departaments ministerials implicats i compta amb un pressupost de més de 836 milions d'euros dels quals el 57% es destinaran a la reutilització de l'aigua.

En els darrers anys, s'han estat desenvolupat tècniques electroquímiques per tractar aigües residuals urbanes i industrials, tot fent una gestió integral i un ús sostenible dels recursos hídrics. Per una banda, s'han fet nombrosos estudis que demostren que les diferents tècniques electroquímiques permeten eliminar del medi contaminants químics com per exemple; residus farmacèutics (Sirés i Brillas, 2012); paracetamol (Brillas *et al.*, 2005); ibuprofè (Ciriaco *et al.*, 2009); naproxè (Coria *et al.*, 2016); omeprazol (Cavalcanti *et al.*, 2013); ketoprofen (Feng *et al.*, 2014); sulfacloropiridazina (Haidar *et al.*, 2013); tints (El-Ghenymy *et al.*, 2014; Hamza *et al.*, 2009; Olvera-Vargas *et al.*, 2014; Thiam *et al.*, 2015 i 2016); àcid cloracètic (Scialdone *et al.*, 2014); alaclor (Pipi *et al.*, 2014). I per altra banda, la desinfecció mitjançant mètodes electroquímics també s'ha provat com a mètode de desinfecció en efluents de plantes de tractament d'aigües urbanes (Cotillas *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2010) i actualment és utilitzada com un nou mètode de desinfecció d'aigües de piscina i spas alhora que s'ha proposat per tractar aigües potables (Llanos *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2011), per prevenir la proliferació de *Legionella* en torres de refrigeració industrials i circuits d'aigua calenta sanitària (Furuta *et al.*, 2004; Kraft *et al.*, 2008) així com per desinfectar aigües sintètiques (Cotillas *et al.*, 2013, Drees *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2009; Kerwick *et al.*, 2005; Lacasa *et al.*, 2013; Nakajima *et al.*, 2004; Polcaro *et al.*, 2007; Rajab *et al.*, 2015).

Malgrat tot, també varem tenir en compte que, tot i que l'electro-oxidació s'utilitzava actualment en desinfecció de piscines i spas, en molts dels estudis de desinfecció microbiològica per testar els aparells no s'especificaven els ànodes utilitzats ni la seva superfície ja que es tracta d'aparells dels quals s'ha registrat la patent. Així mateix, molts dels treballs s'han portat a terme amb aigües sintètiques

i s'han centrat en l'estudi d' *E. coli*; no obstant, manquen estudis més complets sobre la inactivació de la microbiota de les aigües residuals.

El material dels elèctrodes utilitzats amb els diversos mètodes electroquímics, ha anat evolucionant a fi de trobar materials més eficients, i trobem molta diversitat d'elèctrodes utilitzats en els diferents experiments. El treball d'aquesta tesi, s'ha centrat en elèctrodes de Diamant Dopat en Bor (BDD) i amb els elèctrodes formats per òxids de ruteni o d'iridi que són els més utilitzats en els darrers anys per la seva eficiència en la producció de radicals hidroxil.

Els resultats que s'aporten amb aquest treball permeten aprofundir en la metodologia electroquímica molt eficaç per eliminar contaminants microbiològics i químics de l'aigua. Malgrat tot, s'haurà de tenir en compte el tipus de contaminant que hi ha a l'aigua per poder escollir el mètode i el temps més adequats per eliminar-lo. Alguns dels resultats que es troben a la bibliografia ja apunten a aquesta línia, com per exemple els estudis de Llanos *et al.*, 2017 que troba diferent eficiència dels tractaments segons la naturalesa de les matèries orgàniques naturals presents a les mostres o bé Cotillas *et al.*, 2013 que conclou que l'eficiència depèn de la concentració inicial dels bacteris a eliminar.

Un dels primers objectius de la tesi era provar l'efecte de l'electro-oxidació, amb un ànode de BDD, en la inactivació de bacteris, amb diferents parets cel·lulars i morfologia. Es van escollir cinc representants dels patògens bacterians trobats al medi aquàtic; dos bacteris Gram-negatius; *Escherichia coli* ATCC 10536 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, i tres Gram-positius; *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Les primeres proves, fetes amb aigua sintètica, van permetre controlar paràmetres com el pH, la conductivitat i la concentració inicial del bacteri amb la finalitat de poder observar l'efecte de l'electro-oxidació, en igualtat de condicions, en cadascuna de les soques. A aquest control dels paràmetres, s'hi afegia el fet de treballar amb elèctrodes d'una mateixa mida i d'un mateix fabricant per tal de poder comparar els resultats dels diferents experiments. D'aquesta manera, els resultats obtinguts eren atribuïbles, principalment, a les espècies oxigenades reactives generades pel sistema, essent una de les més importants, el radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) que és un dels agents de major poder oxidant que hi ha, fins i tot per sobre del clor.

L'aigua sintètica amb la que es va treballar, es va dopar amb cultius purs de diferents soques bacterianes tenint en compte tant la classificació de Gram (Gram-positives i Gram-negatives) com també la morfologia (cocs i bacils).

Els experiments es van portar a terme utilitzant Na_2SO_4 7mM com a electròlit perquè així no s'incorporaven ions clor al medi i era l'adequat per mantenir la

concentració osmòtica requerida pels bacteris sense afectar-los, alhora que conferia la conductivitat adequada al medi per portar a terme els experiments.

L'electro-oxidació, de l'aigua sintètica dopada amb els bacteris, amb un ànode de BDD a $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$ i en absència de clor va donar bons resultats d'inactivació en tots els bacteris, obtenint almenys 5 logaritmes de reducció (d'una concentració inicial de 10^6 ufc/mL) després d'un tractament de 60 minuts. Tenint en compte que en el medi no hi havia ions clor, les espècies oxigenades reactives eren les principals responsables d'aquesta inactivació. Aquests resultats estaven en consonància amb els obtinguts anteriorment per Heim *et al.* (2015) que aconseguia una reducció de 5 log d'*E.coli*, *P. aeruginosa* i *E. faecium*. En canvi, els resultats no eren tan eficients com els que obtenia Polcaro *et al.* (2007) que aconseguia una reducció de 3 ordres de magnitud d'*E. coli* després de 60 seg d'electro-oxidació amb BDD. Però, cal tenir en compte que en els resultats hi intervenen diversos factors com la superfície i el material dels elèctrodes, el voltatge, l'electròlit utilitzat i el volum de la mostra principalment, i que si aquests no coincidèixen, tampoc podem comparar els resultats totalment.

Tenint en compte que posteriorment, amb els experiments amb aigua residual, es volia utilitzar el tractament d'Electro-Fenton que té un òptim d'eficiència a $\text{pH} \approx 3$, es va treballar amb cadascun dels microorganismes en dos valors de pH; el pH propi de la dissolució de Na_2SO_4 7mM propera a un pH neutre i d'altra banda es va acidificar el medi fins a $\text{pH}=3$ que és l'òptim per a la reacció de Fenton. Això, va permetre comprovar que no hi havia diferències significatives amb els resultats obtinguts a ambdós pH, evidenciant que la inactivació dels bacteris es devia, principalment, a la generació "in situ" dels radicals hidroxil.

Un altre dels objectius que es van proposar va ser l'estudi de la cinètica d'inactivació dels bacteris utilitzats per tal de poder definir un model logístic. Les mostres d'aigua sintètica amb Na_2SO_4 7mM i a una concentració del bacteri de 10^6 ufc/mL es van sotmetre a un tractament d'electro-oxidació amb BDD i a $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$ per tal de poder dibuixar les seves corbes d'inactivació. Es va escollir el tractament d'electro-oxidació perquè així s'evitava haver d'incorporar ions Fe al medi com passava amb el tractament electro-Fenton. D'aquesta manera no s'incrementava el nombre de variables que podrien influir en els resultats obtinguts. Amb els resultats obtinguts es va poder observar que les formes bacil·lifformes es van veure més afectades que les formes cocoides. Això va permetre concloure que, la desinfecció electro-química amb BDD era més efectiva amb els bacils independentment de si eren gram negatius o gram positius, i en canvi, els més resistents eren els cocs. Concretament, dels cinc bacteris avaluats, els més resistents van ser els cocs gram-positius; *S. aureus* i *E. hirae*). Es van tenir en compte aquestes dues característiques perquè a la bibliografia constaven evidències que els bacteris Gram-negatius són més sensibles que els Gram-

positius als camps elèctrics polsats (Barsotti i Cheftel, 1999; Jeyamkondan *et al.*, 1999) i també altres autors com Machado *et al.* (2010) i Guillemes Peira (2014), apuntaven que en general, les cèl·lules grans tendeixen a ser més susceptibles a un camp elèctric que les petites i ovalades, la qual cosa podia justificar la major inactivació en bacils que en cocs. *B. atrophaeus* (dipositat originàriament com *Bacillus subtilis* var. *niger*) va resultar el més sensible dels cinc bacteris avaluats, però s'ha de tenir en compte que en els experiments es van utilitzar formes vegetatives i no espores tal i com trobem en la literatura publicada, és per això que els nostres resultats no es podien comparar ja que l'evidència amb espores de *B. atrophaeus* demostra que són formes resistents als tractaments de desinfecció (Yoon *et al.*, 2007). Tot i que en aquest cas no es van utilitzar espores, posteriorment, quan es van avaluar els resultats dels tractaments electroquímics amb aigua residual urbana si que es van tenir en compte les espores de *C. perfringens*.

Finalment, per confirmar els resultats obtinguts amb l'electro-oxidació, on s'observava la inactivació dels bacteris després de 60 minuts de tractament essent els bacteris amb formes bacil·lifformes els més afectats, es va procedir a preparar mostres dels bacteris per observar-les mitjançant microscòpia d'escombratge. Es van comparar les mostres inicials (abans del tractament) amb les mostres obtingudes després del tractament d'electro-oxidació, amb BDD i a $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$, per veure'n els efectes. Tal i com apunten Linley *et al.* (2012) i Droguí *et al.* (2001), al sotmetre els bacteris al tractament electroquímic es produeix una oxidació de les membranes bacterianes i posteriorment, els oxidants, reaccionen amb les proteïnes o bé són destruïdes per l'efecte del corrent elèctric. A més, els radicals hidroxil produeixen alteracions físiques, químiques i biològiques sobre la paret cel·lular afectant posteriorment les funcions vitals de la cèl·lula i causant-li la mort.

L'observació de les mostres abans del tractament i després de 45 minuts de tractament ens va permetre observar una transició des de cèl·lules amb morfologia estàndard cap a cèl·lules molt alterades, i amb presència de residus cel·lulars en el filtre després del tractament. Aquests resultats concordaven amb els obtinguts per Diao *et al.* (2004) que treballava amb *E. coli* i que també observava materials intracel·lulars fora de les cèl·lules bacterianes sotmeses a una desinfecció electroquímica amb DSA®.

En el cas dels bacteris gram negatius, s'observava una alteració més gran, que no pas els gram positius, segurament a causa de la seva estructura de paret cel·lular. Per tant, a l'efecte d'inactivació s'ha de tenir en compte l'oxidació produïda per les espècies oxigenades reactives, la diferent composició química de la paret bacteriana i les modificacions del potencial transmembrana després de l'aplicació del corrent elèctric.

També es va fer tinció de Life and Dead dels bacteris abans i després del tractament d'electro-oxidació. Com era d'esperar, abans del tractament tots els bacteris, en el microscopi de fluorescència, presentaven color verd corresponent al SYTO-8 (molècula capaç de penetrar en totes les cèl·lules siguin vives o mortes) i en canvi, després del tractament, tots presentaven color vermell degut a la tinció del iodur de Propidi (IP) que només pot travessar les membranes cel·lulars que han perdut la seva integritat (cèl·lules mortes o estressades).

Per poder concretar millor els efectes dels radicals hidroxils sobre la paret bacteriana, hauria estat bé poder fer talls longitudinals dels bacteris i poder-los observar també en el microscopi electrònic, i un pas més en l'anàlisi dels bacteris després del tractament electroquímic podria ser l'anàlisi del seu ADN mitjançant PCR, per saber si els radicals hidroxil arriben a afectar-lo ja que Nakajima *et al.* (2004) apunta que l'ADN no es degenera i que per tant, la seva activitat no estava completament inactivada. Així mateix, també seria interessant aplicar metodologies de PCR amb Propidi Monoazide (PAM), que penetra dins les cèl·lules amb membrana alterada intercalant-se en el ADN i inhibint la seva amplificació, per saber si queda alguna soca viable-no cultivable.

Els resultats obtinguts ens indiquen que el microorganisme indicador més apropiat pels processos d'electro-oxidació amb ànode de BDD i en les condicions exposades, no pot ser *E. coli* malgrat que aquest microorganisme s'ha usat sovint com a indicador de processos electroquímics. En els experiments portats a terme, tant *E. coli* com *P. aeruginosa* i *B. atrophaeus*, amb forma de bacil, s'inactivaven més ràpidament que els bacteris amb forma de coc. Per tant, tenint en compte que els bacteris més resistents van ser els cocs gram-positius, com *S. aureus* i *E. hirae*, s'hauria d'utilitzar algun d'aquests cocs gram-positius com a indicadors de procés per al tractament electro-oxidatiu amb BDD sense ions de clor al medi. Aquí, una vegada més queda palès que cal tenir en compte les condicions de cada experiment, perquè els resultats variaran en presència o absència de clor tal com ho demostren els resultats de Nakajima *et al.* (2004). En aquest cas, Nakajima treballa amb aigua sintètica, en presència de clor, dopada amb *P. aeruginosa*, *E. coli*, *L. pneumophila*, *S. aureus* o *B. subtilis* i aconsegueix una reducció de 6 log de *S. aureus* aplicant 30 mA durant 5 min i amb la generació de 30 ppm de clor lliure. En canvi, necessita aplicar 50 mA durant 30 minuts per aconseguir una reducció de 6 log d'espores de *B. subtilis*.

Els experiments descrits fins ara corresponen als presentats en el primer article del capítol 1. En tots els casos, es van fer en absència de clor per poder avaluar el poder desinfectant atribuïble principalment al radical hidroxil, la principal espècie oxigenada reactiva formada en els tractaments electroquímics. Alguns estudis, havien trobat que en els tractaments d'electròlisi amb ànodes convencionals, com Pt i RuO₂, només s'aconseguien bons resultats de desinfecció quan el líquid tractat

contenia ions clorur (Polcaro *et al.*, 2007). Això és degut a què amb l'oxidació de Cl^- es formen espècies de clor actiu (Cl_2 , HClO i / o ClO^-) que ataquen la cèl·lula bacteriana. Per contra, l'ànode de BDD produeix un $\bullet\text{OH}$ més actiu, perquè està menys adsorbit, més lliure, molt adequat per a aplicacions ambientals.

Per tant, l'ànode BDD és molt eficaç en absència d'ions clorur, evitant així l'acumulació de clor actiu i la possible formació de productes organoclorats tòxics, cloramines, ClO_3^- i ClO_4^- (Vacca *et al.*, 2013; Sirés *et al.*, 2014, Martínez-Huitle *et al.*, 2015). En la desinfecció electroquímica, s'espera que l' $\bullet\text{OH}$ tingui una major efectivitat en l'inactivació, si es compara amb el clor actiu, ja que la seva capacitat d'oxidació és molt més forta (Cong *et al.*, 2008). L'electròlit més idoni per estudiar els efectes dels $\bullet\text{OH}$ produïts amb BDD és Na_2SO_4 , perquè presenta la suficient conductivitat pel funcionament del sistema, manté un potencial osmòtic correcte per a la supervivència de les cèl·lules bacterianes i no té ions clorur. Els resultats que s'han obtingut en aquesta tesi, estan en concordança amb els que s'havien descrit anteriorment.

Però, tenint en compte que a les aigües residuals reals amb què es volia treballar més endavant ens trobaríem presència de clor i de matèria orgànica, es volia veure l'efecte que tenien en els resultats de desinfecció sota condicions controlades, en el segon article, del capítol 1, d'aquest treball es presenten les dades obtingudes en presència de NaCl , on la formació d'àcid hipoclorós (HClO) provoca una inactivació més ràpida dels bacteris i, en el nostre cas, la inactivació de *Pseudomonas aeruginosa*, en un medi on hi havia una concentració 1mM de NaCl , va passar a ser de menys de 30 min en presència de clor versus als gairebé 60 min necessaris per la inactivació quan no hi havia clor al medi. Els estudis fets per Rajab *et al.*, 2015, també obtenien una reducció de 6 log de *P. aeruginosa* en presència de 20 ppm de clor, però amb menys temps; 5 min. Cal aclarir que utilitzaven 167 mA cm^{-2} enfront als $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$ del nostre experiment i que ambdós elèctrodes eren de BDD quan en el nostre cas treballavem amb BDD/acer. Amb aquest seguit d'experiments es va demostrar que quanta més concentració de NaCl hi ha en el medi, més elevat era el rendiment del sistema de desinfecció ja que el temps d'inactivació del bacteri disminuïa a mesura que s'incrementava la concentració de NaCl en el medi. El millor rendiment es va obtenir en 7 mM Na_2SO_4 + 7 mM NaCl a $8,3 \text{ mA cm}^{-2}$, amb desinfecció completa de *Pseudomonas aeruginosa* en només 2 minuts i consum d'energia de $0,059 \text{ kW h m}^3$.

Les dades obtingudes amb *P. aeruginosa* i els ànodes productors de clor indicaven que la presència de clor en les aigües residuals afavoria la inactivació dels bacteris sotmesos a un tractament d'electro-oxidació com a conseqüència de les espècies oxidants generades, majoritàriament $\bullet\text{OH}$, i la formació d'espècies de clor actiu, principalment HClO . Es va treballar a densitats de corrent baixes per dos motius: per prioritzar els processos amb el mínim impacte perjudicial sobre el medi

ambient i perquè els processos poguessin treballar autònomament amb energies renovables.

Un altre objectiu era conèixer l'efecte de la presència de matèria orgànica al medi per veure com interfereix en la inactivació dels bacteris degut a una "competència" pels radicals hidroxils formats al medi, tal com passa quan s'utilitza el clor com a desinfectant. L'addició de paracetamol en el medi aquós va revelar la destrucció preferent d'aquest compost a partir de 27 mg L^{-1} utilitzant un ànode BDD, encara que la inactivació de *Pseudomonas aeruginosa* també es va elevar a causa de les quantitats gradualment més grans de subproductes tòxics. Amb l'ànode IrO_2 , l'adsorció cel·lular es va inhibir al principi de l'electròlisi, però la inactivació es va accelerar amb el pas del temps per la formació de subproductes tòxics.

Tot i que es podrien haver portat a terme altres experiments sobre la presència de matèria orgànica en el medi, es va optar per treballar directament en mostres residuals reals, tenint en compte que en aquestes mostres tant s'hi pot trobar matèria orgànica com altres productes que poden interferir, o no, en el procés electroquímic, i que segons el seu origen poden arribar a presentar una variabilitat de substàncies molt gran que s'haurà de tenir en compte en cada cas.

En l'apartat d'aigües sintètiques, el darrer objectiu va ser comparar l'eficiència dels elèctrodes més utilitzats en desinfecció; l'ànode de BDD i els ànodes dimensionalment estables com són el d'òxid de ruteni i el d'òxid d'iridi.

La soca de *P. aeruginosa* a una concentració de 10^6 ufc mL^{-1} en un medi aquós lliure de clor a pH 5,8 queda inactivada després d'un tractament d'electrooxidació. La inactivació es va aconseguir als 60 minuts de tractament amb un ànode BDD. El procés va ser molt més ràpid utilitzant ànodes dimensionalment estables ja que presenten major adsorció dels microorganismes a la seva superfície, aconseguint una inactivació completa als 30 minuts. Aquest resultat, no concordava amb els obtinguts per Cotillas *et al.* (2013) que per aconseguir eliminar *E. coli* d'una aigua residual necessitava menys densitat de corrent amb BDD que no pas amb DSA®. Així doncs, els nostres resultats podien semblar bastant inesperats perquè és ben sabut que l'elèctrode BDD és un ànode no actiu amb baixa capacitat d'adsorció que produeix quantitats molt més grans de ($\bullet\text{OH}$) en comparació amb els DSA® (Paniza *et al.*, 2009; Sirés *et al.*, 2014; Martínez-Huitle *et al.*, 2015). La potència bactericida superior dels ànodes DSA® es podia atribuir a una adsorció molt més gran de les cèl·lules a la seva superfície en comparació amb la que es produeix en BDD, afavorint l'atac de les espècies oxidants adsorbides sobre la seva estructura i, finalment, millorant la seva inactivació molt notablement.

En canvi, en presència de 1mM NaCl , ja era d'esperar que es requerís menys temps amb els ànodes dimensionalment estables, 5 min per a la inactivació completa de *P. aeruginosa*, que no pas amb els ànodes de BDD, amb els quals es requeria

d'entre 15 i 30 min. Aquests resultats sí que concorden amb els que es podien trobar a la bibliografia, com els obtinguts per Jeong *et al.* (2009) que establí una gradació dels elèctrodes segons la producció de clor actiu; $\text{IrO}_2 \cong \text{RuO}_2 > \text{BDD} > \text{Pt}$.

Aigua residual real

Una vegada portades a terme les anàlisis anteriors realitzades amb aigües sintètiques, es va procedir a treballar amb aigua residual real on, a més de determinar l'abundància de la biota inicial i la seva inactivació al llarg del procés assajat també es va fer seguiment de l'evolució del TOC, de la conductivitat i del pH amb el temps d'electròlisi. Es van escollir dos tipus d'aigua residual per aplicar-hi la tecnologia electroquímica: aigua residual urbana, procedent d'un efluent del primari i d'un efluent del secundari derivat d'un tractament biològic, i aigua residual procedent d'una indústria productora de formatge, els resultats estan recollits en els capítols 2 i 3 d'aquest treball.

Per poder establir l'eficàcia de la reducció de la microbiota present a les mostres, primer es va caracteritzar la presència de bacteris, virus i eucariotes, quantificant la concentració d'alguns dels seus representants com: els bacteris heteròtrofs, enterococs, *E. coli*, espores de *C. perfringens*, colifags somàtics i eucariotes. Com era d'esperar, la contaminació microbiana era superior en l'efluent del primari que en el del secundari.

L'objectiu d'aquesta part del treball era aplicar un procés seqüencial d'electrocoagulació i processos d'oxidació avançada ja que un estudi sobre la inactivació de la microbiota de les aigües residuals durant electrocoagulació i l'electro-Fenton amb càtode de difusió d'oxigen no s'havia descrit a la literatura. En aquest treball es proposa una metodologia combinada d'EC seguida d'EF on el H_2O_2 s'electrogena directament en el medi per la reducció bieletrònica de l' O_2 injectat al càtode de difusió d'oxigen. A la bibliografia, trobem evidència d'inactivació de coliformes presents en lixiviats mitjançant el mètode d'electro-fenton però afegint H_2O_2 a la mostra (Aziz *et al.*, 2013), en canvi, en el nostre cas, no fa falta perquè es va electrogenerar durant tot el procés i contribueix a la formació dels radicals hidroxil aconseguint la inactivació dels bacteris.

L'aplicació de l'electrocoagulació era el pas previ per aplicar el procés electroquímic d'oxidació avançada d'electro-Fenton, ja que aquest procés requereix de la presència d'ions de Fe en el medi per poder portar a terme les reaccions de Fenton. Per tant, es van fer tractaments seqüencials d'electrocoagulació seguits d'electro-Fenton.

Primerament es va aplicar un tractament d'electrocoagulació, amb elèctrodes Fe/Fe, a les mostres amb la finalitat de reduir la seva càrrega orgànica. En l'aigua

residual urbana es va obtenir una major inactivació dels bacteris en l'efluent primari que no pas en el secundari, probablement per la seva major quantitat de microbiota i la presència d'una major quantitat de matèria orgànica amb capacitat de coagulació i adsorció de microorganismes. Aquests resultats estan en concordança amb els obtinguts per Cotillas *et al.*, 2013 que conclouen que l'eficiència de l'EC dependrà de la concentració d'*E. coli* inicial i dels ions $\text{Cl}^-/\text{NH}_4^+$ presents al medi. També els estudis realitzats per Delaire *et al.*, 2016, que treballa amb l'electrocoagulació amb elèctrodes de Fe, conclouen que hi ha substàncies que afavoreixen/inhibeixen la formació de flocs durant l'electrocoagulació, independentment de la composició de la paret cel·lular dels bacteris, Gram – o Gram +.

Un dels desavantatges de l'EC era la formació de flocs i fangs on varem comprovar que contenien bacteris actius, i per tant, havien de seguir un procés de tractament d'aquest residu.

Aplicant directament el tractament d'electro-Fenton a pH 3,0, sense el pas previ d'electrocoagulació de la microbiota, la reducció dels bacteris heteròtrofs era de 3,62 i 3,97 log per a l'efluent primari i secundari respectivament. També es va trobar, en ambdós efluentes, una activació total de l'enterococ i dels colifags somàtics en menys de 10 minuts. En el cas d'*E. coli*, aquest era completament inactivat en ambdós efluentes als 30 min. l'efluent secundari, mentre que va persistir temps més llarg a la primària encara que ja era inactiu a 30 min. Com en el cas de l'electrocoagulació, els microorganismes més resistents van ser les espores de *C. perfringens*. Aquestes tendències, coincidèixen amb les descrites per Durán Moreno *et al.* (2004) per a la inactivació d'*E. coli* d'aigües residuals aplicant EF. Aquests mateixos experiments es van repetir però sense acidificar el medi. En aquest cas, tot i que el pH no era el més òptim per a la reacció de Fenton, el paper d'altres oxidants formats com H_2O_2 , BDD (OH), $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ i clor actiu eren suficients per aconseguir la inactivació dels microorganismes testats.

Finalment, es van portar a terme experiments combinant ambdós tractaments, electrocoagulació i electro-Fenton, sense acidificar el medi que va ser el tractament més eficaç per a la inactivació de la microbiota present a les aigües residuals urbanes perquè després de 30 min d'electrocoagulació seguits de 30 minuts d'electro-Fenton s'inactivaven els enterococs, *E. coli* i fins i tot les espores de *C. perfringens*. Els heteròtrofs, encara persistien després del tractament tal i com ja havíem observat quan aplicàvem l'electro-Fenton directament.

En tots els casos, comparar els resultats obtinguts amb els que consten a la literatura és difícil degut a la varietat de mètodes i a les diferents condicions amb les que ens podem trobar. Tot i així, els resultats d'eliminació d'*E. coli* estan en consonància amb altres que hi ha a la literatura, com per exemple els estudis de

Cotillas *et al.*, 2013 que treballa amb una cel·la on tenen lloc al mateix temps, processos d'electro-oxidació i electrocoagulació.

En resum, podem afirmar que tots els microorganismes queden afectats pels oxidants generats.

Pel què fa a la mostra d'aigua residual procedent de la indústria productora de formatge, s'ha de tenir en compte que, abans d'abocar-se al clavegueram, aquesta aigua residual ha de passar per algun tractament de reducció de la seva càrrega microbiològica i de matèria orgànica ja que de no fer-ho es podrien posar en perill el bon funcionament de les instal·lacions de sanejament públiques. En el nostre cas, l'anàlisi de la microbiota inicial de les mostres d'aigua residual va donar com a promig els següents resultats: $4,3 \times 10^6$ ufc/mL bacteris heteròtrofs (HT); $3,4 \times 10^5$ ufc/mL bacteris de l'àcid làctic (LA); $2,6 \times 10^5$ ufc/mL *E. coli*; $1,2 \times 10^6$ ufc/mL coliforms totals; $2,5 \times 10^2$ ufc/mL *Staphylococcus* i $1,8 \times 10^5$ ufc/mL de llevats i fongs.

El primer tractament aplicat va ser l'electrocoagulació. Aquest procés de separació de fases es va aplicar per reduir la matèria orgànica i per afegir ions de Fe al medi necessaris per aplicar posteriorment el tractament d'electro-Fenton o fotoelectro-Fenton. No obstant, degut a la presència de molècules com ara lactosa, glucosa i àcids grassos, l'electrocoagulació no va donar gaire bons resultats ja que els flòculs formats no eren prou consistents ni abundants. A més, l'anàlisi dels flòculs i dels fangs formats com a conseqüència de l'aplicació d'aquest tractament van evidenciar la presència de $3,2 \times 10^5$ ufc/mL d'heteròtrofs encara actius, per tant, la formació d'aquests fangs, va resultar un problema afegit en el tractament d'aquestes aigües ja que també calia un procediment per eliminar-los tal i com ja havia passat amb l'aigua residual urbana.

En l'aplicació seqüencial dels tractaments d'electrocoagulació seguits d'EF o FEF, una vegada retirats els flòculs i els fangs generats durant el primer pas d'electrocoagulació, es perdia part de la biota de la mostra. A més, l'acidificació del medi per afavorir la reacció de Fenton, també reduïa la microbiota que venia del tractament d'electrocoagulació. Per tant, la microbiota inicial, abans d'aplicar els processos d'oxidació avançada, EF o FEF, quedava reduïda a unes concentracions inicials d'entre 10^2 i 10^3 ufc/mL, les quals quedaven inactivades després de 60 minuts d'EF, o abans en el cas de FEF, independentment de si els ànodes utilitzats eren BDD o RuO₂. En aquests experiments és on es va observar una major reducció del TOC que arribava fins al 28 % quan l'ànode era de BDD i s'aplicava el tractament seqüencial d'electrocoagulació i fotoelectro-Fenton. Aquesta millora de l'eliminació de TOC en FEF pot ser explicada per l'acció oxidativa de la llum UV que pot fotolitzar alguns productes intermedis i fins i tot produir foto-excitació del clor actiu tal com van descriure Watts i Linden (2007).

El tractament d'EF amb ànode de BDD i càtode de difusió d'oxigen, amb acidificació del medi, realitzat després de 60 min d'electrocoagulació va demostrar

una inactivació total, de l'ordre de 3,3 log de bacteris de l'àcid làctic als 90 min. Pel que fa als bacteris heteròtrofs, als 60 min s'aconseguia la inactivació de 2,3 log i aquest valor es mantenia gairebé invariable fins als 120 min. D'altra banda, amb l'aplicació del tractament d'EF després de 30 min d'electrocoagulació sense acidificar el medi, amb els mateixos elèctrodes que en el cas anterior, es va obtenir una inactivació de l'ordre de 3 log tant dels bacteris de l'àcid làctic com dels heteròtrofs després de 60 min d'electro-Fenton. Els oxidants generats inclouen els $\bullet\text{OH}$ de la reacció de Fenton, els generats per l'ànode de BDD i finalment el clor actiu generat a partir dels ions clor presents a l'aigua, per tant, tot i que la reacció de Fenton no es porti a terme al seu pH òptim, es generen oxidants suficients al medi per inactivar la microbiota activa. A més, aquests resultats indicaven que no era necessari acidificar la mostra per afavorir la reacció de Fenton, per tant, això també facilitava que, una vegada tractada, la mostra es podia retornar al medi sense haver-la de neutralitzar, prioritzant una vegada més els processos amb el mínim impacte perjudicial sobre el medi ambient.

Malgrat tot, continuava vigent un dels aspectes negatius del procés que era la formació dels fangs en el pas previ de l'electrocoagulació. Per aquest motiu, es va testar directament l'EF a pH neutre, afegint 0,25 mM Fe^{2+} a la mostra. Els resultats d'inactivació van ser més ràpids amb l'ànode de RuO_2 que no pas amb el de BDD, degut a la major capacitat de formació de clor actiu per part de l'ànode DSA® tal i com s'havia observat en l'aigua sintètica. En les aigües sintètiques podíem mesurar la formació de clor lliure amb el mètode colorimètric N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) i un espectrofotòmetre a $\lambda=515$ nm, però en el cas de les aigües residuals reals, aquest mètode no va resultar eficient degut a la terbolesa inicial de les mostres, tot i que es generava clor.

Perspectives i aplicacions

Existeixen molts escenaris on es poden aplicar els tractaments electroquímics amb l'avantatge que no necessiten de grans infraestructures per instal·lar-los. Alguns dels exemples són:

- **Potabilització de l'aigua**
- **Manteniment d'aigua potable**
Actualment ja s'utilitza en piscines i spas, però en presència de clor perquè la normativa actual requereix de concentracions de clor lliure residual en el medi.
- **Aigües residuals industrials abans d'arribar a l'EDAR**
A banda de l'exemple de l'aigua residual de la indústria productora de formatges que hem treballat en aquesta tesi, hi ha abocaments que per definició són problemàtics, com per exemple els d'hospitals o escorxadors perquè poden presentar una elevada càrrega de microorganismes, molts d'ells

patògens, barrejats amb d'altres productes químics i també amb força presència de matèria orgànica. Per tant, ha de garantir-se un pretractament adequat o una depuració completa abans del seu abocament a la xarxa perquè no afectin al normal funcionament de les EDAR. A més, en el cas d'aigües residuals d'hospital també hi hem d'afegir la presència d'antibiòtics i de microorganismes que podrien incrementar els gens de resistència a antibiòtics.

- **Tractament secundari i terciari de l'EDAR**

Aplicació en indrets on hi ha poca disposició de sòl per construir-hi un tractament terciari de tipus llacunatge.

- **Altres**

Totes les proves fetes, en un futur, s'haurien d'extrapolar a una planta pre-pilot de 10 L i, posteriorment, aplicar energies renovables amb les quals els processos poguessin treballar autònomament.

Hem de tenir clar que moltes vegades s'està utilitzant aigua potable per a usos on no seria necessària aquesta puresa, per tant, sempre que sigui possible, s'ha de prioritzar la reutilització de l'aigua sempre que aquesta no estigui destinada al consum humà (beure, cuinar, preparar aliments, higiene personal, neteja de superfícies).

Per exemple, en torres de refrigeració es podria aplicar un tractament electroquímic en l'aigua de recirculació, tenint en compte que aquesta aigua va acumulant productes tòxics utilitzats com a desinfectants i que també pot esdevenir una font de propagació de *Legionella*. D'aquesta manera, es podria reduir la despesa d'aigua "nova".

Així mateix, hem de comptar amb tecnologies que ens permetin depurar l'aigua en qualsevol punt del seu cicle d'utilització i que aquesta neteja tingui en compte tant contaminants biològics com químics, alhora que l'aplicació del tractament no generi possibles "efectes secundaris" degut a la seva toxicitat, prioritzant els processos amb el mínim impacte perjudicial sobre el medi ambient.

6. Conclusions finals

- Els tractaments d'electro-oxidació utilitzant un ànode de BDD a una densitat de corrent constant de $33,3 \text{ mA cm}^{-2}$, aplicats a l'aigua sintètica, amb Na_2SO_4 7 mM, dopada amb 10^6 ufc/mL d'una de les cinc soques bacterianes estudiades; dues Gram-negatives (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i tres Gram-positives (*B. anthropaeus*, *S. aureus* i *E. hirae*) va reduir, un mínim, de 5 unitats logarítmiques cadascun dels bacteris de la solució en 60 min.
- Amb els resultats obtinguts es va establir un model logístic per descriure la cinètica d'inactivació de cadascun dels cinc bacteris estudiats. Els bacteris més sensibles al tractament d'electro-oxidació, van ser els bacils. Per contra, els més resistents van ser els cocs Gram-positius, *S. aureus* i *E. hirae*.
- D'acord amb els resultats obtinguts, els cocs Gram-positiu van esdevenir els indicadors més adients pel procés d'electro-oxidació amb BDD.
- L'observació de les cèl·lules bacterianes, amb microscòpia electrònica de rastreig, després del tractament mostrava una morfologia alterada, especialment en les Gram-negatives, amb presència de residus cel·lulars.
- El tractament d'electro-oxidació, amb diferents tipus d'ànodes, aplicat a *P. aeruginosa* va mostrar diferents temps d'inactivació: amb l'ànode de BDD es va aconseguir l'inactivació total als 60 min, i quan l'ànode utilitzat era de RuO_2 o IrO_2 la inactivació total s'aconseguia als 30 min.
- El tractament de *P. aeruginosa* en presència de NaCl va mostrar una inactivació més ràpida en tots els ànodes testats, degut a la producció d'espècies de clor actives, essent els més eficients els DSA[®], RuO_2 i IrO_2 , respecte als de BDD.
- La presència de paracetamol, a l'aigua va interferir en la inactivació de *P. aeruginosa*, sotmesa a electro-oxidació, tant amb BDD com amb IrO_2 .
- La inactivació de *P. aeruginosa*, amb BDD, va ser més efectiva quan la concentració de NaCl incrementava. El millor rendiment es va donar amb NaCl 7 mM a $8,3 \text{ mA cm}^{-2}$, amb una desinfecció completa en només 2 min i consum d'energia de $0,059 \text{ kW h m}^3$.

- Els tractaments electroquímics d'aigües residuals; d'origen urbà i d'una indústria productora de formatge, es van desenvolupar combinant l'electrocoagulació amb processos electroquímics d'oxidació avançada, els resultats obtinguts permeten considerar aquests tractaments adequats per a la depuració degut principalment a les espècies oxigenades reactives i al clor actiu generats.
- El tractament de l'aigua residual urbana, tant de l'efluent primari com del secundari, amb un procés d'electrocoagulació realitzat amb elèctrodes Fe / Fe a 200 mA durant 90 minuts, va mostrar que els colifags somàtics i els eucariotes eren els més sensibles i s'inactivaven després de 20 minuts de tractament, mentre que els bacteris heteròtrofs, *E. coli*, enterococci i *C. perfringens* van persistir al tractament.
- El tractament d'electro-Fenton amb ànode de BDD i càtode de difusió d'oxigen durant 30 min, tant a pH 3 com a pH 7, va reduir la microbiota present entre 3 i 4 log tant a l'aigua procedent de l'efluent primari com del secundari.
- L'aplicació seqüencial del tractament d'electrocoagulació seguit d'electro-Fenton, durant 30 minuts cadascun, va ser el tractament més eficaç per a la inactivació de la microbiota present a les aigües residuals urbanes.
- En l'aigua residual de la producció de formatge, l'electrocoagulació amb Fe/Fe a 200 mA va ser poc eficient en la disminució del TOC i en la inactivació dels bacteris. Els flocs, on hi havia els microorganismes adsorbits alguns d'ells encara actius, es podien separar en forma de fang.
- Amb el tractament EF amb elèctrodes BDD/difusió d'oxigen a la mostra d'aigua residual industrial d'una indústria productora de formatge, s'obté una inactivació completa dels bacteris làctics (120 min), *E. coli* i enterococs (60 min). El temps de tractament es redueix a la meitat quan els ànodes són RuO₂. No obstant, els bacteris heteròtrofs persisteixen després de 120 min independentment de l'ànode utilitzat.
- En l'aigua residual industrial d'una indústria productora de formatge, l'aplicació d'un tractament d'EC durant 45 min seguit d'un PEOAs, EF o FEF, durant 120 min a pH 3,0, amb ànodes BDD o RuO₂ i càtode de difusió d'oxigen, va aconseguir inactivar 7 log els bacteris heteròtrofs i 5 log els bacteris de l'àcid làctic. El tractament seqüencial EC + FEF va ser el més efectiu.

7. Bibliografia

- ACA. 2000. Sistemes de depuració natural d'aigües residuals urbanes: depuradores verdes. Agència Catalana de l'Aigua. Departament de Medi Ambient. Dip. Legal B-14762-2000
- Agulló-Barceló M, Oliva F, Lucena F. 2013. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (7), 4448-4454.
- Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R. 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and Hepatitis E viruses in the environment and in a drinking water treatment plant. *Environmental Science & Technology*, 40 (23), 7416-7422
- Anglada A, Urtiaga A, Ortiz I. 2009. Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: fundamentals and review of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84 (12), 1747-1755.
- Arias C, Sala MR, Domínguez A, Bartolomé R, Benavente A, Veciana P, Pedrol A, Hoyo G and the Outbreak Working Group. 2006. Waterborne epidemic outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis in Santa Maria de Palautordera, Catalonia, Spain. *Epidemiology and Infection*, 134; 598-604.
- Ashbolt NJ, Grabow, WOK, Snozzi M. 2001. Indicators of microbial water quality. In Fewtrell L, Bartram J (Eds.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health: Assessment of Risk and Risk Management for Water-related Infectious Disease*. TJ International (Ltd), Padstow, Cornwall, UK (Chapter 13).
- Aziz HA, Othman OM, Amr SSA. 2013. The performance of electro-Fenton oxidation in the removal of coliform bacteria from landfill leachate. *Waste Management*, 33, 396-400.
- Balannec B, Vourch M, Rabiller-Baudry M, Chaufer B. 2005. Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration. *Separation and Purification Technology*, 42, 195-200.
- Barrera-Díaz CE, Roa-Morales G, Balderas Hernández P, Fernandez-Marchante PM, Rodrigo MA. 2014. Enhanced electrocoagulation: new approaches to improve the electrochemical process. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, 4 (4), 285-296.
- Barsotti L, Cheftel JC. 1999. Food processing by pulsed electric fields.II. Biological aspects. *Food Reviews International*, 15 (2), 181-213.
- Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, Cornejo T, Pinto RM, Blosch A. 2017. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 23 (9), 1531-1534.

- Brillas E, Sirés I, Arias C, Cabot PLI, Centellas F, Rodríguez RM, Garrido JA. 2005. Mineralization of paracetamol in aqueous médium by anodic oxidation with a boron-doped diamond electrode. *Chemosphere*, 58, 399-406.
- Brillas E, Sirés I, Oturan MA. 2009. Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry. *Chemical Reviews*, 109, 6570-6631.
- Brillas E, Martínez-Huitle CA. 2015. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166-167, 603-643.
- Cano A, Cañizares P, Barrera C, Sáez C, Rodrigo MA. 2011. Use of low current densities in electrolyses with conductive-diamond electrochemical – Oxidation to disinfect treated wastewaters for reuse. *Electrochemistry Communications*, 13, 1268-1270.
- Cañizares P, Hernández M, Rodrigo MA, Saez C, Barrera CE, Roa G. 2009. Electrooxidation of brown-colored molasses wastewater. Effect of the electrolyte salt on the process efficiency. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (3), 1298-1301.
- Carter MJ. 2005. Enterically infectin viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6), 1354-80.
- Cavalcanti EB, García-Segura S, Centellas F, Brillas E. 2013. Electrochemical incineration of omeprazole in neutral aqueous médium using a platinum or boron-doped diamond. Degradation kinetics and oxidation products. *Water Research*, 47, 1803-1815.
- Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM, Katila M, Etienne J. 2015. Effect of common drinking water disinfectants chlorine and heat, on free legionella and amoebae-associated legionella. *PLoS One* 10 (8), e0134726.
- Ciríaco L, Anjo C, Correia J, Pacheco MJ, Lopes A. 2009. Electrochemical degradation of ibuprofeno on Ti/Pt/PbO₂ and Si/BDD electrodes. *Electrochimica Acta*, 54 (5), 1464-1472.
- Ciruela P, Hernández S, Nuez A, Jané M. 2017. Anàlisi dels microorganismes declarats al sistema de notificació microbiològica de Catalunya els anys 2014-2015. *Butlletí Microbiològic de Catalunya*. Volum 34, 56-66. Març 2017.
- Cong Y, Wu Z, Li Y. 2008. Electrochemical inactivation of coliforms by in-situ generated hydroxyl radicals. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25 (4), 727-731.

- Coria G, Sirés I, Brillas E, Nava JI. 2016. Influence of the anode material on the degradation of naproxen by Fenton-based electrochemical processes. *Chemical Engineering Journal*, 304, 817-825.
- Costán-Longares A, Mocé-Llivina L, Avellón A, Jofre J, Lucena F. 2008. Occurrence and distribution of culturable enteroviruses in wastewater and surface waters of north-eastern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6), 1945-1955.
- Cotillas S, Llanos J, Cañizares P, Mateo S, Rodrigo MA. 2013. Optimization of an integrated electrodisinfection/electrocoagulation process with Al bipolar electrodes for urban wastewater reclamation. *Water Research*, 47 (5), 1741-1750.
- Daghrir R, Drogui P. 2013. Coupled electrocoagulation-electro-Fenton for efficient domestic wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, 11 (2), 151-156.
- Delaire C, van Genuchten CM, Amrose SE, Gadgil AJ. 2016. Bacteria attenuation by iron electrocoagulation governed by interactions between bacterial phosphate groups and Fe (III) precipitates. *Water Research*, 103, 74-82.
- Diao HF, Li XY, Gu JD, Shi HC, Xie ZM. 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochemistry*, 39 (11), 1421-1426.
- Drees KP, Abbaszadegan M, Maier RM. 2003. Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage. *Water Research*, 37 (10), 2291-2300.
- Drogui P, Elmaleh S, Rumeau M, Bernard C, Rambaud A. 2001. Oxidising and disinfecting by hydrogen peroxide produced in a two-electrode cell. *Water Research*, 35 (13), 3235-3241.
- El-Ghenymy A, Oturan N, Oturan MA, Garrido JA, Cabot PL, Centellas F, Rodríguez RM, Brillas E. 2013. Comparative electro-Fenton and UVA photoelectro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide using a stirred BDD/air-diffusion tank reactor. *Chemical Engineering Journal*, 234, 115-123.
- El-Ghenymy A, Centellas F, Garrido JA, Rodríguez RM, Sirés I, Cabot PJ, Brillas E. 2014. Decolorization and mineralization of Orange G azo dye solutions by anodic oxidation with a boron-doped diamond anode in divided and undivided tank reactors. *Electrochimica Acta*, 130, 568-576.
- El-Ghenymy A, Centellas F, Rodríguez RM, Cabot PL, Garrido JA, Sirés I, Brillas E. 2015. Comparative use of anodic oxidation, electro-Fenton and photoelectro-Fenton with Pt or boron-doped diamond anode to decolorize

- and mineralize Malachite Green oxalate dye. *Electrochimica Acta*, 182, 247-256.
- Feng I, Oturan N, Van Hullebusch ED, Esposito G, Oturan MA. 2014. Degradation of anti-inflammatory drug ketoprofen by electro-oxidation: comparison of electro-Fenton and anodic oxidation processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 8406-8416.
- Fernandez-Cassi X, Silvera C, Cervero-Aragó S, Rusiñol M, Latif-Eugeni F, Bruguera-Casamada C, Civit S, Araujo RM, Figueras MJ, Girones R, Bofill-Mas S. 2016. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (16), 16816-16833.
- Figueras MJ, Borrego JJ. 2010. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7 (12), 4179-4202.
- Fong TT, Lipp EF. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (2), 357-371.
- Furuta T, Tanaka H, Nishiki Y, Pupunat I, Haenni W, Rychen P. 2004. *Legionella* inactivation with diamond electrodes. *Diamond and Related Materials*, 13, 2016-2019.
- Galmes A, Nicolau A, Arbona G. 2003. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Euro Surveill*, 7.
- García-García A, Martínez-Miranda V, Martínez-Cienfuegos IG, Almazán-Sánchez PT, Castañeda-Juárez M, Linares-Hernández I. 2015. Industrial wastewater treatment by electrocoagulation-electrooxidation processes powered by solar cells. *Fuel*, 149, 46-54.
- García-Segura S, Garrido JA, Rodríguez RM, Cabot PL, Centellas F, Arias C, Brillas E. 2012. Mineralization of flumequine in acidic medium by electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes. *Water Research*, 46, 2067-2076.
- Generalitat de Catalunya. Departament de territori i sostenibilitat. 2016. Informe anual de medi ambient a Catalunya. Informe 2015. ISSN Internet: 2013-6412
- Generalitat de Catalunya. Departament de territori i sostenibilitat. 2017 Disponible a: <http://mediambient.gencat.cat/ca/detalls/Noticies/27062017-poster-aigua-elemen-vulnerable-cc-00001> [accés 22 abril 2018]

- Ghernaout D i Ghernaout B. 2010. From chemical disinfection to electrodisinfection: the obligatory itinerary? *Desalination and Water Treatment*. 16 (1-3), 156-175.
- Ghernaout D, Ghernaout B. 2012. Sweep flocculation as a second from of charge neutralization – a review. *Desalination and Water Treatment*. 44 (1-3), 15-28.
- Ghernaout D. 2013. Advanced oxidation phenomena in electrocoagulation process: a myth or a reality? *Desalination and Water Treatment*. 51 (40-42), 7536-7554.
- Guillemes Peira A. 2014. Aplicación de la oxidación avanzada en la desinfección de aguas residuales. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 35 (3), 60-72.
- Haidar M, Dirany A, Sirés I, Oturan N, Oturan MA. 2013. Electrochemical degradation of the antibiotic sulfachloropyridazine by hydroxyl radicals generated at a BDD anode. *Chemosphere*, 91, 1304-1309.
- Hamza M, Abdelhedi R, Brillas E, Sirés I. 2009. Comparative electrochemical degradation of the triphenylmethane dye Methyl Violet with boron-doped diamond and Pt anodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 627 (1-2), 41-50.
- Heim C, Ureña de Vivanco M, Rajab M, Müller E, Letzel T, Helmreich B. 2015. Rapid inactivation of waterborne bacteria using boron-doped diamond electrodes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12 (10), 3061-3070.
- Hunsberger JF. 1977. Standard reduction potentials, in : Weast, RC (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Ohio. 58th Ed., D141-D144.
- Jagger J. 1967. *Introduction to research in ultraviolet photobiology*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- Jelic A, Gros M, Ginebreda A, Cespedes-Sánchez R, Ventura F, Petrovic M, Barcelo D. 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45:1165–1176.
- Jeong J, Kim C, Yoon J. 2009. The effect of electrode material on the generation of oxidants and microbial inactivation in the electrochemical disinfection processes. *Water Research*, 43, 895-901.
- Jeyamkondan S, Jayas DS, Holley RA. 1999. Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection* , 62 (9), 1088-1096.

- Kerwick MI, Reddy SM, Chamberlain AHL, Holt DM. 2005. Electrochemical disinfection, an environmentally acceptable method of drinking water disinfection? *Electrochimica Acta*, 50 (25-26), 5270-5277.
- Kobyas M, Senturk E, Bayramoglu M. 2006. Treatment of poultry slaughterhouse wastewaters by electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, 133, 172-176.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000. A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36, 1202-1211.
- Kraft A. 2008. Electrochemical water disinfection: a short review. *Platinum Metals Review*, 52 (3), 177-185.
- Lacasa E, Tsolaki E, Sbokou Z, Rodrigo MA, Mantzavinos D, Diamadopoulos E. 2013. Electrochemical disinfection of simulated ballast water on conductive diamond electrodes. *Chemical Engineering Journal*, 223, 516-523.
- Lee N, Chan MCW, Wong B, Choi KW, Sin W, Lui G, Chan PKS, Lai RWM, Cockram CS, Sung JJY, Leung WK. 2007. Fecal Viral Concentration and Diarrhea in Norovirus Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1399-1401.
- LeChevallier MW i Au K-K. 2004. Water treatment and pathogen control. Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. Llibre publicat per World Health Organization (WHO).
- Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (7), 1589-1596.
- Llanos J, Cotillas S, Cañizares P, Rodrigo MA. 2017. Electrocoagulation as a key technique in the integrated urban water cycle – a case study in the centre of Spain. *Urban Water Journal*, 14 (6), 650-654.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochni J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, Jul, 21; 331(3):161-7.
- Machado LF, Pereira RN, Martins RC, Teixeira JA, Vicente AA. 2010. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. *Journal of Food Engineering*, 96 (4), 520-527.

- Martínez-Huitle CA. 2007. Conductive diamond electrodes for water purification. *Materials Research*, 10 (4), 419-424.
- Martínez-Huitle CA, Brillas E. 2008. Electrochemical alternative for drinking water disinfection. *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (11), 1998-2005.
- Martínez-Huitle CA, Rodrigo MA, Sirés I, Scialdone O. 2015. Single and coupled electrochemical processes and reactors for the abatement of organic water pollutants: a critical review. *Chemical Reviews*, 115 (24), 13362-13407.
- McDonnell G, Denver Russell A. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 12; 147-179.
- Montemayor M, Costan A, Lucena F, Jofre J, Muñoz J, Dalmau E, Mujeriego R, Sala L. 2008. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Science and Technology*, 57 (6), 935-940.
- Moreira FC, Boaventura RAR, Brillas E, Vilar VJP. 2017. Electrochemical advanced oxidation processes: a review on their application to synthetic and real wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental*, 202, 217- 261.
- Nakajima N, Nakano T, Harada F, Taniguchi H, Yokoyama I, Hirose J, Daikoku E, Sano K. 2004. Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis. *Journal of Microbiological Methods*, 57 (2), 163-173.
- Norton CD, LeChevallier MW, Falkinham JO. 2004. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Research*, 38 (6), 1457-1466.
- Olvera-Vargas H, Oturan N, Aravindakumar CT, Sunil Paul MM, Sharma VK, Oturan MA. 2014. Electro-oxidation of the dye azure B: kinetics, mechanisms, and by-products. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 8379-8386.
- OMS. 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Volume 3 Wastewater and excreta use in aquaculture. Disponible a: file:///C:/Users/Usuari/AppData/Local/Temp/9241546840_eng.pdf
- OMS 2016. Planificación de la seguridad del saneamiento: manual para el uso y la disposición seguros de aguas residuales, aguas grises y excretas. Disponible a: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250331/9789243549248-spa.pdf;jsessionid=3F8302E9B3D837C16CE8FE50523639F1?sequence=1>
- OMS I UNICEF. 2017. Progresos en materia de agua potable, saneamiento e higiene: informe de actualización de 2017 y línea de base de los ODS. [Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF); 2017. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0

- IGO. Disponible a: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260291/9789243512891-spa.pdf;jsessionid=523BC0EE18DE987D68A7137EC54BF085?sequence=1>
- OMS. 2017. Enfermedades diarreicas – Disponible a: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> dades de 2 de maig de 2017.
- Panizza M, Cerisola G. 2009. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chemical Reviews*, 109, 6541-6569.
- Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 561-570.
- Payment P, Locas A. 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49 (1), 4-11.
- Pérez G, Gómez P, Ibañez R, Ortiz I, Urtiaga AM. 2010. Electrochemical disinfection of secondary wastewater treatment plant (WWTP) effluent. *Water Science and Technology*, 62, 892-897.
- Pipi ARF, De Andrade A, Brillas E, Sirés I. 2014. Total removal of alachlor from water by electrochemical processes. *Separation and Purification Technology*, 132, 674-683.
- Polcaro AM, Vacca A, Mascia M, Palmas S, Pompei R, Laconi S. 2007. Characterization of a stirred tank electrochemical cell for water disinfection processes. *Electrochimica Acta*, 52 (7), 2595-2602.
- PSARI. 2003. Programa de Sanejament de les Aigües Residuals Industrials. Agència Catalana de l'Aigua. Departament de Medi Ambient. Generalitat de Catalunya. Disponible a: https://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/planificacio/psari/psari2003_090703.pdf
- Rajab M, Heim C, Letzel T, Drewes JE, Helmreich B. 2015. Electrochemical disinfection using boron-doped diamond electrode-The synergetic effects of in situ ozone and free chlorine generation. *Chemosphere* 121, 47-53.
- Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, Wathen JB, Snyder BD, Pitt JL, Perez-Hurtado P, Dobbins LL, Brooks BW, Chambliss CK. 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in fish tissues: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology Chem*, 28, 2587-2597.
- Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. 2015. *Pathogens*, 4 (2), 307-334.
- Rodrigo MA, Cañizares P, Sánchez-Carretero A, Sáez C. 2010. Use of conductive-diamond electrochemical oxidation for wastewater treatment. *Catalysis Today*, 151 (1-2), 173-177.

- Rodríguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Barceló D, Balcázar JL. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-242.
- Scialdone O, Corrado E, Galia A, Sirés I. 2014. Electrochemical processes in macro and microfluidic cells for the abatement of chloroacetic acid from water. *Electrochimica Acta*, 132, 15-24.
- Sirés I. 2006. Electrochemical advanced oxidation processes for the removal of the drugs paracetamol, clofibric acid and chlorophene from waters. *Tesi doctoral*.
- Sirés I, Brillas E. 2012. Remediation of wáter pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. *Environment International*, 40, 212-229.
- Sirés I, Brillas, E, Oturan MA, Rodrigo MA, Panizza M. 2014. Electrochemical advanced oxidation processes: today and tomorrow. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (14), 8336- 8367.
- Souza BS, Dantas RF, Agulló-Barceló M, Lucena F, Sans C, Esplugas S, Dezotti M. 2013. Evaluation of UV/H₂O₂ for the disinfection and treatment of municipal secondary effluents for water reuse. *Journal of Chemical Technoly and Biotechnology*, 88 (9), 1697-1706.
- Steter JR, Brillas E, Sirés I. 2016. On the selection of the anode material for the electrochemical removal of methylparaben from different aqueous media. *Electrochimica Acta*, 222, 1464-1474.
- Thiam A, Zhou M, Brillas E, Sirés I. 2014. Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes. *Applied Catalysis B: Environmental*, 150-151, 116-125.
- Thiam A, Brillas E, Centellas F, Cabot PL, Sirés I. 2015. Electrochemical reactivity of Ponceau 4R (food additive E124) in different electrolytes and batch cells. *Electrochimica Acta*, 173, 523-533.
- Thiam A, Brillas E, Garrido JA, Rodríguez RM, Sirés I. 2016. Routes for the electrochemical degradation of the artificial food azo-colour Ponceau 4R by advanced oxidation processes. *Applied Catalysis B: Environmental*, 180, 227-236.
- Thompson B, Adelsbach T, Brown C, Hunt J, Kuwabara J, Neale J, Ohlendorf H, Schwarzbach S, Spies R, Taberski K. 2007. Biological effects of anthropogenic contaminants in the San Francisco Estuary. *Environmental Research* 105, 156–174.

- USEPA. 1999. Guidance Manual. Alternative Disinfectantes and Oxidants, Office of Water, EPA 815-R-99-014, abril (1999).
- Vacca A, Mascia M, Palmas S, Mais L, Rizzardini S. 2013. On the formation of bromate and chlorate ions during electrolysis with boron doped diamond anode for seawater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88 (12), 2244-2251.
- Valero D, Ortiz JM, García V, Exposito E, Montiel V, Aldaz A. 2011. Electrocoagulation of wastewater from almond industry. *Chemosphere*, 84, 1290-1295.
- Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L. 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41, 1001-1012.
- Walsh FC. 2001. Electrochemical technology for environmental treatment and clean energy conversion. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1819-1837.
- Watts MJ, Linden KG. 2007. Chlorine photolysis and subsequent OH radical production during UV treatment of chlorinated water. *Water Research*, 41, 2871-2878.
- Yao Y, Kubota Y, Murakami T, Ochiai T, Ishiguro H, Nakata K, Fujishima A. 2011. Electrochemical inactivation kinetics of boron-doped diamond electrode on waterborne pathogens. *Journal of Water and Health*, 9 (3), 534-543.
- Yoon KY, Byeon JH, Park JH, Hwang J. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373 (2), 572-575.

Annex 1

Mesura del Carboni Orgànic Total (TOC)

Pel seguiment de la mineralització (conversió de la matèria orgànica inicial en CO_2 , H_2O i ions orgànics) es fa seguiment de la desaparició del Carboni Orgànic Total, perquè la interpretació de les corbes obtingudes permet avaluar la capacitat transformadora dels diferents processos d'oxidació aplicats.

La mesura del TOC és més adient que la mesura del COD o el BOD perquè la mesura no dependrà de l'estat d'oxidació en què es trobi el carboni.

El seu funcionament es basa en la combustió de les mostres en presència d'un catalitzador de platí suportat sobre boles d'alúmina que es troba en un forn de quars en forma de tub. La combustió ($680\text{ }^\circ\text{C}$) produeix vapor d'aigua, sals i CO_2 . Es fa passar el gas CO_2 humit per un deshumidificador i, posteriorment se n'analitza la quantitat de CO_2 mitjançant un detector d'infraroig no dispersiu. Aquest senyal genera un pic en l'aparell i en calcula la seva àrea, que és proporcional a la concentració de carboni.

En els experiments duts a terme a $\text{pH} > 6$ la mostra s'ha acidificat prèviament amb una gota d'una dissolució d'àcid sulfúric, perquè el pH de la mostra disminueixi fins a un pH àcid. D'aquesta manera, els carbonats i hidrogencarbonats passen a trobar-se com a CO_2 dissolt. En aquest cas, l'aparell es programa en mode NPOC, en el qual la mostra es purga amb aire d'elevada puresa, produint-se el despreniment del CO_2 . En aquest cas, a diferència de l'anterior, el CO_2 no es fa passar pel detector sinó que s'elimina cap a l'atmosfera, de manera que resta en dissolució el carboni orgànic i per tant, el NPOC ens donarà directament el valor de TOC de la mostra.

Annex 2

Altres publicacions

A continuació es detallen, per ordre cronològic, altres publicacions i treballs no inclosos en aquesta tesi però realitzats per la doctoranda.

Short Report

Molecular Polymorphism of the ABO Blood Group: A Study in Poland, Spain, and Andorra

MIRIAM UMBRIA,¹ JORDI CANTONS,¹ CARMINA BRUGUERA,¹ ALINA MINIAS,^{1,2,3} CHANTAL BACKES DE DURÓ,⁴ GIULIO CATALANO,^{1,5} CRISTINA SANTOS,¹ RAMON NOGUÉS,¹ AND MARIA PILAR ALUJA^{1,6}¹Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain²Department of Genetics of Microorganisms, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90–131, Lodz, Poland³Institute of Medical Biology, 92–328, Lodz, Poland⁴Hospital de Nostra Senyora de Meritxell, Escaldes-Engordany 08022, Andorra⁵Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità, Università di Palermo, 90133, Palermo, Italy

Objectives: The main goal of this study is to increase knowledge on the molecular level of the ABO blood group system in Europe by providing data for Poland, Spain, and Andorra populations.

Methods: A total of 172 oral scrapings samples from individuals of Polish origin, 108 peripheral blood samples of autochthonous individuals from the province of Zamora (Spain), and 81 peripheral blood samples from individuals with Andorran origin, were analyzed. Molecular characterization of the allelic variants was performed by the analysis of exons 6 and 7 of the ABO gene.

Results: Seven common alleles were identified, namely: *A101*, *A102*, *A201*, *B101*, *O01*, *O02*, and *O03*. Less common variants (*O05*, *O09*, *O21*, *O26*, *O06*, *O11*, and *O12*), were also detected.

Conclusions: The results obtained contribute to the knowledge of the molecular European ABO map, and are discussed in regard to the allelic frequency reported by other Caucasian and Asian populations. *Am. J. Hum. Biol.* 26:556–558, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Since its discovery, the ABO blood group system has become the most important human blood system in medical applications, such as transfusion and transplantations. ABO has been associated with several diseases and, in the last few years, a protective role of blood group O in relation to cardiovascular diseases has also been reported (Reilly et al., 2011).

The human ABO locus is located on chromosome 9 (34.1–q34.2) and spans 18–20 kb. It consists of seven exons, ranging in size from 28 to 688 bp, and six introns with 554–12,982 bp. The molecular variation in the ABO gene gives rise to different transferases. Exons 6 and 7, which comprise 823 of 1,062 bp of the transcribed mRNA, encode 77% of the protein and 91% of the catalytic active part of transferases (Yamamoto et al., 1995).

At the serological level, a large number of population studies have been reported by Mourant et al. (1976) and Tills et al. (1983) as well as by Aluja et al. (1993), Alcobé (1946), and Gronkiewicz (1996). At the molecular level, there are differences in allelic frequencies among different ethnic groups; however, their incidence is not known, except for selected populations (Ogasawara et al., 1996).

Our main goal is to increase knowledge on the molecular level of the ABO blood group system in Europe, providing data for Poland, Spain, and Andorra populations, and to situate these populations in their historic-geographical context.

MATERIAL AND METHODS

Samples

A total of 172 oral scrapings samples from individuals of Polish origin, 108 peripheral blood samples of autochthonous individuals from the province of Zamora (Spain), and 81 peripheral blood samples from individuals with Andorran origin, were analyzed. Population ancestry was verified

to the third generation. Sampling was performed following the Helsinki protocol, with the informed consent of each individual.

DNA extraction, PCR amplification, and molecular characterization

Poland, Zamora (Spain), and Andorra DNA extraction was performed using Jetquick Blood & Cell Culture DNA Spin (Genomed), according to the manufacturer's instructions. For Andorra samples, DNA was extracted using phenol-chloroform-iso-amyl method (Sambrook et al., 1989).

Polymerase Chain Reaction (PCR) specific primers for the amplification of exons 6 and 7 were [ABO 6 F₂₅₂ (5'-CAT GTG GGT GGC ACC CTG CCA-3'), R₂₅₂ (5'-CAC TCG CCA CTG CCT GGG TCT C-3')] and ABO 7 F₈₄₈ (5'-CCG TCC GCC TGC CTT GCA GAT-3'), R₈₄₈ (5'-TTG AGG TGG GGA CGG GGC CTA G-3'). Amplification products were visualized by electrophoresis in agarose gels (2%). PCR products were purified using JETQUICK PCR Purification Spin 250 (Genomed), according to the manufacturer's instruction.

Exon 7 was analyzed by automated sequencing. Sequence reaction was carried out using the sequencing

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: Generalitat de Catalunya; Contract grant number: SGR 2009-566.

*Correspondence to: Maria Pilar Aluja, Unitat d'Antropologia Biològica, Dep. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Biociències, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain. E-mail: mariapilar.aluja@uab.es

Received 5 November 2013; Revision received 20 February 2014; Accepted 9 March 2014

DOI: 10.1002/ajhb.22544

Published online 27 March 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Assessment of total bacterial cells in extended aeration activated sludge plants using flow cytometry as a microbial monitoring tool

Tarik Abzazou¹ · Humbert Salvadó² · Carmina Bruguera-Casamada¹ · Pedro Simón³ · Carlos Lardín³ · Rosa M Araujo¹

Received: 28 October 2014 / Accepted: 12 March 2015 / Published online: 28 March 2015
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The extended aeration activated sludge (EAAS) process is one of the most applied biological processes in small towns. Here, we study the abundance and viability of total bacterial cells in two wastewater treatment plants (WWTPs) operating with an EAAS process. We use flow cytometry (FCM) combined with SYTO13 and propidium iodide (PI) dyes as a rapid, easy, reliable and accurate microbial monitoring tool. A disaggregation procedure with an ultrasonic bath was designed to detach total bacterial cells from activated sludge flocs for subsequent FCM analysis. This procedure permitted the recovery of total bacterial cells from sludge flocs without affecting bacterial viability, as indicated by bacterial strain controls. Since FCM is a multi-parameter technique, it was possible to determine total bacterial abundance and their viability in the activated sludge. As a comparative method, epifluorescence microscopy was also used to quantify total bacterial cells; both methods produced similar

results. The FCM analysis revealed relative microbial stability in both the WWTPs. The total bacterial abundance quantified by FCM in the two plants studied was $1.02\text{--}6.23 \times 10^{11}$ cells L^{-1} with 70–72 % viability, one logarithm less than that reported in the literature for WWTPs using the conventional activated sludge process. This can be explained by the difference in the operational parameters between the conventional plant and EAAS, mainly the organic loading rate.

Keywords Extended aeration activated sludge · Total bacterial cells · Bacterial viability · Disaggregation procedure · Flow cytometry

Nomenclature

FCM	Flow cytometry
WWTP	Wastewater treatment plant
EAAS	Extended aeration activated sludge
F/M	Food to microorganisms
BOD ₅	5-day biochemical oxygen demand
MLSS	Mixed liquor suspended solids
EPS	Extracellular polymeric substances
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
PI	Propidium iodide
V/V	Volume/volume
EM	Epifluorescence microscopy
ANOVA	Analysis of variance
COD	Chemical oxygen demand
HRT	Hydraulic retention time
Max	Maximum value
Min	Minimum value
SD	Standard deviation
χ^2	Chi-square

Responsible editor: Gerard Thouand

✉ Rosa M Araujo
 raraujo@ub.edu
 Tarik Abzazou
 tabzazou@ub.edu

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

² Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

³ ESAMUR (Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales), C. Madre Paula Gil Cano s/n, Ed. Torre Jemeca P. 9^a, 30009 Murcia, Spain



RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system

X. Fernandez-Cassi¹ · C. Silvera² · S. Cervero-Aragó^{1,3,4} · M. Rusñol¹ · F. Latif-Eugeni² · C. Bruguera-Casamada¹ · S. Civit⁵ · R. M. Araujo¹ · M. J. Figueras² · R. Girones¹ · S. Bofill-Mas¹

Received: 7 January 2016 / Accepted: 2 May 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The use of lagooning as a complementary natural method of treating secondary effluents of wastewater treatment plants has been employed as an affordable and easy means of producing reclaimed water. However, using reclaimed water for some purposes, for example, for food irrigation, presents some risks if the effluents contain microbial pathogens. Classical bacterial indicators that are used to assess faecal contamination in water do not always properly indicate the presence of bacterial or viral pathogens. In the current study, the presence of faecal indicator bacteria (FIB), heterotrophic bacterial counts (HBC), pathogens and opportunistic pathogens, such as *Legionella* spp., *Aeromonas* spp., *Arcobacter* spp., free-living amoeba (FLA), several viral indicators (human adenovirus and polyomavirus JC) and viral pathogens (noroviruses and hepatitis E virus) were analysed for 1 year in inlet and outlet water to assess the removal

efficiency of a lagooning system. We observed 2.58 (1.17–4.59) and 1.65 (0.15–3.14) log reductions in *Escherichia coli* (EC) and intestinal enterococci (IE), respectively, between the inlet and outlet samples. Genomic copies of the viruses were log reduced by 1.18 (0.24–2.93), 0.64 (0.12–1.97), 0.45 (0.04–2.54) and 0.72 (0.22–2.50) for human adenovirus (HAdV), JC polyomavirus (JCPyV) and human noroviruses (NoV GI and GII), respectively. No regrowth of opportunistic pathogens was observed within the system. FLA, detected in all samples, did not show a clear trend. The reduction of faecal pathogens was irregular with 6 out of 12 samples and 4 out of 12 samples exceeding the EC and IE values, specified in the Spanish legislation for reclaimed water (RD 1620/2007). This data evidences that there is a need for more studies to evaluate the removal mechanisms of lagooning systems in order to optimize pathogen reduction. Moreover, surveillance of water used to irrigate raw edible vegetables should be conducted to ensure the fulfilment of the microbial requirements for the production of safe reclaimed water.

Responsible editor: Robert Duran

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-6812-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ X. Fernandez-Cassi
xaviako@gmail.com

Keywords Lagooning · Bacterial removal · Virus removal · Regrowth · Reclaimed water · Faecal indicator bacteria · Human adenovirus

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

³ Water Hygiene, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁴ ICC Water and Health, Vienna, Austria

⁵ Department of Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Introduction

Water scarcity is a major problem worldwide, with an estimated 2.7 million people living close to river basins that are affected by severe water need (Oki and Kanae 2006; Hoekstra et al. 2012). The United Nations estimates that the world population will reach 9 billion in approximately 2050 and that water availability will therefore decrease. Current projections indicate that there will be a 55 % increase in water demand between 2000 and 2050 (Gurría 2012). It is clear that reducing



Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

journal homepage: www.elsevier.com

Photoelectrocatalytic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using an Ag-decorated TiO₂ photoanodeRuth Belinda Domínguez-Espíndola^a, Carmina Bruguera-Casamada^b, Susana Silva-Martínez^{c,*}, Rosa María Araujo^b, Enric Brillas^d, Ignasi Sirés^{d,*}^a Department of Chemistry, Curtin University, Bentley, Western Australia 6102, Australia^b Sec. Microbiologia, Virologia i Biotecnologia, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain^c Centro de Investigaciones en Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico^d Laboratori d'Electroquímica dels Materials i del Medi Ambient, Departament de Química Física, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacillus atrophaceus
Bacterial inactivation
Photoelectrocatalysis
Pseudomonas aeruginosa
Water disinfection

ABSTRACT

Fast and total inactivation of Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* in suspensions at natural pH 5.9 has been achieved by photoelectrocatalysis (PEC), using Ag-decorated TiO₂ photoanodes onto transparent conducting indium tin oxide (ITO) under UVA irradiation. The assays were made with 100 mL of bacterial suspensions in an undivided cell equipped with a photoanode, a stainless steel cathode and Ag|AgCl (3 M KCl) as reference electrode. Total inactivation was obtained in only 5 min using coatings with 4 wt.% Ag, 25 mM Na₂SO₄ as the electrolyte and 1.70 V as applied bias potential. Comparative photocatalytic treatments reached total inactivation at much longer time, suggesting the crucial role of hydroxyl radicals in PEC. These oxidants, which were detected by electron spin resonance, attacked the outer cell wall very effectively, since the recombination of the electron/hole pairs photoinduced under UVA irradiation was reduced. As characterized by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), the best synthesized Ag-TiO₂ thin-film photoanode mainly contains anatase TiO₂ nanopowder decorated with Ag nanoparticles of ca. 45 nm. Analyses by X-ray powder diffraction and UV/Vis spectroscopy were also performed. The potential use of PEC for bacterial disinfection was confirmed for the rod-shaped Gram-positive *Bacillus atrophaceus*, which was more slowly inactivated due to its different cell wall structure. Scanning electron micrographs of both bacteria showed that PEC induced a high roughness, cell lysis and accumulation of cellular debris.

1. Introduction

Recently developed electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) like electrochemical oxidation (EO), electro-Fenton, UV- or solar-assisted photoelectro-Fenton and photoelectrocatalysis (PEC) have shown their great potential for water decontamination and disinfection [1–7]. The destruction of suspended or attached biofilms of pathogenic bacteria is a crucial need in drinking water production, swimming pools, washing in food processing, water distribution or ballast water management [8]. Ozone, chlorine dioxide and chlorine are typically utilized for water disinfection. However, they can yield hazardous products, including haloacetic acids and trihalomethanes [1]. To overcome these drawbacks, non-toxic antibacterial nanostructures have

been proposed [9,10]. EAOPs also represent an alternative for bacterial inactivation, since they are eco-friendly methods based on the generation of reactive oxygen species (ROS) like the hydroxyl radical ([•]OH), which is able to react with cell membrane components causing lysis and the death of bacteria [1,11,12].

PEC is electrochemically-assisted photocatalysis (PC) [13]. PC consists in the photoexcitation of an electron from the valence band (VB) of a semiconductor to the conduction band (CB, e⁻_{CB}), with production of a positively charged vacancy or hole (h⁺_{VB}) from reaction (1) [13–17]. The photogenerated holes can oxidize organic molecules or react with water to form the [•]OH via reaction (2). The photoinduced electrons can produce other ROS like superoxide radical anion (O₂^{•-}), hydroperoxyl radical (HO₂[•]) and H₂O₂ from reactions (3)–(6).

* Corresponding authors.

Email addresses: ssilva@uam.mx (S. Silva-Martínez); i.sires@ub.edu (I. Sirés)

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.005>

Received 4 April 2018; Received in revised form 2 May 2018; Accepted 4 May 2018

Available online xxx

1383-5866/© 2018.

Efficacy of heat treatment to inactivate *Paenibacillus larvae* spores in the processing of beeswax foundation

C. Bruquera¹, J. Cambra², R. Araujo¹

⁽¹⁾ Department of Microbiology, ⁽²⁾ Department of Plant Biology, Universitat de Barcelona, Catalunya.

Introduction

American foulbrood (AFB) is an infectious disease that affects the larvae or pupae stage of the honey bee. The infection can be transmitted to larvae by feeding activity of nurse bees or by spores remaining at the base of a larval cell. The spores of *Paenibacillus larvae* can survive in products such as honey, wax or dry larval scales and in the environment for 2 to 10 years and as purified spores even more than 70 years. In order to reduce the risk of AFB disease transmission, caused by the bacteria *P. larvae*, inactivation of the spores from bee products is a necessity.

Beeswax is the material that bees produce for making their combs and its is usually recovered by beekeepers in order to produce new comb foundations. In the wax purification process the wax should remain for longer time in a water bath at a temperature of 75-90°C (usually overnight).

The objective of this study is to know the effectiveness temperature applied during the beeswax comb foundation process to eliminate or inactivate *P. larvae* spores. With this objective the effect of different heat treatments on spores inactivation was examined.



Isolate and identification of *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae and spores from a honey bee brood comb

Isolation of the strain

Paenibacillus larvae strains isolated from diseased larvae until obtain pure culture.



Microscope pictures were taken using "Digital microscope camera SPS_pia"

Presumptive identification

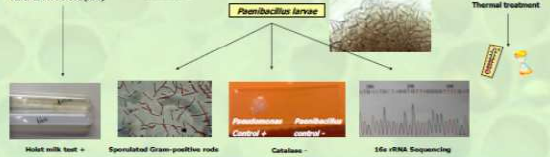
Rod Gram + positive

Production of spores

Catalase test -

Holst milk test +

Identification by sequencing 16s rRNA gene



Material and Methods

Culture

The bacteria were cultured on Brain Heart Infusion Agar (BHI) supplemented with 1mg/l of thiamine chloride at 37°C for 48 h.

Holst milk test

This test detect the production of high levels of proteolytic enzymes produced by sporulating *Paenibacillus larvae*. Suspending a suspect sample of a diseased larva in a test tube of glass vial containing 3 ml of 1% powdered skim milk in water. Incubated at 37°C. If AFB is present, the suspension should clear in 10 to 20 minutes.

Identification by sequencing

The 16s rRNA nucleotide sequencing was performed at Microgen. There was analyzed the total sequence and the 1.515 pb resulted were compared with 16s rRNA nucleotide sequences available by the BLAST search. We confirmed *Paenibacillus larvae*. GenBank ref. DQ079622.1

Production of spores

After that the plates were incubated 15 days at 37°C we add 2ml of Ringer 1% and a suspension containing 10^8 spores/ml of *Paenibacillus larvae* in Ringer 1% was obtained. After a heat shock (80°C, 10 min) the spore concentration was determined by plating a serial dilution (10^1 to 10^7) on BHI agar with 1mg/l of thiamine chlorhydrate. The number of colony forming units (CFU) was determined after 48 h incubation at 37°C. The stock spore suspension was stored at 4°C until used.

Thermal treatment

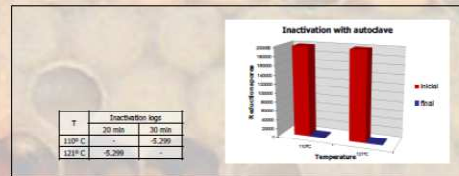
A suspension containing spores around 10^8 per ml of *Paenibacillus larvae* was subjected to different temperatures and times within a water bath or autoclave. After the treatment, samples were diluted and cultured by duplicate on BHI Agar with thiamine chlorhydrate plates. Plates were incubated for a period of 3 days at 37°C.

Statistics

Inactivation was measured by reduction of culturability in BHI agar with 1mg/l of thiamine chlorhydrate for 48 h at 37°C. Culturability inactivation was calculated as \log_{10} units (log %/%) where N_0 is the value of a/c from spores activities at 80°C during 30 min and N_t is the value at the time indicated.

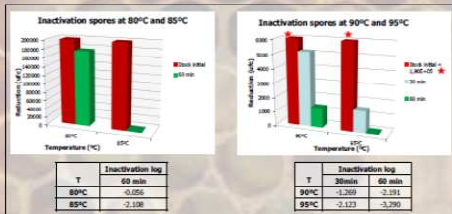
Inactivation of *Paenibacillus larvae* spores at 110°C and 121°C

P. larvae spores were totally inactivated by autoclaving at 121°C for 20 min and at 110°C for 30 min. too.



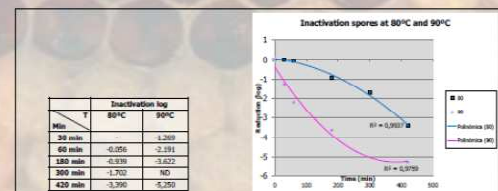
Inactivation of *Paenibacillus larvae* spores at different temperatures: 80°C, 85°C, 90°C and 95°C

Inactivation spores of *Paenibacillus larvae* in Ringer 1% at different temperatures and times was tested. The suspensions treated at 80°C, 85°C, 90°C and 95°C for 60 or 30 min showed spores inactivation from -0,05 logs at 80°C for 60 min up to -2,12 at 95°C for 30 min.



Inactivation Kinetics of *Paenibacillus larvae* spores at 80°C and 90°C for 12 h.

Spore inactivation kinetics of *Paenibacillus larvae* in Ringer 1% at 80°C and 90°C for 7 hours was studied. Data showed that spores inactivation was faster at higher temperature, 90°C. Preliminary results show a total reduction of culturability above 420 min (7h) at 90°C.



Discussion & Conclusions

- It was isolated a strain of a sporulated bacillus Gram-positive with a distinctive colony morphology of a beehive with symptoms of American foulbrood (AFB). The identification by biochemical tests and the complete sequence of the 16s rRNA confirmed the isolation of *Paenibacillus larvae*.
- Disinfection with autoclave either at 121°C for 20 min, and at 110°C for 30 min, was effective against spores.
- The heat treatment at 80°C, 85°C, 90°C or 95°C during 30 or 60 min showed a reduction of the spores which increased with the temperature and time, from -0,05 logs at 80°C for 60 min up to -2,1 logs at 95°C for 30 min. These data showed that to significantly reduce the spores, which may be present in the wax, the exposition to temperatures of 80° or 90°C should be longer.
- In consequence it was studied the spore inactivation kinetics at 80°C and at 90°C. The preliminary data showed two inactivation models. At 80°C it can be appreciated a first order polynomial model characterized by an initial shoulder followed a linear decrease in spore viability. At 90°C the inactivation was much more effective from the beginning and a reduction of -5,250 logs was obtained.
- These results must be considered preliminary, since the inactivation of *Paenibacillus larvae* spores has been done with a Ringer suspension, and they may have a different inactivation pattern during the melting industrial beeswax foundation production.

References

- O.C. de Graaf, A.M. Alpgi, M. Brown et al., "Diagnosis of American Foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols", Letters in Applied Microbiology 23:59 (2006).
- Fongren, E., Stevanovic, J. and Fries, I., "Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes", International Microbiology 2:25 (2008).
- American Foulbrood of honey bees. CEE Reference Laboratories for bee diseases.

