



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE FOTOCÁTALISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2 Y PROCESO
FENTON PARA EL CONTROL DE *Salmonella* spp EN AGUAS GENERADAS EN
PLANTAS DE BENEFICIO AVÍCOLA**

Tesis presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias
Biológicas

Por:

ANGY HERNÁNDEZ MOLANO

Bacterióloga

Bajo la tutoría de:

AURA MARINA PEDROZA RODRÍGUEZ, Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.

ANA KARINA CARRASCAL CAMACHO, Bacterióloga, M.Sc.

Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI).

CARLOS ENRIQUE DAZA VELASCO, Químico Ph.D.

Línea de Físicoquímica de Materiales, Grupo de Fitoquímica.

Bogotá, Junio de 2012

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

EVALUACIÓN DE FOTOCÁTALISIS HETEROGÉNEA CON TiO_2 Y PROCESO FENTON PARA EL CONTROL DE *Salmonella* spp EN AGUAS GENERADAS EN PLANTAS DE BENEFICIO AVÍCOLA

ANGY HERNANDEZ MOLANO

Dra. Aura Marina Pedroza PhD.
Directora

Dr. Ana Karina Carrascal M.Sc.
Codirector 1

Dr. Carlos Enrique Daza PhD.
Codirector 2

EVALUACIÓN DE FOTOCÁTALISIS HETEROGÉNEA CON TiO₂ Y PROCESO FENTON PARA EL CONTROL DE *Salmonella* spp EN AGUAS GENERADAS EN PLANTAS DE BENEFICIO AVÍCOLA

ANGY HERNANDEZ MOLANO

Dra. Ingrid Schuler PhD
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dr. Manuel Antonio Franco MD PhD
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias

*A mis padres por su amor y apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida,
por los valores morales inculcados que me han formado como ser humano, a mi
hermana Camila por ser el mejor regalo que me pudieron haber dado mis padres
y por su necesaria y contagiosa alegría.*

Agradecimientos

A mi mami por inculcarme la dedicación y entrega en cada labor que realizo, por su amor y apoyo incondicional.

A la Doctora Aura Marina Pedroza, directora del Laboratorio de Microbiología Ambiental y suelos por vincularme al grupo de investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) y aportarme con la mejor disposición sus valiosas enseñanzas académicas e investigativas, por apoyarme incondicionalmente en el transcurso de la maestría.

A la Doctora Ana Karina Carrascal, Directora del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, por los aportes tan importantes en las asesorías brindadas, por su colaboración durante el proceso para la realización de la investigación.

Al Doctor Carlos Daza de la línea de fisicoquímica de materiales del Grupo de Investigación en Fitoquímica del Departamento de Química por recibirme en su laboratorio y por sus importantes aportes en la realización de experimentos y correcciones al documento.

A Johanna Moncada por la participación y colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos por sus amistad y apoyo.

A mi familia y amigos por la fortaleza y entendimiento que me brindaron durante el proceso.

Al proyecto *“Aprovechamiento de la biomasa residual de la rosa colombiana para la obtención de carbón activado y su potencial uso en la eliminación de níquel en medio acuoso diluido”* código 12010U00401200, auspiciado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana el cual apoyó con material, reactivos y equipos para la evaluación del proceso Fenton del presente trabajo.

Al grupo de investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) por el apoyo con recursos propios de las unidades académicas.

TABLA DE CONTENIDO

1 Alcances y definición del problema de investigación	16
2. Marco teórico	19
2.1 Salmonella	19
2.1.1 Trasmisión de Salmonella	20
2.1.2 Patogénesis	21
2.2 Proceso de beneficio avícola y riesgo biológico	22
2.3 Desinfectantes en la industria avícola	24
2.3.1 Hipoclorito de sodio	25
2.3.2 Ácido peracético	26
2.4 Semiconductores	27
2.5 Características del Dióxido de titanio (TiO ₂)	28
2.6 Procesos de oxidación avanzada	29
2.6.1 Proceso Fotoquímico: Fotocatálisis	29
2.6.2 Elaboración de películas de TiO ₂ por la técnica sol-gel	30
2.6.3 Modificación de las películas de TiO ₂	31
2.6.4 Factores que afectan el proceso fotocatalítico	32
2.6.5 Inactivación bacteriana	34
2.6.6 Proceso no fotoquímico: Proceso Fenton homogéneo	35
2.7.1 Factores que influyen en proceso Fenton homogéneo	36
2.7.2 Inactivación bacteriana proceso Fenton homogéneo	37
3. Objetivos e hipótesis	38
3.1 Objetivos	38
3.1.1 Objetivo General	38
3.1.2 Objetivos específicos	38
3.2 Hipótesis	38
4. Metodología	39
4.1 Etapa preliminar: Caracterización y manejo de la cepa de referencia	39
4.1.1 Origen de las cepas:	39
4.1.2 Preservación de cepas:	40
4.1.3 Curvas de crecimiento	40
4.1.4 Descripción y caracterización de las muestras de agua objeto de estudio	41

4.1.5 Caracterización de las muestras.....	41
4.2 Etapa I: Selección de condiciones para los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton	42
4.2.1 Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO ₂)	42
4.2.2 Obtención y caracterización de las películas de TiO ₂ y CuO/ TiO ₂	42
4.2.3 Obtención de películas de TiO ₂	42
4.2.4 Elaboración de las películas de CuO/TiO ₂	43
4.2.5 Caracterización física de las películas de TiO ₂ y CuO/ TiO ₂	43
•Microscopia Electrónica de barrido (MEB)	43
•Difracción de rayos X (DRX)	44
•Microscopia de fuerza atómica (MFA)	44
4.2.6 Selección de los factores que afectan el proceso fotocatalítico empleando un diseño experimental Plackett-Burman	44
4.2.7 Curvas de inactivación fotocatalítica bajo las condiciones seleccionadas en el diseño de Plackett-Burman	48
4.2.8 Determinación de las constantes de inactivación fotocatalítica	49
4.2.9 Proceso Fenton homogéneo Fe ⁺² /H ₂ O ₂	49
4.2.14 Diseño experimental Plackett-Burman para Proceso Fenton homogéneo	50
4.2.10 Factorial 2 ³ para proceso Fenton	52
4.2.11 Características del reactor de proceso Fenton y montaje de los tratamientos para el diseño factorial 2 ³	53
4.2.12 Curvas de inactivación para proceso Fenton homogéneo	54
4.2.13 Determinación de las constantes de inactivación de proceso Fenton	54
4.3 Etapa II: Comparación de los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton con tratamientos químicos con ácido peracético e hipoclorito de sodio	55
4.3.1 Selección de condiciones para las curvas de inactivación	55
4.3.2 Curvas de inactivación para hipoclorito de sodio y ácido peracético	55
4.3.3 Determinación de las constantes de inactivación de desinfectantes	56
4.4.4 Comparación de los procesos de oxidación con desinfectantes	56
4.5 Etapa III: Pruebas de tratabilidad con fotocátalisis y proceso Fenton de aguas provenientes del beneficio avícola	56
5. Resultados y discusiones	58
5.1 Etapa preliminar	58
5.1.1 Curvas de crecimiento para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i>	58

5.1.2 Caracterización de agua de salida del proceso chiller:	60
5.2 Etapa I: Selección de condiciones para los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton	61
5.2.1 Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO ₂)	61
5.2.2 Obtención y caracterización de las películas de TiO ₂ y CuO/TiO ₂	61
• <i>Microscopia electrónica de barrido (MEB)</i>	62
• <i>Espectros EDS: composición química</i>	65
• <i>Difracción de rayos X (DRX)</i>	66
• <i>Microscopia de fuerza atómica (MFA)</i>	67
5.2.3 Diseño experimental Plackett-Burman para fotocátalisis	68
5.2.4 Curvas de inactivación para fotocátalisis con CuO/TiO ₂	73
5.2.5 Proceso Fenton	77
5.2.6 Plackett-Burman para proceso Fenton homogéneo	77
5.2.7 Diseño factorial 2 ³ de proceso Fenton homogéneo	80
5.2.8 Curvas de inactivación de proceso Fenton homogéneo	83
5.3 Etapa II: Comparación de los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton con tratamientos químicos con ácido peracético e hipoclorito de sodio.	85
5.3.1 Curvas de inactivación desinfección química:	85
5.3.2 Comparación de los procesos de oxidación avanzada contra desinfección química.....	88
5.4 Etapa III: Pruebas de tratabilidad con fotocátalisis y proceso Fenton en aguas provenientes del beneficio avícola	90
5.4.1 Caracterización muestras de salida del proceso chiller:	91
5.4.2 Caracterización muestra residual del proceso de beneficio:	92
7. Conclusiones	97
8. Recomendaciones	98
9. Bibliografía	99
10. ANEXOS	112
Anexo 1. Curvas de inactivación de hipoclorito de sodio	112
Anexo 2. Curvas de inactivación de ácido peracético	113
Anexo 3. Valores predichos y observados Plackett-Burman	115
Anexo 4. Figuras para la comprobación de supuesto diseños experimentales	115
Anexo 5. Figuras para la comprobación de supuesto diseños experimentales	116
Anexo 6. Valores predichos y observados Plackett-Burman	118

Anexo 7. Figuras para la comprobación de supuesto	118
Anexo 8. Factorial 2^3 para Fenton a escala de reactor	119
Anexo 9. Productos científicos generados de la tesis de Maestría	120

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de procesos de oxidación avanzada. Adaptada de la referencia (12).	29
Tabla 2. Caracterización de agua: Pruebas físicas, químicas y microbiológicas.	41
Tabla 3. Factores evaluados para el Plackett Burman de fotocatalisis.	45
Tabla 4. Combinación de los factores a evaluar para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> .	46
Tabla 5. Factores evaluados para el Plackett-Burman de proceso Fenton.	50
Tabla 6. Combinación de los factores a evaluar para <i>S. Typhimurium</i> .	51
Tabla 7. Factores y niveles evaluados en el diseño factorial 2^3 .	53
Tabla 8. Clasificación de las pruebas de tratabilidad.	57
Tabla 9. Parámetros de crecimiento para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> .	59
Tabla 10. Parámetros físicos y químicos y microbiológicos. Agua de salida de proceso chiller	60
Tabla 11. Composición obtenida por EDS para las películas calcinadas a 450 °C/2 h.	66
Tabla 12. Resultados y coeficientes de regresión para el Plackett Burman de <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> .	69
Tabla 13. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para fotocatalisis. Porcentajes de inactivación para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> .	71
Tabla 14. Constantes cinéticas y coeficiente de regresión para la inactivación de <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> en fotocatalisis heterogénea con CuO/TiO_2 /UV y UV (fotolisis)	75
Tabla 15. Resultados y coeficientes de regresión para el Plackett Burman de proceso Fenton con <i>S. Typhimurium</i> .	78
Tabla 16. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para proceso Fenton. Porcentajes de inactivación para <i>S. Typhimurium</i> .	79
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza y coeficientes de regresión para el Factorial 2^3 .	80
Tabla 18. Constantes de inactivación para ácido peracético e hipoclorito de sodio.	88
Tabla 19. Constante de inactivación de cinéticas de fotocatalisis heterogénea y desinfectante.	89
Tabla 20. Resultados de parámetros físicos, químicos y microbiológicos de empresas de beneficio avícola.	91
Tabla 21. Pruebas de tratabilidad	92

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de las etapas del proceso de beneficio avícola en Colombia. 1: Esquema de las etapas del proceso de beneficio avícola en Colombia (1).	22
Figura 2. Tratamiento fotocatalítico con lámparas de radiación UV y visible. Diseño experimental Plackett Burman. Foto tomada del laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.....	47
Figura 3. Curvas de inactivación para fotocátalisis con CuO/TiO ₂ en fotoreactor. Foto tomada del laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.	48
Figura 4. Reactor Proceso Fenton. Foto tomada del laboratorio de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana.....	54
Figura 5. Curvas de crecimiento para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> en caldo BHI. 12 horas, 35 °C 120 rpm y pH 7,0.....	59
Figura 6. Imágenes MEB para las películas de TiO ₂ elaboradas por la técnica sol/gel. Calcinación a 450 °C.	62
Figura 7. Imágenes MEB para las películas de CuO/TiO ₂ elaboradas por la técnica sol/gel. Calcinación a 450 °C/2 h.....	63
Figura 8. Distribución de tamaño de agregado obtenida a partir de MEB (El histograma fue construido luego de la medición de una población de 100 partículas con el software ImageJ®).	64
Figura 9. Espectros EDS para las películas calcinadas a 450 °C; a) EDS de TiO ₂ , b) EDS de CuO/TiO ₂	65
Figura 10. DRX para las películas calcinadas a 450 °C/2 h. TiO ₂ y CuO/ TiO ₂	66
Figura 11. Imágenes de MFA para las películas calcinadas a 450 °C/2 h.	67
Figura 12. Curvas espectrales. La línea roja corresponde a la películas de TiO ₂ calcinadas a 450 °C <i>gap</i> 3.2 eV. Línea negra corresponde a las películas modificadas CuO/TiO ₂ calcinadas a 450 °C, valor de <i>gap</i> 3.08eV.	68
Figura 13. Diseño experimental Plackett-Burman para fotocátalisis con TiO ₂ . Porcentajes de inactivación y pH final para los 12 tratamientos evaluados para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i>	70
Figura 14. Curva de inactivación para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i> para fotocátalisis con CuO/TiO ₂ , controles de UV (fotólisis) y adsorción (oscuridad)	74
Figura 15. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para proceso Fenton homogéneo. Porcentaje de inactivación para los 12 tratamientos a evaluar para <i>S. Typhimurium</i>	79
Figura 16. Representación cubica del efecto del efecto de pH, concentración de H ₂ O ₂ y concentración de FeSO ₄ sobre la inactivación de <i>S. Typhimurium</i>	82
Figura 17. Proceso Fenton homogéneo. Porcentajes de inactivación para los 8 tratamientos evaluados en el diseño factorial 2 ³ para <i>S. Typhimurium</i>	82
Figura 18. Cinética de inactivación para <i>S. Typhimurium</i> con Proceso Fenton H ₂ O ₂ /FeSO ₄ ; controles de H ₂ O ₂ y FeSO ₄	84

Figura 19. Curvas de inactivación con ácido peracético 80-160 ppm e hipoclorito de sodio 20 ppm para <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i>	87
Figura 20. Comparación de los procesos de oxidación (fotocatálisis y proceso Fenton) contra desinfección con hipoclorito de sodio y ácido peracético	89
Grafica 21. Inactivación de <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> y coliformes totales con tratamiento fotocatalítico con CuO/TiO ₂ /UV y Proceso Fenton homogéneo Fe ⁺² /H ₂ O ₂	94
Grafica 22. Resultados de parámetros químicos con tratamiento fotocatalítico CuO/TiO ₂ /UV y Proceso Fenton homogéneo Fe ⁺² /H ₂ O ₂	95

RESUMEN

El agua utilizada en las plantas de beneficio avícola es susceptible a la contaminación con patógenos como *Salmonella* spp el cual es un microorganismo de gran trascendencia en salud pública dada su relación directa con enfermedades transmitidas por alimentos. Con base en lo anterior, en esta investigación se estudiaron dos procesos de oxidación avanzada: fotocátalisis y reacción Fenton para lograr la inactivación de *Salmonella* spp presente en agua proveniente del proceso chiller del beneficio avícola. Se evaluaron dos sistemas: *i*). fotocátalisis con películas de TiO₂ dopadas con CuO las cuales fueron caracterizadas física y químicamente por medio de diferentes técnicas (DRX, SEM-EDS y AFM) y, *ii*). Proceso Fenton homogéneo usando FeSO₄/H₂O₂. Como parte de la metodología, se planteó la utilización de un diseño experimental Plackett-Burman para la selección de condiciones de las variables que favorecen el proceso fotocatalítico, y un Plackett-Burman complementando con un diseño factorial 2³ para el caso del proceso Fenton.

Los resultados del diseño experimental Plackett-Burman para fotocátalisis demostraron que cuando se usan las películas modificadas con CuO (P= 0,0265) y radiación UV (P=0,0005) se obtuvieron porcentajes de inactivación del 100% para los dos serotipos de *Salmonella* seleccionados. En el caso del proceso Fenton, el diseño factorial 2³ indicó que el pH, [H₂O₂] y [FeSO₄] tienen un efecto altamente significativo (p<0,0001) sobre el proceso de inactivación obteniendo resultados de porcentaje de inactivación de 56,2 % de inactivación con pH=4, [H₂O₂]=200 ppm y [FeSO₄]=100 ppm.

Las curvas de inactivación para fotocátalisis y el proceso Fenton fueron realizadas con las condiciones establecidas en los diseños experimentales. En el caso de la fotocátalisis, se lograron porcentajes de inactivación de 100 % a los 25 minutos para *S. Enteritidis* y a los 35 minutos de exposición para *S. Typhimurium*. En el caso del proceso Fenton, para *S. Typhimurium* se obtuvieron porcentajes de inactivación de 100% a los 15 minutos. Las curvas de inactivación con desinfectantes tradicionales como el hipoclorito de sodio (20 ppm) y ácido peracético (80 y 160 ppm) fueron realizadas para determinar la eficiencia en la desinfección de *Salmonella* y compararlos con los procesos de oxidación avanzada; dichos resultados permitieron estimar que se logró solamente el 12 % de inactivación con ácido peracético y una inactivación nula con hipoclorito de sodio haciendo evidente el mejoramiento del tratamiento.

La efectividad de los procesos estudiados en el presente trabajo, se evaluó en dos muestras de agua proveniente de dos empresas de beneficio avícola con diferentes niveles de producción. En donde fotocátalisis disminuyó el total de los recuentos iniciales para *S. Typhimurium* y los microorganismos indicadores de contaminación fecal (*E. coli* y coliformes totales). El proceso Fenton disminuyó tres unidades logarítmicas de la concentración inicial de los mismos microorganismos. Adicionalmente se evaluaron otros parámetros físicos y químicos donde se logró remoción de DQO y disminución de unidades de color (UC) con los dos tratamientos.

Palabras claves: Fotocátalisis, Fenton homogéneo, películas de TiO₂ y CuO/TiO₂, *Salmonella* spp, inactivación, beneficio avícola, agua de chiller.

ABSTRACT

The water utilized in poultry plants can be easily contaminated by pathogenic microorganisms. Among them, *Salmonella spp* has been recognized as serious issue for public health, since it has been related with foodborne diseases. Taking this into account, Photocatalysis with thin films of CuO-TiO₂ and homogenous fenton reaction were employed in order to eliminate two serotypes of *Salmonella* (*S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*) from the water produced in the chiller process. CuO-TiO₂ Thin films were characterized by DRX, SEM-EDS and AFM. A Placket-Burman and 2³ factorial statistical designs were used to select the best variables for the photocatalytical and Fenton treatment.

In regards to photocatalysis, the best results were obtained by the thin films CuO/TiO₂ (P=0,0265) irradiated with UV light (P=0,0005) in which the percentage of *Salmonella*'s inactivation reached a 100%. Concerning, the Fenton reaction, the statistical analysis revealed a significant effect (p<0,0001) in terms of pH, [H₂O₂] y [FeSO₄] in which the inactivation percentage was 56.2%. This operational conditions were chosen for the following experiments.

The kinetics of inactivation for photocatalysis with CuO/TiO₂ showed 100 % of inactivation of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in 25 and 35 minutes respectively. And Fenton process showed 100% inactivation of *S. Typhimurium* in 15 minutes. Traditional disinfectants (sodium hypochlorite, 20 ppm and peracetic acid 80 and 160 ppm) were also tested, founding 12 % of inactivation using peracetic acid. No inactivation was produced by sodium hypochlorite.

The effectiveness of the processes studied in this work was evaluated in two water samples from two poultry plants with different production levels. Where photocatalysis decreased the total initial counts for *S. Typhimurium* and contamination indicator bacteria (*E. coli* and total coliforms). Fenton process decreased three logarithmic units of the initial concentration of the same microorganisms. Additionally, other physical parameters were evaluated chemicals where DQO removal was achieved and decreased color units (Uc) with the two treatments.

Key words: photocatalysis, homogeneous Fenton, films TiO₂, CuO/TiO₂, *Salmonella spp*, inactivation, poultry plants, water the chiller.

1 Alcances y definición del problema de investigación

El proceso de beneficio avícola consiste en el sacrificio de aves de corral para consumo humano y disposición para su comercialización (1). Como está contemplado en la resolución 4282/2007 del Ministerio de Protección Social en Colombia; en el proceso de beneficio como etapa crucial está el proceso chiller; que consiste en la inmersión del pollo en un sistema de recirculación de agua donde se reduce la temperatura y se utilizan tratamientos de desinfección como el hipoclorito de sodio y ácido peracético con el propósito de evitar una posible contaminación con microorganismos patógenos (2).

Es de vital importancia tener un adecuado control de la calidad microbiológica del agua que puede ser contaminada con el ingreso de aves contaminadas con bacterias patógenas como *Salmonella* y *Campylobacter* (3) y posiblemente en etapas posteriores como la evisceración puede contaminar otras aves constituyéndose en un peligro dentro de las plantas de beneficio (4).

Como parte del decreto 4282/07 este establece unos estándares de desempeño de reducción de patógenos como *Salmonella*; este incumplimiento podría ocasionar medidas sanitarias o sanciones que disponga el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (1).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) publicó en el 2011 un informe de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos; donde indicó que los patógenos asociados a este tipo de enfermedades generaron costos de 9,4 millones resultado de hospitalización y muertes. *Salmonella* fue una de las bacterias más frecuentemente asociadas a este grupo de enfermedades (5). En Colombia el Instituto Nacional de Salud (INS) en el informe de vigilancia de eventos de interés en salud pública en el año 2010 notificó 11,563 casos de enfermedades transmitidas por alimentos, involucrados 761 brotes en donde *Salmonella* se encontró dentro de los agentes etiológicos más reportados (6).

Una de las principales fuente de contaminación con esta bacteria es la ingestión de alimentos y aguas contaminadas siendo el pollo uno de los vehiculos mas importantes a nivel mundial (4). Se han descrito más de 2600 serotipos de *Salmonella* algunos de ellos con mayor importancia clínica (7).

Como se mencionó anteriormente dentro de los métodos utilizados para garantizar la calidad del agua en las plantas de beneficio avícola están los desinfectantes como el hipoclorito de sodio y ácido peracético; su implementación está indicado en la Norma Técnica Colombiana (NTC 5480) y la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO) (2); no obstante el uso indiscriminado puede generar efectos adversos como la generación de compuestos orgánicos clorados como trihalometanos (THMs) los cuales son tóxicos y podrían producir un efecto perjudicial para la industria avícola convirtiéndose en un problema de salud pública (8,9). La generación de estos compuestos también reduce el efecto residual del cloro, por lo tanto requiere de un constante recambio (10). Como desventajas del ácido peracético está la disminución de la concentración inicial durante el proceso de desinfección y olor fuerte que podría generar cambios organolépticos en el pollo beneficiado.

Estos hallazgos han sugerido el uso de tecnologías más amigables como lo son los procesos de oxidación avanzada (POA); estas pueden ser una alternativa eficaz en el tratamiento para la desinfección del agua minimizando el uso de productos químicos que pueden generar un impacto negativo en el ambiente. Dentro de las ventajas de estas tecnologías de oxidación están la descontaminación de aguas que contienen contaminantes orgánicos mediante la producción de especies químicas altamente reactivas con baja especificidad capaces de degradar diferentes tipos de compuestos (11).

Los POA se clasifican en procesos foto químicos como la fotocatalisis heterogénea, fotolisis, foto-Fenton, UV/H₂O₂ y UV/O₃ y procesos no foto químicos como oxidación electroquímica, proceso Fenton, radiólisis, plasma no térmico, ultrasonido, O₃/H₂O₂.

(12). Aunque estos procesos tienen características diferentes en común se da la formación de los radicales $\bullet\text{OH}$ (11).

La fotocatalisis se basa en la generación de los radicales $\bullet\text{OH}$ que pueden oxidar materia orgánica e inactivar microorganismos de forma eficiente y no selectiva. El proceso se basa en la aceleración de una reacción foto inducida sobre la superficie de un sólido semiconductor como el TiO_2 (12).

Se ha demostrado la eficiencia de la fotocatalisis con TiO_2 pero también se ha planteado la posibilidad de la modificación del semiconductor con iones metálicos y no metálicos con el fin de mejorar los procesos fotocatalíticos al ser modificados con este tipo de iones. Uno de los principales objetivos de la modificación es mejorar los resultados en la desinfección de aguas e inactivación de microorganismos. La modificación busca optimizar los procesos de fotocatalisis ya sea con radiación UV y la posible implementación de la luz solar o la utilización de lámparas de bajo costo haciendo que estos tratamientos sean más versátiles (11).

Otro de los procesos de oxidación avanzada es el proceso Fenton que es una reacción catalítica que involucra la adición de iones ferrosos (Fe^{2+}) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una solución (13). Este proceso también implica la formación de radicales hidroxilo $\bullet\text{OH}$, la reacción Fenton se ha utilizado ampliamente en la oxidación de contaminantes y de sustancias recalcitrantes del agua (14,15). Durante el proceso es importante el control de ciertos factores como el pH, adición de H_2O_2 , agitación constante, concentración del catalizador entre otros (16,17).

Actualmente el proceso Fenton se utiliza para tratamiento de efluentes textiles, lodos industriales, para la eliminación de compuestos orgánicos tales como fenoles, formaldehído, pesticidas, colorantes de uso industrial, reducción de la DQO (18). En cuanto a la inactivación de microorganismos se han reportado estudios con éxito en patógenos como *E. coli* (15,20) *Salmonella* spp (21,22).

En este proyecto se propuso la implementación de métodos de desinfección no convencionales como lo son la fotocatalisis y proceso Fenton como alternativa viable

para el tratamiento y desinfección en aguas potables y residuales en la industria de beneficio avícola con el propósito de reducir la presencia de patógenos de importancia como lo es *Salmonella*; realizando un tratamiento de una manera eficiente, económica y rápida. Estos procesos serian unas tecnologías innovadoras en la industria avícola y es necesario su optimizarlos para su posible implementación.

2. Marco teórico

2.1 Salmonella

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; es un bacilo Gram negativo corto no esporulado, anaerobio facultativo; son móviles gracias a sus flagelos peritricos con excepción de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pollorum*. Crecen a temperatura entre (7- 48 °C) y pH entre (4 y 8), su tamaño oscila entre 0.3 a 1 µm x 1.0 a 6.0 µm (23). El principal reservorio es el tracto gastrointestinal de hombre y animales. Actualmente se han descrito más de 2600 serotipos; algunos de ellos con mayor importancia clínica (24).

La clasificación inicial de Kauffman-White se basa en las características de antígeno flagelar H y el antígeno somático O, se describen dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, esta última especie se divide 6 subespecies (*entérica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (III), *diarizonae* (IV), *houtenae* (V), *indica* (VI)). Cada subespecie contiene serovariedades o serotipo definidas por su fórmula antigénica (23).

Le minor y col en 1987, con el fin de disminuir la nomenclatura de los serotipos propusieron que al identificar un serotipo se debe escribir la inicial en mayúscula y no en cursiva como por ejemplo *Salmonella enterica* subesp *enterica* serotipo Typhimurium y se abrevia *Salmonella* Typhimurium (26).

2.1.1 Trasmisión de Salmonella

La trasmisión de *Salmonella* en algunos serotipos ocurre a hospederos específicos como *S. Gallinarium* donde su único hospedero son las aves de corral, o *S. Typhi* en donde el único hospedero es el hombre.

Al contrario, hay otros serotipos como *S. Typhimurium* que tiene una amplia gama de huéspedes entre ellos el hombre, animales domésticos y animales salvajes (26). Las principales fuentes de contaminación con este serotipo son la ingestión de alimentos contaminados como pollo, carnes, vegetales o agua contaminada (24).

En cuanto a *S. Enteritidis* es un serotipo con amplia distribución y de importancia en salud pública; su trasmisión puede ser zoonótica y es una de las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causando salmonelosis en el hombre. En las aves de corral *S. Enteritidis* causa infección asintomática generando huevo contaminados; si el hombre consume huevo poco cocidos o crudos podría adquirir una infección producida por *Salmonella* (27).

Las infecciones con Salmonellas no tíficas son de gran importancia en salud pública. En años recientes se ha generado un aumento en el caso de brotes asociados al consumo de carne de pollo contaminados con este microorganismos (23). El aumento de la Salmonelosis en Estados Unidos podría relacionarse con cuatro factores: Aumento en el número de *Salmonella* resistente a antibióticos, incremento en el número de personas con deficiencias inmunitarias que son susceptibles a *Salmonella*, incremento en la contaminación de huevos por la presencia de gallina ponedora con ovarios infectados como también aves contaminadas en donde las plantas de beneficio pueden proporcionar brotes muy amplios y diseminados. Si se controlan estos factores se pueden tomar medidas correctivas y controlar la incidencia (31).

Otro factor importante a tener en cuenta para la trasmisión de *Salmonella* es la dosis infecciosa; que es la cantidad de *Salmonella* que se requiere para causar salmonelosis que esta influenciada por el grado de resistencia del huésped que está

disminuido en personas mayores de 50 años, niños y personas con alteración del sistema inmunológico. La dosis infectiva para humanos está entre 10^6 y 10^8 células, no obstante, existen datos epidemiológicos en diversos brotes que señalan dosis infectiva bajas como 10 células (32).

Según reportes del año 2010 por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS), indicó que los serotipos que más se notificaron en Colombia fueron *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* datos estadísticos que tiene relación con lo reportado en otros países de América Latina y Estados Unidos (32), aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta la importancia de las ETA existen pocos referencias bibliográficas de casos de salmonelosis asociada a consumo de pollos; Mercado y colaboradores (2012) mencionan que el riesgo a contaminarse por *Salmonella* se da por el consumo de pollo a medio cocer (33).

2.1.2 Patogénesis

Los mecanismos de defensa de *Salmonella* han evolucionado para protegerse de estrés oxidativo por medio de la expresión de diferentes genes. La activación de regulon *soxR/S* que está compuesto de al menos 10 genes con diferentes funciones como la neutralización de la super oxidación, absorción de compuestos oxidantes (gen *micF*) entre otros (28).

También *Salmonella* tiene mecanismo para defenderse de señales o factores ambientales (temperatura, pH, osmolaridad, potencial redox, péptidos antimicrobianos y supresión de nutrientes) mediante los promotores tándem que regulan genes implicados en el estrés extra citoplasmático (*rpoH*) (29).

Un factor importante en la patogénesis de *S. Typhimurium* es la resistencia a algunos antibióticos; esta resistencia se debe al uso indiscriminado para el tratamiento de salmonelosis, tanto en el hombre como en los animales; por ejemplo la administración de tetraciclina como profilaxis o en el alimento de animales destinados para consumo. (30). “*Salmonella* genomic island 1 (SGI1)” es la primera isla de

genes reportada que contiene un cluster de genes de resistencia a antibióticos, específicamente para *S. Typhimurium* TD104, este cluster le confiere resistencia a streptomina, ampicilina, sulfonamida, cloranfenicol y tetraciclina. Este serovar también es resistente a Ampicilina, por la presencia de un plásmido que contiene el gen *ampC* (*bla_{CMY}*), que codifica para una β -lactamasa (32).

2.2 Proceso de beneficio avícola y riesgo biológico

El proceso de beneficio avícola, actualmente en Colombia, lo reglamenta la resolución 4282 de 2007 del Ministerio de Protección Social que establece “el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de las aves de corral destinadas para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desprese, almacenamiento, transporte, comercialización” (1). En la figura 1, se observa el proceso y las etapas de beneficio avícola:

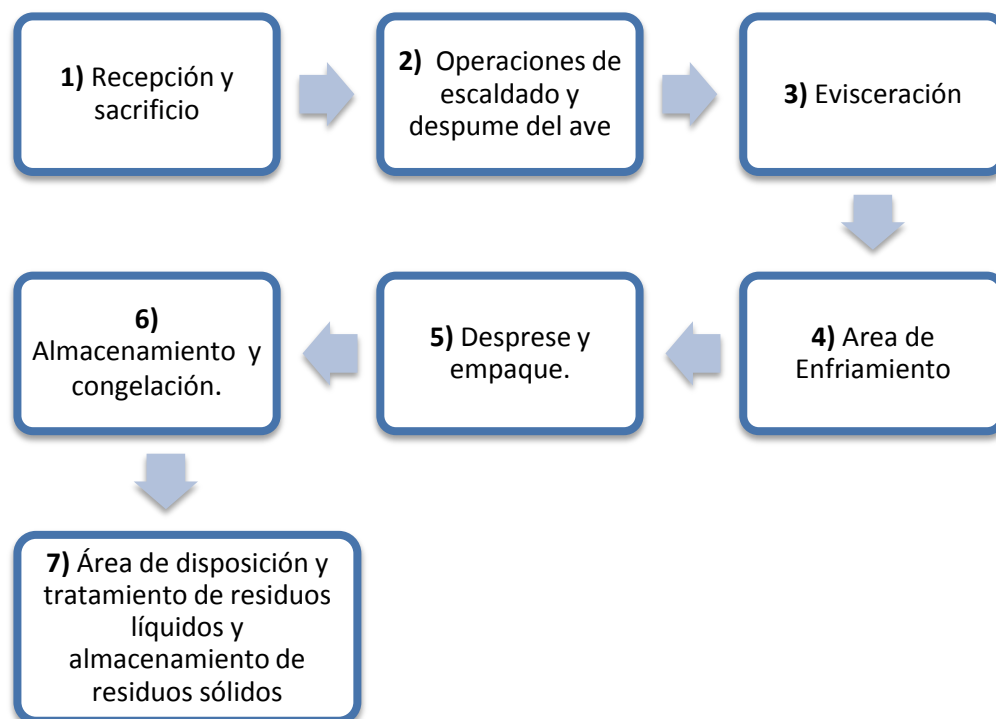


Figura 1. Esquema de las etapas del proceso de beneficio avícola en Colombia. 1: Esquema de las etapas del proceso de beneficio avícola en Colombia (1).

En la primera etapa ingresa el ave a las plantas de beneficio; Una de las fuentes que genera mayor contaminación antes del ingreso de las aves al proceso son las jaulas que podrían estar contaminadas en un 10% después de su uso (32). En esta etapa ocurre el beneficio y se realiza una inspección post mortem. Las plantas de beneficio deben cumplir con ciertos requerimientos sanitarios y áreas adecuadas para la eliminación de residuos generados, desinfección de utensilios utilizados en las diferentes etapas con el propósito de evitar desde el inicio de proceso una posible contaminación.

En la siguiente etapa se eliminan plumas por medio de operación de escaldado, se debe tener equipos adecuados para evitar la contaminación cruzada. Desde que inicia en esta etapa hasta el final del proceso el consumo de agua es elevado (1). En la etapa de evisceración se extraen los órganos de la cavidad torácica y abdominal de las aves; esta área debe estar separada de las demás, el proceso se puede realizar de forma automatizada o manual pero se debe evitar el riesgo de una posible contaminación cruzada. Esta etapa se considera como la fuente primaria de contaminación con *Salmonella* (32).

La etapa siguiente es la etapa de chiller con el fin de disminuir la temperatura de las canales hasta 4°C. Esta etapa se puede realizar de varias formas: por inmersión en tanques de agua fría con o sin hielo, por spray de agua fría o por circulación del agua (32), tanto en el pre-chiller como en el chiller con el fin de mantener la inocuidad del producto. Esta es una etapa crítica en donde puede haber contaminación con *Salmonella* por esta razón es importante la adición de desinfectantes; la resolución 4287/07 no indica que tipo de desinfectantes y en que dosis, indica que deben ser los desinfectantes aprobados por el Ministerio de Protección Social. Otro factor importante es la calidad del agua que debe ser potable (1,32).

Se debe tener en cuenta que en estos procesos de beneficio es importante tener un adecuado control en cada una de las etapas ya que la misma naturaleza de la materia prima implica cierta contaminación. Existe el potencial riesgo de

contaminación biológica debido a que después del sacrificio la defensa natural se pierde y podría ocasionar contaminación del producto con microorganismos potencialmente patógenos (34).

El ave entra en contacto con diversas fuentes naturalmente contaminadas como el contenido intestinal y/o materia fecal; si algún ave está infectada con algún patógeno al entrar en contacto con utensilios, superficies o el agua que se puede extender al resto del proceso, por lo que es de gran importancia el estricto cumplimiento de las normas de higiene y métodos eficientes para la desinfección del agua (34).

En los procesos de escaldado, evisceración y chiller, los canales de las aves son vulnerables a la contaminación de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* (34, 36, 37).

No solo es importante el control del agua potable que se utiliza en el proceso sino también el agua residual generada porque si bien es posible controlar a patógenos como *Salmonella* llevando adecuadamente los procesos; en el agua residual no se realiza tratamientos de desinfección y podrían ser una fuente de contaminación ambiental importante (37).

2.3 Desinfectantes en la industria avícola

Los desinfectantes son sustancias químicas capaces de inhibir el desarrollo microbiano, el objetivo fundamental de estos agentes químicos es disminuir el número de microorganismos vivos, de forma que los que sobrevivan no influyan en la calidad microbiológica del producto que pueda entrar en contacto con las superficies o medios líquidos desinfectados. Para que la acción de un desinfectante sea considerada eficaz se debe desarrollar en un breve periodo de tiempo y su acción debe ser bactericida (38,39).

Los desinfectantes están conformados comúnmente por diferentes agentes químicos activos que pueden incluir alcoholes, fenoles o yoduros. En la industria avícola los

más empleados son los compuestos a base de cloro, yodo, ácido peracético, formulaciones de amonios cuaternarios, anfóteros y biguanidinas poliméricas (35,40).

Al igual que en todas las industrias, en las plantas de beneficio los procedimientos seleccionados para cubrir la necesidad de desinfección garantizan la protección del producto terminado, disminuyendo así los riesgos inherentes a la producción. La eficacia de la desinfección suele ser variable, dependiendo del agua a ser tratada (4).

El hipoclorito de sodio y el ácido peracético son dos de los principales desinfectantes empleados por la industria avícola en aguas utilizadas para el proceso de chiller; el uso de estos dos desinfectantes está indicado por la norma técnica Colombiana NTC 5480 y la FAO; donde los desinfectantes a base de cloro en industrias alimenticias se aceptan (2,35). Estos agentes desinfectantes favorecen la disminución de la carga microbiana pero no asegura la inocuidad de esta fase; de manera que continúa presente el riesgo de generar contaminación.

Por otro lado según indica la FAO; el uso de desinfectantes a base de cloro no debe exceder concentraciones de 20-50 ppm al adicionarse al agua de chiller y que el ácido peracético no puede exceder las 150 ppm en el mismo proceso (2). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), permite el uso del hipoclorito de sodio en concentraciones de 50 ppm. Se ha demostrado que el uso del ácido peracético en concentraciones de 85 ppm puede reducir en un 92% *Salmonella* en la etapa de chiller (32).

2.3.1 Hipoclorito de sodio

Dentro de los agentes desinfectantes más utilizados a base de cloro se encuentran el cloro elemental gaseoso (Cl_2), el hipoclorito (ClO^-), y el cloro granulado entre otros. En las siguientes ecuaciones (1 y 2) se puede observar como el cloro molecular cuando entra en contacto con el agua forma ácido hipocloroso o ion hipocloroso el cual tiene un efecto desinfectante (40).

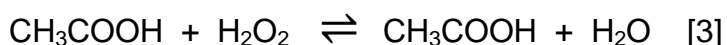


Esta dismutación ocurre en medio alcalino aunque el hipoclorito tiene su mayor acción desinfectante en medio ácido (41). El equilibrio de estas sustancias depende del pH, al descender el pH, el equilibrio se desplaza hacia la forma no disociada, donde el ácido hipocloroso predomina, por lo que la acción antimicrobiana es mayor.

Algunos compuestos clorados reducen la actividad antimicrobiana pero su uso puede conllevar a la formación de otros intermediarios clorados como trihalometanos (THMs) y clorofenoles los cuales son tóxicos (8), estos compuestos producen olores fuertes según la concentración y efectos mutagénicos en las bacterias por concentraciones elevadas (41). El empleo de este desinfectante en el proceso de chiller a lo largo del proceso avícola ha sido bastante cuestionado, ya que su eficiencia se ve notablemente afectada por factores tales como altas cargas de materia orgánica y por pH superiores a 7.0 (42).

2.3.2 Ácido peracético

El ácido peracético es otro desinfectante utilizado en la industria de beneficio avícola; este desinfectante es un fuerte agente oxidante, se encuentra disponible comercialmente en forma de mezcla de ácido acético y peróxido de hidrógeno lo que contribuye a su acción desinfectante. Como se observa en la ecuación 3. Como desventaja tiene un fuerte olor característico de su principal componente el ácido acético. Igualmente, ha sido empleado como desinfectante en industrias farmacéuticas, de alimentos y en el sector de la salud (42,43).



Su actividad desinfectante se basa en la liberación de oxígeno activo haciendo reaccionar los puentes de azufre presentes en las enzimas y proteínas

desestabilizando la estructura de la célula bacteriana. Su efecto como desnaturalizante de proteínas explica el efecto sobre proteínas esenciales en el metabolismo microbiano deteriorando consecuentemente la actividad celular (43).

Se ha reportado que el ácido peracético no produce compuestos tóxicos o mutagénicos tras reaccionar con materia orgánica presente en el agua tratada, se ha determinado que los subproductos generados mayoritariamente son ácidos carboxílicos por proceso oxidativo (44).

2.4 Semiconductores

La tecnología de la electrónica específicamente de la nanotecnología se ha enfocado en el estudio y uso de los semiconductores. Un semiconductor es un material en el que la energía eléctrica se puede controlar por medios externos comportándose como un aislante o un conductor. Los semiconductores pertenecen al grupo de los sólidos cristalinos lo que indica que sus propiedades físicas están definidas por las simetrías de traslación y rotación, en donde los átomos y moléculas se ubican en posiciones bien definidas formando una estructura ordenada. Existen diferentes tipos de semiconductores como los óxidos semiconductores dentro de los más utilizados están el óxido de cobre (CuO), el dióxido de cobre (CuO₂) y el óxido de Zinc (ZnO) (11).

En cuanto a la actividad fotocatalítica de estos semiconductores se basa en la transferencia de cargas entre la superficie de un sólido semiconductor irradiado y una solución acuosa. Los átomos de este sólido forman una red tridimensional infinita donde ocurre un solapamiento de los orbitales atómicos que se extienden en toda la red cristalina formando bandas de estados electrónicos permitidos; dentro de estas bandas hay intervalos de energía donde “no hay estados electrónicos permitidos” o banda de energía prohibida *gap*. Las bandas que limitan el *gap* son la banda de valencia (BV) de menor energía y la banda de conducción (BC) de mayor energía (45). La absorción de energía de un fotón mayor que la banda prohibida o *gap* conduce la formación de pares electro/hueco (e^-/h^+) generando procesos oxidativos y

reductivos para la reducción de un contaminante por medio de la generación de especies fuertemente oxidantes como los radicales hidroxilo $\bullet\text{OH}$ (11).

2.5 Características del Dióxido de titanio (TiO_2)

Se han investigado diferentes semiconductores para la utilización de procesos fotocatalíticos en la inactivación de microorganismos y degradación de compuestos; el semiconductor que presenta mayor aplicación medioambiental es el TiO_2 ; dentro de sus características están:

- Resistente a la descomposición química y a la foto corrosión.
- Alto índice de refracción
- Foto estabilidad,
- Insolubilidad en el agua
- No tóxico y seguro

Este semiconductor también es de interés porque puede ser utilizado con irradiación UV y visible ya que tiene una adecuada separación energética entre la banda de valencia y conducción que puede ser superada por un fotón de energía tanto UV como solar (11).

Algunas de las utilidades de este semiconductor es el empleo en la producción de hidrógeno y energía eléctrica, en la industria de cosméticos, como protector de corrosión, en cerámicas, en la industria farmacéutica como protectores solares (48,49).

En su forma más estable como óxido, puede encontrarse en tres formas cristalinas diferentes que son brookita, rutilo y anatasa. Donde rutilo (3.0 eV) y anatasa (3.2 eV) tienen actividad fotocatalítica siendo la forma cristalina anatasa la más importante (47).

En cuanto a la estructura del TiO_2 cada átomo de titanio está rodeado por ocho átomos de oxígeno que forma una estructura octaédrica alrededor del metal, a su vez

cada átomo de oxígeno está unido a tres átomos de titanio (45). La fase rutilo tiene como cara cristalina más estable la 110 mientras que la fase anatasa a la 101 esta cara es termodinámicamente más estable. La formación de una u otra fase en cada cara cristalina depende de los diferentes métodos o técnicas que se utilizan en la síntesis del material (48).

2.6 Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POA) se basan en la generación de especies reactivas como los radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ que oxidan contaminantes presentes en el agua de forma rápida y no selectiva. Los POA se dividen en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de procesos de oxidación avanzada. Adaptada de la referencia (12).

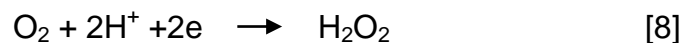
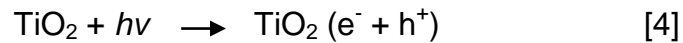
NO FOTOQUIMICOS	FOTOQUIMICOS
Proceso Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)	Fotocatálisis heterogénea TiO_2/UV
Ozonización con ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$)	Foto-Fenton $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$
Ozonización e O_3	Fotólisis UV
Ultrasonido	UV/peróxido de hidrogeno (UV/ H_2O_2)
Radiólisis	UV/ O_3
Plasma no térmico	
Oxidación electroquímica	

2.6.1 Proceso Fotoquímico: Fotocatálisis

La fotocatálisis se define como un proceso de fotorreacción en la superficie de un sólido semiconductor como el TiO_2 . El catalizador se activa por la absorción de fotones UV, con energía que iguala o supera el valor de la E_g , este proceso conlleva a la liberación de un electrón hacia la banda de conducción (BC) y la formación de un hueco en la banda de valencia (BV) propiciando la formación de los pares electrón/hueco (e^-/h^+) en la superficie del semiconductor (50,51). Entre las dos

bandas se genera una energía en donde no hay estados electrónicos permitidos denominados la banda de energía prohibida o *gap* (45,46).

La formación de los pares e^-/h^+ genera procesos de oxidación y reducción en donde se forma un donador de electrón oxidado y un aceptor de electrón reducido (53,59). El hueco generado en la banda de valencia (BV) reacciona con iones hidroxilo OH^- y absorbe agua para formar radiales libres $\cdot\text{OH}$. En la reacción se generan otras especies reactivas de oxígeno (ROS) como O_2^\cdot y HO_2^\cdot , siendo los radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ la especie más oxidante e importantes responsables de la inactivación bacteriana (9). Este proceso se puede representar mediante la secuencia de ecuaciones químicas 4-8 en donde se realiza el proceso en un medio acuoso y con irradiación de radiación UV:



2.6.2 Elaboración de películas de TiO_2 por la técnica sol-gel

La técnica sol-gel tiene aplicaciones en la síntesis de catalizadores, materiales funcionales, sensores químicos y posee una amplia gama de repercusiones en campos científicos y de ingeniería. El método sol-gel se utiliza, entre otros propósitos, para la elaboración de películas delgadas con semiconductores (54,62).

En el presente trabajo, se empleó la técnica sol-gel para la elaboración de películas de TiO_2 la cual permite obtener una suspensión de partículas de un óxido metálico a partir de reacciones de hidrólisis/condensación de precursores como sales inorgánicas o alcóxidos. Para la obtención de TiO_2 se utilizan como precursores principalmente alcóxidos de Ti (54).

El proceso consta de varios pasos: 1. hidrólisis del precursor y formación de grupos OH, 2. Condensación con pérdida de agua, 3. Condensación con formación de polímeros, 4. Gelificación o fase sólida con la formación de una estructura tridimensional y 5. Deshidratación por calentamiento (55,56).

Las partículas coloidales que se forman en el proceso sol-gel tienen una alta relación superficie/volumen y elevada energía superficial, por lo que tienden a aglomerarse. El proceso por el que el precipitado se transforma en un sistema coloidal estable o sol se denomina peptización. Cuanto mayor sea la carga, mayor va a ser la repulsión entre las partículas y menor la agregación, alcanzándose un equilibrio cinético. Durante la sinterización, si la repulsión es elevada, se produce una capa compacta, que da lugar a películas micro porosas (52).

2.6.3 Modificación de las películas de TiO₂

La fotocatalisis con TiO₂ es un proceso que puede ser utilizado en la desinfección del agua; no obstante el rendimiento de TiO₂ no es tan elevada; esto se debe a la rápida recombinación de los pares e⁻/h⁺ en la superficie del semiconductor (57). Para mejorar la actividad de TiO₂ y evitar la recombinación se ha implementado el depósito de diversos metales nobles (58). Estos metales tienen niveles fermi menores que el TiO₂ facilitando la transferencia electrónica, resultando en una separación eficiente de portadores de carga (57). Por lo tanto, los iones metálicos también pueden servir como sitios de captura y reducir la formación de electrón-hueco y velocidad de recombinación (61).

Dentro de los átomos no metálicos están el Azufre y Nitrógeno y metálicos como el cromo, hierro y cobre el cual es uno de los más utilizados para el proceso de modificación (59-60). Los metales, se difunden e incrustan por la red de TiO₂, lo cual permite la formación de un nuevo nivel de energía entre la banda de valencia (BV) y la banda de conducción (BC) del semiconductor; este puede actuar como una trampa de electrones evitando la recombinación de estos. Los átomos no metálicos

se encargan de conceder características al material, permiten reducir la banda de energía prohibida y generar vacancias de oxígeno (59).

El mejoramiento y la optimización del TiO_2 como fotocatalizador es una tarea importante para las aplicaciones técnicas de la fotocatálisis ya que potencializar la actividad fotocatalítica en la región ultravioleta e incluso en la visible. Es importante saber seleccionar con que metal se va a modificar el material ya que lo que se busca es mejorar la eficiencia del proceso (54).

El efecto de la modificación depende de muchos factores, como el método de dopaje, el tipo y la concentración del material. La dinámica de portadores de carga es uno de los factores más importantes que afectan a la actividad fotocatalítica de las partículas de TiO_2 . De hecho, la transferencia de electrones interfacial se considera un proceso complicado limitado por una serie de factores termodinámicos y cinéticos. Por lo tanto, cuanto mayor sea el tiempo en que los electrones estén atrapados, mayor es la actividad fotocatalítica (61).

Existen diferentes métodos para la preparación del catalizador o de las películas modificadas de TiO_2 ; algunos de los métodos utilizados son: electroquímica, reacciones continuas, multi-gelificación, dióxido de carbono supercrítico, plasma, precipitación térmica, recubrimiento por inmersión; entre otros. Uno de los métodos más utilizados es la técnica sol-gel modificado, que produce películas delgadas y potencializa la actividad fotocatalítica (54).

2.6.4 Factores que afectan el proceso fotocatalítico

Dentro de los parámetros importantes que afectan el proceso están:

- Área superficial del catalizador: En cuanto mayor sea el área superficial habrá un contacto más cercano de las especies generadas en el proceso fotocatalítico con la molécula a degradar (63).
- Efecto del pH: la eficiencia del proceso es mejor a un pH ácido entre 3-5 que tiene un efecto sobre la superficie del catalizador y la forma química del

compuesto a degradar. Si el pH es ácido la velocidad de reacción es mayor y hay mayor adherencia del contaminante a la película (64). El punto isoeléctrico del TiO_2 es 6,5, valores de pH bajo 6,5 cargan al compuesto de manera positiva, teniendo los h^+ fotogeneradores con mayor poder oxidativo permitiendo la atracción de microorganismo u otros compuestos con carga opuesta inactivarlos o degradarlos. Si se carga en condiciones de alcalinidad del TiO_2 de manera negativa genera repulsión entre el semiconductor y el compuesto a degradar o microorganismo a inactivar (95).

- Oxígeno: No se producirá fotomineralización del contaminante en ausencia de oxígeno. Adicionalmente, el oxígeno no compite con las moléculas de contaminante durante la adsorción sobre el TiO_2 , ya que los lugares superficiales donde se producen las reacciones de oxidación y reducción son distintos. El O_2 es altamente electrofílico, por lo que capta los electrones liberados tras la separación de pares e^-/h^+ y evita su recombinación generando así el radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ (47).
- Intensidad de la luz: La velocidad de reacción es proporcional a la intensidad de la luz. La distancia de penetración de los fotones dentro de la partícula de TiO_2 es más corta cuanto menor es la longitud de onda, ya que son absorbidos por las moléculas del semiconductor con más fuerza. Para poder generar la formación de los pares e^-/h^+ en la superficie del sólido semiconductor se requiere de energía suficiente o mayor que la banda *gap*, es por esta razón que se debe utilizar lámparas con longitud de onda mas cortas como las lámparas de radiación UV (254 nm) (65).
- Tiempo de irradiación: El tiempo de exposición al tratamiento fotocatalítico depende del tipo de compuesto a degradar, el tipo de microorganismo a inactivar y la concentración en que se encuentre. Dependiendo del tiempo de exposición podría afectar positiva o negativamente el proceso (59).

2.6.5 Inactivación bacteriana

La mayoría de las investigaciones que involucran la inactivación de microorganismos con el tratamiento fotocatalítico están asociados a *E. coli* (66,67), también se han realizado estudios en bacterias como *Legionella pneumophila*, *Pseudomona. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* donde el proceso de inactivación es efectivo (11). En cuanto a *Salmonella* se ha reportado con éxito la desinfección de aguas por medio de la fotocatalisis con TiO_2 , tanto para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (11, 50,51).

Se ha estudiado el proceso de inactivación en bacterias Gram negativas y Gram positivas, en donde se indica que la principal causa de muerte celular por parte de la fotocatalisis con TiO_2 es el agotamiento de la coenzima A por dimerización y posterior inhibición de la respiración celular. Se ha descrito que la muerte celular se debe al daño de la membrana y pared celular (50).

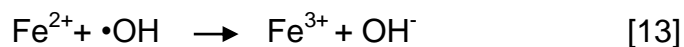
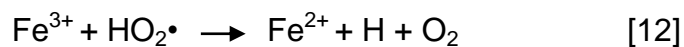
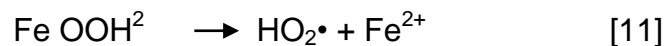
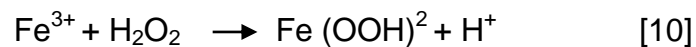
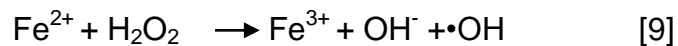
El daño celular producido por la fotocatalisis empieza en la membrana celular de las bacteria, es la primera estructura en ser atacada por los radicales hidroxilo $\bullet OH$. El proceso de inactivación bacteriana por parte de la fotocatalisis con TiO_2 comienza con un contacto directo con la membrana celular alterando la permeabilidad seguido por un daño mayor a la pared celular permitiendo la salida de iones de K^+ . El daño en esta etapa puede ser irreversible y causar la muerte celular (9,59).

Por otro lado la purinas y pirimidinas; moléculas presentes en el ADN absorben fuertemente la radiación ultravioleta llevando a la formación de dímeros e hidratos; esta dimerización produce ruptura de la estructura del ADN y una inhibición de la replicación ocasionando muerte celular (41,69).

2.6.6 Proceso no fotoquímico: Proceso Fenton homogéneo

El Proceso Fenton pertenece a los procesos de oxidación avanzada (POA) no fotoquímicos. Diferentes investigadores han demostrado que las soluciones de peróxido de hidrógeno y sales ferrosas son capaces de oxidar compuestos orgánicos. Este proceso es uno de los métodos clásicos de producción de radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ (70, 71,72).

El Proceso Fenton homogéneo es un tratamiento práctico y fácil de implementar para tratamiento de aguas residuales. Consiste en la adición de una sal de hierro (Fe^{2+}) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) directamente a las aguas residuales; estos dos compuestos origina la reacción Fenton. Esta reacción favorece la formación de radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ por la descomposición catalítica del H_2O_2 en medio acido con un pH de 3-4 (73). En la siguiente secuencia de ecuaciones químicas se puede observar la reacción Fenton:



No solo los radicales hidroxilo degradan contaminantes, en la primera reacción que se forma del proceso Fenton, los iones férricos formados también promueven la remoción de contaminantes (88). En la reacción Fenton se generan dos tipos de radicales $\cdot\text{OH}$ y $\text{HO}_2\cdot$. Un exceso de los iones de Fe^{2+} (el catalizador) al igual que un exceso de H_2O_2 (reactivo) puede generar reacciones improductivas (19).

El proceso Fenton no solo se utiliza para la inactivación de microorganismos sino también para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCBs, colorantes azo, PCP, fenoles y formaldehído (18-74). En la remoción de la DQO de

aguas, tratamiento de lixiviados y en pre-tratamiento de compuestos no biodegradables, tratamiento de efluentes de empresas papeleras y textiles, reducción de unidades de color (UC). Dentro de las ventajas están que el Fe (Fe^{2+}) es abundante y no tóxico, así como el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y no tóxico para el ambiente. (75,76).

2.7.1 Factores que influyen en proceso Fenton homogéneo

Dentro de los factores que influyen en el proceso Fenton están:

- Efecto de pH: La velocidad de la reacción tiende a aumentar a pH óptimo. Cuando hay valores de pH superiores a 4,0 el hierro se puede precipitar en la solución formando hidróxidos. El pH óptimo para el proceso Fenton está alrededor de 3.0 a 3.5 donde el $\text{Fe}(\text{OH})^2$ es la especie predominante en la solución (17).
- Relación Fe (Fe^{2+})/ H_2O_2 : La concentración de H_2O_2 influye sobre la eficiencia del proceso mientras que la concentración de hierro afecta la cinética. Tanto la eficiencia como la velocidad de reacción tienden a aumentar de Fe (Fe^{2+}) y H_2O_2 . Un exceso Fe^{2+} es posible que dé lugar a una disminución de la velocidad de reacción debido a la activación de reacciones secundarias no deseadas, como es $\text{Fe}(\text{OH})_3$ que puede precipitar la reacción (73).
- Presencia de iones inorgánicos: La presencia en el medio de algunos iones como fluoruros, bromuros, sulfatos o cloruros tienen repercusiones negativas en la reacción. Estos iones pueden actuar como inhibidores de los $\bullet\text{OH}$. El mecanismo de acción es reducción de la actividad de (Fe^{3+}) a través de mecanismos de secuestro de los radicales $\bullet\text{OH}$ (73).
- Adición de H_2O_2 : La adición puede realizarse al inicio de la reacción en un 100% de H_2O_2 o durante todo el tratamiento de manera controlada. Al controlar la adición de H_2O_2 se obtienen óptimos resultados en la disminución de carbono orgánico total (COT), potencializa las acción de los radicales $\bullet\text{OH}$

sobre el microorganismos a inactivar (18) y garantiza la acción oxidante del H_2O_2 durante toda la reacción (73).

- Temperatura: En algunos estudios se reporta que la temperatura óptima esta alrededor de 30 °C, valores de temperatura más elevados podría descomponer H_2O_2 en H_2O y O_2 . No obstante este valor de temperatura no indica que la reacción Fenton no se pueda llevar a cabo. En el proceso foto-Fenton es posible encontrar valores sobre los 50 °C sin afectar la reacción. (18).

2.7.2 Inactivación bacteriana proceso Fenton homogéneo

La aplicación del proceso Fenton para la inactivación de microorganismos se ha enfocado principalmente en la inactivación de *E. coli* aunque hay reportes con *Salmonella* (20,21); utilizando principalmente el proceso con la irradiación UV o Foto-Fenton (72,77).

De acuerdo con la reacción Fenton el mecanismo de daño celular a la bacteria es por medio de la liberación de H_2O_2 extracelular que puede aumentar la permeabilidad de la membrana y permite que el Fe^{2+} ingrese a la célula, causando daño a las funciones celulares. El hierro causa una peroxidación de los lípidos en la membrana celular (21). Además de los iones férricos que se produce po la reaccion Fenton se generan radicales $\bullet OH$ que son citotóxicos para la célula bacteriana acumulándose en el citoplasma causando muerte celular (77).

En la investigación realizada por Moncayo (2007) la inactivación de *E. coli* por medio de proceso foto-Fenton, sugiere que bajo condiciones aeróbicas el metabolismo bacteriano da lugar a especies de oxígeno reactiva que producen peroxidacion de lípidos de membrana, mutación del ADN y otros daños producidos a la membrana celular por la acción de los radicales y especies oxidantes (20).

3. Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo General

Evaluar fotocátalisis con TiO_2 y proceso Fenton para el control de *Salmonella* spp en aguas generadas en plantas de beneficio avícola

3.1.2 Objetivos específicos

- Seleccionar y evaluar las condiciones que influyen sobre el proceso fotocatalítico con TiO_2 y proceso Fenton en el tratamiento *Salmonella* spp.
- Comparar la eficiencia de inactivación de los procesos de oxidación avanzada contra desinfección química empleada en el proceso de beneficio avícola.
- Realizar pruebas inactivación con fotocátalisis con TiO_2 y proceso Fenton en muestras de aguas utilizadas en el proceso de beneficio avícola.

3.2 Hipótesis:

La utilización de fotocátalisis con TiO_2 y proceso Fenton es efectiva en la inactivación de *Salmonella* spp presente en aguas contaminadas de plantas provenientes de beneficio avícola.

4. Metodología:

La metodología desarrollada en la presente investigación se dividió en las siguientes etapas:

Etapas preliminar:

- Selección de cepas de referencia
- Descripción y caracterización de las muestras de agua objeto de estudio

Etapas I: Selección de condiciones para los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton

- Fotocatálisis con TiO_2
- Proceso Fenton homogéneo

Etapas II: Comparación de los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton con tratamientos químicos con ácido peracético e hipoclorito de sodio.

Etapas III: Pruebas de tratabilidad con fotocátalisis y proceso Fenton de aguas provenientes del beneficio avícola (salida de chiller y residuales)

A continuación se describen en detalle las etapas mencionadas.

4.1 Etapas preliminar: Caracterización y manejo de la cepa de referencia

4.1.1 Origen de las cepas:

S. Typhimurium ATCC 13176 y *S. Enteritidis* ATCC 13076 fueron proporcionada por el cepario del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana. Las bacterias se reactivaron en Agar Infusión cerebro corazón (BHI) (Scharlau®) y se incubaron durante 24 horas a 35 °C, posteriormente se realizó coloración de Gram para confirmar morfología.

4.1.2 Preservación de cepas:

Para garantizar la viabilidad y pureza de los dos microorganismos durante todo el estudio, se realizó un protocolo de criopreservación con glicerol al 30 % (v/v). Cada bacteria se cultivó en caldo BHI por 12 horas a 35 °C y 120 rpm. Posteriormente, se adicionó una cantidad conocida de glicerol al 80 % (v/v) previamente esterilizado para obtener una concentración final en la mezcla del 30 % (v/v). Bajo condiciones de esterilidad se dispensó 1 mL del cultivo en tubos eppendorff de 1.5 mL e inmediatamente se congelaron a -30 °C. El control de calidad del banco se verificó descongelando 3 viales para realizar diluciones en base 10 y sembrando 0.1 mL en superficie en agar BHI. Las cajas se incubaron por 24 horas a 35 °C y al finalizar el proceso se realizó recuento de colonias por mL (78).

4.1.3 Curvas de crecimiento

Para conocer las fases de crecimiento de cada una de las cepas se realizaron fermentaciones discontinuas en Erlenmeyer de 1000 mL que contenían 200 mL de caldo BHI inoculado con una suspensión bacteriana (absorbancia de 0.2). Los cultivos se mantuvieron a 35 °C y con agitación constante de 120 rpm. Durante 12 horas de proceso se tomaron muestras con intervalos de 15 minutos para los primeros 60 minutos y posteriormente cada hora. El incremento de biomasa en función del tiempo se monitoreó por el cambio en la absorbancia a 540 nm empleando como blanco el medio estéril; a continuación estos valores fueron transformados a biomasa en g/L por medio de una curva patrón previamente estandarizada (79). Para calcular las velocidades de crecimiento y el tiempo de duplicación se realizó una transformación matemática de los datos para representar $\ln = x/x_0$ en función del tiempo, cuyo valor de pendiente es igual a la velocidad específica de crecimiento (μh^{-1}) y el tiempo de duplicación será igual a: $\ln 2/\mu$ (ecuaciones 14-15)

$$X = X_0 * e^{\mu t} \quad [14]$$

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [15]$$

4.1.4 Descripción y caracterización de las muestras de agua objeto de estudio

- **Muestra tipo 1**

La muestra tipo 1, proviene de una empresa ubicada en la ciudad de Bogotá que tiene una producción de beneficio de 80 mil pollos al día. El muestreo del agua se realizó a la salida del chiller. El tipo de agua utilizada es agua potable que se recircula por todo el proceso hasta que sus condiciones lo permitan.

- **Muestras tipo 2**

Las muestras tipo 2, provienen de dos empresas con niveles de producción diferentes; una empresa con producción aproximada de 300,000 pollos/día y la otra empresa de 8,000 pollos/día. Se muestreó tanto el agua de salida del chiller y el agua residual generada durante el proceso de beneficio.

4.1.5 Caracterización de las muestras

Se realizaron análisis físicos, químicos y microbiológicos a las muestras de agua de proceso chiller y residual descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de agua: Pruebas físicas, químicas y microbiológicas.

Parámetro	Nombre del método
pH (Unidades)	potenciométrico
Unidades de color (UC)	Espectrofotométrico APHA
DQO (ppm)	Reflujo cerrado, APHA 2005
Conductividad (μScm^{-1})	Conductímetro
Oxígeno disuelto (ppm)	Oximétrico
Ausencia/Presencia 100 mL <i>Salmonella</i>	APHA 2004
Recuento de <i>E. coli</i> y coliformes totales	APHA,2004

4.2 Etapa I: Selección de condiciones para los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton

Esta etapa a su vez se dividió en dos, la primera se centró en evaluar el proceso de fotocátalisis y la segunda evaluó el proceso Fenton. Para cada tecnología de oxidación avanzada se realizaron diseños experimentales para seleccionar los factores que afectan favorablemente la inactivación de *Salmonella* y posteriormente evaluar las curvas de inactivación en función del tiempo empleado las condiciones previamente determinadas.

4.2.1 Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO₂)

Para evaluar esta tecnología se elaboraron y se caracterizaron películas del óxido semiconductor, las cuales fueron utilizadas para realizar el diseño de Plackett-Burman y con nuevo lote de películas se evaluaron las curvas de inactivación.

4.2.2 Obtención y caracterización de las películas de TiO₂ y CuO/ TiO₂

Se elaboraron dos clases de películas, sin modificar TiO₂ y modificadas CuO/TiO₂. Los protocolos de preparación de los reactivos y elaboración se describen a continuación.

4.2.3 Obtención de películas de TiO₂

Para la obtención de las películas se empleó el TiO₂ USP y como sustrato se utilizaron láminas de borosilicato (20x26 mm) previamente lavadas y desengrasadas por sonicación durante 15 minutos realizando cuatro ciclos de agua, etanol, acetona y agua desionizada. El proceso de hidrofiliación se realizó por medio de un lavado con una solución 3:1 de H₂SO₄ al 98 % (v/v) y H₂O₂ al 30 % (v/v) durante 20 minutos seguido de lavados con agua desionizada.

Posteriormente, se preparó una suspensión de TiO₂ USP (A) mezclando 0,5 mg de TiO₂ USP previamente tamizado, 25 ml de agua desionizada y 360 µL de ácido nítrico al 70 % (v/v). Seguido de sonicación durante 15 minutos. El precursor amorfo (B) se preparó mezclando 209 µL de tetraisopróxido de titanio ((C₂H₅)₂N)₄Ti (TiP)), 25 mL de etanol absoluto (C₂H₅OH) y 70 µL de H₂O₂ 30 % (v/v) seguido de sonicación durante 15 minutos.

Las dos suspensiones se mezclaron agregando A sobre B con sonicación durante 15 minutos. Posteriormente en cajas de Petri se depositaron los sustratos y se adicionaron 5 mL de la mezcla A+B. El crecimiento se llevó a cabo a 50 °C durante 4 horas con deposición de la mezcla A+B dos veces. Posteriormente, las películas se llevaron a mufla para la sinterización del material a una temperatura de 450 °C (59).

4.2.4 Elaboración de las películas de CuO/TiO₂

En este caso, la mezcla A+B se llevó a secado a 100 °C durante 8 horas; del polvo obtenido se tomaron 0,2 g y se mezclaron mecánicamente con 0,0375 g de CuSO₄·6H₂O (59). Esta mezcla se suspendió en 50 mL de una solución 1:1 de agua desionizada y etanol absoluto seguido por sonicación durante 15 minutos. Posteriormente en cajas de Petri se depositaron los sustratos y se adicionaron 5 mL de la suspensión. El crecimiento y sinterización se llevó a cabo como se describió anteriormente.

4.2.5 Caracterización física de las películas de TiO₂ y CuO/ TiO₂

- **Microscopia Electrónica de barrido (MEB)**

Se utilizó MEB para evaluar la morfología (imágenes de electrones secundarios) y la composición superficial de las películas (espectroscopía dispersiva de Rayos X). Para la preparación de las muestras se realizó un recubrimiento con oro.

- **Difracción de rayos X (DRX)**

Se utilizó para determinar la estructura cristalográfica del TiO₂ (80). La difracción se llevó a cabo en un equipo de rayos X Siemens D-5000 operado con un ánodo de Cu K α = 1.5418 Å.

- **Microscopia de fuerza atómica (MFA)**

Se utilizó para generar imágenes tridimensionales de la superficie de las películas y determinar la distribución y homogenización de partículas sobre la el sustrato (81).

- **Barridos UV-VIS**

Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS para determinar las transmitancia y absorbancia de los dos tipos de películas elaboradas y poder establecer la banda gap del material.

4.2.6 Selección de los factores que afectan el proceso fotocatalítico empleando un diseño experimental Plackett-Burman

Este tipo de diseños se propone cuando se desea evaluar el efecto de más de 5 factores a dos niveles sobre una determinada variable dependiente. Es una metodología sencilla que permite con 12 tratamientos identificar las variables más influyentes con miras a realizar una optimización posterior si es necesario (81,82) Para este tipo de diseños se generan modelos de primer orden que podrían ser definidos por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad [16]$$

Donde Y es la respuesta predicha (Porcentaje de inactivación de *Salmonella*), β_0 y β_i con coeficientes de la regresión y X_i es el factor independiente codificado. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza previa verificación de los supuestos empleando el programa estadístico Design expert para Windows. Por otro lado, se realizó un análisis complementario para determinar que tratamiento fue el

mejor a través de una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Con la premisa de que los factores significativos deben estar incluidos en los mejores tratamientos.

Tabla 3. Factores evaluados para el Plackett Burman de fotocatalisis.

Factores codificados	Factores Nominales	Nivel alto	Nivel bajo
A	Tiempo	60 minutos	30 minutos
B	Concentración celular	1x10 ³ UFC/mL	1x10 ⁶ UFC/mL
C	pH	5,6	9
D	Agitación	120 rpm	0 rpm
E	Tipo de películas de TiO ₂	TiO ₂ /CuO	TiO ₂ /TiP
F	Longitud de onda	254 nm	430 nm
G	Dumy	-	-
H	Dumy	-	-
I	Dumy	-	-
J	Dumy	-	-
K	Dumy	-	-

*Dumy: Factores no realizados

Se estudió el efecto seis factores a dos niveles (+1, -1) sobre el porcentaje de inactivación fotocatalítica de dos serotipos de Salmonella (*S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*). Los factores y niveles evaluados se presentan en la tabla 3 y 4, y generaron un total de 12 tratamientos que se realizaron por triplicado. Como controles se realizaron corridas independientes con radiación ultravioleta, luz blanca y adsorción a las películas de dióxido de titanio en la oscuridad.

Selección de los factores:

- Tiempo: Se determino su nivel alto por el tiempo de retención de las carcasas del pollo en el agua de chiller y nivel bajo tiempo mínimo de inactivación por fotocatalisis reportado por estudios previos en el grupo de investigación.
- Concentración celular: La dosis mínima y máxima infectante de *Salmonella*.
- pH: Se planteo dos rangos de pH (acido y básico), el nivel bajo corresponde a el valor de pH en el agua de la etapa chiller y el nivel alto para determinar como afecta a la superficie del catalizador.

- Películas: Determina si la modificación del material afecta positivamente la eficiencia del proceso de inactivación. Nivel alto películas TiO₂ y nivel bajo películas modificadas CuO/TiO₂.
- Longitud de onda: Determinar el porcentaje de inactivación con luz visible (430 nm) y radiación ultravioleta (245 nm).

Tabla 4. Combinación de los factores a evaluar para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Tratamiento	Factor A Tiempo (min)	Factor B Concentración celular UFC/mL	Factor C pH	Factor D Agitación (rpm)	Factor E Películas TiO ₂ (0) CuO/TiO ₂ (1)	Factor F longitud de onda (nm)
1	60	1x10 ³	9	0	0	254
2	60	1x10 ⁶	5,6	120	0	254
3	30	1x10 ⁶	9	0	1	254
4	60	1x10 ³	9	120	0	430
5	60	1x10 ⁶	5,6	120	1	254
6	60	1x10 ⁶	9	0	1	430
7	30	1x10 ⁶	9	120	0	430
8	30	1x10 ³	9	120	1	254
9	30	1x10 ³	5,6	120	1	430
10	60	1x10 ³	5,6	0	1	430
11	30	1x10 ⁶	5,6	0	0	430
12	30	1x10 ³	5,6	0	0	254

Para realizar cada uno de los tratamientos se preparó un inóculo concentrado de cada serotipo de *Salmonella* empleando agua de Chiller previamente esterilizada 120 °C, 15 libras de presión por un periodo de 1 hora a la cual se le inoculó una suspensión de *Salmonella* con una absorbancia de 0.12. El agua de chiller y la bacteria se incubaron a 35 °C por 12 horas a 120 rpm para favorecer el crecimiento de cada una de ellas a expensas de los nutrientes presentes en el agua hasta obtener una concentración similar a la hallada en las curvas de crecimiento realizadas en la etapa preliminar. Posteriormente, se realizaron diluciones con agua peptonada al 0.1 % (m/v) del cultivo concentrado para ajustar la concentración celular según los niveles del factor B (10³ y 10⁶ UFC/mL) y se confirmó la concentración realizando siembras por la técnica de microgota en agar BHI (Scharlau®).

El montaje de todos los tratamientos se realizó en cajas de Petri de 10 mL sin tapa que contenían 5 mL de agua de chiller previamente ajustada con la concentración celular deseada y una película de TiO₂ de acuerdo con los niveles del factor E. La irradiación se realizó colocando en la parte superior y a 5 cm de las cajas de Petri dos lámparas de radiación UV (254 nm) y luz blanca (430 nm), según los niveles del factor F. Cada tratamiento fue expuesto por un periodo de tiempo definido por el factor A. La agitación se suministró colocando las cajas de Petri sobre un agitador horizontal por un periodo de 30 y 60 minutos (figura 2). Al finalizar cada corrida se tomó una alícuota para realizar diluciones en base diez y sembrar por la técnica de microgota en agar BHI. Las cajas se incubaron por 24 horas a 35 °C y se estimó la población de sobrevivientes. El porcentaje de inactivación se calculó con la ecuación 17:

$$\text{Inactivación (\%)} = \frac{UFC/mL_i - UFC/mL_f}{UFC/mL_i} \times 100 \quad [17]$$

Donde UFC/mL_i son ufc/mL iniciales y UFC/mL_f son ufc/mL finales.

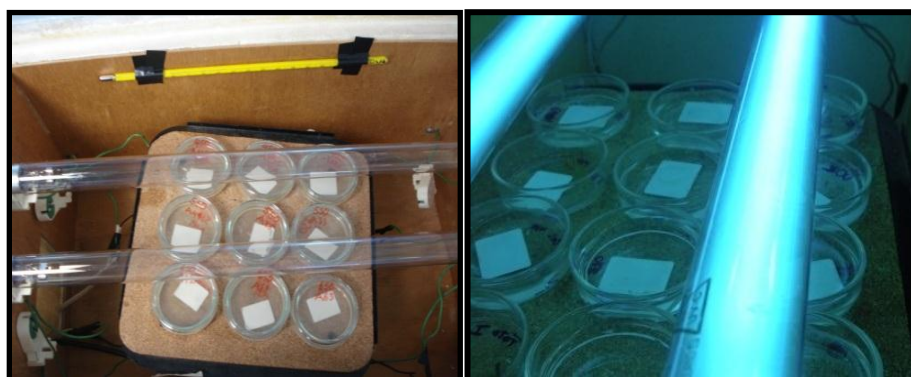


Figura 2. Tratamiento fotocatalítico con lámparas de radiación UV y visible. Diseño experimental Plackett Burman. Foto tomada del laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.2.7 Curvas de inactivación fotocatalítica bajo las condiciones seleccionadas en el diseño de Plackett-Burman

Se realizaron curvas de inactivación empleando tres vasos de cuarzo como foto reactores con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 140 mL de agua de chiller re inoculada con una concentración conocida de cada una de los serotipos de *Salmonella* (10^6 UFC/mL). Por cada réplica se colocaron en un soporte plástico seis películas de CuO/TiO₂ que equivalen a 3.12 mg del catalizador. Antes de iniciar la irradiación de las películas se estabilizó el sistema por 30 minutos en oscuridad y posteriormente, se encendieron las lámparas que estaban colocadas paralelas a 5 cm de los vasos (figura 3). La agitación se realizó empleando un agitador horizontal a 120 rpm. Para cada replica se tomaron muestras con intervalos cortos durante 65 minutos (1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 25 min, 35 min, 45 min y 65 min). Adicionalmente, se realizaron dos controles: fotólisis (UV) y adsorción (TiO₂/oscuridad). Se verificaron los supuestos estadísticos y se aplicó la prueba ANOVA para seleccionar los factores significativos.

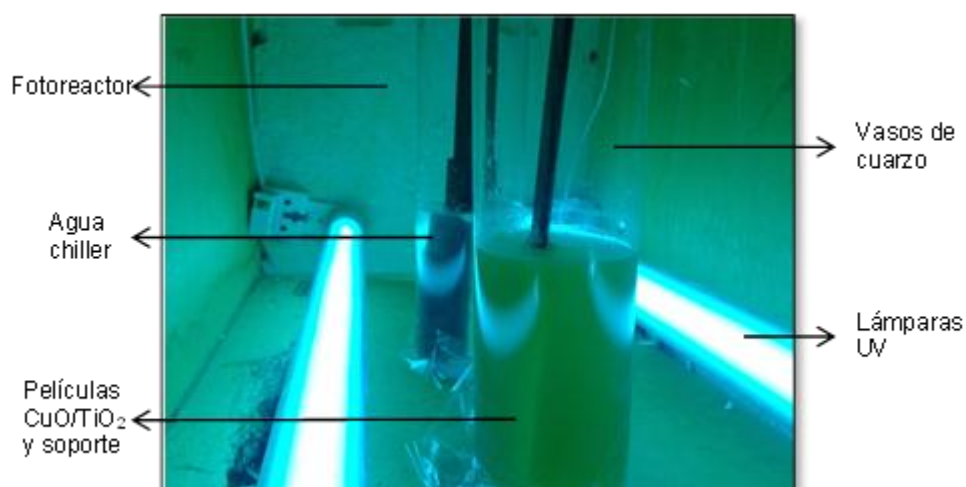


Figura 3. Curvas de inactivación para fotocatalisis con CuO/TiO₂ en fotoreactor. Foto tomada del laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.2.8 Determinación de las constantes de inactivación fotocatalítica

Con los datos obtenidos en las curvas de inactivación (UFC/mL) se calcularon las constantes inactivación fotocatalítica y fofolítica aplicando el modelo reportado por Kang y colaboradores (2010) que se presenta en la ecuación [18]

$$\ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = -kt \quad [18]$$

Donde, N_t UFC/mL en el tiempo, N_0 UFC/mL inicial, min^{-1} es la constante de inactivación en minutos, N_t/N_0 es la relación de supervivencia, t es el tiempo en minutos y b el

Para aplicar el modelo se calculó la relación de supervivencia y se transformó a Ln. La representación gráfica de $\ln (N_t/N_0)$ en función del tiempo generó una línea recta cuyo valor de pendiente es igual a la constante de inactivación. Los coeficientes de regresión superiores a 0,9 indicaron que el modelo graficado predice apropiadamente el decaimiento de la población.

4.2.9 Proceso Fenton homogéneo $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$

Para evaluar la segunda tecnología se prepararon las soluciones de trabajo y se realizó un diseño de Plackett-Burman para selección de condiciones, un diseño factorial 2^3 para evaluar los cambios realizados en el reactor del proceso Fenton y las curvas de inactivación bajo las condiciones seleccionadas previamente en los diseños experimentales. Adicionalmente, es importante aclarar para el proceso Fenton y las pruebas de tratabilidad del objetivo 3 solamente se utilizó a *S. Typhimurium* ya que esta cepa presentó mayor resistencia.

Según la concentración seleccionada por el diseño experimental de H_2O_2 y de $FeSO_4$ se realizaron las curvas de inactivación. La realización de los cálculos se expresó en H_2O_2 (ppm) y $FeSO_4$ (ppm).

4.2.14 Diseño experimental Plackett-Burman para Proceso Fenton homogéneo

Se estudió el efecto seis factores a dos niveles (+1,-1) sobre el porcentaje de inactivación de *S. Typhimurium*. Los factores y niveles evaluados se presentan en las tablas 5 y 6, y generaron un total de 12 tratamientos que se realizaron por triplicado. Como controles se realizaron corridas independientes con hierro y peróxido.

Tabla 5. Factores evaluados para el Plackett-Burman de proceso Fenton.

Factores codificados	Factores Nominales	Nivel alto	Nivel bajo
A	Tiempo	60 minutos	30 minutos
B	Concentración celular	1×10^3 UFC/mL	1×10^6 UFC/mL
C	pH	5,6	9,0
D	Agitación	120 rpm	0 rpm
E	H_2O_2	200 ppm	20 ppm
F	$FeSO_4$	100 ppm	10 ppm
G	Dumy	-	-
H	Dumy	-	-
I	Dumy	-	-
J	Dumy	-	-
K	Dumy	-	-

*Dumy: Factores no realizados.

Selección de los factores:

- Tiempo: Se determinó su nivel alto por el tiempo de retención de las carcasas del pollo en el agua de chiller y nivel bajo tiempo mínimo de inactivación por fotocátalisis reportado por estudios previos en el grupo de investigación.
- Concentración celular: La dosis mínima y máxima infectante de *Salmonella*.
- pH: Se planteó dos rangos de pH (ácido y básico), el nivel bajo corresponde a el valor de pH en el agua de la etapa chiller y el nivel alto para determinar como afecta el proceso Fenton.
- Concentración de H_2O_2 y $FeSO_4$: La concentración del catalizador y el oxidante en niveles altos y bajos se seleccionaron realizando búsqueda

bibliográfica de varios autores que reportan estas concentraciones para la inactivación de bacterias obteniendo óptimos resultados.

Tabla 6. Combinación de los factores a evaluar para *S. Typhimurium*.

Tratamiento	Factor A Tiempo (min)	Factor B Concentración Celular UFC/mL	Factor C pH	Factor D Agitación (rpm)	Factor E H ₂ O ₂ (ppm)	Factor F FeSO ₄ (ppm)
1	60	1x10 ³	9	0	20	10
2	60	1x10 ⁶	5,6	120	20	10
3	30	1x10 ⁶	9	0	200	10
4	60	1x10 ³	9	120	20	100
5	60	1x10 ⁶	5,6	120	200	10
6	60	1x10 ⁶	9	0	200	100
7	30	1x10 ⁶	9	120	20	100
8	30	1x10 ³	9	120	200	10
9	30	1x10 ³	5,6	120	200	100
10	60	1x10 ³	5,6	0	200	100
11	30	1x10 ⁶	5,6	0	20	100
12	30	1x10 ³	5,6	0	20	10

La preparación del agua de chiller con las diferentes concentraciones de *Salmonella* se realizó de la misma forma que en el tratamiento fotocatalítico. Para el montaje de cada tratamiento se colocaron en cajas de Petri de 10 mL con 5 mL del agua con *Salmonella*, H₂O₂ y FeSO₄ según los niveles de los factores E y D. El pH se monitoreo al principio y al final de cada tratamiento. A los 30 y 60 minutos se tomaron alícuotas de cada uno de los tratamientos para realizar diluciones decimales, realizar siembras en agar BHI y estimar la población de sobrevivientes para expresarlos como porcentaje de inactivación. Nuevamente se verificaron los supuestos estadísticos y se aplicó la prueba ANOVA para seleccionar los factores significativos. Por otro lado, se realizó un análisis complementario para determinar qué tratamiento fue el mejor a través de una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %. Con la premisa de que los factores significativos deben estar incluidos en los mejores tratamientos.

4.2.10 Factorial 2^3 para proceso Fenton

Dadas las necesidades de escalar el sistema de proceso Fenton para realizar las curvas de inactivación y mantener más controlado el proceso por medio de la adición continua de peróxido y control de pH, se propuso hacer un diseño experimental complementario tomando como base los factores que fueron significativos para el Plackett Burman. Se estructuró un diseño factorial $2^k=2^3=8$ tratamientos, con la adición de 3 puntos centrales (Tabla 7). Este tipo de diseño fundamentalmente busca reducir la cantidad de pruebas a realizar. Además, hace posible establecer una aproximación empírica, mediante modelos matemáticos, de la relación funcional entre la variable dependiente (porcentaje de inactivación de *Salmonella*) y las variables independientes o factores, lo cual permite caracterizar la relación y hallar, de ser posible, una condición operativa para el proceso Fenton aproximadamente óptima en el rango en el cual oscilan las variables en el diseño. La ecuación general para un modelo 2^k podría ser resumida como:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad [19]$$

Donde b_0 es el intercepto de la ecuación, b_n son los coeficientes asociados a cada factor, las letras X_1, X_2, X_3 representan el factor individual x_1x_2 y. Representan las interacciones entre factores. En este tipo de diseños se pueden evaluar puntos centrales con el fin de estimar el error puro y la curvatura del modelo. Determinando que si la curvatura es significativa se podría proponer un segundo diseño experimental pero que se enfoque en la optimización de los factores que tuvieron un efecto positivo significativo sobre la variable dependiente.

El análisis estadístico se desarrolló con el programa Design Expert ® para Windows, previa comprobación de las premisas de normalidad e independencia de los residuales aplicando un Análisis de varianza multifactorial.

Tabla 7. Factores y niveles evaluados en el diseño factorial 2^3

Tratamiento	A	B	C	pH (A)	H ₂ O ₂ (ppm) (B)	FeSO ₄ (ppm) (C)
1	-1	-1	-1	4,0	50	25
2	+1	-1	-1	5,6	50	25
3	-1	+1	-1	4,0	200	25
4	+1	+1	-1	5,6	200	25
5	-1	-1	+1	4,0	50	100
6	+1	-1	+1	5,6	50	100
7	-1	+1	+1	4,0	200	100
8	+1	+1	+1	5,6	200	100
9	0	0	0	4,8	125	62,5
10	0	0	0	4,8	125	62,5
11	0	0	0	4,8	125	62,5

4.2.11 Características del reactor de proceso Fenton y montaje de los tratamientos para el diseño factorial 2^3

Se utilizaron reactores de vidrio pyrex de 500 mL de capacidad total (figura 4). Para cada tratamiento (tabla 7) se colocaron en el vaso 150 mL de volumen efectivo de trabajo (VET) de agua de Chiller re inoculada con una suspensión de *S. Thypimurium* para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL. Para cada combinación se adicionó la cantidad de hierro a evaluar definida por los niveles del factor C y de manera continua con una bomba peristáltica se adicionó H₂O₂ a razón de 150 μ L/min, (factor B). La homogenización del catalizador se favoreció continuamente por la inyección de aire en profundidad (0,2 mL/h) y agitación de 720 rpm empleando un agitador magnético. El pH se monitoreó continuamente con un sensor de pH. Cada tratamiento se evaluó por 60 minutos y al finalizar el tiempo se tomó un alícuota para determinar las UFC/mL de *S. Thypimurium* sobrevivientes y estimar el porcentaje de inactivación. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

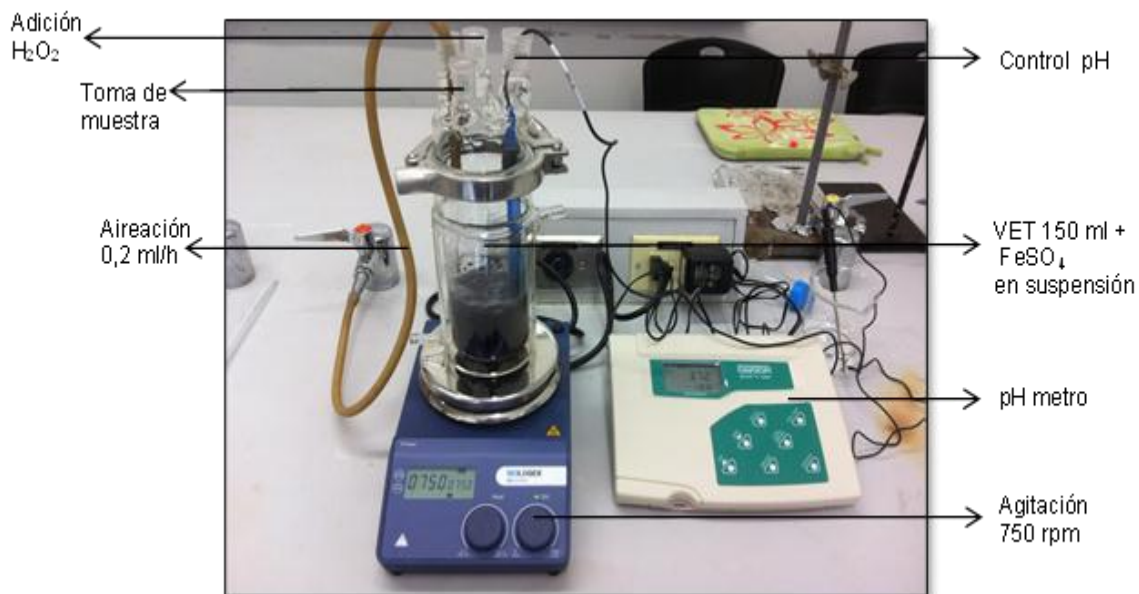


Figura 4. Reactor Proceso Fenton. Foto tomada del laboratorio de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.2.12 Curvas de inactivación para proceso Fenton homogéneo

Una vez se hechos los ajustes necesarios se realizaron las curvas de inactivación por tratamiento con reactivo Fenton colocando 150 mL de agua de chiller con *S. Thypimurium* con una concentración celular de 10^6 UFC/mL. Cada curva se evaluó por 65 minutos con una agitación de 750 rpm, adición continua de peróxido y control continuo de pH. El esquema de muestreo fue el mismo que el valorado en fotocátalisis. Adicionalmente, se realizaron dos controles: curvas con H_2O_2 y curvas con $FeSO_4$.

4.2.13 Determinación de las constantes de inactivación de proceso Fenton

De la misma forma que se realizó para fotocátalisis en este numeral se calcularon la constantes de inactivación para proceso Fenton empleando el mismo modelo cinético.

4.3 Etapa II: Comparación de los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton con tratamientos químicos con ácido peracético e hipoclorito de sodio

Para poder comparar fotocátalisis y Proceso Fenton con los desinfectantes convencionales fue necesario realizar cinéticas de inactivación para los desinfectantes.

4.3.1 Selección de condiciones para las curvas de inactivación

Los objetos de estudio fueron dos desinfectantes, ácido peracético e hipoclorito de sodio en concentraciones de 80 -160 ppm y 20 ppm respectivamente. El producto fue evaluado y sometido a prueba basado en las concentraciones de uso común en la industria. Para establecer las condiciones se llevó a cabo una prueba inicial, en la que se analizó la capacidad bactericida de los dos desinfectantes a emplear bajo condiciones experimentales definidas, esto basado en la norma técnica colombiana NTC-5150. Aplicando las modificaciones correspondientes al ensayo según el serotipo a emplear y sin empleo de neutralizante. La evaluación de la acción de los desinfectantes químicos se realizó formando una preparación homogénea de los mismos en agua de chiller, evidenciando la respuesta por parte del microorganismo inoculado.

4.3.2 Curvas de inactivación para hipoclorito de sodio y ácido peracético

Las cinéticas de inactivación se realizaron en tubos de vidrio con 9 mL de agua de chiller previamente esterilizada, se re inóculo con una concentración conocida de cada una de los serotipos de *Salmonella* (10^6 UFC/mL). La curva de inactivación se realizó a 65 minutos de exposición con los intervalos de tiempo mencionados anteriormente en las curvas de fotocátalisis y el tratamiento Fenton. Cada curva de los desinfectantes se realizó por triplicado.

Al agua de chiller se le adicionó el desinfectante diluido según la concentración a analizar, para ácido peracético 80-160 ppm y 20 ppm de hipoclorito de sodio respectivamente en el agua de chiller con agitación constante a 120 rpm (anexo 1 y 2). Al finalizar cada corrida se tomó una alícuota para realizar diluciones en base diez y sembrar por la técnica de microgota en agar BHI. Las cajas se incubaron por 24 horas a 35 °C y se estimó la población de sobrevivientes

4.3.3 Determinación de las constantes de inactivación de desinfectantes

De la misma forma que se realizó para fotocátalisis y proceso Fenton se calcularon la constantes de inactivación para proceso Fenton empleando el mismo modelo cinético.

4.4.4 Comparación de los procesos de oxidación con desinfectantes

Según los resultados obtenidos de las curvas de inactivación realizadas en las mismas condiciones experimentales (tiempos de exposición) y los resultados obtenidos de las constantes de inactivación y las unidades logarítmicas se compararon los tratamientos realizando análisis de homogeneidad de varianzas.

4.5 Etapa III: Pruebas de tratabilidad con fotocátalisis y proceso Fenton de aguas provenientes del beneficio avícola

Como se describió anteriormente en el numeral 4.1.3 las muestras tipo 2 provienen de dos empresas con niveles de producción diferentes; una empresa con producción aproximada de 300,000 pollos/día y la otra empresa de 8,000 pollos/día. Se muestreó tanto el agua de salida del chiller y el agua residual generada durante el proceso de beneficio. Se tomaron estas muestras con el propósito de retar los dos sistemas de oxidación (fotocátalisis y Proceso Fenton).

Antes de realizar los tratamientos todas las aguas se caracterizaron siguiendo las técnicas presentadas en la tabla 2. La evaluación de los dos tratamientos se realizó bajo las mismas condiciones de operación establecidas en las curvas de inactivación. La única modificación consistió en el tiempo de proceso, ya que para fotocátalisis se irradia por 35 minutos y para proceso Fenton el tratamiento fue de 15 minutos. Adicionalmente, se evaluó la inactivación de otros microorganismos como *E. coli* y coliformes totales que pudieran estar en el agua y son considerados como indicadores de contaminación del agua, para determinar si los tratamientos de oxidación avanzada pueden inactivar estos microorganismos en aguas crudas con diferentes características físicas y químicas. Estos tratamientos se realizaron por triplicado.

Para procesar los resultados se realizó un análisis de varianza donde se tuvo en cuenta la comparación de medias entre tratamiento y la homogeneidad de varianza para determinar cuál de los dos tratamientos de oxidación fue más efectivo en el tratamiento de este tipo de aguas. Las muestras se clasificaron como se observa en la tabla 8:

Tabla 8. Clasificación de las pruebas de tratabilidad.

Clasificación	Tratamiento
T1	Línea base agua chiller
T2	Línea base agua residual
T3	Fotocatálisis para agua de chiller
T4	Fotocatálisis para agua residual
T5	Proceso Fenton para agua de chiller
T6	Proceso Fenton para agua de residual

5. Resultados y discusiones

5.1 Etapa preliminar

5.1.1 Curvas de crecimiento para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*

Las dos cepas realizaron una etapa de adaptación en los primeros 60 minutos, a continuación se evidenció la fase de crecimiento exponencial que se prolongó hasta los 360 minutos. Posteriormente, se observó una fase de desaceleración que se prolongó hasta el final de las dos curvas, sin que se evidenciara la fase de muerte. La tendencia de los datos podría relacionarse con el consumo acelerado de la fuente de carbono sencilla (glucosa), con posterior utilización de los componentes del caldo de enriquecimiento BHI (Brain Heart Infusion) los cuales fueron utilizados más lentamente y se vio reflejado en el crecimiento menor de las dos serotipos sin que pueda considerarse como una verdadera fase estacionaria por el agotamiento en el medio de la fuente de carbono y nitrógeno. Una tendencia similar fue reportada por Juneja et al., 2006, en su estudio determinaron que *Salmonella* spp en el mismo medio de cultivo alcanzo la máxima producción de biomasa a las 6.5 horas (84). (Figura 5).

Con respecto a los parámetros relacionados con velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación se observó que la cepa de *S. Typhimurium* creció más rápido que *S. Enteritidis* y por consiguiente los tiempos de duplicación más cortos (tabla 9). Esto podría convertirse en un mecanismo adicional de tolerancia a condiciones adversas ya que esta bacteria podría restablecer rápidamente su población si las condiciones ambientales son favorables. Determinando que si los sistemas de desinfección o tratamiento no son muy eficientes la población incrementara generando nuevamente un riesgo de contaminación en el agua, materias primas o producto terminado.

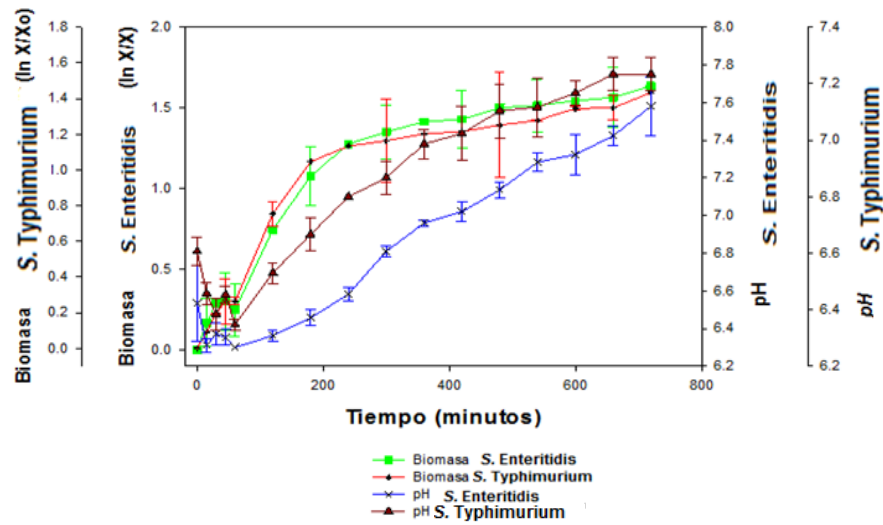


Figura 5. Curvas de crecimiento para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en caldo BHI. 12 horas, 35 °C 120 rpm y pH 7,0

Tabla 9. Parámetros de crecimiento para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Serotipo	Biomasa (g/L)	Recuento de colonias (UFC/mL)	Velocidad específica de crecimiento (μh^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
<i>S. Enteritidis</i>	1,21 ± 0,0164	26x10 ¹⁰ ± 10x10 ¹	0,0069 ± 0,00069	1,68 ± 0,159
<i>S. Typhimurium</i>	1,40 ± 0,15	12x10 ¹² ± 10x10 ¹	0,3908 ± 0,063	0,03 ± 0,004

Por otro lado, al conocer las curvas de crecimiento de las dos bacterias se estableció que con 12 horas de cultivo se podrían obtener biomazas altas de las dos bacterias para poder producir los inóculos que se utilizaron para acondicionar el agua de chiller con una concentración conocida de *Salmonella* de acuerdo con los diseños experimentales y en las curvas de remoción, como se detallará más adelante.

5.1.2 Caracterización de agua de salida del proceso chiller:

Los resultados de la caracterización física química y microbiológica de la muestra de agua de salida de chiller (muestra tipo 1), se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros físicos y químicos y microbiológicos. Agua de salida de proceso chiller

Parámetros	Resultado
	Agua de Salida de chiller (Agua tipo 1).
pH (unidades)	6.9
Conductividad $\mu\text{mhos/cm}$	800
OD (ppm)	8.5
Grasas y aceites ppm	1050
Unidades de color (UC)	220
Ausencia presencia <i>Salmonella</i> /100mL	Ausencia
DQO (ppm)	1400
DBO ₅ (ppm)	924

El decreto 1575 de 2007 para agua potable menciona el rango permitido de pH (6.5 y 9.0). En este tipo de agua proveniente del proceso chiller se obtuvo un pH de 6.9 valor permitido dentro de los parámetros de la legislación de agua potable en Colombia. Este valor de pH obedece a que en el proceso avícola en la etapa chiller se mantiene un pH de 6.5 aproximadamente para realizar la desinfección con hipoclorito de sodio.

La conductividad establece una medida de los iones que se encuentran en el agua influenciando la calidad del agua (85); también puede relacionarse con la cantidad de sólidos disueltos. Se obtuvo un valor de conductividad de 800 $\mu\text{mhos/cm}$. El decreto de agua potable nombrado anteriormente establece un rango 50 a 1000 $\mu\text{mhos/cm}$. El valor obtenido obedece a que el agua utilizada en el proceso la mayoría de veces se recircula, por esta razón es normal encontrar cantidades elevadas de carga orgánica en el agua.

EL valor de oxígeno disuelto (O.D) fue de 8.5 ppm; si el valor obtenido es menor que 4 mg/L; hay un posible incremento de la población bacteriana (86). Otro parámetro que se tuvo en cuenta fue la cuantificación de grasas y aceites; el valor para este tipo de agua fue de 1050 ppm, la normatividad en agua potable no acepta ningún valor de grasas y aceites, pero como se mencionó anteriormente debido a la naturaleza del proceso y a la recirculación del agua se van encontrar valores elevados que puede afectar los procesos de desinfección del agua.

El decreto 1575 de 2007 incluye como parámetro microbiológico indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y coliformes totales. *Salmonella* no es considerado un indicador, pero es un patógeno importante en la industria avícola el cual es importante evaluar la presencia de *Salmonella* en el agua utilizada en estas industrias.

Aunque no hay valores establecido de la DQO y DBO₅ para aguas potables se realizó el análisis como indicador para tener conocimiento en qué condiciones estaba el agua de salida de chiller. Comparando los valores de la DQO (1400 ppm) y DBO₅ (924 ppm) con la resolución 3930 de 2010 versión IV sección para límites máximos permisibles de vertimiento de empresas industriales a alcantarillado público, los datos exceden el límite establecido (DQO=800 ppm y DBO₅= 300 ppm); estos resultados están asociados con el reusó del agua en la inmersión de las canales de pollo donde se incrementa los niveles de materia orgánica.

5.2 Etapa I: Selección de condiciones para los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton

5.2.1 Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO₂)

5.2.2 Obtención y caracterización de las películas de TiO₂ y CuO/TiO₂

Los resultados obtenidos de la caracterización física de las películas de TiO₂ de las películas modificadas CuO/TiO₂ fueron los siguientes:

- *Microscopia electrónica de barrido (MEB)*

En la figura 6, se presentan las imágenes obtenidas a partir de la caracterización por MEB de las películas de TiO_2 con diferentes aumentos. En las fotografías se puede apreciar que se logró un recubrimiento total del sustrato con el óxido semiconductor, no obstante, existen unas zonas con recubrimiento no homogéneo. Los agregados presentan una morfología mayoritariamente esférica lo cual probablemente es el resultado del proceso de sedimentación. Dicha forma de las partículas puede favorecer el empaquetamiento sobre el sustrato y maximizar el contacto con el mismo (74,87).

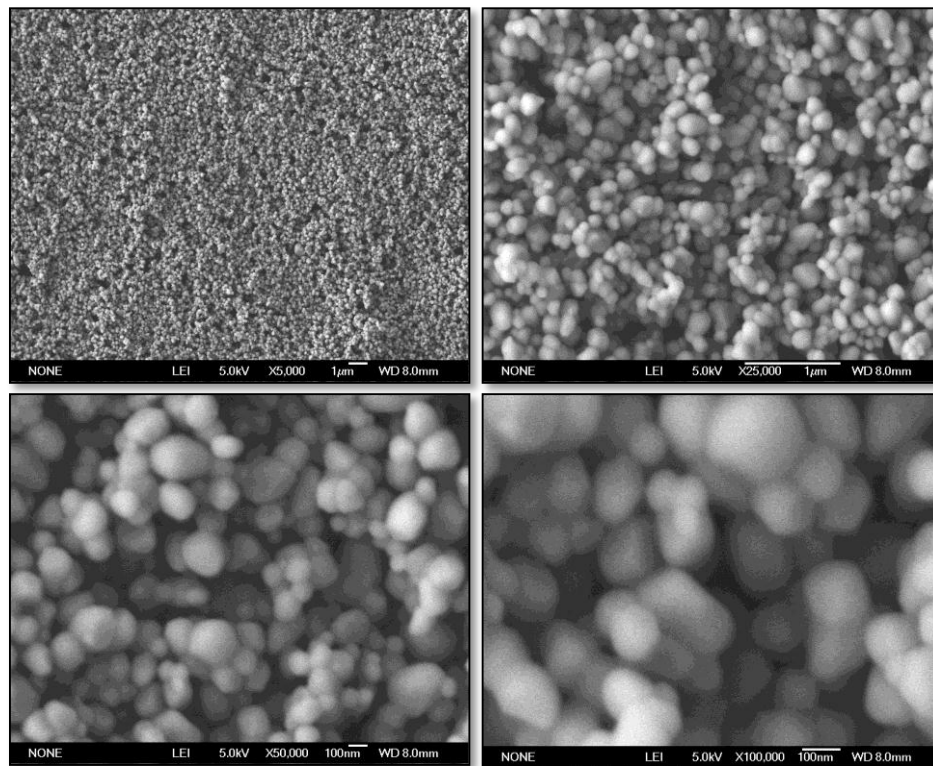


Figura 6. Imágenes MEB para las películas de TiO_2 elaboradas por la técnica sol/gel. Calcinación a 450 °C.

La uniformidad de la película generalmente está relacionada con la velocidad de sedimentación y con el pH. En efecto, a valores de pH bajos como los usados en el presente trabajo, el TiO_2 se carga positivamente y se genera repulsión entre las

partículas, evitando el crecimiento de agregados; a valores cercanos al punto isoelectrico, se favorece una rápida sedimentación causando que las partículas grandes arrastren a las partículas pequeñas formando agregados de mayor tamaño (59).

Por otro lado las películas modificadas con Cu calcinadas a 450 °C el precursor (CuSO_4) se descompone para formar CuO el cual probablemente está depositado sobre la superficie de las partículas de TiO_2 formando un recubrimiento. Las fotografías (figura 7) demuestran que los sustratos fueron completamente cubiertos observándose una capa de mayor compactación respecto a la de TiO_2 .

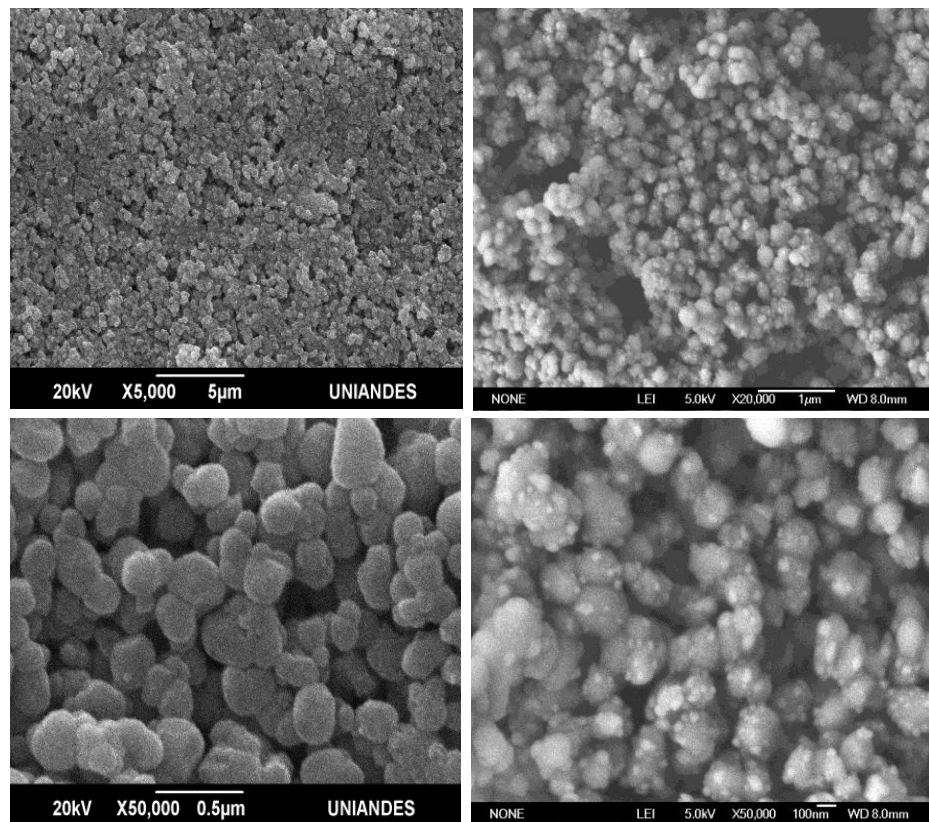


Figura 7. Imágenes MEB para las películas de CuO/TiO_2 elaboradas por la técnica sol/gel. Calcinación a 450 °C/2 h

En este caso, la deposición fue realizada de idéntica forma que para el TiO_2 , sin embargo, a partir de las micrografías es claro que la inclusión de CuO modificó la morfología de los agregados ya que para este material se observan partículas con

formas heterogéneas. A mayores aumentos, fue posible observar pequeños agregados que posiblemente pueden corresponder a la formación de clústers de CuO sobre las partículas de TiO₂. Los resultados de Huang y colaboradores (2009) sustentan la anterior hipótesis, en su estudio establecieron que cuando se modifica al TiO₂ con Cu se observan unas partículas esféricas más pequeñas debido a la formación de CuO superficial, así mismo, señalan que la presencia de estas partículas depende de la concentración de Cu depositado (89,90).

En la figura 8, se presenta una distribución (histograma) de los tamaños de agregado observados para las películas de TiO₂ y CuO/TiO₂. El histograma señala para el TiO₂ una distribución bimodal con tamaños mayoritariamente entre 20-60 nm y 180-260 nm; por su parte, la película de CuO/TiO₂ presenta tamaños mayoritarios entre 140-220 nm. Los tamaños de agregado para las películas de CuO/TiO₂, en mayor proporción, son de tamaños mayores en comparación con las películas de TiO₂, esto debido a que el CuO se deposita (nuclea) sobre las partículas de TiO₂ incrementando su volumen (como fue observado en las imágenes) (91,92).

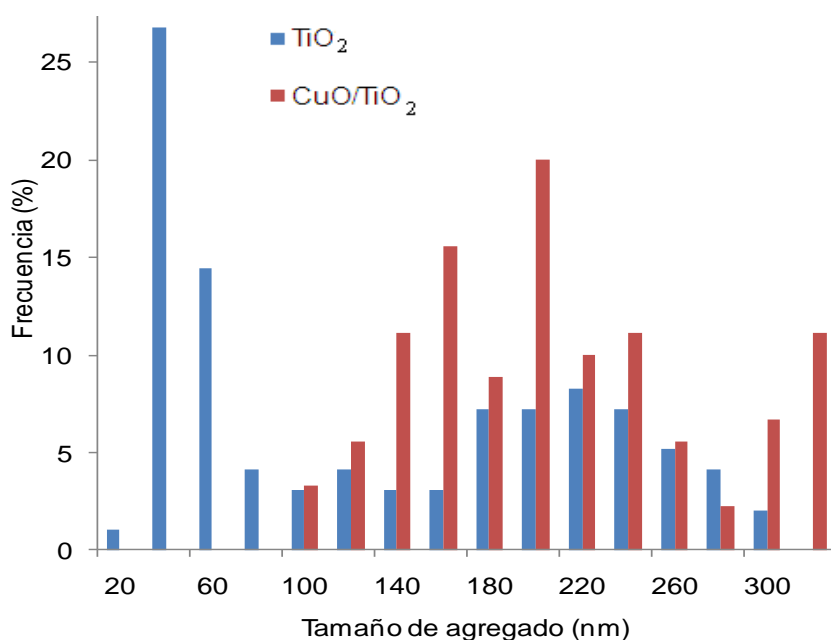


Figura 8. Distribución de tamaño de agregado obtenida a partir de MEB (El histograma fue construido luego de la medición de una población de 100 partículas con el software ImageJ®).

- *Espectros EDS: composición química*

Los espectros EDS se determinaron para medir semi-cuantitativamente la composición química de cada película (figura 9).

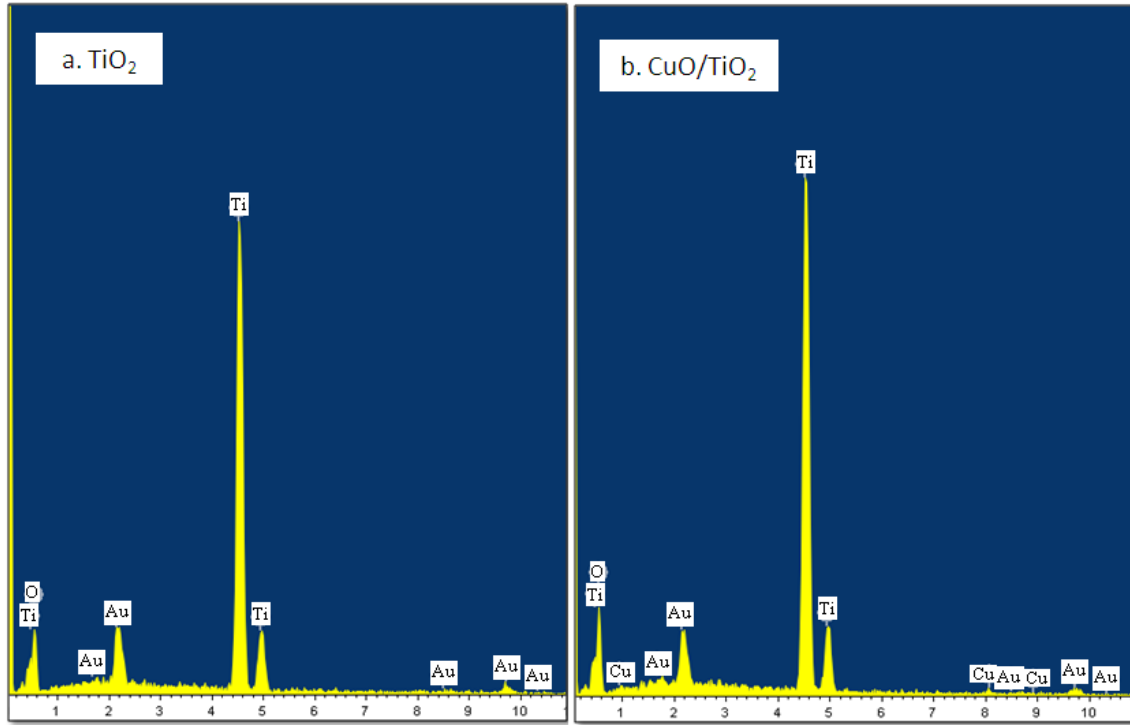


Figura 9. Espectros EDS para las películas calcinadas a 450 °C; a) EDS de TiO₂, b) EDS de CuO/TiO₂.

Los resultados indican una composición rica en oxígeno, se observa una proporción de oxígeno mucho más alta que la estequiométrica (ver relaciones atómicas en la tabla 11). Esto puede deberse a que la técnica EDS no es capaz de medir a grandes profundidades (menor a 100 Å) sobre el material lo que causa una sobreestimación de los átomos superficiales de la red cristalina (oxígeno) (93,97).

Mediante la técnica EDS fue posible determinar la efectividad de la modificación con CuO de las películas de TiO₂ en una proporción menor al 0,5 % en masa (tabla 11) (94).

Tabla 11. Composición obtenida por EDS para las películas calcinadas a 450 °C/2 h.

Película	Masa (%)			Átomo (%)			Relaciones atómicas		
	O	Ti	Cu	O	Ti	Cu	Ti/O	Cu/O	(Ti+Cu)/O
TiO ₂	84,96	15,04	nd	94,42	5,58	n.d.	0,05910	n.d.	n.d.
CuO/TiO ₂	86,12	13,62	0,26	94,90	5,01	0,07	0,05279	7,376X10 ⁻⁴	0,05353

n.d.= no detectado debido al límite de cuantificación de la técnica.

- *Difracción de rayos X (DRX)*

La difracción de rayos X se empleó para determinar las fases cristalógicas de las películas de TiO₂ y de CuO/TiO₂, este análisis es importante considerando que la presencia de la fase anatasa favorece los procesos fotocatalíticos (74).

Los DRX obtenidos se presentan en la figura 10. Las señales obtenidas, en ambos casos, corresponden a los planos cristalinos de la fase anatasa, lo cual es coherente dada la temperatura de calcinación empleada en el presente trabajo. En los DRX no se observa la presencia de la fase rutilo ni tampoco señales correspondientes al CuO, esto último debido a que el límite de detección de DRX generalmente es superior al 1 % en masa como se observó en la tabla 11, el CuO está presente en una proporción menor a este valor (94,95).

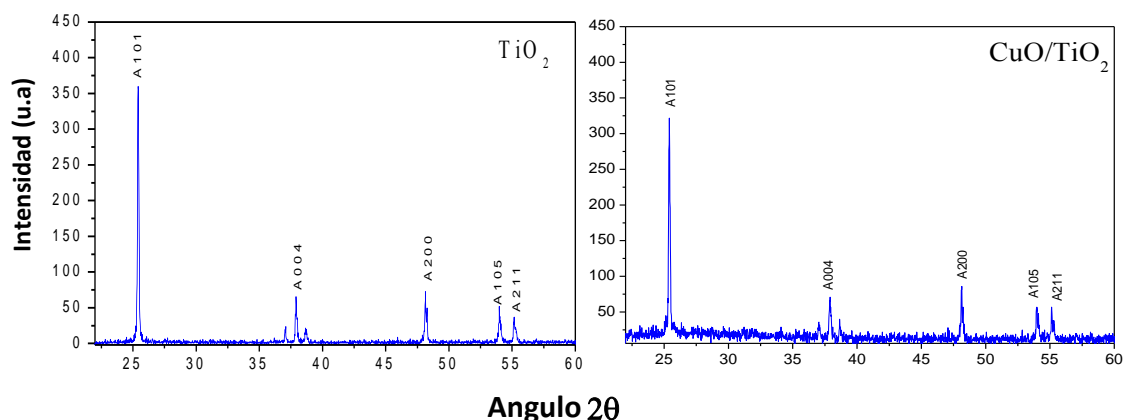


Figura 10. DRX para las películas calcinadas a 450 °C/2 h. TiO₂ y CuO/ TiO₂

- *Microscopia de fuerza atómica (MFA)*

La MFA fue empleada para determinar la rugosidad de la superficie de las películas de TiO_2 y CuO/TiO_2 (96). La figura 11 presenta los resultados los cuales señalan que la película de TiO_2 tiene mayor rugosidad en comparación con la película de CuO/TiO_2 ; lo anterior, guarda correlación con lo observado en las micrografías MEB. Además, las imágenes indican que el crecimiento de la película de TiO_2 favoreció la formación de “islas” de agregados, tal como lo señalan diferentes autores, estas islas pueden ser recubiertas por la presencia de CuO lo que aumenta la compactación del material (90,98). De igual manera, se observa que la película de CuO/TiO_2 presenta mayores tamaños de agregado lo cual es coherente con los resultados de MEB. Por otra parte, es posible estimar que el espesor de la película en ambos casos es inferior a 123 nm (99,100).

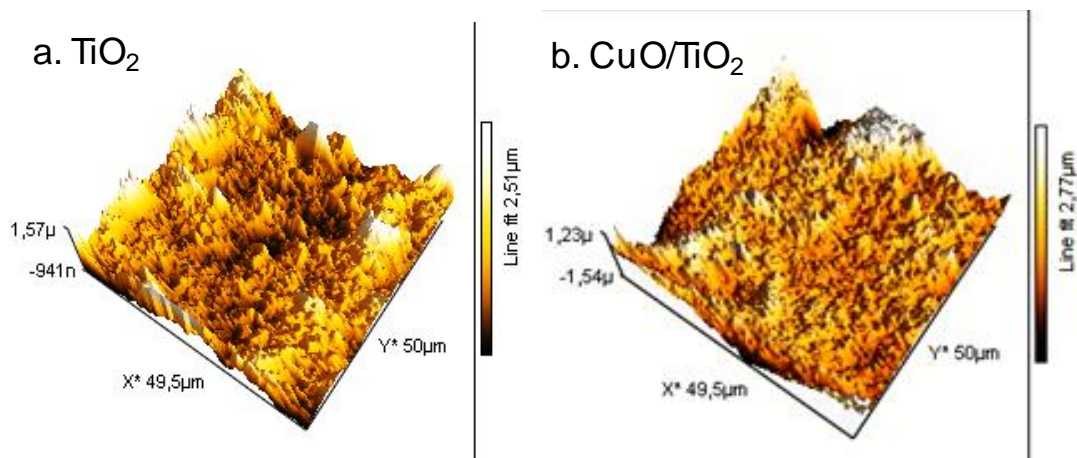


Figura 11. Imágenes de MFA para las películas calcinadas a 450 °C/2 h.

- *Curvas espectrales*

En la figura 12 se encuentran las curvas espectrales realizadas para las películas de TiO_2 y CuO/TiO_2 . En la gráfica se pudo encontrar la E_g en T (transmitancia) versus $h\nu$ que corresponde a la energía de los fotones. Los valores experimentales de las películas elaboradas por medio de sol/gel para TiO_2 calcinadas a 450 °C presentó un E_g de 3.28 eV. Este valor de energía corresponde a la longitud de onda que cae en

el espectro UV, lo que sugiere que esta fuente de luz potencializa la formación de radicales que inciden sobre el sólido (89).

Con las películas modificadas con CuSO_4 (CuO/TiO_2) en la cual hubo una inserción de nuevos materiales para realizar la modificación elaboradas también por la técnica sol/gel y calcinadas a $450\text{ }^\circ\text{C}$ presentó un valor de E_g de 3.08 eV (figura 12), este valor en comparación con el valor de las películas sin modificar representa un corrimiento importante que aunque no está dentro del espectro visible y potencializa la fotocatalisis con radiación UV. Este valor puede estar relacionado por la inserción de materiales como el Cu que se puede distribuir en la red del TiO_2 y actuar como especie fotoactiva (61,97). Estos resultados de modificación fueron determinantes en los porcentajes de inactivación obtenidos con los dos serotipos de *Salmonella*.

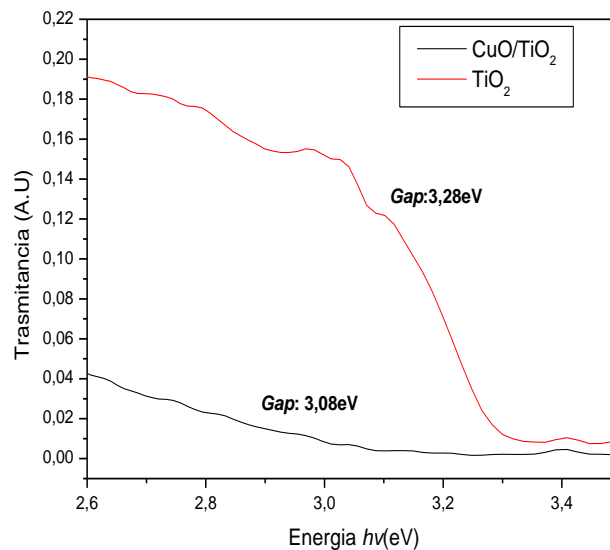


Figura 12. Curvas espectrales. La línea roja corresponde a las películas de TiO_2 calcinadas a $450\text{ }^\circ\text{C}$ $gap\ 3.2\text{ eV}$. Línea negra corresponde a las películas modificadas CuO/TiO_2 calcinadas a $450\text{ }^\circ\text{C}$, valor de $gap\ 3.08\text{ eV}$.

5.2.3 Diseño experimental Plackett-Burman para fotocatalisis

En la tabla 12, se presenta el resumen del análisis de varianza y los coeficientes de regresión para los diseños realizados con los dos serotipos de *Salmonella*. Observando que los modelos obtenidos tenían buen R^2 lo que demostró buena

correlación entre los valores predichos y los observados (anexo 3). Adicionalmente, los dos presentaron una precisión adecuada (9.2 y 7.8) ya que es deseable que sea superior a 4.0 para poder analizar los resultados del modelo. Una vez verificada la calidad del modelo se procedió a determinar cuáles fueron los factores que generaron el efecto principal y se determinó que los factores E y F (tipo de película y tipo de lámpara) tuvieron un efecto significativo sobre la inactivación de los dos serotipos de *Salmonella* con valores de $p = 0.0265$, 0.0005 , 0.0247 y 0.0012 , para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (anexo 4 y 5). Con respecto a los coeficientes de regresión el signo determinó si es más favorable el nivel bajo (-1) o el nivel alto (+1) para continuar con futuros experimentos de optimización. En el presente estudio de los valores obtenidos se presentan en las ecuaciones 20 y 21. Según los resultados, los signos del factor E son positivos, por lo tanto, es más favorable trabajar con las películas modificadas con cobre y para el factor F es mejor trabajar con las lámparas de 254 nm (signo negativo).

$$\text{Inactivación (\%)} S.E = 36 - 3.13_A + 6.22_B + 4.54_C + 6.22_D + 13.3_E - 36.6_F \quad [20]$$

$$\text{Inactivación (\%)} S.T = 41.35 + 0.57_A + 4.66_B + 1.74_C + 2.02_D + 15.93_E - 33.25_F \quad [21]$$

Tabla 12. Resultados y coeficientes de regresión para el Plackett Burman de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Factor	<i>Salmonella</i> Enteritidis						<i>Salmonella</i> Thypimurium					
	Inactivación (%)						Inactivación (%)					
	SC	GL	CMg	Valor F	Proba>f	CR	SC	GL	CM	Valor F	Proba>f	CR
Modelo	19261.90	6	3210.32	13.47	0.005	36.12	16659.90	6	2776.65	9.18	0.0139	41.35
a	116.60	1	116.60	0.49	0.5155	-3.12	3.85	1	3.85	0.013	0.9146	0.57
b	463.80	1	463.80	1.95	0.2219	6.22	261.12	1	261.12	0.86	0.3955	4.66
c	247.47	1	247.47	1.04	0.3550	4.54	36.26	1	36.26	0.12	0.7433	1.74
d	463.80	1	463.80	1.95	0.2219	6.22	49.10	1	49.10	0.16	0.7037	2.02
e	2310.28	1	2310.28	9.69	0.0265	13.88	3045.22	1	3045.22	10.06	0.0247	15.93
f	15659.96	1	15659.96	65.69	0.0005	-36.12	13264.36	1	13264.36	43.84	0.0012	-33.25
Residuales	1191.98	5	238.39				1512.88	5	302.58			

Correlación total	20453.84	11					18172.78	11				
R ²	0.8718					R ²	0.8169					
Precisión adecuada	9.250					Precisión adecuada	7.844					

*p= <0,05 indican los términos son significativos. Suman de cuadrados (SM), grados de libertad (GL), cuadrado medio (CM), valor F (F), Probabilidad (>P) y coeficientes de regresión (CR).

Los tratamientos que contenían estos factores en los niveles que favorecieron la inactivación de las dos Salmonellas fueron T₃, T₅ y T₈, con valores del 100 % (Figura 13 y tabla 13). No obstante entre ellos no se observaron diferencias significativas (p>0.0001) por lo tanto, se seleccionó el tratamiento 5 (60 min, 1x10⁶ UFC/ml, pH 5.6, agitación, CuO/TiO₂ y lámparas UV) para continuar con las curvas de inactivación ya que el pH seleccionado es de 5,6 que es el valor que se debe usar en condiciones de operación en el proceso chiller del beneficio avícola (36).

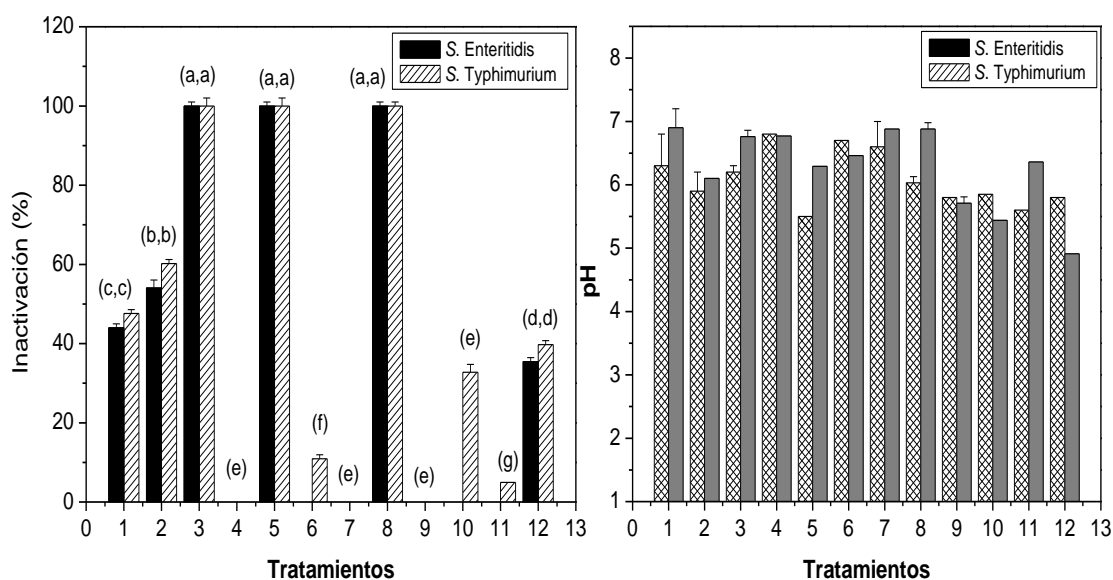


Figura 13. Diseño experimental Palckett-Burman para fotocatalisis con TiO₂. Porcentajes de inactivación y pH final para los 12 tratamientos evaluados para S. Enteritidis y S. Typhimurium.

Tabla 13. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para fotocatalisis. Porcentajes de inactivación para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*

Tratamiento	(%) Inactivación <i>S. Enteritidis</i>	(%) Inactivación <i>S. Typhimurium</i>
1	44,01	47,60
2	54,22	60,22
3	100,00	100,00
4	0,00	0,00
5	100,00	100,00
6	0,00	10,91
7	0,00	0,00
8	100,00	100,00
9	0,00	0,00
10	0,00	32,75
11	0,00	4,94
12	35,50	39,75

Los resultados obtenidos de los porcentajes de inactivación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* por el tratamiento de fotocatalisis están directamente relacionados con la foto excitación provocada por radiación UV con energía suficiente que permite que los electrones presentes en la banda de valencia (BV) superen el *gap* propio del material (3-3,2 eV) pasando a la banda de conducción (BC) (50).

Se produce la interacción de los pares e^-/h^+ en las superficie de las películas de CuO/TiO₂ que reaccionan con especies presentes en el medio permitiendo la formación de especies fuertemente oxidantes como los radicales hidroxilo $\bullet OH$ y de otras especies como $O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet-}$ que producen daño y alteración a la célula bacteriana (59,101).

Como se mencionó anteriormente el daño celular producido por la fotocatalisis con TiO₂ se da por el ataque de los radicales hidroxilo a la membrana celular $\bullet OH$ alterando la permeabilidad de la membrana y posterior daño en la pared celular (59). El ADN absorbe la radiación UV alterando las purinas y pirimidinas llevando a la formación de dímeros e hidratos, produciendo dimerización y ruptura de la estructura del ADN (69) y la posible muerte celular. Los porcentajes de inactivación obtenidos

fueron del 100 % para los tratamientos en donde hubo interacción con radiación UV y películas modificadas CuO/TiO₂.

La luz visible (3.5 eV) no proporciona la energía suficiente para provocar la excitación de los e⁻, inhibiendo la producción de los radicales •OH. Como resultado no tuvo un efecto significativo sobre la inhibición en los dos serotipos de *Salmonella* en los tiempos evaluados (103). Los resultados de inactivación con lámparas de luz visible y película de TiO₂ y CuO/TiO₂ no fueron efectivos; el mejor porcentaje de inactivación fue de 32 % para el tratamiento 10 sugiriendo que un aumento en el tiempo de exposición a la luz visible, mejora la eficiencia de fotocatalisis con películas modificadas con CuSO₄ como lo reportó Villanueva donde obtuvo porcentajes de inactivación del 99,9% para *E. coli* con este mismo tipo de películas (CuO/TiO₂) en un tiempo de 6 horas (360 minutos), o lo reportado por Xiong y colaboradores en la degradación de colorante rojo brillante con resultados del 100% de degradación del colorante con películas de TiO₂/Cu₂O durante 9 horas (59,104).

Benabbou y colaboradores, reportan que en los primeros 10 minutos de la radiación con este tipo de emisión se produce un proceso de autodefensa y mecanismos de auto reparación de la célula bacteriana. Debido a la baja intensidad lumínica se necesita un tiempo mínimo de 90 a 180 minutos para llevar a cabo el proceso de inactivación (9,106).

Investigaciones recientes se han enfocado en la modificación de TiO₂, para potencializar el proceso con radiación UV (107-108). El cobre (Cu) es un metal que ofrece características importantes en la modificación del material produciendo un incremento del área superficial que está directamente relacionado con la actividad fotocatalítica (60,95). Otro factor importante son los iones que se encuentran en la superficie del TiO₂; estos iones pueden capturar los electrones foto inducidos y transferir al Cu a la superficie de TiO₂ evitando la recombinación (109,111,112).

En los resultados obtenidos de los controles: UV (fotolisis) se encontraron porcentajes de inactivación del 100 % debido a la radiación directa de radiación UV a la solución con *Salmonella*. Este resultado podría deberse a un flujo elevado de

fotones que ataca a las bacterias, favorece la velocidad de reacción y evita los mecanismos de foto reactivación (53). De igual forma se realizó un control de fotocatalisis con las lámparas de luz visible con los dos tipos de películas en donde no se presentó inactivación. Como se indicó anteriormente la utilización de la luz visible en los tiempos de exposición del Plackett-Burman fueron ineficientes para la inactivación de los dos serotipos de *Salmonella* evaluados.

La literatura indica que los procesos de fotocatalisis con un semiconductor son más eficientes a un rango de pH de 3 a 5, ya que afecta de manera directa la superficie del catalizador y la forma química del compuesto a degradar; si el pH es ácido la velocidad de reacción es mayor porque el TiO_2 se carga positivamente generando atracción entre los compuestos a degradar o microorganismos facilitando la eliminación de estos por medio de especies reactivas generadas por la radiación UV sobre la superficie de CuO/TiO_2 (11). Se esperaba que a pH de 5,6 la inactivación fuera superior que a pH 9.0; pero no hubo diferencias sobre la tasa de inactivación con los dos serotipos de *Salmonella* spp. No obstante, es poco usual encontrar aguas tan alcalinas en la industria de beneficio avícola ya que genera deterioro de las tuberías por deposición de sales de calcio y magnesio. Los tratamientos T_3 y T_8 se realizaron con un pH de 9.0 donde obtuvo inactivación del 100 %.

5.2.4 Curvas de inactivación para fotocatalisis con CuO/TiO_2

Los resultados de las curvas de inactivación para los tratamiento con fotocatalisis CuO/TiO_2 en agua de chiller demostró que a los 25 minutos de exposición para *S. Enteritidis* el porcentaje de inactivación fue del 100% y a los 35 minutos de exposición para *S. Typhimurium*. Se realizó recuento en profundidad donde no observó reactivación de la población bacteriana en los 65 minutos de exposición. (Figura 14).

Con el control de fotolisis (UV), se obtuvo 100% de inactivación a los 55 minutos de exposición para *S. Enteritidis* y a los 45 minutos de exposición para *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos de fotolisis en el diseño Plackett-Burman no se evidenció

diferencias en los porcentajes de inactivación para fotocatalisis y fotolisis a los 60 minutos de exposición.

Como se pudo determinar en las curvas de inactivación la fotocatalisis con CuO/TiO_2 es más eficiente que fotolisis, esto se debe a que la irradiación de la radiación UV se da sobre la superficie del sólidos semiconductor (CuO/TiO_2) potencializando la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ y otras especies con poder oxidativo.

Por el contrario en los resultados obtenidos para el control de adsorción a 65 minutos de exposición no se observaron disminuciones de las poblaciones de los dos serotipos de *Salmonella*; por el contrario se evidenció un incremento en los recuentos sugiriendo que los dos serotipos de *Salmonella* asimilaron los nutrientes existentes en el agua para su proceso de crecimiento durante los 65 minutos de exposición.

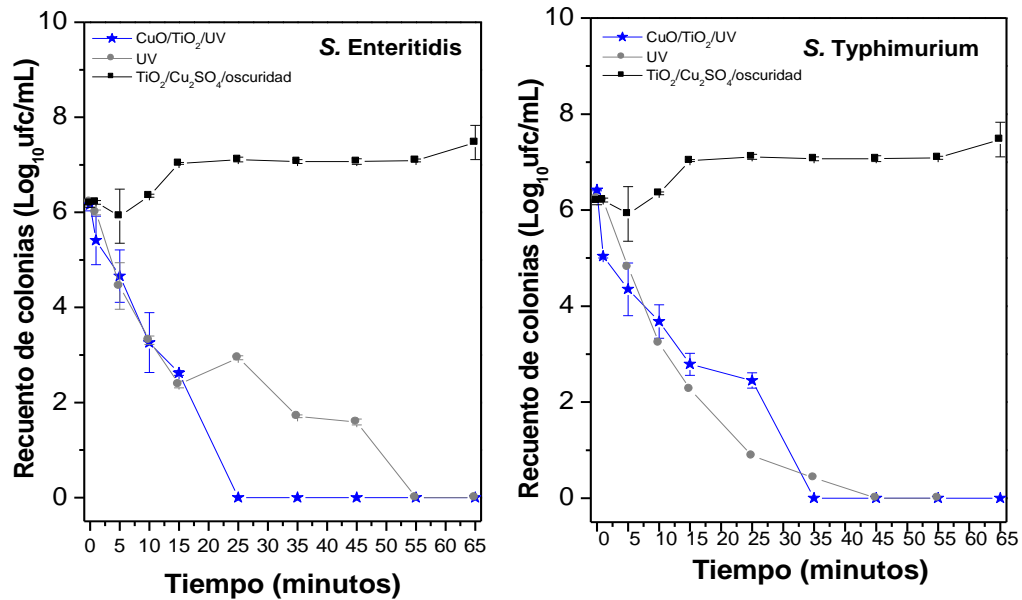


Figura 14. Curva de inactivación para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* para fotocatalisis con CuO/TiO_2 , controles de UV (fotolisis) y adsorción (oscuridad)

Con respecto los resultados obtenidos de las constantes de inactivación (min^{-1}) las mejores constantes fueron para el tratamiento de $\text{CuO}/\text{TiO}_2/\text{UV}$ para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Los resultados están en la tabla 14.

Tabla 14. Constantes cinéticas y coeficiente de regresión para la inactivación de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en fotocatalisis heterogénea con $\text{CuO}/\text{TiO}_2/\text{UV}$ y UV (fotolisis).

Microorganismos	$\text{CuO}/\text{TiO}_2/\text{UV}$ $K (\text{min}^{-1})$	R^2	UV $K (\text{min}^{-1})$	R^2
<i>S. Enteritidis</i>	$0.479 \pm 0,012$	0.998	$0.229 \pm 0,0065$	0,98
<i>S. Typhimurium</i>	$0.364 \pm 0,0045$	0.997	$0.298 \pm 0,07$	0,99

Las constantes de inactivación se relacionan con la velocidad de muerte de los microorganismos expuestos a un determinado tratamiento. Entre más alto es el valor de la constante, la inactivación es más rápida y está directamente relacionado con la efectividad del tratamiento fotocatalítico (97). Las constantes de inactivación obtenidas para fotocatalisis con CuO/TiO_2 para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron de $k = 0,479 \text{ min}^{-1}$ y $k = 0,364 \text{ min}^{-1}$ respectivamente.

Según los resultados obtenidos de las constantes de inactivación para fotocatalisis con CuO/TiO_2 se obtuvo mayores resultados y por consiguiente el tratamiento demostró ser mas efectivo; debido a la presencia del semiconductor modificado con Cu el cual le concedió características al TiO_2 , mejorando su eficiencia de inactivación ya que el Cu, actúa como una trampa de electrones evitando la recombinación de los pares e^-/h^+ ; adicionalmente estos iones de Cu tiene la facilidad de dispersarse en la red del TiO_2 favoreciendo el proceso fotocatalítico (95,113).

En el control de fotolisis también se obtuvo constantes de inactivación para *S. Enteritidis* de $k = 0.229 \text{ min}^{-1}$ y *S. Typhimurium* de $k = 0.298 \text{ min}^{-1}$ pero como se pudo observar el valor de las constantes de inactivación fue menor que el de el valor de $\text{CuO}/\text{TiO}_2/\text{UV}$; esto se debe a la presencia no solo de la radiación UV sino de la

superficies del sólido semiconductor que potencializa la generación de radicales $\bullet\text{OH}$ y otras especies con poder oxidativo.

Se han realizado múltiples estudios sobre la modificación del TiO_2 ; Villanueva (2010), realizó modificación con CuSO_4 utilizando lámparas de luz visible para la inactivación de *E. coli* obteniendo resultados de inactivación cercanos al 100 % a los 720 minutos de exposición (59). Karunakaran y colaboradores (2010), reportaron la inactivación de *E. coli* con la modificación con Cu proveniente de la síntesis de $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ con luz visible obteniendo resultados eficientes a los 30 minutos (108). Por otro lado, Rengifo y colaboradores (2010), estudiaron el dopamiento con nitrógeno y azufre preparado con urea y tiourea para ser utilizado con luz visible para la inactivación de *E. coli* y eliminación de fenoles (109).

También se ha modificado con otros materiales; Kang y colaboradores realizaron modificación con la platino (Pt) CdS/Pt-TiO_2 mejorando la absorción de fotones y resultados eficientes en la inactivación de *E. coli* (97). Liu y colaboradores realizaron la modificación con plata Ag/TiO_2 y demostraron la inactivación de *E. coli* con radiación UV y en oscuridad (110).

También se ha reportado éxito en la remoción de colorantes, se ha modificado con $\text{Cu}_x\text{S/TiO}_2$ para la degradación de colorantes como el azul de metileno y naranja de metilo (60), se ha estudiado la actividad fotocatalítica de Cu-TiO_2 (61), en el tratamiento de agua residuales (74), degradación de contaminantes orgánicos y separación de agua por medio de TiO_2/CuO con luz visible (104). Estos estudios demuestran que el proceso de modificación del TiO_2 resulta ser exitoso obteniendo mejores resultados en la inactivación de microorganismos y en otro tipo de procesos como la remoción de colorantes y contaminantes. La mayoría de estudios se han enfocado en la inactivación de *E. coli*.

5.2.5 Proceso Fenton

Se realizaron dos diseños experimentales PlackettBurman y un factorial 2^3 , con los resultados obtenidos se procedió a realizar las curvas de inactivación. A continuación se presentas los resultados para cada una de los experimentos.

5.2.6 Plackett-Burman para proceso Fenton homogéneo

En la tabla 15, se presenta el resumen del análisis de varianza y los coeficientes de regresión para el diseño realizado con la cepa de *S. Typhimurium*. Observando que el modelo obtenido tenían buen R^2 lo que demostró buena correlación entre los valores predichos y los observados (anexo 6). Adicionalmente presentó una precisión adecuada (35.27) ya que es deseable que sea superior a 4.0 para poder analizar los resultados del modelo. Una vez verificada la calidad del modelo se procedió a determinar cuáles fueron los factores que generaron el efecto principal y se determinó que los factores C, E y F tuvieron un efecto significativo sobre la inactivación de *Salmonella* con valores de $p = 0.0001$, 0.0301 y 0.0363 (anexo 6). Con respecto a los coeficientes de regresión el signo determinó si es más favorable el nivel bajo (-1) o el nivel alto (+1) para continuar con futuros experimentos de optimización. En el presente estudio los valores obtenidos se presentan en la ecuación 22 y según los resultados el signo del coeficiente del factor C fue negativo lo que indicó que la inactivación se favoreció a pH ácidos y muy posiblemente si se disminuye más el pH la respuesta puede incrementar. Para los factores E y F los signos fueron positivos e indicaron que a concentraciones altas de los dos reactivos favorecieron la inactivación.

$$\text{Inactivación (\%)} S.T = 62.42 - 1.08_A + 7.25_B - 3.42_C + 0.25_D + 0.75_E + 0.25_F \quad [22]$$

Tabla 15. Resultados y coeficientes de regresión para el Plackett Burman de proceso Fenton con *S. Typhimurium*

<i>Salmonella Typhimurium</i>						
Inactivación (%)						
	SC	GL	CM	Valor F	Probabilidad > P	CR
Modelo	793.17	6	132.19	176.26	< 0.0001	62.42
A Tiempo	14.08	1	14.08	18.78	0.0565	-1.08
B Ufc/mL	630.75	1	630.75	841.00	0.567	7.25
C pH	140.08	1	140.08	186.78	< 0.0001	-3.42
D Agitación	0.75	1	0.75	1.00	0.3632	0.25
E H ₂ O ₂	6.75	1	6.75	9.00	0.0301	0.75
F FeSO ₄	0.75	1	0.75	1.00	0.0363	0.25
Residuales	3.75	5	0.75			
Correlación total	796.92		11			
R ²	0.98					
Precisión adecuada	35.27					
Coefficiente de variación	1.39					

* $p < 0,05$ indican los términos son significativos.

Debido a que no se encontró diferencias entre los tratamientos que presentaron porcentajes de inactivación bajos 57.5 % (B) y altos 72.4 % (A) como se observa en la figura 15 y tabla 16 se decidió realizar los experimentos del proceso Fenton a escala de reactor para poder controlar durante todo el tratamiento las variables que presentaron diferencias significativas como el valor de pH, concentración de FeSO₄ y adición en cantidades controladas de H₂O₂; ya que son variables que influyen en la reacción Fenton (114,115).

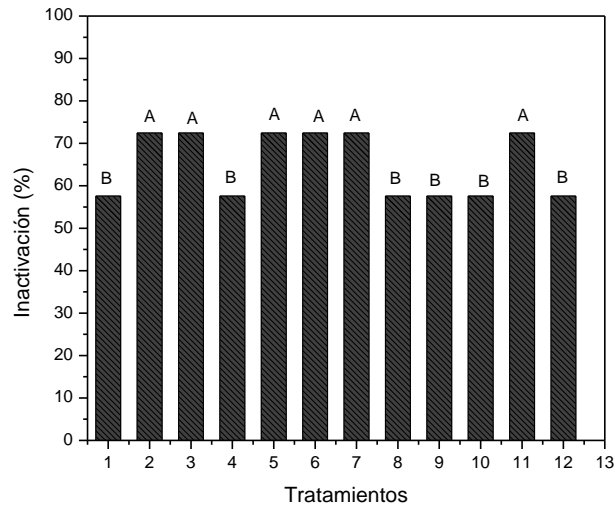


Figura 15. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para proceso Fenton homogéneo. Porcentaje de inactivación para los 12 tratamientos a evaluar para *S. Typhimurium*

Tabla 16. Resultados del diseño experimental Plackett-Burman para proceso Fenton. Porcentajes de inactivación para *S. Typhimurium*

Tratamiento	(%) Inactivación <i>S. Typhimurium</i>
1	57,59
2	72,45
3	72,45
4	57,59
5	72,45
6	72,45
7	72,45
8	57,59
9	57,59
10	57,59
11	72,45
12	57,59

El control en adición H_2O_2 juega un papel importante en la generación de radicales $\bullet OH$ e inactivación de microorganismos, por otro lado el control de pH desde el inicio hasta el final de la reacción juega un papel importante sobre el potencial de oxidación de los radicales $\bullet OH$ (114). En los ensayos realizados en el diseño factorial Plackett-Burman no fue posible controlar todas las variables por esta razón se hizo necesario realizarlo en reactor.

5.2.7 Diseño factorial 2^3 de proceso Fenton homogéneo

Al cambiar la configuración del sistema e incrementar el volumen de agua a tratar en las curvas de inactivación fue necesario evaluar si los factores que fueron significativos en el Plackett-Burman se comportaban de la misma forma y favorecían la inactivación de *Salmonella*. Adicionalmente, se controló mejor el proceso al adicionar continuamente el peróxido, monitorear el pH e incrementar la agitación. Para esto se realizó el diseño factorial 2^3 los resultados del análisis de varianza y regresión se presentan en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza y coeficientes de regresión para el Factorial 2^3

Fuente	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Prob>F	Coefficientes de regresión
Modelo	6135.75	7	876.54	1448.33	< 0.0001	35.96
A	332.82	1	332.82	549.94	< 0.0001	-3.72
B	418.29	1	418.29	691.16	< 0.0001	4.17
C	1561.91	1	1561.91	2580.81	< 0.0001	8.07
AB	310.29	1	310.29	512.70	< 0.0001	3.60
AC	404.18	1	404.18	667.84	< 0.0001	4.10
BC	10.81	1	10.81	17.86	< 0.0001	0.67
ABC	3097.45	1	3097.45	5118.03	0.0005	-11.36
Curvatura	76.84	1	76.84	126.97	< 0.0001	
Error puro	10.89	18	0.61			
Correlación total	6223.49	26				
R^2	0.99					
Precisión adecuada	121.6					
Coefficiente de variación	2.13					

* $p < 0,05$ indican los términos son significativos

Inicialmente, se realizó una gráfica para establecer cuáles eran los factores o interacciones que generaron un efecto sobre el porcentaje de inactivación de *Salmonella*, seleccionando solamente los principales que serán aquellos que se observaron más distantes a la línea base (anexo 8). Por otro lado se verificó que los resultados de la variable dependiente (porcentaje de inactivación) cumplieran con las premisas de distribución normal, independencia y homocedasticidad. Por esta razón, no fue necesario realizar una transformación matemática de la variable dependiente.

De acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA se determinó que tanto el modelo, como los factores y todas las interacciones tuvieron un efecto significativo (tabla 17), por esta razón al realizar el análisis de regresión múltiple de los datos experimentales se generó la ecuación que se presentan a continuación:

$$\text{Inactivación (\%)} = 35,96 - 3,72A + 4,17B + 8,07C + 3,60AB + 4,10AC + 0,67BC - 11,36ABC \quad [23]$$

Los tres factores tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.0001$) sobre el porcentaje de inactivación de *Salmonella*. Como se puede observar en la figura 16 que corresponde a la representación cúbica de la interacción de los factores en la intersección de los niveles altos de H_2O_2 y $FeSO_4$ con el nivel bajo de pH es el punto donde se obtuvo un 56 % de inactivación a los 60 minutos de tratamiento .
Adicionalmente, esta interacción se dió en el tratamiento 7 y en la figura 17 se observa que este es significativamente diferente ($p < 0.0001$) que los demás tratamientos.

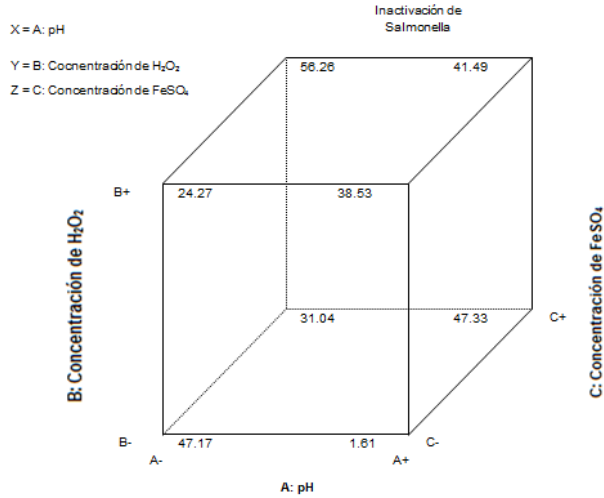


Figura 16. Representación cubica del efecto del efecto de pH, concentración de H₂O₂ y concentración de FeSO₄ sobre la inactivación de *S. Typhimurium*

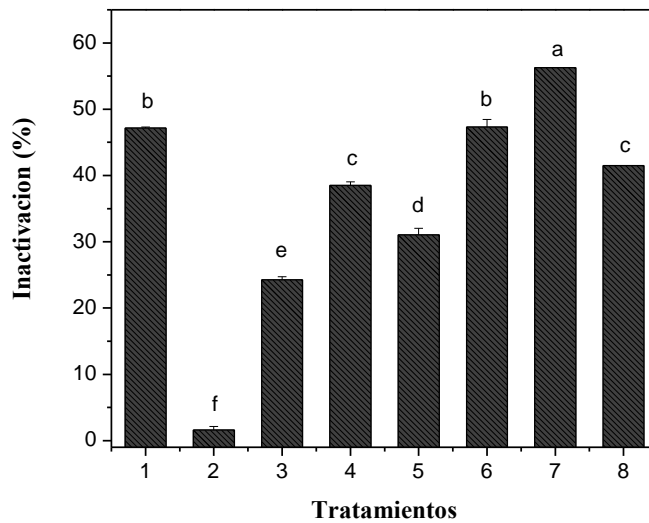


Figura 17. Proceso Fenton homogéneo. Porcentajes de inactivación para los 8 tratamientos evaluados en el diseño factorial 2³ para *S. Typhimurium*.

Como se observó en los resultados obtenidos con las concentraciones más altas del catalizador (FeSO₄) y del agente oxidante (H₂O₂) y con un pH de 4,0 se obtuvieron los mejores porcentajes de inactivación de *S. Typhimurium*. Fue indispensable mantener el valor de pH durante todo el proceso para no afectar la reacción Fenton,

también la adición en cantidades controladas de H_2O_2 . Como condiciones de operación para optimizar el proceso hubo agitación e inyección de aire continua para evitar la precipitación de la reacción y la formación de lodos por parte del catalizador (22).

El pH es una variable determinante en el proceso Fenton ya que afecta directamente el rendimiento catalítico. El pH óptimo de la reacción fue de 4.0, donde no hubo disminución de la concentración del catalizador ni tampoco se precipitó la reacción y por tanto no se afectó el rendimiento catalítico (18,117).

Durante el proceso Fenton el H_2O_2 tiene un papel determinante en la producción de radicales $OH\cdot$, se demostró que el efecto de la dosificación controlada de H_2O_2 contribuyó en la inactivación de *Salmonella* (114). Se obtuvo el mayor porcentaje de inactivación con una concentración de H_2O_2 de 200 (ppm) que podría incrementar la producción de $\cdot OH$ (73).

El Fe^{2+} es otro factor importante en la reacción Fenton que catalíticamente descompone el H_2O_2 para generar radicales $OH\cdot$. Concentraciones más elevadas de Fe^{2+} produce un incremento en la velocidad de reacción; como se pudo observar el mejor porcentaje de inactivación se dio con una concentración de $FeSO_4$ de 100 (ppm) (114).

No se encontró porcentajes de inactivación para los controles de H_2O_2 y $FeSO_4$ a las concentraciones seleccionadas del factorial, no hubo un exceso ni del catalizador ni del oxidante que estuvieran inhibiendo a *Salmonella* por sí solos y no se estuviera llevando a cabo la reacción Fenton.

5.2.8 Curvas de inactivación de proceso Fenton homogéneo

Con los resultados obtenidos del diseño factorial 2^3 se seleccionaron las variables con las que se realizaron las curvas de inactivación.

Los resultados de las curvas de inactivación para el proceso Fenton homogéneo H_2O_2/Fe^{+2} en agua de chiller arrojaron 100% de inactivación para *S. Typhimurium* a los 15 minutos de exposición. Se realizó recuento en profundidad donde no observó reactivación de la población bacteriana en los 65 minutos de exposición (figura 18).

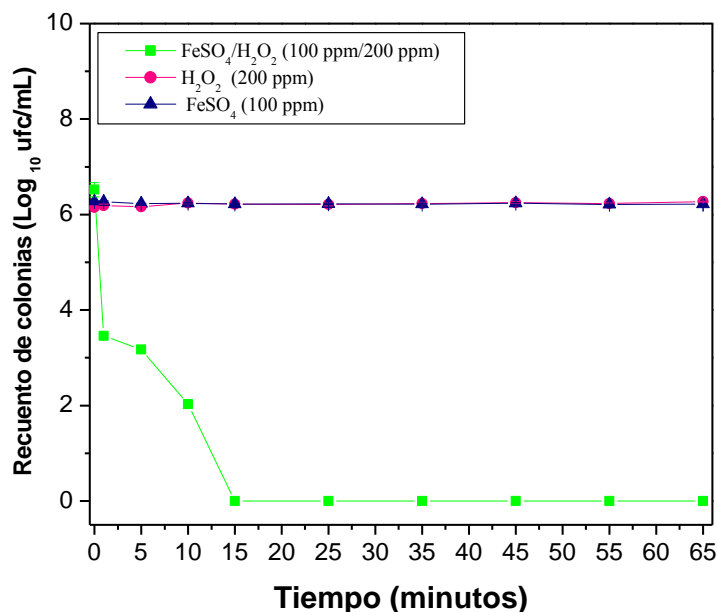


Figura 18. Cinética de inactivación para *S. Typhimurium* con Proceso Fenton $H_2O_2/FeSO_4$; controles de H_2O_2 y $FeSO_4$

Como se menciona anteriormente la interacción entre una concentración adecuada del oxidante H_2O_2 : 200 ppm y del catalizador Fe^{+2} : 100 ppm bajo condiciones de acidez pH: 4.0 controlando cada una de las variables generó la reacción Fenton. Uno exceso del oxidante puede dar lugar a la degradación del mismo por los radicales $OH\cdot$. Blanco (2008) demuestra la importancia de la adición controlada de H_2O_2 ya que mejora la eficiencia del proceso cuando se dosifica el reactivo; si no se controla esta dosificación podría inhibir la generación de $\cdot OH$ (73).

Lipczynska y colaboradores (2008) investigaron la eliminación de compuestos como el arsénico en aguas residuales utilizaron concentraciones de H_2O_2 : 200 ppm y concentración de $FeSO_4$: 100 ppm obteniendo resultados de remoción de 95 %. Concentraciones iguales a las utilizadas en este estudio (88).

En cuanto a la inactivación de microorganismos se han realizado algunos estudios, entre estos estudios Spuhler y colaboradores (2010) evaluaron el efecto de Fe^{2+} , $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ en foto-Fenton para la inactivación de *E. coli* a un pH cercano a la neutralidad (7-7.5), con concentración de Fe^{2+} de 0,6 mg/L y de H_2O_2 de 10 ppm donde se obtuvo eficiencia a las 4 horas de exposición. Lo que demuestra la importancia de un valor de pH que favorezca la reacción para obtener resultados de inactivación en tiempos de exposición más cortos (77).

Sciacca y colaboradores (2010), realizaron tratamiento para la eliminación de *S. Enteritidis* con proceso foto-Fenton en aguas naturales, donde encontraron una inactivación a los 30 minutos de exposición con una concentración de 10 ppm de H_2O_2 . (22). De igual forma los estudios con *E. coli* también involucra la utilización de radiación solar o ultravioleta para potencializar el proceso foto-Fenton (20).

Uno de los mecanismo de daño celular se da por medio de la liberación de H_2O_2 extracelular que puede aumentar la permeabilidad de la membrana y permitiendo que el Fe^{2+} ingrese a la célula bacteriana causando alteración en la función celular (21).

5.3 Etapa II: Comparación de los tratamientos por fotocátalisis y proceso Fenton con tratamientos químicos con ácido peracético e hipoclorito de sodio.

Para poder comparar los procesos de oxidación avanzada (fotocátalisis y proceso Fenton homogéneo) fue necesario realizar curvas de inactivación para las concentraciones seleccionadas de ácido peracético ($\text{CH}_3\text{-CHOOOH}$) e hipoclorito de sodio (NaOCl), en los mismos tiempo de inactivación utilizados previamente.

5.3.1 Curvas de inactivación desinfección química:

Los resultados obtenidos de las cinéticas de inactivación demostraron que la desinfección química con ácido peracético ($\text{CH}_3\text{-CHOOOH}$) a 80 ppm y 160 ppm no fue eficiente a los 65 minutos de exposición tanto para *S. Enteritidis* como para *S.*

Typhimurium en agua de chiller (figura 19). Hubo una ligera disminución del recuento celular para el tratamiento con ácido peracético a 160 ppm.

El proceso de inactivación con hipoclorito de sodio depende de factores importantes como el control del pH y materia orgánica presente en el medio. En este tipo de aguas donde la carga de materia orgánica es alta y el pH generalmente no es controlado se esperaría que el hipoclorito de sodio no sea tan eficiente; sin embargo, en este tipo de industrias el uso del cloro se ha convertido en un procedimiento estándar para desinfección del agua en la industria avícola (41).

En las curvas de inactivación con hipoclorito de sodio el consumo cloro en la desinfección de agua residual juega un papel importante en el proceso. Ocurre un primer paso de consumo de hipoclorito de sodio tras reacciones reductivas con compuestos presentes en el agua. Un segundo paso donde el cloro residual es transformado a cloro libre y es en este paso donde el hipoclorito de sodio ejerce su acción desinfectante (118).

Hassen y colaboradores (2000) realizaron curvas de inactivación en aguas residuales pre tratadas con filtros de arena con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para el tratamiento de indicadores de contaminación como *E. coli* y *Streptococcus faecalis*, donde obtuvieron disminución de 3 unidades logarítmicas con una concentración de 13.6 ppm en 40 minutos. Estos resultados son mejores que los obtenidos en este trabajo con *S. typhimurium*; puede estar relacionado con el tipo de agua de chiller ya que los niveles de materia orgánica son altos y afectan el proceso de inactivación y a la capacidad de *Salmonella* de producir mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (28,118).

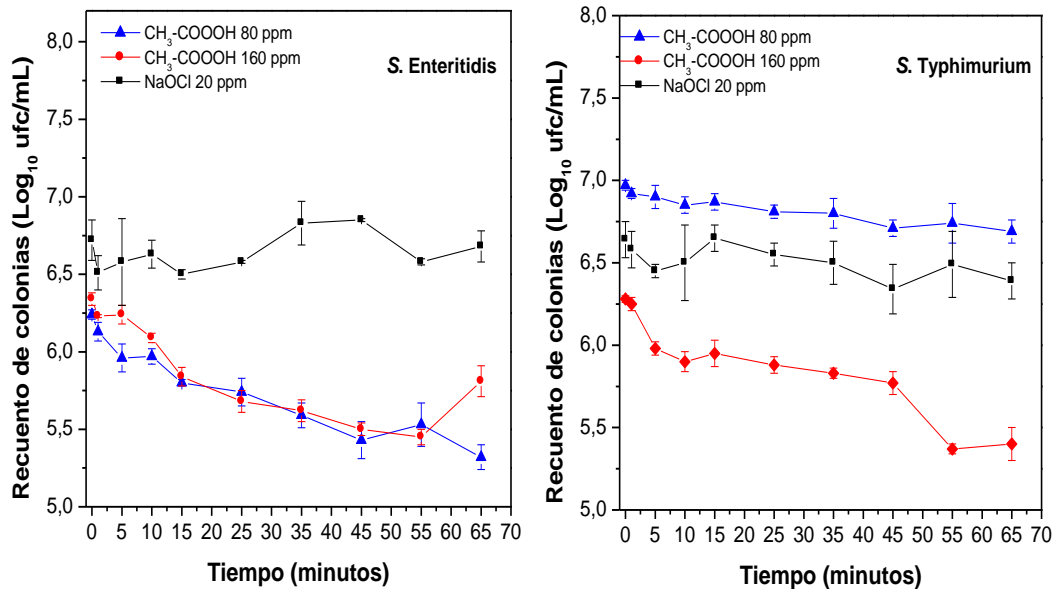


Figura 19. Curvas de inactivación con ácido peracético 80-160 ppm e hipoclorito de sodio 20 ppm para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Sallen y colaboradores describen la eficacia del ácido peracético como agente desinfectante a concentraciones superiores a 25 ppm, reportando la inhibición de bacterias, Gram negativas en cortos periodos de tiempo (119), se ha reportado que su efecto mejora considerablemente al aumentar la concentración demostrando una respuesta eficiente a concentraciones de 100 a 200 ppm, sin evidenciar efectos secundarios en las características organolépticas de las carcasas de aves (42).

Sin embargo pese a los resultados reportados; en los ensayos realizados no se evidenció una disminución en el recuento con las dos concentraciones evaluadas del desinfectante sobre ninguna de los dos serotipos de *Salmonella* evaluadas (figura 19) para ambos microorganismos se observaron resultados similares en cada una de las concentraciones analizadas, donde la máxima disminución correspondió al 12 %

Contrario a lo reportado por Bauermeister y colaboradores quienes afirman que el uso de ácido peracético a 100 y 200 ppm resulta efectivo como agente bactericida frente a *S. Typhimurium*. En los resultados obtenidos a concentraciones de 80, 160

ppm bajo las condiciones previamente establecidas la disminución de viabilidad de los microorganismos no fue lo suficientemente efectiva. Es posible que la materia orgánica presente en este tipo de agua allí generado interferencias en el efecto del desinfectante.

Los resultados de las constantes de inactivación se encuentran en la tabla 18. Las constantes de inactivación se relacionan con la velocidad de muerte de los microorganismos expuestos a un determinado tratamiento. Entre más alto sea el valor de la constante la inactivación fue más rápida y está directamente relacionado con la efectividad de desinfección (119). Las constantes de inactivación obtenidas de las curvas de inactivación del ácido peracético para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* a 80 y 120 ppm se observa en la tabla 16. Como no hubo porcentaje de inactivación con hipoclorito de sodio no genero ningún valor en la constante.

Tabla 18. Constantes de inactivación para ácido peracético e hipoclorito de sodio.

Microorganismos	CH ₃ -COOOH: 80 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)	CH ₃ -COOOH: 160 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)	HClO: 20 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)
<i>S. Enteritidis</i>	0.0367±0,00023	0.182 ±0,00014	ND
<i>S. Typhimurium</i>	0.012±0,012	0.0935±0,00023	ND

5.3.2 Comparación de los procesos de oxidación avanzada contra desinfección química.

Al realizar la comparación entre tratamientos se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) que demostraron que los dos procesos de oxidación avanzada fueron mejores para la inactivación de *S. Thypimurium* en comparación con los métodos de desinfección química.

A su vez entre los dos tratamientos de oxidación el proceso Fenton fue superior que fotocátalisis obteniendo una inactivación del 100 % a los 15 minutos de tratamiento mientras que para fotocátalisis fue a los 35 minutos como se observa en la gráfica 20.

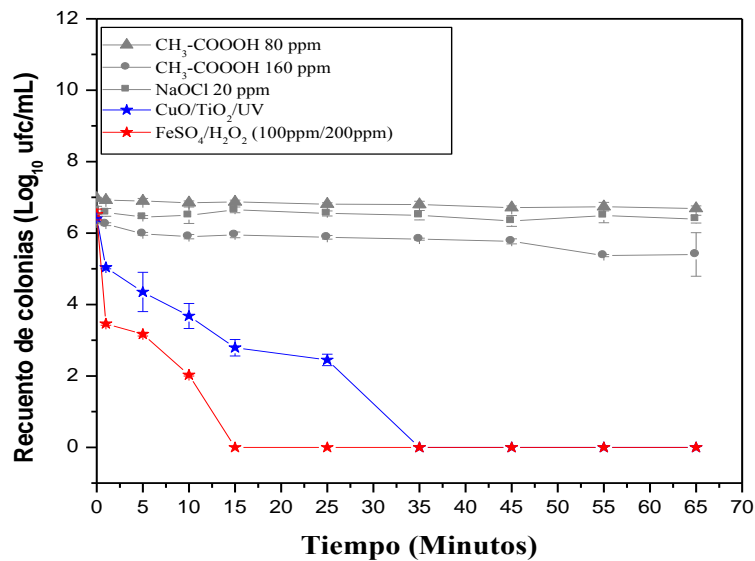


Figura 20. Comparación de los procesos de oxidación (fotocatálisis y proceso Fenton) contra desinfección con hipoclorito de sodio y ácido peracético

Al comparar los resultados obtenidos de las curvas de inactivación de la fotocatalisis con CuO/TiO₂ y proceso Fenton homogéneo con hipoclorito de sodio y ácido peracético; los porcentajes de inactivación de los desinfectantes no presentaron un efecto significativo sobre la inhibición *S. Typhimurium*, obteniendo constantes de inactivación menores que los procesos de oxidación como se observa en la tabla 19.

Tabla 19. Constante de inactivación de cinéticas de fotocatalisis heterogénea y desinfectante.

Microorganismo	CuO/TiO ₂ /UV <i>k</i> (min ⁻¹)	CH ₃ -COOOH 80 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)	CH ₃ -COOOH 160 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)	HClO 20 ppm <i>k</i> (min ⁻¹)
<i>S. Typhimurium</i>	0.3644±0,0045	0.012±0,012	0.0935±0,00023	ND
Microorganismo	CuO/TiO ₂ /UV <i>R</i> ²	CH ₃ -COOOH 80 p <i>R</i> ²	CH ₃ -COOOH 160 ppm <i>R</i> ²	HClO 20 ppm <i>R</i> ²
<i>S. Typhimurium</i>	0.998	0.94	0.95	ND

La eficiencia de los fotocátalisis CuO/TiO_2 y el proceso Fenton en comparación con los desinfectantes convencionales radicó principalmente en que estos procesos tienen una mayor factibilidad termodinámica y velocidad de oxidación debido a la producción de especies fuertemente oxidantes como los radicales hidroxilo $\bullet\text{OH}$ que son producidos por fotocátalisis y proceso Fenton homogéneo (120,121).

Debido a las características de estos procesos de oxidación y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone la posible implementación de fotocátalisis con CuO/TiO_2 y proceso Fenton como tratamiento de desinfección en la plantas de beneficio avícola. Fotocatálisis se podría implementar como parte del tratamiento de agua de salida del proceso chiller para luego poder reciclar y recircular el agua para un nuevo proceso de beneficio.

Aunque el Proceso Fenton fue más efectivo en el tiempo de inactivación que fotocátalisis no podría utilizarse para el tratamiento de las aguas de salida del proceso chiller por la posible generación de lodos, el pH al que debería ser implementado el proceso no es el pH adecuado para utilizar en el beneficio avícola. No obstante, se implementaría para el tratamiento de las aguas residuales generadas durante el proceso en este tipo de empresas para poder ser eliminadas a alcantarillado público.

5.4 Etapa III: Pruebas de tratabilidad con fotocátalisis y proceso Fenton en aguas provenientes del beneficio avícola

Como parte de los objetivos planteados se tomaron muestras de 2 empresas de beneficio avícola con diferentes niveles de producción. Se realizaron muestreos del agua de salida del proceso chiller y del agua residual generada por la planta de beneficio. Antes de ser sometidas a los tratamientos de desinfección se les realizó caracterización física, química microbiológica (tabla 20). Estas muestras fueron sometidas a tratamientos de desinfección por fotocátalisis y proceso Fenton en los tiempos de inactivación obtenidos en las curvas realizadas anteriormente.

Tabla 20. Resultados de parámetros físicos, químicos y microbiológicos de empresas de beneficio avícola.

PARAMETROS	Resultado (8 mil pollos/día) Salida Chiller	Resultado (300 mil pollos/día) Salida Chiller	Resultado (8 mil pollos/día) <u>Residual</u>	Resultado (300 mil pollos/día) <u>Residual</u>
pH (unidades)	6,5	6,8	6,0	6,8
DQO (ppm)	1060	1014	2746	2604
Conductividad (µmhos/cm)	590	500	780	800
OD (ppm)	6,5	7,0	6,3	8,3
Unidades de color (UC)	293,5	236	435	676,5
Ausencia/presen cia <i>Salmonella</i> (100 ml)	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Coliformes Totales	< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	1.6 x10 ⁷	2.7 x10 ⁶
<i>E. coli</i>	< 1 UFC/ml	< 1UFC/ml	5 x10 ⁶	1.6 x10 ⁶

5.4.1 Caracterización muestras de salida del proceso chiller:

Para las dos empresas los resultados obtenidos de pH, conductividad y OD se encontraron dentro del rango permitido por el decreto 1575/07 de aguas potables. El valor permitido de pH para aguas potables debe estar comprendido entre 6.5 - 9.0 y para conductividad entre 50 - 1000 µmhos/cm.

Los resultados de caracterización microbiológica para *Salmonella* spp, *E. coli* y coliformes totales fueron los esperados para agua potable. No se encontró presencia de ninguno de los indicadores de contaminación fecales y de *Salmonella*; lo que indicó que aunque hay diferencias en la cantidad de producción para cada una de estas empresas están cumpliendo con lo establecido con la legislación en cuanto a estos parámetros.

La legislación en aguas potables no establece valores de la DQO pero se analizaron con el fin de establecer si los tratamientos de oxidación reducen los niveles de la DQO comparados con los iniciales. Los resultados de las unidades de color son similares en las dos muestras.

5.4.2 Caracterización muestra residual del proceso de beneficio:

Los resultados obtenidos de pH, conductividad y OD para las dos empresas cumplen con la resolución 3930 de 2010 versión IV. En cuanto a los resultados de la DQO los valores obtenidos fueron elevados para los establecidos por esta misma resolución que establece un valor límite hasta 800 ppm; los resultados obtenidos estuvieron sobre 2000 mg/L como se observa en la tabla 18 para las dos empresas. Estos resultados elevados de la DQO se deben a la naturaleza de producción del beneficio avícola por las diferentes etapas del proceso.

Los resultados de la caracterización microbiológica de los indicadores de contaminación fecal arrojaron valores entre 6 y 7 unidades logarítmicas; considerados como altos para ser eliminados hacia el alcantarillado sin ningún tratamiento previo. Los resultados de ausencia/presencia para *Salmonella* demostraron presencia para la empresa de mayor producción 300.000 pollos/día en recuentos bajos (tabla 21).

Para el análisis de los resultados de las muestras de las dos empresas tanto de agua de salida de proceso chiller como agua residual se realizó un análisis de varianza para cada uno de los tratamientos. Como se puede observar en la figura 21 y 22. Se graficaron los 6 tratamientos en el siguiente orden:

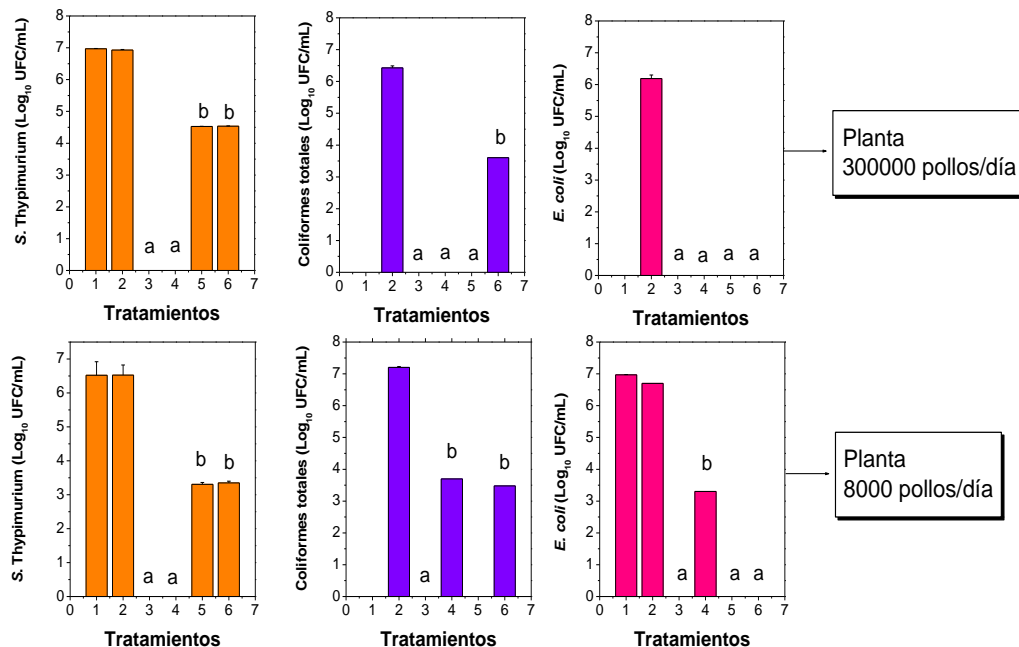
Tabla 21. Pruebas de tratabilidad

Clasificación	Tratamiento
T1	Línea base agua chiller
T2	Línea base agua residual
T3	Fotocatálisis para agua de chiller

T4	Fotocatálisis para agua residual
T5	Proceso Fenton para agua de chiller
T6	Proceso Fenton para agua de residual

Al realizar los recuentos iniciales de *Salmonella* de los dos tipos de aguas no se obtuvo concentraciones celulares elevadas (10 UFC/mL), se inocularon las muestras de agua cruda con la misma concentración celular de *S. Typhimurium* utilizada en las curvas de inactivación (10^6 UFC/mL).

Como se observa en la grafica 21 se encuentran los resultados de los análisis microbiológico para los 6 tratamientos como están clasificados tabla 21. En color naranja esta graficado los resultados obtenidos para *S. Typhimurium*, color morado coliformes totales y color rosa *E. coli*. Los recuentos iniciales son los T1 y T2, de inactivación con los tratamientos por fotocatalisis T3 y T4 y tratamiento con proceso Fenton T5 y T6. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$) obteniendo los mejores resultados de inactivación para la fotocatalisis con $\text{CuO/TiO}_2/\text{UV}$ durante los 35 minutos para *S. Typhimurium*, coliformes totales y *E. coli* (grafica 21). Indicando la efectividad de fotocatalisis para el tratamiento de aguas crudas provenientes de industrias de beneficio avícola con presencia en concentraciones altas de diferentes microorganismos y diversas características físico químicas del agua.



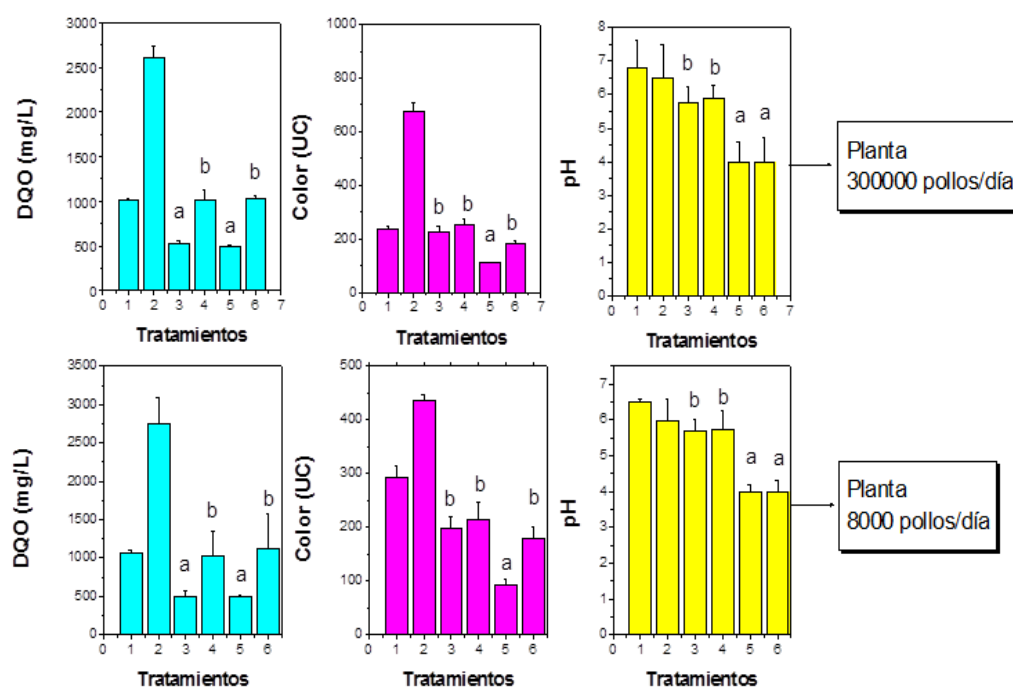
Grafica 21. Inactivación de *S. Typhimurium*, *E. coli* y coliformes totales con tratamiento fotocatalítico con $\text{CuO/TiO}_2/\text{UV}$ y Proceso Fenton homogéneo $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$.

El proceso Fenton homogéneo disminuyó tres unidades logarítmicas de coliformes totales, *E. coli* y *S. Typhimurium* (grafica 21) durante los 15 minutos de exposición. Lo que demostró que el tratamiento produce una disminución de la carga microbiana inicial pero no tan efectivo como la fotocatalísis.

Aunque esta reportado en la literatura por autores como Alrousa y colaboradores (2009) , Rincon y Pulgarin (2007) que la presencia de cargar orgánica afecta el rendimiento del tratamiento con fotocatalísis porque estos compuestos entran a competir con las especies reactivas formadas por los tratamientos, los resultados obtenidos arrojan que no afecto el proceso de inactivación bacteriana tanto de un microorganismos patógeno y de los indicadores fecales determinando la relevancia e importancia de los resultados obtendidos no solo en la inactivacion microbiana sino también en la remocion de la DQO y disminucion de la UC.

Como se observa en la grafica 22 se encuentran los resultados de los análisis químico para los 6 tratamientos como están clasificados tabla 21. En color verde esta graficado los resultados obtenidos para la remoción de la DQO, color morado disminución de unidades de color (U.C) y color amarillo valor de pH final para cada tratamiento. Los valores iniciales son los T1 y T2, la remoción y disminución con los tratamientos por fotocatalisis T3 y T4 y tratamiento con proceso Fenton T5 y T6. Hubo una remoción del 50% de la DQO para los dos tipos de agua con 15 minutos de exposición para proceso Fenton y 35 minutos de exposición para fotocatalisis con CuO/TiO₂. En cuanto a la reducción de las unidades de color; con el proceso Fenton se obtuvo un mejor resultado.

Los valores de pH finales son similares a los valores iniciales para cada tratamiento ya que es indispensable mantener y controlar los valores de pH en este tipo de tratamientos (figura 20).



Grafica 22. Resultados de parámetros químicos con tratamiento fotocatalítico CuO/TiO₂/UV y Proceso Fenton homogéneo Fe⁺²/H₂O₂

Los resultados obtenidos indican la posibilidad de implementar la fotocatalisis y el proceso Fenton en las plantas de beneficio avícola. Es importante seguir realizando investigación y mejorar la eficiencia del proceso par poder escalarlo a volúmenes mayores.

Debido a la formación de lodos que puede generar el proceso Fenton y al pH al que debe ser operado (4.0), se implementaría la utilización de este tratamiento en el agua residual del proceso de beneficio.

7. Conclusiones

- El proceso fotocatalítico se favoreció al emplear radiación UV y películas modificadas con CuO, obteniendo 100% de inactivación para las dos serovariedades de *Salmonella*. Por otro lado, el proceso Fenton mejoró al utilizar controladamente H₂O₂ 200 ppm, Fe²⁺ 100 ppm a pH 4.0, obteniendo un 100% de inactivación para *Salmonella* Thypimurium.
- Los procesos de oxidación avanzada superaron a la desinfección química, logrando 100% de inactivación en contraste con los valores del 0 y 12% obtenidos con 20 ppm de hipoclorito y 160 ppm con ácido peracético.
- Fotocatálisis y proceso Fenton fueron eficientes para la inactivación de *Salmonella* Thypimurium, coliformes fecales y *Escherichia coli*, tanto en agua de chiller y residual en las dos empresas evaluadas, sin embargo el proceso Fenton pudo ser afectado por la presencia de materia orgánica, obteniendo menor inactivación.
- Se obtuvo una disminución en la DQO y unidades de color superiores al 50% y 60% al tratar los dos tipos de aguas de origen avícola empleando Fotocatálisis y proceso Fenton, determinando que las dos estarían cumpliendo con los límites de vertimiento estipulados para este tipo de industrias.

8. Recomendaciones

- Optimizar el protocolo de modificación del TiO_2 con Cu_2SO_4 para la posible implementación de la fotocatalisis irradiada con luz visible y su posible aplicación en la industria de beneficio avícola disminuyendo costos.
- Caracterización más detallada de las películas semiconductoras para establecer correlaciones con el comportamiento catalítico del sistema.
- Estudiar la catálisis heterogénea en el proceso Fenton para evitar la contaminación colateral producida por precipitados formados por los iones de Fe.
- Seguir estudiando los procesos de oxidación avanzada fotoquímicos y no fotoquímicos para el tratamiento de agua potable y residual de empresas del sector alimenticio como opción viable de desinfección.
- Generar mas investigación con patógenos importantes como *Salmonella* para los procesos de oxidación avanzada como la fotocatalisis y proceso Fenton en diferentes tipos de aguas.

9. Bibliografía

1. Ministerio de protección social. Resolución número 4287. Reglamento técnico sobre los requisitos de inocuidad de la carne y productos cárnicos. . http://www.finagro.com.co/html/cache/HTML/SIS/Avicultura/Resolucion_4287_2007.pdf. Consultado Febrero 2011.
2. FAO/WHO. Report of a Joint Expert Meeting. Benefits and Risks of the use of Chlorine-containing Disinfectants in food Production and Food Processing. Ann Arbor, Miami, USA. 27–30 May 2008. Consultado Noviembre 2011.
3. Hooda, PS., Edwards, AC., Anderson, HA., Miller, A. A review of water quality concerns in livestock farms areas. *The Science of the Total Environment* 2000; **250** (2): 143-167.
4. Mead G. Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos. Editorial ACRIBIA S.A, Zaragoza, España 2007, **332**.
5. Scallan, Elaine. Hoekstra Robert, Frederick J. Angulo, Robert V. Tauxe, Marc-Alain Widdowson, Sharon L. Roy, Jeffery L. Jones, and Patricia M. Griffin. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA *Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens* 2011; 1-21.
6. Instituto Nacional de Salud. Informe de eventos: Enfermedades transmitidas por alimentos, hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2010. <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=90286&pag=1>. Consultado el 19 de abril de 2012.
7. Smith T, Salmon DE. Call for Papers: *Salmonella* in Foods: Evolution, Strategies and Challenges. *Food Research International* 2010; **43**(6).
8. Dos Santos J. L. La cloración de agua: Factores de desinfección adecuada. *Poultry International*. WATT. Poultry USA 2005 1-6.
9. Benabbou a. K, Derriche Z, Felix C, Lejeune P, Guillard C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. *Applied Catalysis B: Environmental* 2007; **76** (3-4):257–63.

10. Tsai, LS., Schade, JE., Molyneux, BT. Chlorination of pond water: chlorine demand and disinfection efficiency. *Poult. Sci*, **71** 1992; 188-196.
11. Malato S, Fernández P, Maldonado M, Blanco J, Gernjak W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today* 2009; **147**: 1-59.
12. Domènech, X., Jardim, W. F., Litter, M. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Capítulo 1*. 2009.
13. Mozia S. Photocatalytic membrane reactors (PMRs) in water and wastewater treatment. A review. *Separation and Purification Technology* 2010 **18**; **73**(2):71–91.
14. Lipczynska-Kochany E, Kochany J. Effect of humic substances on the Fenton treatment of wastewater at acidic and neutral pH. *Chemosphere* 2008; **73** (5):745–50.
15. Spuhler D, Andrés Rengifo-Herrera J, Pulgarin C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Applied Catalysis B: Environmental* 2010; **96** (1-2):126–41.
16. He Y, Zhao B, Hughes JB, Han SS. Fenton oxidation of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene and acetone inhibition. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 2008 **5**; **2** (3):326–32.
17. Hong S-hoon, Kwon B-hyuk, Lee J-keun, Kim I-kyu. Degradation of 2-chlorophenol by Fenton and photo-Fenton processes. 2008; **25** (1):46–52.
18. Ramirez Herney, Vicente M a., Madeira LM. Heterogeneous photo-Fenton oxidation with pillared clay-based catalysts for wastewater treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental* 2010; **98** (1-2):10–26.
19. Amigó Martínez, Jordi. Caracterización de la degradación de sulfametazina mediante foto-Fenton (POA's). 2008; <http://upcommons.upc.edu/pfc/handle/2099.1/5809>.
20. Moncayo-Lasso A, Torres-Palma R a., Kiwi J, Benítez N, Pulgarin C. Bacterial inactivation and organic oxidation via immobilized photo-Fenton reagent on

- structured silica surfaces. *Applied Catalysis B: Environmental* 2008; **84** (3-4):577–83.
21. Calhoun LN, Kwon YM. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. *International journal of antimicrobial agents* 2011; **37** (3):261–5.
 22. Sciacca F, Rengifo-Herrera J a., Wéthé J, Pulgarin C. Solar disinfection of wild *Salmonella* sp. in natural water with a 18L CPC photoreactor: Detrimental effect of non-sterile storage of treated water. *Solar Energy* 2011; **85** (7):1399–408.
 23. Uribe C, Cecilia . Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Universidad del Valle. *Colombia médica* 2006; **37**:151–8.
 24. Smith T, Salmon DE. Call for Papers: *Salmonella* in Foods: Evolution, Strategies and Challenges. *Food Research International* 2010; **43** (6):1725–6.
 25. Mejía D. Aplicación de métodos microbiológicos en plantas de sacrificio para la detección de *salmonella* spp en canales porcinos. **Trabajo de grado**. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá 2006; 13-28.
 26. Allen Halsey, T. The Role of SlyA-dependent Genes in *Salmonella* Pathogenesis. **Tesis Doctoral**. Universidad estatal de Carolina del Norte. Carolina del Norte. 2-19: 6. <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/3767/1/etd.pdf>.
 27. Arayaa Daniela, Quiroza Tania S, Tobará Hugo E, Lizanaa Rodrigo, Quezadab Carolina P, Santiviagob Carlos A, Riedelc Claudia A, Kalergisa Alexis M, Buenoa Susan M. Deletion of a prophage-like element causes attenuation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and promotes protective immunity. *Vaccine*. 2010 Jul 26;28(33):5458–66.
 28. Janssen R, van der Straaten T, van Diepen A, van Dissel JT. Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2003; **5** (6): 527–34.

29. Shen S, Fang FC. International Journal of Food Microbiology Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 2011; **152** (3): 75–81.
30. Weir EK, Martin LC, Poppe C, Coombes BK, Boerlin P. Subinhibitory concentrations of tetracycline affect virulence gene expression in a multi-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2008; **10** (8): 901–7.
31. Ray, Bhunia, A. Fundamentos de microbiología de alimentos. Mc Graw Hill. México, 2010.
32. Ministerio de protección social. Instituto Nacional de Salud. UEIRA. Perfil de riesgo *Salmonella* spp (no tíficas) en pollo entero y en piezas 2011; 42-56. <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=92614&download>. Consultado 23 de Mayo 2011.
33. Mercado M, Ávila J, Rey M, Montoya M, Gamboa A, Carrascal AK. Brotes por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. Revisión sistemática de la literatura. Instituto Nacional de Salud. *Revista Biomédica*. 2012; **32** (3).
34. Marriot N., Principios de higiene alimentaria. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España 2003; 416.
35. ICONTEC. NORMA TECNICA COLOMBIANA 5480. Limpieza y desinfección de plantas y equipos utilizados en la industria cárnica y avícola 2007.
36. Evers EG. Predicted quantitative effect of logistic slaughter on microbial prevalence. *Preventive veterinary medicine* 2004 30; **65** (1-2):31–46.
37. Chia TWR, Goulter RM, McMeekin T, Dykes G, Fegan N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food microbiology* 2009; **26** (8):853–9.
38. Álvarez A., Espigares E., Gálvez R. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Higiene y Sanidad Ambiental* 2001; **1**: 1-5.
39. Arias J. Métodos en microbiología farmacéutica. 1ª edición. Centro editorial CEJA. Bogotá Colombia, 2006; 165.

40. Tamblyn K., Conner D. Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella* Typhimurium attached to broiler skin. *Food Microbiology* 1997; **14**, 477–484.
41. United States Environmental Protection Agency (EPA). Office of water Alternative Disinfectants and Oxidants. *Guidance manual* 1999; **6**: 8-25.
42. Bauermeister L. J., Bowers J. W. J., Townsend J. C., McKee S. R. The Microbial and Quality Properties of Poultry Carcasses Treated with Peracetic Acid as an Antimicrobial Treatment. *Poultry Science* 2008; **87**: 2390–2398.
43. Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*. 2004; **30**: 47– 55.
44. Monarca S., Richardson S., Feretti D., Grottolo M., Thruston A., Zani C., Navazio G., Ragazzo P., Zerbini I., Alberti A. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid, *Environmental toxicology and chemistry* 2001; **21** (2). 309–318.
45. Candal Roberto, Bilmes Sara y. Blesa Miguel. Semiconductores con actividad fotocatalítica. <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/cyted/10cap04.pdf>
46. Robertson PKJ, Robertson JMC, Bahnemann DW. Removal of microorganisms and their chemical metabolites from water using semiconductor photocatalysis. *Journal of hazardous materials* 2012 **15**; 211-212:161–71.
47. Fernández Antonio, Leton Pedro, Rosal Roberto, Dorado Miriam, Villar Susana. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt2_tratamientos_avanzados_de_aguas_residuales_industriales.pdf
48. Diebold U, Ruzycski N, Herman GS, Selloni a. One step towards bridging the materials gap: surface studies of TiO₂ anatase. *Catalysis Today* 2003 **15**; **85** (2-4): 93–100.
49. Jaroenworuluck A, Pijarn N, Kosachan N, Stevens R. Nanocomposite TiO₂–SiO₂ gel for UV absorption. *Chemical Engineering Journal* 2012; **181-18**: 45–55.

50. Foster H a, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied microbiology and biotechnology* 2011; **90** (6): 1847–68.
51. Baran W, Makowski A, Wardas W. The effect of UV radiation absorption of cationic and anionic dye solutions on their photocatalytic degradation in the presence TiO₂. *Dyes and Pigments* 2008; **76** (1): 226–30.
52. Portela Rodriguez Eliminación fotocatalítica de H₂S en aire mediante TiO₂ soportado sobre sustrato transparente en el UV-A. **Tesis Doctoral**. Universidad Santiago de Compostela 2008.
53. Giraldo Fernando, Franco Alejandro, Arango Julian. Revista lasallista de investigación - vol. 1 no. 1. La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales 2009; **1**: 4:83-92.
54. Akpan UG, Hameed BH. The advancements in sol–gel method of doped-TiO₂ photocatalysts. *Applied Catalysis A: General* 2010; **375** (1): 1–11.
55. Pedroza AM, Mosqueda R, Alonso-Vante N, Rodríguez-Vázquez R. Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO₂/Ru(x)Se(y) to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere* 2007; **67** (4): 793–801.
56. Barati N, Sani M a. F, Ghasemi H, Sadeghian Z, Mirhoseini SMM. Preparation of uniform TiO₂ nanostructure film on 316 L stainless steel by sol–gel dip coating. *Applied Surface Science* 2009; **255** (20): 8328–33.
57. Xu S, Ng J, Zhang X, Bai H, Sun DD. Fabrication and comparison of highly efficient Cu incorporated TiO₂ photocatalyst for hydrogen generation from water. *International Journal of Hydrogen Energy* 2010; **35** (11): 5254–61.
58. He Y, Zhao B, Hughes JB, Han SS. Fenton oxidation of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene and acetone inhibition. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 2008 **5;2** (3): 326–32.
59. Villanueva C. Fotocatálisis con TiO₂/ultravioleta y TiO₂ Cu₂SO₄/visible como sistemas de desinfección para inactivar *E. coli* proveniente de agua residual doméstica. **Tesis maestría**. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia, 2011.

60. Andronic L, Isac L, Duta A. Photochemical synthesis of copper sulphide/titanium oxide photocatalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2011; **221** (1): 30–7.
61. Colón G, Maicu M, Hidalgo MC, Navío J a. Cu-doped TiO₂ systems with improved photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental* 2006; **67** (1-2): 41–51.
62. Hamid MA, Rahman IA. Preparation of Titanium Dioxide (TiO₂) thin films by sol gel dip coating method 2003; 5 (1): 86–91.
63. Fotocatálisis heterogénea. Capítulo 5. <http://bdigital.eafit.edu.co/PROYECTO/P660.2995V732/capitulo5.pdf>. Consultado en febrero 2011.
64. Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water research* 2010; **44** (10): 2997–3027.
65. Sato T, Taya M. Enhancement of phage inactivation using photocatalytic titanium dioxide particles with different crystalline structures. *Biochemical Engineering Journal* 2006; **28** (3):303–8.
66. Alrousa, D. M., Dunlop, P. S. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ films 2009; **43, 8**: 47 – 54.
67. Rincón a, Pulgarin C. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂ Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* 2004; **51** (4): 283–302.
68. Maya Rendón Catalina. inactivación de bacterias y amibas anfizoicas por medio de la aplicación de un proceso de desinfección con radiación UV. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México 2002.
69. Guimarães, J, Ibáñez, J. Desinfección de agua. capítulo 15. <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/cyted/22cap15.pdf> 2008. Consultado Marzo 2011.

70. Agladze GR, Tsurtsunia GS, Jung B-I, Kim J-S, Gorelishvili G. Comparative study of chemical and electrochemical Fenton treatment of organic pollutants in wastewater. *Journal of Applied Electrochemistry* 2007; **5**;37 (9): 985–90.
71. Bauer R, Fallmann H. The photo-Fenton oxidation a cheap and treatment method efficient wastewater 1997; **23** (4): 341–54.
72. Cho M, Jeong J, Kim J, Yoon J. Photo or Solar Ferrioxalate Disinfection *Technology without External Hydrogen Peroxide Supply* 2007; **12** (5): 238–43.
73. Blanco J. Degradación de un efluente textil real mediante procesos Fenton y Foto Fenton. **Tesis maestría**, Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona, España, 2009.
74. Xu S, Ng J, Zhang X, Bai H, Sun DD. Fabrication and comparison of highly efficient Cu incorporated TiO₂ photocatalyst for hydrogen generation from water. *International Journal of Hydrogen Energ.* 2010; **35** (11): 5254–61.
75. Pignatello J, Oliveros J, MacKay A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2006; **(1)**: 1-84.
76. Soon AN, Hameed BH. Heterogeneous catalytic treatment of synthetic dyes in aqueous media using Fenton and photo-assisted Fenton process. *Desalination* 2011; **269** (1-3): 1–16.
77. Spuhler D, Andrés Rengifo-Herrera J, Pulgarin C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Applied Catalysis B: Environmental* 2010; **96** (1-2): 126–41.
78. Meza R., Monroy A., Mercado M., Poutou R., Rodríguez P., Pedroza A. Study of the stability in real time of cryopreserved strain banks. *Universitas scientiarum* 2004; (2): 35-42
79. Martínez María Mercedes., Carrascal Ana Karina y Martínez Patricia. Manual de laboratorio. Introducción a la biotecnología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2000.

80. Chiaramonte, Th., E. Abramof, F. Fabreguette, M. Sacilotti, and L.P. Cardoso. X-ray multiple diffraction in the characterization of TiNO and TiO₂ thin films grown on Si (001). *Applied Surface Science* 253, no. 3 2006; 1590-1594.
81. Bukharaev a. a., Ziganshina S a., Chuklanov a. P. Atomic force microscopy metrology of catalytic nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia* 2010; **13**;5 (5-6):364–76.
82. Chauhan K, Trivedi U, Patel KC. Statistical screening of medium components by Plackett – Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice 2007; **98**: 98–103.
83. Zhou J, Yu X, Ding C, Wang Z, Zhou Q, Pao H, et al. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* 2011; **23** (1): 22–30.
84. Juneja, V. K., Marks, H. M. Growth kinetics of *Salmonella* spp. pre- and post-thermal treatment 2006; **109**, **5**: 54-59.
85. Medrano W. Evaluación de la calidad de aguas residuales de la planta de tratamiento de Alba Rancho (SEMAPA) con fines de riego. Universidad Mayor de San Simón. **Tesis Maestría**. Profesional en Levantamiento de Recursos Hídricos. Bogotá 2001
86. Theys. Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 67-77.
87. Xia H-L, Zhuang H-S, Zhang T, Xiao D-C. Photocatalytic degradation of Acid Blue 62 over CuO-SnO₂ nanocomposite photocatalyst under simulated sunlight. *Journal of environmental sciences (China)* 2007; **19** (9): 1141-5.
88. Bensalah N, Khodary A, Abdel-Wahab A. Kinetic and mechanistic investigations of mesotrione degradation in aqueous medium by Fenton process. *Journal of hazardous materials* 2011; **15- 189** (1-2): 479–85.

89. Huang L, Peng F, Wang H, Yu H, Li Z. Preparation and characterization of $\text{Cu}_2\text{O}/\text{TiO}_2$ nano-nano heterostructure photocatalysts. *Catalysis Communications* 2009; **25;10** (14): 1839–43.
90. Karuppuchamy S, Iwasaki M, Minoura H. Electrochemical properties of electrosynthesized TiO_2 thin films. *Applied Surface Science* 2006; **253** (5) 2924–9.
91. Di Paola A, García-López E, Marcì G, Palmisano L. A survey of photocatalytic materials for environmental remediation. *Journal of hazardous materials* 2012; **15**; 211-212: 3–29.
92. Daza Carlos Enrique, Centeno Miguel A, Molina Rafael, Mondrago Fanor, Gamba Oscar A, Hernández Yesid, Moreno Sonia. High-Stable Mesoporous Ni-Ce/Clay Catalysts for Syngas Production. *Catalysis Letters* 2011; **22;141**(7): 1037–46.
93. Daoud W a., Xin JH, Zhang Y-H, Qi K. Surface characterization of thin titania films prepared at low temperatures. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2005; **351** (16-17): 1486–90.
94. Van Hullebuscha Eric D, Gieteling Jarno, Zhanga Min, Zandvoort Marcel H, Van Daeleb Wim, Defrancqb Jacques, Lensa Piet N.L. Cobalt sorption onto anaerobic granular sludge: isotherm and spatial localization analysis. *Journal of biotechnology* 2006; **24;121** (2): 227–40.
95. Colón G, Maicu M, Hidalgo MC, Navío J a. Cu-doped TiO_2 systems with improved photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental* 2006; **67** 1-2): 41–51.
96. Medina-valtierra J, Garcá J, Frausto-reyes C, Calixto S. The photocatalytic application and regeneration of anatase thin films with embedded commercial TiO_2 particles deposited on glass microrods 2006; **252**: 3600–8.
97. Kang Q, Lu QZ, Liu SH, Yang LX, Wen LF, Luo SL, Cai Qing Y. A ternary hybrid $\text{CdS}/\text{Pt-TiO}_2$ nanotube structure for photoelectrocatalytic bactericidal effects on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 2010; **31** (12): 3317–26.

98. Ingrosso C, Striccoli M, Agostiano a., Sardella E, Keller S, Blagoi G. Surface Functionalization of Micro Mechanical Cantilever Sensors by Organic Capped TiO₂ and Fe₂O₃ Nanocrystals. *Procedia Chemistry* 2009; **1** (1): 32–5.
99. Yin S, Ihara K, Komatsu M, Zhang Q, Saito F, Kyotani T, Sato Tsugio. Low temperature synthesis of TiO₂-xNy powders and films with visible light responsive photocatalytic activity. *Solid State Communications* 2006; **137** (3): 132–7.
100. Hou Y-Q, Zhuang D-M, Zhang G, Zhao M, Wu M-S. Influence of annealing temperature on the properties of titanium oxide thin film. *Applied Surface Science* 2003; **218** (1-4): 98–106.
101. Fu, Pingfeng, Pengyi Zhang, and Jia Li Photocatalytic degradation of low concentration formaldehyde and simultaneous elimination of ozone by-product using palladium modified TiO₂ films under UV254+185nm irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* 105 2011; 1-2.
102. Robertson JMC, J. Robertson PK, Lawton L a. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005; **175** (1): 51–6.
103. Cabrera JA, Cuesta MJ, Perez M. Detoxificación solar. Ministerio de educación y ciencia 2006.
104. Xiong L, Yang F, Yan L, Yan N, Yang X, Qiu M, Yu Ying. Bifunctional photocatalysis of TiO₂/Cu₂O composite under visible light: Ti³⁺ in organic pollutant degradation and water splitting. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2011; **72** (9): 1104–9.
105. Janssen R, van der Straaten T, van Diepen A, van Dissel JT. Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2003; **5** (6): 527–34.
106. Sun H, Bai Y, Jin W, Xu N. Visible-light-driven TiO₂ catalysts doped with low-concentration nitrogen species. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 2008; **92** (1): 76–83.


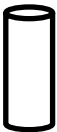
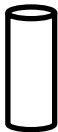
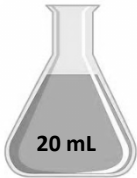
107. Jun TH, Lee K-S, Song HS. Hydrophilicity of anatase TiO₂/Cr-doped TiO₂ thin films with different band gaps. *Thin Solid Films* 2012; **520** (7): 2609–12.
108. Karunakaran C., Abiramasundari G., Gomathisankar P., Manikandan G., Anandi V. “Cu-doped TiO₂ nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light” *Journal of colloid and interface science* 2010; **352**. 68-74.
109. Rengifo-Herrera J, Pulgarin C. Photocatalytic activity of N, S co-doped and N-doped commercial anatase TiO₂ powders towards phenol oxidation and *E. coli* inactivation under simulated solar light irradiation. *Solar Energy* 2010; **84** (1): 37–43.
110. Liu Y, Wang X, Yang F, Yang X. Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO₂ and Ag/TiO₂ composite films. *Microporous and Mesoporous Materials* 2008; **114** (1-3):431–9.
111. Tseng I-H, Wu JC., Chou H-Y. Effects of sol–gel procedures on the photocatalysis of Cu/TiO₂ in CO₂ photoreduction. *Journal of Catalysis* 2004; **25**; 221 (2): 432–40.
112. Xin B, Wang P, Ding D, Liu J, Ren Z, Fu H. Effect of surface species on Cu-TiO₂ photocatalytic activity. *Applied Surface Science* 2008; **254** (9): 2569–74.
113. Du Y, Goldstein S, Rabani J. The catalytic effects of copper ions on photo-oxidation in TiO₂ suspensions: The role of superoxide radicals. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2011; **225** (1): 1–7.
114. Li J, Luan Z, Yu L, Ji Z. Pretreatment of acrylic fiber manufacturing wastewater by the Fenton process. *Desalination* 2012; **284**: 62–5.
115. Pontes RFF, Moraes JEF, Machulek A, Pinto JM. A mechanistic kinetic model for phenol degradation by the Fenton process. *Journal of hazardous materials* 2010; **176** (1-3): 402–13.
116. Martinez L, Hodaifa G, Rodríguez S, Giménez J, Ochando J. Degradation of organic matter in olive-oil mill wastewater through homogeneous Fenton-like reaction. *Chemical Engineering Journal*; **173** (2): 503–10.

117. Maezono T, Tokumura M, Sekine M, Kawase Y. Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere* 2011; **82** (10): 1422–30.
118. Hassen A, Heyouni A. Inactivation of indicator bacteria in wastewater by chlorine kinetics study 2000; **72**: 85–93.
119. Salles M., Codina C., Higiene y antisepsia del paciente. Limpieza, desinfección y esterilización en el ámbito hospitalario. Sociedad española de farmacia hospitalaria. Barcelona, España. 2005
120. Baran W, Makowski A, Wardas W. The effect of UV radiation absorption of cationic and anionic dye solutions on their photocatalytic degradation in the presence TiO₂. *Dyes and Pigments* 2008; **76** (1): 226–30.
121. Rincón A-G, Pulgarin C. Fe³⁺ and TiO₂ solar-light-assisted inactivation of *E. coli* at field scale. *Catalysis Today* 2007; **122** (1-2): 128–36.

10. ANEXOS


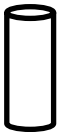
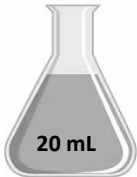
Anexo 1. Curvas de inactivación de hipoclorito de sodio 20 ppm.

Procedimiento

DILUCIONES HIPOCLORITO DE SODIO			
Hipoclorito de Sodio comercial (Blancox™)		5,25% o 52.500ppm	
Se realiza dilución aproximadamente hasta 500 ppm empleando agua potable como diluyente			
	→		→
52.500 ppm		5.250 ppm	
			→
			
			525 ppm
Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones			
Concentración 20 ppm			
Inóculo 2 mL			Hipoclorito de sodio 685 µL
Agua de chiller 17,32 mL			
Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.			
• $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$			
$525 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 18 \text{ mL}$			
$V_1 = 0,685 \text{ mL} \text{ ó } 685 \text{ µL}$			
$V_{\text{final}} = 20 \text{ mL}$			
<i>Inoculo = Estandarizado, dilución 1/10 (2 mL)</i>			

$$18 \text{ mL} - 0,685 \text{ mL} = 17,32 \text{ mL agua de chiller}$$

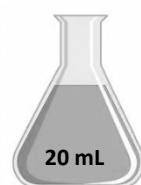
Anexo 2. Curvas de inactivación de ácido peracético 80 y 160 ppm. Procedimiento

DILUCIONES ÁCIDO PERACÉTICO			
<i>Ácido peracético empleado</i>	150.000 ppm		
Se realiza dilución aproximadamente hasta 1500 ppm empleando agua potable como diluyente			
	→		→
150.000 ppm		15.000 ppm	1.500 ppm
			Esta última es la empleada como solución stock para realizar las diluciones
Concentración 80 ppm			
Inóculo 2 mL			Hipoclorito de sodio 960 µL
Agua de chiller 17,04 mL			
Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.			
• $C1 \times V1 = C2 \times V2$			
$1500 \text{ ppm} \times V1 = 80 \text{ ppm} \times 18 \text{ mL}$			
$V1 = 0,96 \text{ mL} \text{ ó } 960 \text{ µL}$			
$V_{final} = 20 \text{ mL}$			
<i>Inoculo = Estandarizado, dilución 1/10 (2 mL)</i>			
$18 \text{ mL} - 0,96 \text{ mL} = 17,04 \text{ mL agua de chiller}$			

Concentración 160 ppm

Inóculo 2 mL

Agua de chiller
16,08 mL



Hipoclorito de sodio 1,92 μ L

Las concentraciones se establecieron de acuerdo a los siguientes cálculos, basado en la ley de la volumetría.

$$\bullet \quad C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1500 \text{ ppm} \times V_1 = 160 \text{ ppm} \times 18 \text{ mL}$$

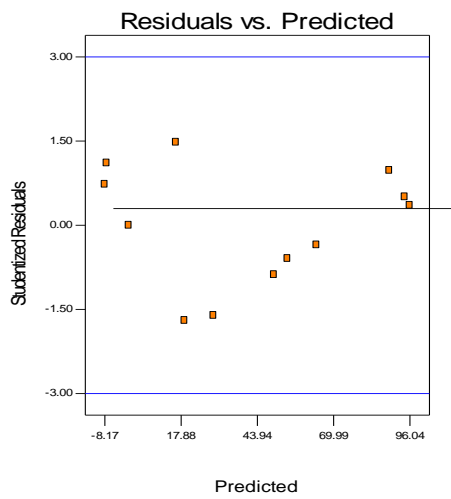
$$V_1 = 1,92 \text{ mL} \text{ ó } 1920 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V_{\text{final}} = 20 \text{ mL}$$

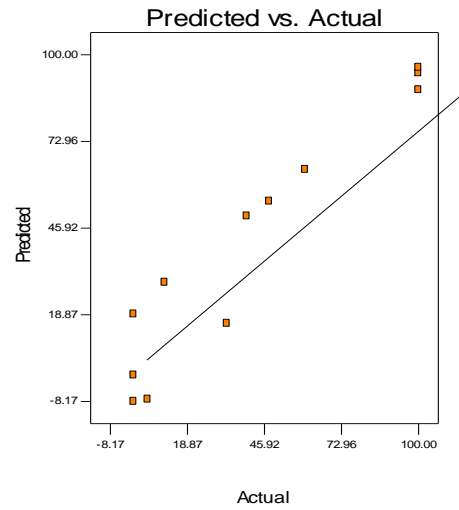
Inoculo = Estandarizado, dilución 1/10 (2 mL)

$$18 \text{ mL} - 1,92 \text{ mL} = 16,08 \text{ mL agua de chiller}$$

Anexo 3. Valores predichos y observados Plackett-Burman para fotocatalisis

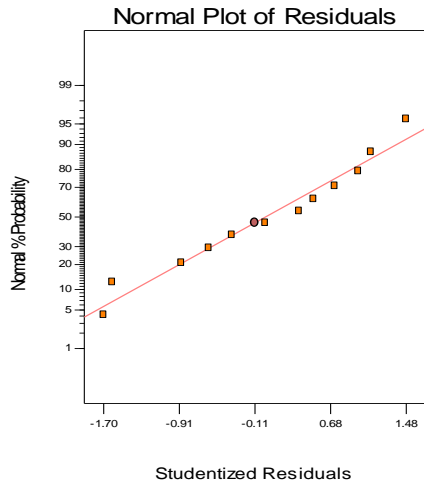


Grafica de residuales versus valores predichos



Grafica de valores predichos versus valores observados

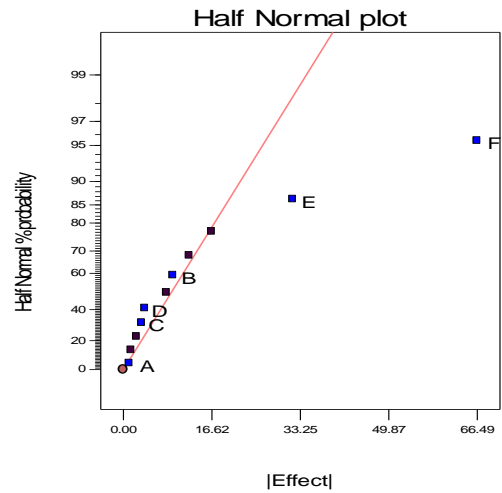
Anexo 4. Figuras para la comprobación de supuesto diseños experimentales. Plackett-Burman para fotocatalisis de *S. Thypimurium*



Grafica de normalidad

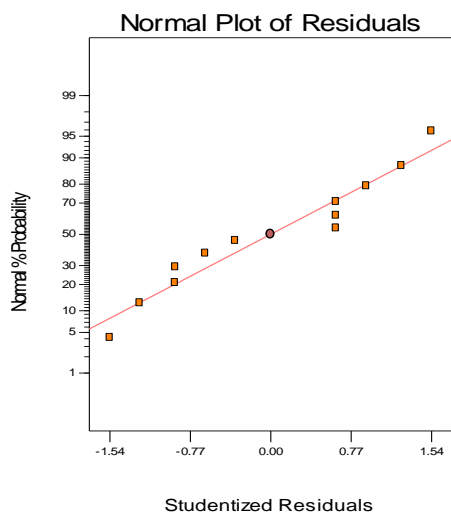
DESIGN-EXPERT Plot
innac

- A: time
- B: concentra
- C: pH
- D: agita
- E: tio2
- F: uv
- G: Dummy1
- H: Dmmy2
- J: Dummy3
- K: Dummy4
- L: Dummy5



Selección de factores que generaron los efectos principales.

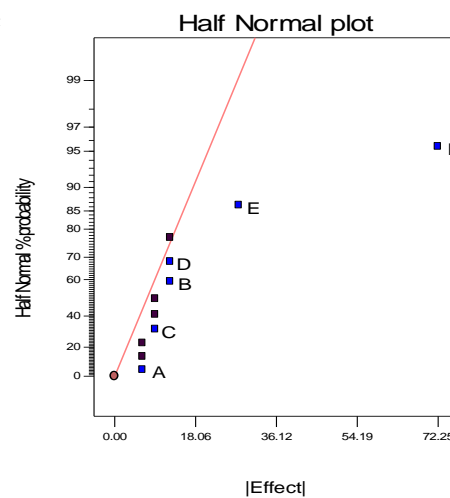
Anexo 5. Figuras para la comprobación de supuesto diseños experimentales. Placket-Burman para fotocátalisis de S. Enteritidis



Grafica de normalidad

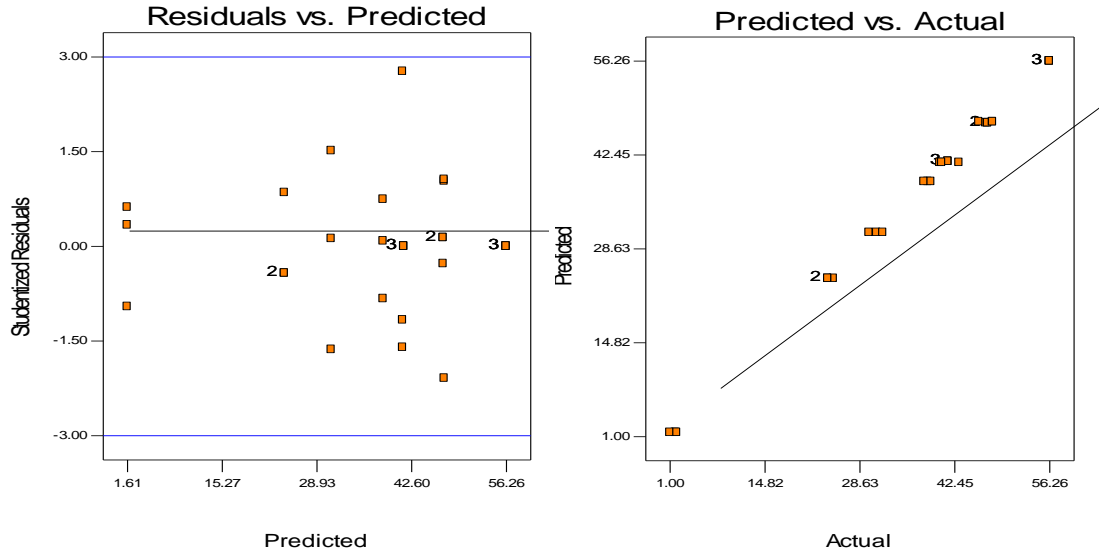
DESIGN-EXPERT Plot por

- A: time
- B: con
- C: ph
- D: agit
- E: tio2
- F: longitus
- G: Dummy 1
- H: Dummy 2
- J: Dummy 3
- K: Dummy 4
- L: Dummy 5

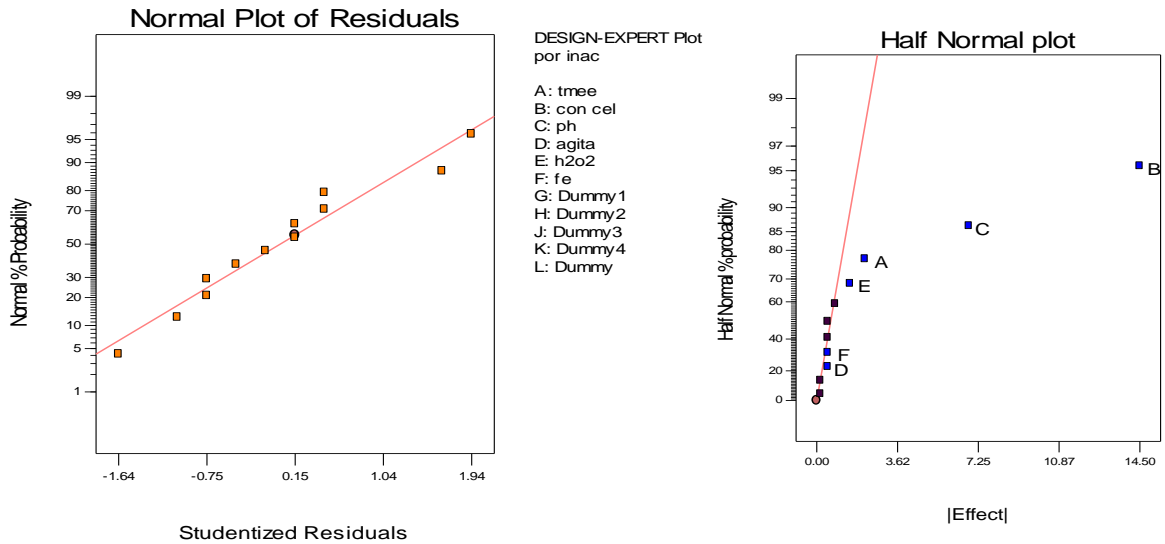


Selección de factores que generaron los efectos principales.

Anexo 6. Valores predichos y observados Plackett-Burman para proceso Fenton



Anexo 7. Figuras para la comprobación de supuesto diseños experimentales. Plackett-Burman para proceso Fenton para *S. Typhumurium*



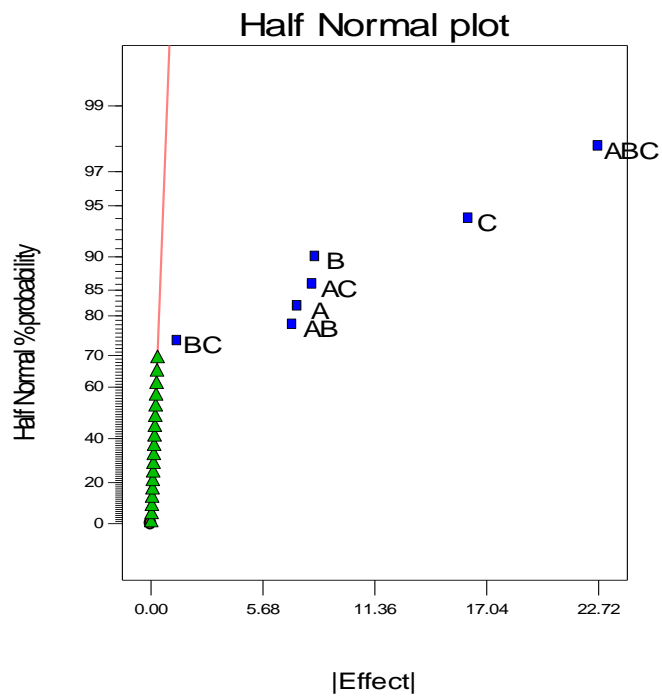
Grafica de normalidad

Selección de factores que generaron los efectos principales.

Anexo 8. Factorial 2³ para Fenton a escala de reactor

DESIGN-EXPERT Plot
inma

A: ph
B: h2o2
C: fe



Selección de factores que generaron los efectos principales

Anexo 9. Productos científicos generados de la tesis de Maestría

Trabajo aceptado en:

International Conference on Photochemical Conversion and Storage of solar Energy

IPS-19. Pasadena California. Julio 20 al 3 de agosto

Cu-modified TiO₂-photocatalysis for *Salmonella* spp. inactivation

A. Hernández ¹, A.K. Carrascal ², C.E. Daza³, A.M. Pedroza ¹

¹ Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 40 – 62. Bogotá, D.C. (Colombia).

² Laboratorio de Microbiología de alimentos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Edificio 50. Bogotá Colombia.

³ Grupo de Fitoquímica. Fisico-Química de Materiales. Departamento de Química. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 40 – 62. Bogotá, D.C. (Colombia).

apedroza@javeriana.edu.co

ABSTRACT

Salmonella spp.; is a bacteria highly related with food transmitted diseases and great impact in public health. TiO₂-Photocatalysis is an efficient method for microbial disinfection. The main objective of this research was evaluating Cu-modified TiO₂-photocatalysis for *Salmonella* spp.; inactivation from poultry plants. The wastewater obtained from the chiller process was inoculated with two strains of *Salmonella* spp.; A Placket-Burman design was performed in order to evaluate six factors (pH, microbial concentration, microbial inactivation time, stirring, modified and unmodified thin film, and irradiation energy). Cu-modified TiO₂ thin films and UV radiation were chosen from an Anova test (p<0.05). Inactivation kinetics were evaluated during 65 min. *Salmonella* Enteritis was completely inactivated in 25 min. *Salmonella* Typhimurium was totally inactivated in 35 min. Mathematical modelation was made and inactivation constants were determined obtaining K (min⁻¹) of 0,479±0,012 (R²=0,998) and K (min⁻¹), 0,3644±0,0045 (R²=0,998) for the former strains, respectively.

Keywords: TiO₂-thin films, inactivation, photocatalysis, salmonella.

Anexo 10. Artículo para revista indexada

Comparative study of CuO/TiO₂, Fe⁺²/H₂O₂, sodium hipoclorine and peracetic acid treatments of pathogenic *Salmonella* spp in Chiller water

Angie Hernández-Molano¹, Johana Moncada¹, Carlos Enrique Daza³, Ana Karina Carrascal-Camacho², Aura M. Pedroza-Rodriguez^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología ambiental y suelos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Edificio 50. Bogotá Colombia.

²Laboratorio de Microbiología de alimentos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Edificio 50. Bogotá Colombia.

³ Grupo de Fitoquímica. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Edificio 53. Bogotá Colombia.

apedroza@javeriana.edu.co

ABSTRACT

In Poultry slaughter plants may be contamination of the process water chiller with pathogens. In such industry a crucial part of the process is known as a chiller. Several types of disinfectants like peracetic acid and sodium hypochlorine are used in this stage to eliminate pathogenic microorganisms such as *Salmonella*. Due to different kinds of issues related with the use disinfectants, new type of disinfections technologies has been explored. Among them, photocatalysis with CuO/TiO₂ and process Fenton Fe⁺²/H₂O₂ are considered as good alternatives for water disinfection. These two technologies were evaluated and compared with sodium hypochlorine and peracetic acid for inactivation of *Salmonella*. Using a statistical designs Plackett Burman and Factorial 2³ the operational conditions for the process were selected, these were pH: 5.0, cell concentration 1 X 10⁶ UFC/mL, 60 min. Statistical analyses suggest that process Fenton and photocatalysis with CuO/TiO₂ were more effective for *Salmonella* spp inactivation under the parameters evaluated. Additionally, process Fenton was capable of 100% of inactivation in 15 minutes while photocatalysis achieved 100% in 35 minutes. Traditional disinfectants (sodium hypochlorite, 20 ppm and peracetic acid 80 and 160 ppm) were also tested, founding 12 % of inactivation using peracetic acid. No inactivation was produce by sodium hypochlorite

Key words: photocatalysis CuO/TiO₂, process Fenton Fe⁺²/H₂O₂, *Salmonella* spp, inactivation, wáter the chiller, hypochlorite and peracetic acid.