



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA FOTÓLISIS UV/254 nm COMO TRATAMIENTO PARA LA  
ELIMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN AGUAS DE GRANJAS PORCÍCOLAS.

**CYNTHIA LORENA VALENCIA ACOSTA**

Directora

Ana Karina Carrascal Camacho, Bacterióloga. M. Sc.

Laboratorio de Microbiología de alimentos, Grupo de Biotecnología Ambiental e industrial  
(GBAI). Departamento de Microbiología.

Co-directora

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Bacterióloga. M.Sc., Ph.D

Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e  
industrial (GBAI). Departamento de Microbiología.

Asesora

Iliana Constanza Chamorro Tobar

Microbióloga Industrial

Bogotá, mayo 24 de 2019

EVALUACIÓN DE LA FOTÓLISIS UV/254 nm COMO TRATAMIENTO PARA LA  
ELIMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN AGUAS DE GRANJAS PORCÍCOLAS.

Cynthia Lorena Valencia Acosta

**APROBADO**

---

**Concepción Puerta Bula, Ph.D**

**Decana Académica**

**Facultad de Ciencias**

---

**Marcela Franco Correa, Ph.D**

**Directora**

**Carrera Microbiología  
Industrial**

EVALUACIÓN DE LA FOTÓLISIS UV/254 nm COMO TRATAMIENTO PARA LA  
ELIMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN AGUAS DE GRANJAS PORCÍCOLAS.

Cynthia Lorena Valencia Acosta

**APROBADO**

---

**Ana Karina Carrascal C**

**Bacterióloga M.Sc.**

**Directora**

---

**Aura Marina Pedroza R**

**Bacterióloga. M.Sc. P.hD**

**Co-directora**

---

**Iliana Constanza Chamorro Tobar**

**Microbióloga Industrial**

**Asesora**

---

**Nadenka Melo.**

**M. Sc.**

**Universidad Distrital Francisco**

**José de Caldas**

**Jurado**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo infinito, por nunca desfallecer, por siempre apoyarme a lo largo de mi vida, a mi padre que aunque no esté conmigo sé que de una u otra forma apoyo todo mi proceso.

A Dios por darme fuerza para seguir adelante y nunca parar.

A las profesoras Ana Karina Carrascal y Aura Marina Pedroza por todo el apoyo y aporte tanto intelectual como personal a mi vida.

Iliana Chamorro e Irina Barrientos por el apoyo brindado durante el trabajo y por ser más que mis compañeras, mis amigas.

A Leonel Beltrán por el apoyo en la recolección de las muestras y a los dueños de las granjas por permitir tomar las muestras de agua en sus predios. Asimismo, a Porkcolombia FNP por el apoyo financiero del proyecto. Proyecto de investigación ID 7644. Prevalencia de *Salmonella*, perfil de susceptibilidad y factores de riesgo, en granja porcícola de tres regiones de Colombia.

A todos mis amigos por estar hasta el final.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	14
3. MARCO CONCEPTUAL.....	17
3.1 <i>Salmonella</i> .....	17
3.2 <i>Salmonella</i> en granjas porcícolas .....	18
3.3 Procesos de oxidación avanzada .....	19
3.4 Fotólisis .....	19
3.5 Fotólisis asistida químicamente o proceso foto Fenton modificado.....	21
3.6 Factores que afectan el proceso fotolítico y foto-Fenton .....	23
3.7 Mecanismos de reparación de las bacterias.....	25
3.7.1 Reparación fotoenzimática.....	25
3.7.2 Reparación por escisión-resíntesis .....	26
3.7.3 Reparación por recombinación.....	27
4. VACÍO DEL CONOCIMIENTO.....	28
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	28
6. OBJETIVOS .....	28
6.1 Objetivo general .....	28
6.2 Objetivos específicos.....	29
7. HIPÓTESIS.....	29
8. METODOLOGÍA .....	29
8.1 Selección de cepas.....	29
8.2 Selección de las granjas para el estudio .....	29
8.3 Caracterización microbiológica y fisicoquímica del agua.....	30
8.4 Selección de las condiciones de inactivación fotolítica empleando un diseño factorial 2 <sup>2</sup> 3 <sup>1</sup>	
8.5 Caracterización y preparación del agua a emplear en el diseño experimental .....	32
8.6 Configuración del reactor.....	33
8.7 Montaje de los experimentos.....	33
8.8 Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico .....	34

8.9	Pruebas en prototipo piloto en laboratorio .....	35
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
9.1	Identificación de <i>Salmonella</i> spp .....	36
9.2	Hallazgos de las encuesta realizadas a las granjas.....	36
9.3	Caracterización microbiológica del agua .....	38
9.4	Caracterización inicial de agua residual a emplear en el diseño experimental.....	40
9.5	Experimentos preliminares de inactivación en función del tiempo a concentraciones bajas y altas de <i>Salmonella</i> spp .....	41
9.6	Diseño experimental 2 <sup>2</sup> con tres puntos centrales .....	45
9.7	Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico PUJ .....	47
9.7.1	Caracterización de los tanques .....	47
9.8	Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico .....	52
9.9	Cinética a escala de laboratorio en reactor portátil CAMOCOL.....	57
10	CONCLUSIONES .....	62
11	BIBLIOGRAFIA.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de <i>Salmonella</i> entérica.....	18
Tabla 2. Clasificación de procesos de oxidación avanzada.....	19
Tabla 3. Granjas seleccionadas y muestreadas del departamento de Cundinamarca .....	30
Tabla 4. Parámetros físicos.....	30
Tabla 5. Parámetros químicos .....	30
Tabla 6. Parámetros microbiológicos .....	31
Tabla 7. Diseño factorial 2 <sup>2</sup> con tres puntos centrales. Efecto de la aireación y concentración inicial de <i>Salmonella</i> sobre la inactivación de <i>Salmonella</i> y remoción de DQO. ....	32
Tabla 8. Datos obtenidos de la encuesta a las granjas .....	37
Tabla 9. Parámetros microbiológicos, fisicoquímicos de muestras de punto de captación (Tanque de almacenamiento) del agua (7) y zona de disposición (Tanque de salida) (8) granja número cuatro. ....	38
Tabla 10. Parámetros microbiológicos, fisicoquímicos de muestra de zona de recolección (Tanque de almacenamiento) del agua (15) y zona de disposición (Salida del tanque) de (16) de la granja número cuatro.....	40
Tabla 11. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para aireación y concentración inicial de <i>Salmonella</i> spp.....	45
Tabla 12. Caracterización física, química y microbiológica del agua empleada para las cinéticas de inactivación en el reactor cúbico .....	52
Tabla 13. Contantes cinéticas de inactivación calculadas por modelos de pseudo primer orden .....	55
Tabla 14. Contantes cinéticas de inactivación calculadas por modelos de pseudo primer orden .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de las lesiones de ADN inducidas por UV. R, H o CH <sub>3</sub> .....	21
Figura 2. Reactor a escala de laboratorio.....	33
Figura 3. Reactor piloto portátil construido por CAMOCOL S.A.S para la instalación en campo. ....	36
Figura 4. Cinéticas de inactivación fotolítica de <i>Salmonella</i> spp empleando radiación UV/254 nm. (A) recuento de bacterias sobrevivientes en función del tiempo a bajas y altas concentraciones. (B) Constantes de inactivación fotolítica de pseudo segundo orden para concentraciones bajas. (C) Constantes de inactivación fotolítica de pseudo segundo orden para concentraciones altas .....	42
Figura 5. Variables de respuesta del diseño experimental 2 <sup>2</sup> según el tratamiento. a) Porcentaje de inactivación de <i>Salmonella</i> spp, b) Porcentaje de remoción de DQO, c) pH del tratamiento. Los resultados son el promedio de tres replicas con su respectiva desviación estándar. Las letras en la figura representan las diferencias significativas entre tratamientos. Siendo los mejores los aquellos con la letra a.....	47
Figura 6. Caracterización inicial de los 14 tanques de agua de uso porcícola de la granja en San Antonio de Tequendama.....	52
Figura 7. Cinéticas de inactivación a escala de laboratorio en reactor cúbico. En azul tratamiento fotolítico UV, en rojo tratamiento fotolítico UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y en negro tratamiento control con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Promedio de tres replicar con respectivas desviaciones estándar. Las letras en la figura son las diferencias significativas entre tratamientos y controles .....	55
Figura 8. Cinéticas de inactivación a escala de laboratorio en reactor cúbico. En negro tratamiento fotolítico UV, en rojo tratamiento fotolítico UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y en azul tratamiento control con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
Figura 9. Cinéticas de inactivación fotolítica de <i>Salmonella</i> spp y <i>E.coli</i> empleando radiación UV/254 nm. (A) recuento de bacterias sobrevivientes en función del tiempo Log <sub>10</sub> UFC/mL (B) Log <sub>10</sub> X/X <sub>0</sub> de UFC/mL bacterias sobrevivientes .....	59
Figura 10. Caracterización fisicoquímica de las cinéticas de inactivación a escala de laboratorio en prototipo piloto. (A) En negro pH y en rojo conductividad (mS/cm) (B) En azul nitratos y en verde nitritos (mg/L), (C) Sólidos suspendidos totales (mg/L) (D) Demanda química de oxígeno (mg/L) .....	61

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1

..... 34

## TABLA DE ABREVIATURAS

° C:	Grados centígrados.
μ:	Micras
μm:	Micromicras
ADN:	Ácido desoxirribunucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
a <sub>w</sub> :	Actividad de agua
BHI:	Infusión cerebro corazón
CDC :	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
CuO:	Óxido de cobre
DANE:	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DBO:	Demanda biológica de oxígeno
DQO:	Demanda química de oxígeno
E .coli:	Escherichia coli
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fe <sup>2+</sup> :	Ión ferroso
H <sub>2</sub> O:	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
INS:	Instituto Nacional de Salud mL: Mililitro
nm:	Nanometro
NTC:	Norma técnica Colombiana
O <sub>3</sub> :	Ozono
PC:	Punto central
pH:	Potencial de hidrógeno
PIB:	Producto Interno Bruto
POA:	Procesos de oxidación avanzada
ppm:	Partes por millón
rpm:	Revoluciones por minuto
SS:	Sólidos suspendidos
SST:	Sólidos suspendidos totales
THMs:	Trihalometanos
TiO <sub>2</sub> :	Óxido de titanio
TSA:	Tripticasa de soya
UFC:	Unidades formadoras de colonia
UV:	Ultravioleta

## RESUMEN

El agua utilizada en las granjas porcícola es susceptible a la contaminación con patógenos como *Salmonella* spp. con base en lo anterior, en esta investigación se estudió un proceso de oxidación avanzada: fotólisis UV/254 nm como alternativa física para la inactivación de *Salmonella* spp. presente en agua proveniente de granjas porcícolas. Inicialmente se realizaron muestreos de aguas provenientes de granjas porcícolas para emplearlas en la caracterización física, química y microbiológica. La selección de las condiciones que favorecen el proceso de fotólisis se evaluó a través de un diseño factorial  $2^2$  con tres puntos centrales. Finalmente se realizaron cinéticas de inactivación/remoción valorando tres tratamientos: Fotólisis UV/254 nm, fotólisis UV/254 nm con peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  15 ppm y peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  a 15 ppm. De acuerdo por los resultados del diseño experimental la inactivación de *Salmonella* spp. se favorece al emplear una aireación de 1 L/min a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC/mL a los 10 minutos de exposición a la luz ultravioleta (100 % de inactivación). Por otro lado, con las cinéticas de inactivación se estableció que los mejores tratamientos fueron fotólisis y fotólisis  $H_2O_2$ , sin que se observarán diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre ellos a los tres minutos. En relación la remoción de DQO los mayores porcentajes se obtuvieron para el T2 con porcentajes de 21 %. Respecto a las cinéticas de inactivación con el reactor piloto se redujeron tres unidades logarítmicas de *E. coli* y *Salmonella* spp. La remoción de DQO fue de 37 % a los 60 minutos.

**Palabras claves:** Fotólisis, *Salmonella* spp, inactivación, ganadería de porcinos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa causal de gastroenteritis en el hombre y los animales, ocasionando en humanos brotes asociados principalmente a alimentos de origen animal (aves, bovinos y cerdos) [1]. Por esta razón, se han adoptado medidas de control a lo largo de las agrocadenas dentro de las cuales se incluyen la implementación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), con la cuales se pretende disminuir los riesgos para la salud animal y humana, y la inocuidad de los productos [2]. En Colombia, el sector porcícola ha experimentado un importante crecimiento y ha mejorado significativamente su productividad durante los últimos 15 años, esto debido a que la carne de cerdo, es una proteína de bajo precio. El sector porcícola mueve al año \$ 2,6 billones en términos de producción, tiene una participación de 1,4 % del PIB agropecuario y de 4,8 % del PIB pecuario, según el último estudio sectorial del DANE de 2018 [2, 3] de acuerdo con el último inventario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en 2018, se contabilizaron 239.199 granjas porcícolas en todo el país con una población porcina de más de 5,5 millones de animales [4]

En ese volumen, se destacan Antioquia (45 %), Valle del Cauca (15 %), Eje Cafetero (8,6 %), Meta (5,6 %) y Atlántico (2,9 %), como las regiones con mayor producción de cerdos. Sin embargo, Bogotá también sobresale por ser un importante epicentro del beneficio porcino, ya que acoge la mayoría de la producción del centro del país. Esto ha generado un incremento en la demanda nacional de productos de origen porcino, los cuales deben garantizar que no causen daño a la salud humana, haciéndose imprescindible el establecimiento de acciones que promuevan la inocuidad de los alimentos. [2].

La principal herramienta de control de la salmonelosis es el conocimiento de su epidemiología. Así, es necesario conocer los factores de riesgo para el control de la salmonelosis en porcinos y así establecer su relación con la introducción y diseminación de la misma en las granjas de crianza. La alimentación, el manejo y las medidas de bioseguridad han sido descritos como los más importantes [3], estudios previos de nuestro

grupo de investigación han establecido que el agua empleada en las granjas porcícolas es el principal factor de riesgo de *Salmonella* spp. [5]

El agua utilizada en las granjas es susceptible a la contaminación con patógenos como *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, así como virus y parásitos, para la protección de los animales de granja, todas las fuentes de agua utilizadas para el consumo de los animales deben cumplir con unos requisitos mínimos determinados por la resolución 0631 de 2015 del Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos para ganadería de porcinos (cría). Las aguas que no cumplen los requisitos de calidad sanitaria pueden tratarse mediante tratamientos físicos como la desinfección con calor y rayos ultravioleta (UV), o químicos como la cloración o el uso de peróxido de hidrógeno [6]; su implementación está indicada en la Norma Técnica Colombiana (NTC 5480) del 2007 y la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO); no obstante el uso indiscriminado de los desinfectantes químicos como el cloro, usado generalmente en la industria, 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 convirtiéndose en un problema de salud pública [6]. La generación de estos compuestos también reduce el efecto residual del cloro, por lo tanto requiere de un cambio constante. Estos hallazgos han sugerido el uso de tecnologías más amigables como lo son los procesos de oxidación avanzada (POA) minimizando el impacto negativo en el ambiente y en la calidad del agua mediante la producción de especies químicas altamente reactivas con baja especificidad capaces de degradar diferentes tipos de compuestos e inactivar microorganismos [32], con base en lo anterior, en esta investigación se estudió un proceso de oxidación avanzada: Fotólisis UV/254nm para la inactivación de *Salmonella* spp presente en agua proveniente de granja porcícolas a escala de laboratorio.

## **2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

*Salmonella* es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, constituye una de las causas más importantes de enfermedades gastrointestinales y zoonosis en el mundo [3]. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos en 2015, se identificaron 2.500 cepas diferentes (serotipos) de

*Salmonella* y en 2018 el Instituto Nacional de Salud (INS) publicó un informe de enfermedades transmitidas por alimentos en Colombia donde indicó que fueron notificados 9062 casos y de estos el 15 % fue asociado a *Salmonella* spp [5].

*Salmonella* es transmitida por vía fecal-oral puesto que la mayor fuente de contaminación son las heces de animales. La infección se genera a partir la ingestión de alimento o agua contaminada con dicho patógeno, o a través del contacto directo o indirecto con animales infectados [6]. Debido a esto se considera que existen tres factores de riesgo asociados a la prevalencia de *Salmonella*: el suministro y la calidad de agua, el control de plagas y por último la limpieza y desinfección [3].

Diversos estudios han establecido que, en promedio, el 20 % de todos los casos humanos de salmonelosis se pueden vincular al consumo de carne de cerdo. Se ha establecido que los cerdos durante las etapas de levante pueden convertirse en portadores de *Salmonella* por tanto son una fuente importante de contaminación de la carne. Se ha demostrado que una reducción de la prevalencia de *Salmonella* en la etapa previa al sacrificio aumenta la seguridad de la carne de cerdo [7,8].

La calidad y cantidad de agua debe ser apropiada, estar tratada y ser suficiente para abastecer a los animales presentes en la granja. Para garantizar la buena salud de los cerdos debe llevarse un registro del tratamiento de la misma [8]. Una fuente adecuada de agua limpia y fresca es importante en la producción porcina, ya que el agua utilizada en la explotación puede estar contaminada en el origen o puede contaminarse en la propia granja, se recomienda, realizar pruebas de potabilidad, y la protección de los depósitos del agua para prevenir la contaminación por pájaros, roedores y polvo [19, 20, 21]. Durante la etapa de levante es importante la correcta limpieza y desinfección de los comederos y bebederos entre diferentes lotes de cerdos, pues los cerdos pueden ser reservorio de la bacteria, contaminando directamente los bebederos.

Es importante el control de la calidad microbiológica del agua que puede contaminarse con bacterias como mesófilas, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Enterococcus* y dentro del grupo de *Enterobacterias* encontramos otros géneros como *Shigella* y *Salmonella* spp. Existen diferentes medidas para mantener el control de la calidad del agua

entre ellas el uso de compuestos clorados, ácidos orgánicos, entre otros; no obstante, el uso indiscriminado de compuestos clorados puede generar efectos adversos tanto en la salud humana, animal como en el medio ambiente [9]. Lo más empleados son los compuestos a base de cloro, dióxido de cloro o peróxido de hidrógeno [10]. La eficacia de la desinfección suele ser variable, dependiendo del agua a ser tratada, las dosis del desinfectante usado y la frecuencia de aplicación [11].

El hipoclorito de sodio, el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno son los principales productos empleados por las industrias para aguas, el uso de estos agentes favorece la disminución de la carga microbiana, el uso de estos desinfectantes está indicado en la NTC 5480, la FAO aceptó su implementación en granjas de animales, sin embargo, difieren en gran medida en su mecanismo de acción. Estos agentes favorecen la disminución de la carga microbiana presente en las superficies de equipos y en procesos que incluyen agua [11]. 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 y que el ácido peracético no puede exceder las 150 ya que es una sustancia corrosiva y comburente, a concentraciones superiores al 10 % [12].

Los problemas que acarrear el uso de este tipo de compuestos han llevado a la implementación de nuevas tecnologías como los procesos de oxidación avanzada (POA) definidos como métodos de oxidación físico/químicos en fase acuosa basados principalmente en la intermediación de radicales hidroxilo  $\text{OH}^*$  [13] siendo una alternativa más eficaz en la reducción del uso de compuestos químicos que pueden ser tóxicos para el ser humano y el medio ambiente.

Los POAs como la fotólisis y la fotocatalisis han sido ampliamente utilizados para la eliminación de microorganismos de importancia en salud pública como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp. entre otros [13]. En un estudio realizado en muestras del afluente de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de Subachoque al realizar tratamiento con radiación UV se obtuvieron porcentajes de inactivación de *E. coli* del 100 % en agua esterilizada re-inoculada después de 8 horas de irradiación y a la hora y media en agua sin esterilizar, debido a que el proceso de fotólisis promueve la generación de especies oxidativas como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ), radical hidroperóxido ( $\text{HO}_2$ ) y el

radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), que provocan un daño oxidativo a nivel de la membrana bacteriana y en el ADN alterando las bases nitrogenadas generando dímeros y trímeros [13].

En otro estudio realizado con aguas generadas en plantas de beneficio avícola en los resultados obtenidos con fotólisis 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*. [14].

Por esto es importante implementar el uso de nuevas tecnologías diferentes a las convencionales como lo son los procesos de oxidación avanzada como la fotólisis para el tratamiento de agua potable y residual de empresas del sector porcícola como opción viable y amigable de desinfección.

### **3. MARCO CONCEPTUAL**

#### ***3.1 Salmonella***

Es un género de bacterias Gram negativas, móviles, no formadoras de esporas, no encapsuladas, anaeróbicas facultativas que causan varias enfermedades, principalmente entéricas (intestinales), en humanos y otros animales. Crecen a temperatura entre (7- 48 °C) y pH entre (4 y 9), su tamaño oscila entre 0.3 a 1  $\mu\text{m}$  x 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ . El principal reservorio es el tracto gastrointestinal de hombre y animales como pollos, pavos, cerdos, iguanas entre otros [14].

*Salmonella* se clasifica como anaerobio facultativo. El crecimiento bajo atmósferas de nitrógeno es ligeramente menor a las condiciones aeróbicas. Puede crecer de 8-11 °C con concentraciones de 20-50 % de  $\text{CO}_2$ , su crecimiento se ve retardado cuando hay un 80 % de  $\text{CO}_2$  en el aire [15].

*Salmonella* puede multiplicarse en  $a_w$  que van desde 0.94 hasta 0.995 y puede persistir en alimentos con  $a_w$  inferiores a 0.94 como chocolate, nueces y mantequilla de maní [7].

Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Grupo V), *Salmonella* entérica se subdivide en 6 subespecies [15] como se observa en la tabla 1 que se presenta a continuación:

**Tabla 1.** Clasificación de *Salmonella* entérica

<i>Salmonella</i> <i>Enterica</i>	<i>S. enterica</i> subsp <i>enterica</i> (Subespecies I)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>salamae</i> (Subespecies II)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>arizoanae</i> (Subespecies IIIa)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>diarizonae</i> (Subespecies IIIb)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>houtenae</i> (Subespecies IV)
	<i>S. enterica</i> subsp <i>indica</i> (Subespecies VI)

Fuente: [15]

Las heces de personas infectadas pueden contener un gran número de *Salmonella* y pueden excretarla hasta por 3 meses. De acuerdo al serovar implicado, el 1 % de los adultos infectados y el 5 % de los niños menores de 5 años pueden excretar el microorganismo por más de un año [16]. La excreción de *Salmonella typhimurium* en pacientes después de haber sufrido salmonelosis puede durar hasta 110 días. [14,3].

### 3.2 *Salmonella* en granjas porcícolas

La epidemiología se centra en la introducción de microorganismos en la granja y la transmisión dentro de la granja. Las fuentes más importantes de las infecciones son los cerdos reproductores y otros cerdos que entran de otras granjas, seguido de alimentación, el agua, y otros animales como bovinos, roedores, aves, insectos y mascotas [17].

Las hembras que provienen del exterior, pueden suponer una vía de entrada de *Salmonella* a la granja, la entrada de animales de reposición se le atribuye entre un 1 y 10 % de las infecciones producidas durante la fase de levante [18]. La transmisión vertical de la cerda a sus crías también es un factor importante, se ha demostrado que los lechones pueden ser infectados desde muy temprana edad pues la excreción en cerdas aumenta en la fase de lactancia, resultando en una posible exposición a los lechones que están amamantando [19].

La presencia de *Salmonella* spp. es de gran impacto para la industria porcícola, por las pérdidas económicas por diagnóstico, tratamiento y disminución de la producción, y por constituir una barrera no arancelaria para la comercialización de alimentos y un grave problema de salud pública. El microorganismo se introduce en las granjas a través del

alimento, el pie de cría, y se disemina a través de enfermos o portadores asintomáticos. El estrés por manipulación, el ayuno, la alta densidad animal, y la permanencia [62]. Por tal razón el control de *Salmonella* es un aspecto fundamental para garantizar la calidad y la inocuidad de los alimentos de origen porcino en Colombia.

### 3.3 Procesos de oxidación avanzada

Los POAs se definen como métodos de oxidación físico/química en fase acuosa basados principalmente en la generación de especies reactivas como los radicales hidroxilo OH\* que oxidan contaminantes e inactivan microorganismos presentes en el agua de forma rápida y no selectiva [17] El radical hidroxilo es una especie oxidante altamente reactiva, potente y no selectiva con un potencial de oxidación de 2,8 eV. El cual es capaz de oxidar una amplia gama de compuestos orgánicos, incluyendo las moléculas de las paredes celulares y los componentes intracelulares de los microorganismos llevándolos a productos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y iones inorgánicos [21]. Los POAs se dividen en procesos fotoquímicos y no fotoquímicos mostrados en la tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de procesos de oxidación avanzada

No fotoquímicos	Fotoquímicos
Proceso Fenton (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Fotocatálisis heterogénea TiO <sub>2</sub> /UV
Ozonización con (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Foto-Fenton Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
Ozonización e O <sub>3</sub>	Fotólisis UV
Ultrasonido	UV/peróxido de hidrogeno (UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Radiólisis	UV/O <sub>3</sub>
Plasma no térmico	
Oxidación electroquímica	

Fuente: [21]

### 3.4 Fotólisis

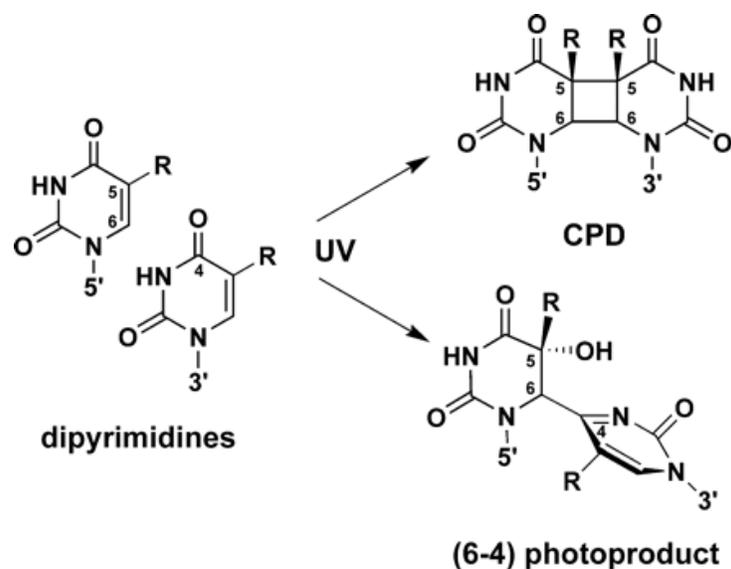
Es el proceso mediante el cual se degradan compuestos mediante la aplicación de luz UV a radiaciones con una longitud de onda ( $\lambda$ ) promedio entre 200 – 400 nm. El efecto de la luz UV puede desencadenar fenómenos de degradación o inactivación por fotólisis directa o indirecta, en donde las moléculas absorben la radiación UV generando un incremento en su energía (estado excitado), lo que ocasiona ruptura de enlaces, seguido de la degradación o descomposición (directa); o mediante la generación de radicales altamente reactivos (indirecta) [23] permitiendo la inactivación de microorganismos patógenos y no patógenos,

generando daños oxidativos a nivel de pared y peroxidación de fosfolípidos en membrana así como de componentes intracelulares causando deleciones en el ADN. Empleando esta tecnología se han encontrado reportes de una disminución de hasta el 91 – 99 % de coliformes luego de 60 minutos de irradiación [24].

Adicionalmente, la radiación UV genera un efecto sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los microorganismos, el cual es particularmente sensible a la misma. Las purinas y pirimidinas, moléculas presentes en el ADN absorben fuertemente la radiación ultravioleta promoviendo transiciones en las bases nitrogenadas que constituyen los nucleótidos, alterando directamente el establecimiento normal de los enlaces llevando a la formación de dímeros e hidratos; esta dimerización, afecta principalmente a bases de timina adyacentes, formando estructuras cíclicas denominadas dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs); además de la formación de otros fotoproductos denominados dímeros de pirimidina pirimidona (6-4 PPs) entre bases adyacentes de timina y citosina, y en el caso del ácido ribonucleico (ARN) dímeros de uracilo. Ambos tipos de dímeros alteran los procesos de transcripción de genes y de duplicación del ADN, ya que tanto la ADN polimerasa como la ARN polimerasa no son capaces de leer la hebra de ADN o ARN a través de estos fotoproductos y produce ruptura de la estructura del ADN y una inhibición de la replicación ocasionando muerte celular [24, 25].

La radiación más utilizada para la fotólisis es aquella con una longitud de onda comprendida entre 200-400 nm; esta pertenece a la región del espectro ultravioleta. La estructura de la molécula determinará si esta es capaz de absorber el tipo de radiación e incrementar su energía en forma que alcance un estado excitado, pudiendo llegar a la ruptura de enlaces, y por tanto, a su degradación [26].

En el caso que los compuestos no lleguen a ser degradados por fotólisis directa, sigue existiendo la posibilidad de lograrlo mediante vía indirecta, por generación de radicales libres [27]

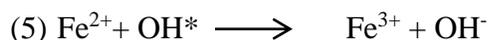
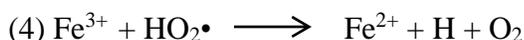
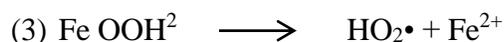
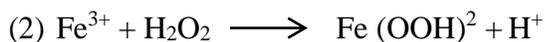
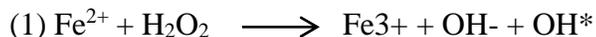


**Figura 1.** Estructuras de las lesiones de ADN inducidas por UV. R, H o CH<sub>3</sub>.

### 3.5 Fotólisis asistida químicamente o proceso foto Fenton modificado

El proceso foto fenton pertenece a los procesos de oxidación avanzada (POA) 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 OH\*.

El proceso fenton homogéneo convencional consiste en la adición de una sal de hierro (Fe<sup>2+</sup>) o el agua a tratar puede tener hierro y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) directamente; estos dos compuestos originan la reacción Fenton. Esta reacción favorece la formación de radicales hidroxilo OH\* por la descomposición catalítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio ácido o ligeramente ácido con un pH de 3-4. En la siguiente secuencia de ecuaciones químicas que puede generar en la reacción Fenton convencional son:



No solo el radical hidroxilo degrada contaminantes, en la primera reacción que se forma del proceso Fenton, los iones férricos formados también promueven la remoción de contaminantes [33]. En la reacción Fenton se generan dos tipos de radicales  $\text{OH}^*$  y  $\text{HO}_2^*$ . Un exceso de los iones de  $\text{Fe}^{2+}$  (el catalizador) al igual que un exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reactivo) puede generar reacciones improductivas [19].

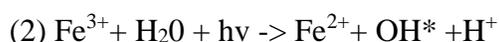
El proceso Fenton no solo se utiliza para la inactivación de microorganismos sino también para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, colorantes azo, fenoles y formaldehído [18]. En la remoción de la DQO de aguas, tratamiento de lixiviados y en pre-tratamiento de compuestos no biodegradables, tratamiento de efluentes de empresas papeleras y textiles, reducción de unidades de color (UC). Dentro de las ventajas están que el Fe ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es abundante y no tóxico, así como el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y no tóxico para el ambiente [36].

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 [32, 37]. En un estudio se evaluó la eficiencia del proceso foto-Fenton para la inactivación de las bacterias: *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*, demostrando que el proceso foto-Fenton llevado a cabo con bajas concentraciones de hierro (0,3 y 0,7 ppm) y 20 ppm de  $\text{H}_2\text{O}_2$  permite la inactivación completa de las tres bacterias [39]

El proceso Fenton se basa en la combinación de peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{2+}$  (o  $\text{Fe}^{3+}$ ) que actúa como catalizador, para la formación de radicales  $\text{OH}^*$ . Esta reacción puede tener variaciones, como el uso de radiación UV, proceso que es llamado foto-fenton que en comparación con el método fenton convencional o la fotólisis UV puede tener una mayor eficiencia en la degradación de contaminantes orgánicos, este incremento en la velocidad de reacción es atribuido principalmente a la foto-reducción de los iones Fe.

La tecnología foto-Fenton es usualmente utilizada cuando se requiere una alta reducción de Demanda Química de Oxígeno. En este proceso el reactivo de Fe(II) se oxida a Fe(III) descomponiendo el peróxido de hidrógeno para formar radicales hidroxilo como lo mostrado en la ecuación 2, el empleo de la radiación UV-V incrementa el poder de

oxidación principalmente por la foto-reducción de Fe(III) a Fe(II) la cual produce más radicales hidroxilo (ecuación 2) y de esta forma se establece un ciclo en el reactivo de Fenton y se producen los radicales hidroxilo para la oxidación de compuestos orgánicos (ecuación 3)



### 3.6 Factores que afectan el proceso fotolítico y foto-Fenton

Dentro de los parámetros importantes que afectan el proceso están:

- Efecto de la radiación: El proceso combinado  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  tiene la capacidad de acelerar la generación de radicales  $\text{OH}^*$ . El mecanismo ocurre por la acción de la radiación emitida por las lámparas UV (con longitudes de onda menores de 400 nm) que son capaces de fotolizar las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [8]. Generalmente, se utilizan para la disociación del peróxido de hidrógeno lámparas UV con emisión máxima de 254 nm, debido a que la absorción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  alcanza su máximo a los 220 nm [60]
- Relación Fe ( $\text{Fe}^{2+}$ )/ $\text{H}_2\text{O}_2$ : La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Un exceso  $\text{Fe}^{2+}$  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 [33].
- 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  $\text{OH}^*$ . El mecanismo de acción es reducción de la actividad de ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a través de mecanismos de secuestro de los radicales  $\text{OH}^*$  [43].

- Adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: La adición puede realizarse al inicio de la reacción en un 100 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o durante todo el tratamiento de manera controlada. Al controlar la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se obtienen óptimos resultados en la disminución de carbono orgánico total (COT), potencializa la acción de los radicales OH\* sobre la inactivación de los microorganismos y garantiza la acción oxidante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante toda la reacción [18].
- Temperatura: En algunos estudios se reporta que la temperatura óptima esta alrededor de 30 °C, valores de temperatura más elevados podría descomponer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. 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].
- pH: En algunas aplicaciones con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, se recomienda adicionar ácido para disminuirlo y trabajar en la franja de 2,5 a 3,5. De esta forma, se tendrían alteraciones en el equilibrio ácido carbónico–bicarbonato–carbonato, desfavoreciendo la formación más acida, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Este equilibrio es importante, porque los iones carbonato y bicarbonato son conocidos secuestradores de OH\*. Por otra parte, [41] afirman que la eficiencia del proceso H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV no varía significativamente para valores de pH inferiores a 8,0. El pH neutro corresponde a la franja efectiva de oxidación.
- Oxígeno: A partir de los OH\*• se forman los radicales C-centrados que en presencia de oxígeno forman radicales peroxilo intermedios, claves en las reacciones de oxidación y la completa mineralización de los compuestos. Los radicales reaccionan con la materia orgánica según las reacciones de abstracción del hidrógeno, adición y por las reacciones de transferencia de electrones.
- 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. Debido a la propiedad intrínseca de promover disociación entre las moléculas, la aplicación de la radiación UV individualmente se

prueba en algunos trabajos. Sin embargo, hay poca mineralización de los compuestos químicos estudiados, en tiempos cortos de radiación [41].

### **3.7 Mecanismos de reparación de las bacterias**

Las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN, activando mecanismos de reparación cuando hay deficiencias o errores durante la replicación. Una consecuencia potencial de los daños son las alteraciones permanentes en la estructura del ADN que pueden generar mutaciones y muerte celular. Estos son atribuidos a diferentes agentes endógenos como los radicales libres de oxígeno provenientes de la respiración, los cuales son considerados el centro del envejecimiento por daño genómico; agentes exógenos como la luz ultravioleta que inducen dímeros de pirimidina y la radiación ionizante que produce una gran variedad de daños sobre las bases [29].

La radiación UV es responsable de una amplia gama de efectos biológicos como la alteración de proteínas, de DNA y de la reducción del crecimiento y división celular [30].

Las lesiones producidas por la luz UV más comunes sobre el DNA son los dímeros de pirimidina (o anillos de ciclobutano) y los fotoproductos 6-4 (pirimidín-pirimidón), que de no ser reparadas pueden provocar mutaciones e incluso muerte celular. La formación de los dímeros se origina entre dos pirimidinas adyacentes, que por la reacción de los enlaces covalentes entre sus carbonos 5 y 6 provoca la formación de un anillo de ciclobutano que da como un resultado un abultamiento en la cadena de DNA, causando el bloqueo de la replicación. Por su parte, los fotoproductos 6-4 pirimidin-pirimidon, se refieren a la formación de una estructura no cíclica entre los carbonos 4' y 6', lo que da origen a torceduras en el DNA provocando mutaciones [31].

Los principales mecanismos hallados en bacterias se pueden agrupar así:

#### **3.7.1 Reparación fotoenzimática**

Se debe a la actuación de una enzima denominada fotoliasa o enzima fotorreactivante, que muchas bacterias sintetizan de manera constitutiva. Las fotoliasas reparan directamente los

dímeros de pirimidina, en una reacción que requiere luz visible de 300-500 nm de longitud de onda (luz azul). Estas enzimas poseen dos grupos prostéticos coloreados (cromóforos):

- Flavina reducida (FADH<sub>2</sub>)
- Pterina.

Mecanismo reparación fotoenzimática

La primera fase del mecanismo es independiente de la luz. La fotoliasa reconoce el dímero de pirimidina, y se une a él, formando un complejo enzima-sustrato [E-S]. La flavina reducida (FADH<sub>2</sub>) de la fotoliasa, en presencia de luz, se excita, y dona electrones al anillo de ciclobutano del dímero de pirimidina, rompiéndolo, y regenerando las dos pirimidinas sin alterar [32].

### **3.7.2 Reparación por escisión-resíntesis**

La distorsión en la doble hélice provocada por el dímero es reconocida por un complejo proteico con actividad de endonucleasa correctora, conocido como correndonucleasa o escinucleasa. El daño se repara indirectamente (es decir, no se actúa sobre el propio fotoproducto), sino que las bases dañadas se eliminan (se escinden) formando parte de un oligonucleótido, y el hueco resultante se rellena por resíntesis reparadora de ADN [33].

Mecanismo reparación por escisión-resíntesis

Un complejo formado por dos subunidades de la proteína UvrA y una de la UvrB (Uvr[A<sub>2</sub>B]) se une cerca del dímero de pirimidina, usando la energía de la hidrólisis del ATP, y merced a su actividad helicasa, desenrolla localmente la doble hélice [34].

Se une la proteína UvrC, con lo que se completa el complejo Uvr[A<sub>2</sub>BC], es decir, la correndonucleasa, unido a la cadena dañada del ADN, cerca del dímero [34].

La correndonucleasa realiza dos cortes en la cadena afectada por el dímero: corta el 8º enlace fosfodiéster "a la izquierda" del dímero (o sea, hacia el lado 5') respecto de la localización del dímero y corta el 4º o 5º enlace fosfodiéster "a la derecha" (en dirección 3' del dímero). Por lo tanto, se produce y libera un fragmento de unos 12 nucleótidos de

longitud, que incluye al dímero de pirimidina, al mismo tiempo que se retira la escinucleasa, que se separa en sus polipéptidos constituyentes [35].

Queda, pues, un hueco de cadena sencilla en el ADN. Este hueco es ocupado ahora por la ADN-polimerasa-I y por la ADN-helicasa-II (codificada por el gen *uvrD*), que llevan a la síntesis de nuevo ADN para rellenar el hueco (por supuesto, en sentido 5'--->3'), tomando como molde la cadena intacta, y usando como cebador ("primer") el extremo 3'-OH que se había generado en la fase anterior [35].

Finalmente, la actuación de la ADN-ligasa sella la cadena (regeneración del enlace fosfodiéster del lado 5')

### **3.7.3 Reparación por recombinación**

Cuando la ADN-polimerasa-III bacteriana (que es la enzima que normalmente replica el cromosoma) se encuentra, en la cadena que está usando como molde, con un dímero de pirimidina, deja de replicar esa zona, y "salta" unos 1000 nucleótidos más adelante para seguir la replicación. Por lo tanto, deja un gran hueco o mella de unos 1000 nucleótidos. Esta discontinuidad (llamada mella post-replicativa) se puede rellenar por el mecanismo de reparación por recombinación general, recurriendo a la proteína RecA, que verifica una recombinación con la hebra parental homóloga intacta [36].

Mecanismo reparación por recombinación

Numerosas unidades de proteína RecA recubren la zona de cadena sencilla de la mella posreplicativa, formando estructuras helicoidales.

La proteína RecA promueve emparejamiento homólogo de la cadena sencilla a la que recubre con la doble cadena "hermana" intacta.

Se produce un intercambio recíproco de cadenas.

El extremo 3'-OH libre de la cadena dañada (que merced al intercambio recíproco está ahora emparejada con la cadena complementaria procedente de la doble hélice "hermana") sirve de cebador a la ADN-polimerasa-I, que sintetiza ADN nuevo usando como molde la cadena complementaria intacta del dúplex [37].

Ligación e isomerización espontáneas, que produce la llamada "estructura de Holliday", una figura en "X" donde hay dos sobrecruzamientos ("crossing-over") que mantienen unidos entre sí a los dos duplex.

Resolución de los dos sobrecruzamientos por sendas roturas y religaciones, lo cual genera dos dobles hélices ininterrumpidas.

Como se puede ver, el mecanismo de reparación por recombinación no repara por sí mismo la lesión en el ADN, pero logra reparar la mella postreplicativa, evitando que se detenga la replicación del cromosoma. Al final del proceso el dímero como tal sigue sin reparar, pero ahora tendrá una oportunidad de ser reparado por algún otro mecanismo, como el de escisión-resíntesis [37].

#### **4. VACÍO DEL CONOCIMIENTO**

Se desconoce si la fotólisis es capaz de disminuir tres unidades logarítmicas de *Salmonella* spp. en aguas provenientes de granjas porcícolas y además disminuir parámetros fisicoquímicos.

#### **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto de la fotólisis UV/254 nm en la disminución de *Salmonella* spp. en aguas de uso en granjas porcícolas?

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la fotólisis UV/254 nm en la inactivación de *Salmonella* spp. en aguas de granjas porcícolas

## **6.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar las condiciones de operación que influyen en la inactivación de *Salmonella* spp. al emplear fotólisis UV de 254 nm
- Realizar las cinéticas de inactivación fotolítica de *Salmonella* spp. a escala de laboratorio empleando agua de uso porcícola
- Realizar las cinéticas de inactivación fotolítica empleando un prototipo piloto portátil en el laboratorio empleando agua de uso en granjas porcícolas

## **7. HIPÓTESIS**

El uso de fotólisis a 254 nm es efectivo para la inactivación de 2 UL *Salmonella* spp inoculada artificialmente en agua de granjas.

## **8. METODOLOGÍA**

La metodología está dividida en las siguientes fases

### **Fase I**

#### **8.1 Selección de cepas**

Las cepas de *Salmonella* fueron seleccionadas del banco de trabajo del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana, donde los aislamientos habían sido previamente aislados de granjas porcícolas. Las bacterias se reactivaron en agar BHI y se incubaron durante 24 horas a 35 °C, posteriormente se realizó tinción de Gram para confirmar la morfología.

### **Fase II**

#### **8.2 Selección de las granjas para el estudio**

Se seleccionaron cuatro granjas porcícolas ubicadas en el departamento de Cundinamarca tabla 3 estas granjas hacen parte de los asociados de Porkcolombia. Para su inclusión se solicitó a los dueños de estas que se permitiera el ingreso para toma de muestras de agua (agua de punto de ingreso y distribución a los corrales de los cerdos), adicionalmente, se aplicó una encuesta para conocer el origen del agua y el tipo de tratamiento que se aplica.

El volumen de agua a tomar fue de 5 litros distribuidos en garrafones de 2,5 litros, estos garrafones fueron transportados en condiciones de refrigeración durante el desarrollo del proyecto se realizaron 4 muestreos. En las primeras tres granjas no se halló *Salmonella* spp. sin embargo en la granja número 4 si hubo presencia de la bacteria, por lo tanto todos los ensayos realizados fueron con el agua de esta granja.

**Tabla 3.** Granjas seleccionadas y muestreadas del departamento de Cundinamarca

<b>Granja</b>	<b>Ubicación</b>
1	Silvania/Santa Rita
2	Fusagasugá/ Jordán bajo
3	Fusagasugá/Usatama
4	San Antonio del Tequendama/ Rambla

Se realizó una encuesta a cada granja, que consta de 16 preguntas clasificadas en dos ítems: (Anexo 1)

I. Información general

II. Condiciones de la granja y corrales

### **8.3 Caracterización microbiológica y fisicoquímica del agua**

Se realizaron análisis microbiológicos y fisicoquímicos a las muestras de agua, siguiendo los protocolos mencionadas en las tablas 4-6.

**Tabla 4.** Parámetros físicos.

<b>Parámetro</b>	<b>Nombre del método</b>	<b>Referencia</b>
pH	pHmetro	Santos, D.; 2013.
Conductividad	Conductímetro	Sawyer, C.; McCarty, 1996.

**Tabla 5.** Parámetros químicos

Parámetro	Nombre del método	Referencia
DQO	Digestión del reactor	Standard Method 5220.
DBO <sub>5</sub>	Respirométrico	Calderón, F.; Pavlova, M.; 2007
Nitratos	HACH 8039	Jirka, A.M.; Carter, M.J., Analytical Chemistry, 1975, 47(8), 1397
Nitritos	HACH 8192	Jirka, A.M.; Carter, M.J., Analytical Chemistry, 1975, 47(8), 1397
SST	Gravimétrico	Ruiz, D.; 2017

**Tabla 6.** Parámetros microbiológicos

Parámetro	Nombre del método	Referencia
Prueba de Ausencia/Presencia Salmonella	MDS 3M Filtración por membrana Recuento en placa	MDS 3M ISO 9308-1: 2014 ISO 6579-1:2017
Recuento <i>E. coli</i>	Recuento en Petrifilm	ISO 9308-1:2014
Recuento <i>Enterobacteriaceae</i>	Recuento en Petrifilm	ISO 21528-2:2017

### Fase III

#### 8.4 Selección de las condiciones de inactivación fotolítica empleando un diseño factorial 2<sup>2</sup>

Para evaluar el efecto de la aireación y la concentración inicial de microorganismos que favorecen la inactivación de *Salmonella* spp. se realizó un diseño factorial 2<sup>2</sup> con 3 puntos centrales. Lo que generó un total de 4 tratamientos y 3 puntos centrales (PC). Los factores y niveles se presentan en la **tabla 7**.

**Tabla 7.** Diseño factorial  $2^2$  con tres puntos centrales. Efecto de la aireación y concentración inicial de *Salmonella* sobre la inactivación de *Salmonella* y remoción de DQO.

Tratamiento	Factor A Aireación (L/min)	Factor B Concentración inicial (UFC/mL)
1	0	$1 \times 10^4$
2	1.0	$1 \times 10^4$
3	0	$1 \times 10^8$
4	1.0	$1 \times 10^8$
PC	0.5	$1 \times 10^6$

### 8.5 Caracterización y preparación del agua a emplear en el diseño experimental.

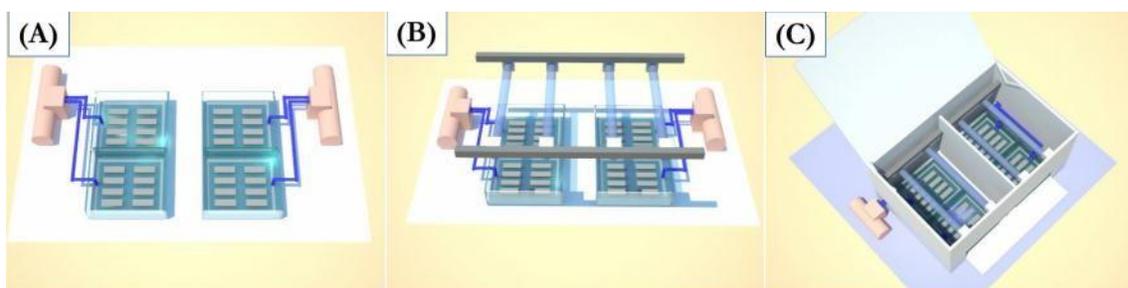
Se realizó la caracterización inicial del agua de punto de ingreso y distribución a los corrales de los cerdos del agua y de cada tratamiento: pH, sólidos suspendidos totales (SST) mg/L, demanda química de oxígeno (DQO) mg/L, *Enterobacteriaceae* como indicador de contaminación del agua y *Salmonella* spp.

Para cada uno de los tratamientos del diseño, se preparó un inóculo de 1500 mL de *Salmonella* spp empleando agua de distribución a los corrales de las granjas previamente esterilizada a 120 °C, 15 libras de presión por 15 minutos. El agua se inoculó con una suspensión de *Salmonella* spp. con una absorbancia de 0,25 nm equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL, la mezcla se incubó a 35 °C por 12 horas a 120 rpm. Para confirmar la concentración del inóculo se realizó recuento en agar tripticasa de soya.

Posteriormente, se realizaron diluciones con agua peptonada bufferada (de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial) del cultivo concentrado para ajustar la concentración celular según los niveles del factor B ( $10^4$ ,  $10^8$  y  $10^6$  UFC/mL) niveles bajos, altos y punto central) de los cuales se adicionaron 500 mL a cada reactor. En relación con el factor A (aireación se utilizaron bombas aireadoras que podían inyectar un flujo de 1,0 L/min y 0,5 L/min).

## 8.6 Configuración del reactor

El montaje de los tratamientos se realizó con dos reactores cúbicos de 20x40x5 cm (ancho, largo y profundidad) **figura 2A**. Cada una se dividió en dos secciones de igual tamaño (20 cm de ancho, 20 cm de largo, y 5 cm de profundidad) **figura 2B**. Se utilizaron difusores de vidrio de aire de 19 cm<sup>2</sup>, con 2 mm que fueron colocados dentro de cada sección. Ambos reactores fueron colocados dentro de una caja hecha de láminas de metal galvanizado (60x50x30 cm) [29] como el mostrado en la **figura 2C**. Posteriormente se instalaron dos lámparas de luz ultravioleta con Mercurio como gas inerte para tener una emisión máxima de 254 nm (Philips TUV 18, 15 W, longitud de onda 254 nm). Las lámparas se ubicaron sobre cada reactor, a 10 cm de distancia de cada uno.



**Figura 2.** Reactor a escala de laboratorio. Blanco et al., 2018

## 8.7 Montaje de los experimentos

Previamente a la evaluación de los cuatro tratamientos se realizaron cinéticas de inactivación empleando el agua re inoculada con *Salmonella* spp a concentraciones altas y bajas ( $10^4$  y  $10^8$  UFC/mL), para realizar un sondeo acerca del efecto de la concentración, el tiempo de irradiación y el número de lámparas a usar. Para estas curvas el tiempo de evaluación fue de 60 minutos y se tomaron muestras para realizar recuentos cada 5 minutos. Los recuentos se realizaron en agar TSA y las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C. Los resultados fueron expresados como  $\text{Log}_{10}$ , para los tiempos en donde se evidenció una muerte exponencial se realizó una segunda transformación ( $\text{Log}_{10} X/\text{Log}_{10} X_0$ ), para calcular las constantes de inactivación; realizando una regresión lineal de estos datos, cuyo valor de pendiente es igual a constantes de inactivación fotolítica ( $\text{min}^{-1}$ ) y la bondad de ajustes fue determinada por el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) que debe ser igual o superior a 0.9.

Para realizar los diferentes tratamientos del diseño factorial, una vez se ajustaron y verificaron las concentraciones iniciales se colocaron 500 mL del agua residual re inoculada, se encendieron las lámparas UV y la irradiación se realizó por 60 min. Al completar el tiempo de radicación se apagaron las lámparas y se colectó la totalidad del efluente para realizar los análisis microbiológicos y fisicoquímicos: pH, SST (mg/L), DQO (mg/L), *Salmonella* spp y *Enterobacteriaceae*. Las cajas de Petri se incubaron por 24 horas a 35 °C y se estimó la población de sobrevivientes (UFC/mL). Estos resultados se transformaron a Log<sub>10</sub> de UFC/mL y se calculó el porcentaje de inactivación como variable de respuesta principal empleando la ecuación 1. Como variable de respuesta complementaria se determinó el porcentaje de remoción de DQO y como variables de monitoreo no estadísticas se determinó el pH final y los sólidos suspendidos totales (SST).

$$\% \text{ de inactivación} = \frac{\frac{\text{UFC}_{\text{iniciales}}}{\text{ml}} - \frac{\text{UFC}_{\text{finales}}}{\text{ml}}}{\frac{\text{UFC}_{\text{iniciales}}}{\text{ml}}} \times 100 \text{ . Ecuación 1}$$

Dónde:  $\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$  iniciales, son unidades formadoras de colonias iniciales sobre mililitros  
 $\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$  finales, son unidades formadoras de colonias finales sobre mililitros

Para la selección de los factores influyentes sobre el porcentaje de inactivación se realizó un análisis de varianza y análisis de regresión empleando el programa Desing Expert 6.0. Por otro lado, se realizó una comparación de medias entre tratamientos para seleccionar el mejor de los 4 tratamientos, empleando una prueba de Tukey con un alfa 0.05 utilizando el programa SAS 9.0.

### **8.8 Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico**

De acuerdo con los resultados del diseño factorial 2<sup>2</sup> se realizaron cinéticas de inactivación usando un pool de microorganismos (*E. coli* y *Salmonella* spp). La cepa de *E. coli* fue

aislada de las aguas provenientes de las granjas (cepa nativa). Se realizaron dos tratamientos y como control la tecnología convencional empleada en la granja de estudio. Durante el montaje el T1 correspondió a fotólisis UV/254 nm, T2: Fotólisis UV/254 nm y T3: Peróxido de hidrógeno. El control: Peróxido de hidrógeno se utilizó en una concentración de 3 % (v/v) (15 ppm).

Las curvas se realizaron empleando dos reactores cúbicos como el mostrado en la figura 2, cada uno con un volumen de 1500 mL de agua de las granjas, que previamente fue inoculada con una concentración conocida de *Salmonella* spp. Para cada replica se tomaron muestras durante una hora a los 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5min, 10 min, 15 min, 30 min, y 60 min. Se realizó el recuento por duplicado para cada tiempo de bacterias totales, y de *Salmonella* spp posteriormente para cada tiempo también se realizó la caracterización de parámetros fisicoquímicos: DQO, SST, nitratos, nitritos, pH, conductividad, y DBO<sub>5</sub>. Se realizó modelación matemática para determinar constantes de inactivación fotolítica, fotolítica/química y química aplicando los modelos presentados con anterioridad. La selección del mejor tratamiento fue por medio de una comparación de medias entre tratamientos empleando las constantes de inactivación y los porcentajes de remoción de DQO.

### **8.9 Pruebas en prototipo piloto en laboratorio**

Se realizó la caracterización inicial del agua de punto de ingreso y distribución a los corrales de los cerdos y de cada tratamiento: pH, SST mg/L, SS ml/L, DQO mg/L, *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* spp.

El reactor piloto para uso en campo fue diseñado por la empresa CAMOCOL SAS figura 3 y consta de un taque rectangular que se divide en 3 secciones. La sección de entrada, funciona como protección del sistema eléctrico y contiene un cierre automático de nivel, evitando que se desborde el tanque o exista acceso de presión interna, la segunda sección está compuesta por 3 baffles hidráulicos que maximizan el tiempo de exposición labores de limpieza y mantenimiento de cualquiera de las secciones. La tercera sección de salida consta de dos válvulas de salida. El reactor tiene un volumen total de 15 litros y un

volumen efectivo de trabajo de 10 litros con un tiempo de retención de 15 minutos para garantizar la desinfección.

Construido el reactor, se realizaron dos montajes con fotólisis/254 nm con un volumen efectivo de trabajo de 10 L, estos fueron depositados en el reactor y se inoculó una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL de *Salmonella* spp, se homogenizó y se realizó sin que el agua fluyera constantemente sino de manera estática, el ensayo se realizó durante 15 minutos, evaluando la inactivación de *Salmonella* spp, *E. coli* y la disminución de parámetros fisicoquímicos además se realizó modelamiento matemático para verificar los resultados.



**Figura 3.** Reactor piloto portátil construido por CAMOCOL S.A.S para la instalación en campo.

## 9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Identificación de *Salmonella* spp

Las cepas de *Salmonella* spp seleccionadas del banco de trabajo del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana fueron la número 108, y la 305 (provenientes de granja), las cepas fueron confirmadas usando el equipo MDS de 3M.

### 9.2 Hallazgos de las encuestas realizadas a las granjas

Se seleccionaron cuatro granjas porcícolas ubicadas en el departamento de Cundinamarca, la primera ubicada en Silvania, la segunda y la tercera en Fusagasugá, y la última en San Antonio de Tequendama. En las tabla 8, se presentan los hallazgos más importantes de la encuesta donde se observa que el origen del agua varía en función de la granja, así como el tipo de tratamiento empleado

**Tabla 8.** Datos obtenidos de la encuesta a las granjas

<b>Granja</b>	<b>Tipo de granja</b>	<b>Captación del agua</b>	<b>Almacenamiento en tanques</b>	<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>Control de calidad al agua</b>
1	Ciclo completo	Acueducto veredal	1 tanque 100 m <sup>3</sup>	Sulfato de Aluminio, Peróxido de hidrogeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si, cada seis meses
2	Crecimiento y engorde	Acueducto veredal	1 tanque 100 m <sup>3</sup>	Sulfato de Aluminio tipo A, Cloro	Si, cada año
3	Crecimiento y engorde	Acueducto veredal	Entre 13 m <sup>3</sup> – 15 m <sup>3</sup>	Sulfato de aluminio, Cloro	No realizan
4	Crecimiento y engorde	Acueducto veredal (Unión de tres)	14 tanques entre 1 m <sup>3</sup> y 5 m <sup>3</sup>	Peróxido de hidrogeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No realizan, lavan los tanques cada 3 meses

Según las encuestas realizadas en las cuatro granjas se observa que el registro y el control de calidad solo se realizan en las dos primeras granjas mientras que en las otras dos granjas solo se realizan lavados cada 3 meses de los tanques que contienen el agua para disposición El control reduce el riesgo de contaminación con bacterias como *E. coli*, o *Salmonella* spp, entre otras. La calidad y cantidad de agua debe ser correcta, estar tratada y ser suficiente para abastecer a los animales presentes en la granja, para garantizar la buena salud de los cerdos y debe llevarse un registro del tratamiento de la misma y así cumplir con la resolución 0631 del 2015. No obstante, la protección de la fuente hídrica se da en un 40 %, según un estudio realizado por Hamilton [49] que concluye que no se protege completamente el agua de la contaminación por contacto con el medio o por excremento u

orina de animales silvestres o mascotas cercanas, lo cual puede ocasionar aparición de enfermedades en la granja y generar grandes problemas sanitarios y económicos.

### 9.3 Caracterización microbiológica del agua

Los resultados de la caracterización microbiológica y fisicoquímica de las muestras de agua de punto de captación y zona de disposición de la granja número cuatro en la **tabla 9**.

**Tabla 9.** Parámetros microbiológicos, fisicoquímicos de muestras de punto de captación (Tanque de almacenamiento) del agua (7) y zona de disposición (Tanque de salida) (8) granja número cuatro.

Muestra	Concentración (UFC/mL) <i>Enterobacteriaceae</i>	pH	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	DQO (mg/L)	NO <sub>2</sub> (mg/L)	NO <sub>3</sub> (mg/L)
7	16	6,56	20,7	7	0,004	0,2
8	42	4,88	41,4	4	0,007	0,1

De acuerdo con la normatividad vigente en Colombia según la resolución 0631 del 2015 se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones, para agua de ganadería de porcino (cría) y otras, esta resolución no incluye parámetros microbiológicos ni indicadores de contaminación fecal, sin embargo, se evaluó la presencia y posterior inactivación de microorganismos como *Enterobacterias* que pudieran estar en el agua y que son considerados como indicadores de contaminación del agua, para determinar si los tratamientos de oxidación avanzada pueden inactivar estos microorganismos en aguas con diferentes características físicas y químicas. El grupo bacteriano que cumple con las características de potencial bioindicador de calidad del agua es el de las *Enterobacteriaceae*, que comprende bacilos Gram negativos se caracterizan por no formar esporas, crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, fermentan la glucosa, no producen oxidasa, y tienen una movilidad variable. Corresponden a 10 % de los microorganismos intestinales humanos y animales, por lo que su presencia en el agua está asociada con contaminación fecal [44, 45] e indica tratamientos inadecuados o contaminación posterior [46].

La resolución 0631 del 2015 establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles, para agua de ganadería de porcino (cría) menciona el rango permitido de pH que debe estar en un rango de (6,5 y 9,0) En este tipo de agua proveniente del punto de captación y de la zona de disposición se obtuvo un pH de 6,56 y 4,88 respectivamente, la muestra número siete (7) se encuentra dentro de los valores permitido, mientras que la muestra ocho (8) está por debajo del rango esto puede deberse a la adición del peróxido de hidrogeno para la desinfección en los tanques de disposición además de estar influida por una mayor carga de iones en la muestra según el valor reportado de conductividad de esta muestra.

La conductividad establece la cantidad de iones que se encuentran en el agua influenciando la calidad de la misma; también esta relacionarse con la cantidad de sólidos disueltos. Se obtuvo un valor de conductividad de 20,7 y 41,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$  respectivamente. El decreto no establece parámetros de conductividad de vertimientos de agua para esta industria, sin embargo, en la resolución 2115 de 2007 el valor máximo aceptable para la conductividad puede ser hasta 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  evidenciando que las muestras se encuentran por debajo del valor permitido. Los valores no deberían ser altos, pues la carga orgánica y los sólidos de estas aguas deben ser bajos para el consumo de los cerdos, evitando cualquier tipo de contaminación.

En cuanto a valores de Demanda Química de Oxígeno (DQO) la resolución 0631 establece un valor de 900 (mg/L), los valores de la muestra siete (7) y ocho (8) se encuentra por debajo del valor establecido, dando a entender que la carga orgánica de estas aguas es baja.

Los valores de nitratos y nitritos tampoco se establecen en la resolución 0631, sin embargo en la resolución 2115 de 2007 se establecen valores máximos aceptables en mg/L de nitratos ( $\text{NO}_3$ ): 10 mg/L y nitritos ( $\text{NO}_2$ ): 0,1 mg/L para la muestra siete el valor de  $\text{NO}_3$  fue de 0,2 y de  $\text{NO}_2$  0,004 mg/L, y en la muestra 8 el valor de  $\text{NO}_3$  fue de 0,1 y de  $\text{NO}_2$  0,007 mg/L, valores que se encuentran dentro de la norma.

Los valores de nitratos y nitritos tampoco se establecen en la resolución, solo requiere de análisis y reporte, pero estos valores bajos se asocian como se mencionó anteriormente a la poca carga de materia orgánica y el impacto del pH en el agua.

#### 9.4 Caracterización inicial de agua residual a emplear en el diseño experimental

Para la caracterización del agua residual que fue empleada para seleccionar las condiciones de inactivación se caracterizaron muestras provenientes de la granja número cuatro ubicada en San Antonio de Tequendama. En la tabla 10 se presentan los resultados del agua empleada para el diseño experimental

**Tabla 10.** Parámetros microbiológicos, fisicoquímicos de muestra de zona de recolección (Tanque de almacenamiento) del agua (15) y zona de disposición (Salida del tanque) de (16) de la granja número cuatro.

Muestra	Concentración (UFC/mL) Enterobacteriaceae	pH	Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )	DQO (mg/L)	NO <sub>2</sub> (mg/L)	NO <sub>3</sub> (mg/L)
Zona de recolección del agua (15)	8	6,52	69,4	370	1	1,3
Zona de disposición (16)	$3 \times 10^2$	6,36	78,3	90	3	1,3

De acuerdo con la normatividad vigente en Colombia según la resolución 0631 del 2015 se menciona el rango permitido de pH que debe estar en un rango de (6,5 y 9,0). En este tipo de agua proveniente de la zona de recolección y de la zona de disposición se obtuvo un pH de 6,52 y 6,36 respectivamente, las dos muestras se encuentran dentro del rango permitido.

Respecto a la conductividad se obtuvo un valor de 69,4 y 78,3  $\mu\text{S/cm}$  respectivamente. El decreto no establece parámetros de conductividad de vertimientos de agua para esta industria, sin embargo, en la resolución 2115 de 2007 menciona que el valor máximo aceptable para la conductividad puede ser hasta 1000  $\mu\text{S/cm}$  evidenciando que las muestras se encuentran dentro de los límites de vertimiento. El valor de la muestra 16 puede atribuirse 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.

En cuanto a valores de Demanda Química de Oxígeno (DQO) la resolución 0631 establece un valor de 900 (mg/L), los valores de la muestra quince (15) y dieciséis (16) se encuentra

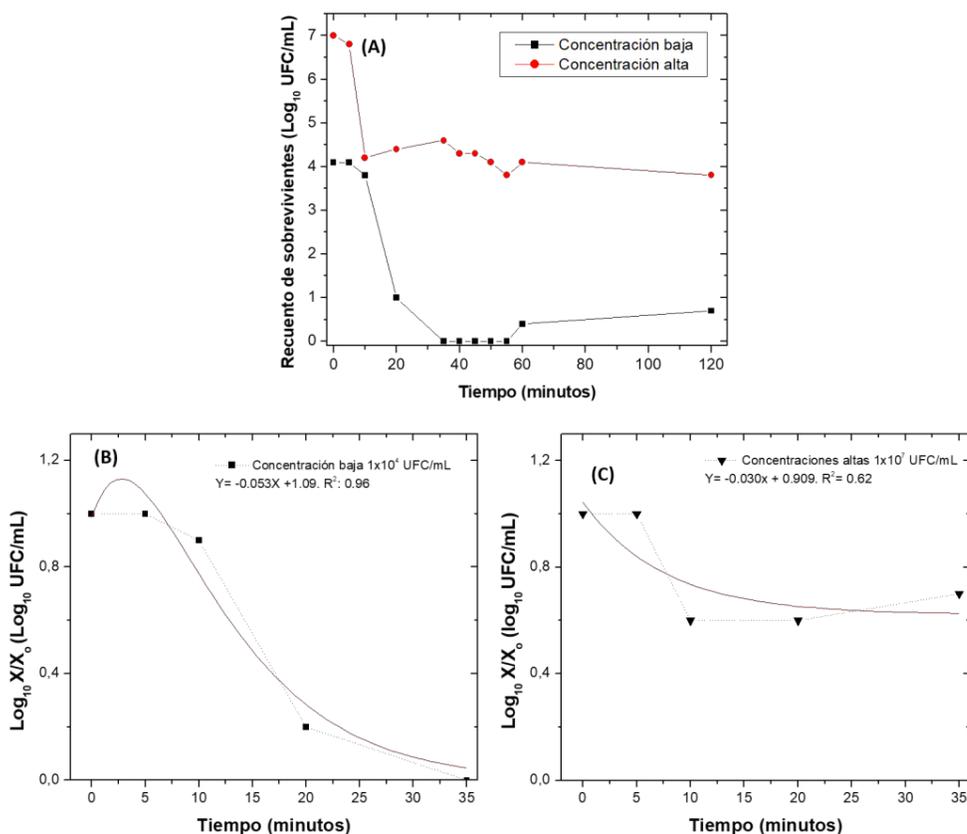
por debajo del valor establecido, dando a entender que la carga orgánica de estas aguas es baja. Sin embargo la muestra quince (15) tiene un valor mayor a la dieciséis (16) a pesar de tener una concentración de *Enterobacterias* menor, pero también puede asociarse a la cantidad de sólidos totales, los iones y la cantidad de materia orgánica e inorgánica.

Los valores de nitratos y nitritos tampoco se establecen en la resolución, solo requiere análisis y reporte, pero estos valores bajos se asocian como se mencionó anteriormente a la poca carga de materia orgánica y el impacto del pH en el agua, sin embargo en la resolución 2115 se establecen valores máximos aceptables en mg/L de nitratos ( $\text{NO}_3$ ): 10 mg/L y nitritos ( $\text{NO}_2$ ): 0,1 mg/L para la muestra quince el valor de  $\text{NO}_3$  fue de 1,3 y de  $\text{NO}_2$  1 mg/L, y en la muestra dieciséis el valor de  $\text{NO}_3$  fue de 1,3 y de  $\text{NO}_2$  3 mg/L, los valores de nitritos para las dos muestras se encuentran por fuera del rango siendo un riesgo por lo que indica contaminación de materia orgánica por heces.

El nitrógeno en el agua se puede encontrar en forma de amoníaco, nitratos y nitritos. El ion nitrito es menos estable que el ion nitrato; es muy reactivo y puede actuar como agente oxidante y reductor. Esta es la causa de que los nitritos se transformen rápidamente para dar nitratos y que, generalmente estos últimos predominen en aguas. La contaminación causada por excretas animales contribuye a elevar la concentración de nitratos en agua. [57]

### **9.5 Experimentos preliminares de inactivación en función del tiempo a concentraciones bajas y altas de *Salmonella* spp**

Como se presenta en la figura 4, los recuentos iniciales para el experimento de cargas bajas fueron  $1 \times 10^4$  UFC/mL y para cargas altas fueron  $1 \times 10^8$  UFC/mL. De acuerdo con los resultados la mayor inactivación se presentó al emplear bajas concentraciones de *Salmonella* spp, durante los 35 minutos obteniendo velocidades de inactivación fotolítica de  $0.053 \text{ min}^{-1}$  (a partir de modelos de pseudo segundo orden con  $R^2$  de 0.96) y recuentos menores a 100 UFC/mL (figura 4A y 4C).



**Figura 4.** Cinéticas de inactivación fotolítica de *Salmonella* spp empleando radiación UV/254 nm. (A) recuento de bacterias sobrevivientes en función del tiempo a bajas y altas concentraciones. (B) Constantes de inactivación fotolítica de pseudo segundo orden para concentraciones bajas. (C) Constantes de inactivación fotolítica de pseudo segundo orden para concentraciones altas

En la cinética de concentraciones altas de *Salmonella* spp. la velocidad de inactivación fue menor ( $0.030 \text{ min}^{-1}$ ,  $R^2$  de 0.61 no ajustan a pseudo segundo orden) y no se observó una eliminación total de la población. Ya que a los 120 minutos los recuentos fueron de  $6.0 \times 10^3$  UFC/mL, reduciendo tan solo 3 unidades logarítmicas (figura 4A y 4C).

Para las concentraciones altas de *Salmonella* spp., durante los primeros 5 a 10 minutos de irradiación, la inactivación fue lenta. Este es un período de inducción, donde las especies generadas comienzan a atacar la membrana pero no lo suficiente como para causar un daño grave a la bacteria. La membrana bacteriana se oxida gradualmente, aunque el

microorganismo está resistiendo este ataque con los mecanismos habituales de autodefensa y reparación automática. Este último implica la generación de enzimas reparadoras por las bacterias [29]. Al final de este primer período, los repetidos ataques en la membrana pueden resultar en una perforación que acelera el proceso de inactivación bacteriana. Benabbou [46], reportaron 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.

La literatura reporta mayor inactivación a mayor tiempo de irradiación ya que esto incrementa la producción de radicales hidroxilos que causan el daño celular. En el caso de concentraciones alrededor de  $1.0 \times 10^7$  UFC/mL, se puede decir que a los 10 minutos se supera el umbral de daño de la bacteria, llegando al punto en el que ya no puede recuperarse. Los daños en la pared celular se incrementan, culminando con la lisis bacteriana [47] A lo anterior, se suma la presencia del efecto pantalla ocasionado por el aumento de partículas en suspensión que hace que los valores permanezcan constantes [48]

Durante el periodo comprendido entre 5/10 y 60 minutos se aceleró la inactivación. Las enzimas no son capaces de proteger durante más este periodo la membrana bacteriana contra la oxidación y, por lo tanto, la perforación de la membrana puede ocurrir. Durante este período, la inactivación de bacterias también podría ser debido a la formación de subproductos, tales como ácidos o aldehídos. [49]

Los radicales oxidantes atacan los diferentes componentes celulares. En un principio los daños se originan a nivel de pared y membrana, ocasionando la pérdida de fluidez, estructura, permeabilidad, y cambios en el gradiente iónico transmembranales, así como la alteración de funciones celulares. El daño en la membrana plasmática se mide por la pérdida de iones potasio, proteínas y RNA o concentraciones extracelulares de iones calcio [34]. Adicionalmente, los radicales atacan, proteínas, lípidos y otros componentes con efectos citotóxicos y mutagénicos [35]. La degradación de los componentes celulares culmina de forma irreversible en la mineralización celular a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

En base con la figura 4, se evidencia que entre los 0 y los 60 minutos se muestra un fenómeno de hombro inicial (shoulder) en la que una fracción de los microorganismos se mantiene constante en los primeros instantes del tratamiento hasta un determinado punto a partir del cual se produce un descenso o ascenso lineal de los mismos. Este tipo de comportamiento en la inactivación puede deberse a diversos factores como por ejemplo los mecanismos de defensa de *Salmonella* spp, que 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 superoxidación, absorción de compuestos oxidantes (gen micF) entre otros [38].

También *Salmonella* spp 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) [39].

El comportamiento shoulder puede atribuirse también a el proceso de inactivación, que puede generar stress, en las bacterias donde se afecta principalmente la síntesis del mRNA con la consecuente reducción en la síntesis de proteínas, adicionalmente afectan la capacidad de las bacterias de obtener nutrientes del medio externo; estos fenómenos también impiden la recuperación de las células estresadas en los medios de cultivo, por lo que en tiempos cortos de estudios, es frecuente encontrar recuentos cercanos a cero, sin embargo se ha demostrado cómo se mencionó anteriormente que las bacterias después de un tiempo puede inducir mecanismos de reparación que les permite cambiar sus estructuras, de tal manera que las bacterias inician su proceso de duplicación, estos mecanismos se han demostrado en *Salmonella*, donde se ha observado que después de 15 minutos de exposición al proceso de inactivación, *Salmonella* es recuperada [50].

Algunos autores mencionan que los sobrevivientes se pueden ver favorecidos por residuos generados de las células muertas al comienzo del tratamiento, generando una protección hacia estos [51, 52] así mismo se ha sugerido que las poblaciones de bacterias que genotípicamente son homogéneas, presentan diferencias fenotípicas en cuanto a la resistencia no homogénea a los agentes letales [51].

Para concentraciones bajas de *Salmonella* spp. la inactivación se presentó en un menor tiempo esto tiene que ver que a mayores concentraciones de bacterias se enturbia más la solución por lo que las bacterias actúan como sólidos suspendidos y por lo tanto el paso del haz de luz es menor y no se da el daño directo tan rápido como a bajas concentraciones.

### 9.6 Diseño experimental 2<sup>2</sup> con tres puntos centrales

De acuerdo con el análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de inactivación de *Salmonella* sp, el modelo de regresión fue significativo ( $R^2 = 0,95$  y  $p = 0,025$ ) y la precisión adecuada fue de 12,8, siendo superior a 4,0 permitiendo navegar en el modelo. El factor que tuvo el porcentaje de contribución más alto fue la concentración inicial de *Salmonella* (B) con un 98,06 % de contribución y un valor de  $p = 0,008$ . El factor aireación (A) y la interacción de AB no fueron significativos y tuvieron unos valores de p iguales a 0,933 y 0,567, con unos porcentajes de contribución del 0,007 % y 0,024 % tabla 11.

Al analizar los resultados de la segunda variable de respuesta (Remoción de DQO). El  $R^2$  para este modelo fue de 0,75, con un valor de  $p = 0,347$  no significativo y una precisión adecuada de 5,1. Nuevamente el factor significativo fue la concentración inicial con un valor de p igual a 0,042. El porcentaje de contribución fue de 27,6. El factor A y la interacción AB, no fue significativa con p igual a 0,305 y 0,26.

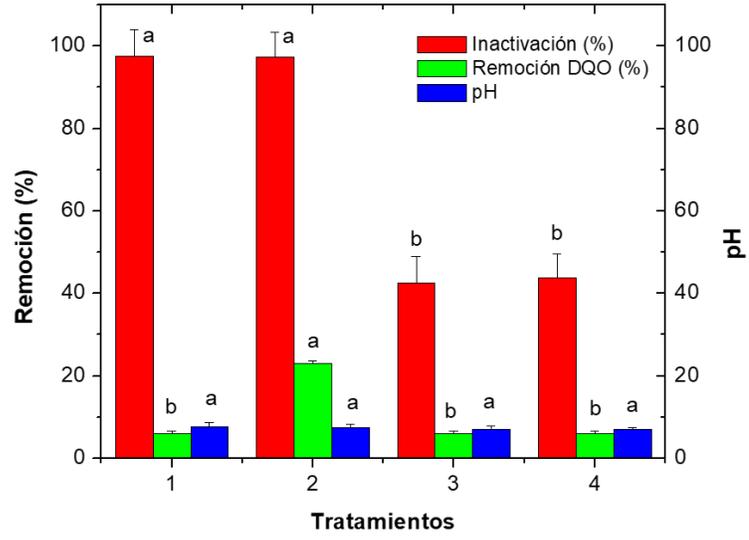
**Tabla 11.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para aireación y concentración inicial de *Salmonella* spp

Inactivación de <i>Salmonella</i> sp (%)				Remoción de DQO (%)		
Factor	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado
Modelo	<b>0,025</b>		+70,27	0,347		+10,18
A	0,933	0,007	+0,24	0,305	22,51	+4,09
B	<b>0,008</b>	98,06	-27,13	0,042	27,67	-4,17

AB	0,567	0,014	+0,33	0,26	23,343	-4,54
Precisión	12,8			5,1		
CV	7,12			4		
R <sup>2</sup>	0,57			0,75		

En la figura 5 se observan los resultados para porcentaje de inactivación de *Salmonella*, remoción de DQO y pH final, en función de los cuatro tratamientos evaluados. Con respecto al porcentaje de inactivación se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.0001$ ), siendo los mejores T1 y T2, seguidos T3 y T4, con porcentajes del 97,5 %, 97,3 %, 42,6 % y 43,7 %. A su vez entre T1 y T2, T3 y T4 no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,0001$ ) (Figura 5).

Para el porcentaje de remoción de DQO también se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,0001$ ) siendo el mejor T2 (23 % de remoción), seguido T3, T2 y T1 (6,5, 5,7 y 5,6 %) (Figura 5). En la misma figura se presentan los valores de pH final que, aunque no fueron variable de respuesta incluida en el análisis si fueron medidos. Observándose que oscilaron entre 7,01 y 7,6.



**Figura 5.** Variables de respuesta del diseño experimental  $2^2$  según el tratamiento. a) Porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp, b) Porcentaje de remoción de DQO, c) pH del tratamiento. Los resultados son el promedio de tres replicas con su respectiva desviación estándar. Las letras en la figura representan las diferencias significativas entre tratamientos. Siendo los mejores los aquellos con la letra a.

Después de analizar las dos variables de respuesta se seleccionó para continuar con las cinéticas de inactivación el T2. Este tratamiento estableció que las curvas de inactivación deben realizarse con aireación de 1 L/min, con una concentración inicial de *Salmonella* de  $1 \times 10^4$  UFC/mL, por un periodo de 60 minutos o menos, empleando 1500 mL de agua, sin ajuste inicial del pH y una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm.

Las razones por las cuales la aireación y la concentración generaron la mayor inactivación y remoción de DQO fueron porque el oxígeno actúa como aceptor de electrones generándose el radical superóxido, promotor de más radicales hidroxilos. La presencia de oxígeno es por tanto esencial para que se produzca una oxidación efectiva [61]

Molano [32] estudió el efecto de la radiación UV en la inactivación de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, y obtuvo 100 % de inactivación a los 55 minutos de exposición para *S. enteritidis* y a los 45 minutos de exposición para *S. typhimurium*.

## **9.7 Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico PUJ**

### **9.7.1 Caracterización de los tanques**

En la figura 6 se presenta la caracterización inicial de los 14 tanques de muestreo de la finca número cuatro ubicada en San Antonio de Tequendama, estos análisis se realizaron para determinar si existía gran variación entre los tanques al realizar una comparación de medias entre tanque se observaron diferencias significativas en tre ellos.

En la figura 6A en relación con el recuento de *E. coli* los tanques que tienen las concentraciones más altas fueron el 8, 11, 12 y 6 con valores de  $3.0 \times 10^3$ ,  $2,7 \times 10^3$ ,  $9.0 \times 10^2$  y  $1,4 \times 10^3$  UFC/mL ( $p < 0.0001$ ). Estos resultados en aguas tratadas, funcionan como una

alerta temprana de que ocurrió contaminación, sin identificar el origen. Indica que hubo fallas en el tratamiento, en la distribución o en las propias fuentes. Su presencia acciona los mecanismos de control de calidad y de procesamiento dentro de la industria de tratamiento de agua, e intensifica la vigilancia en la red de distribución [25].

Se ha usado el grupo de las bacterias coliformes como indicadores, ya que su detección es más rápida y sencilla [19, 20] El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana debido a que estos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente, están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección.

Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, entre otros, viven como saprofitos independientes o como bacterias intestinales; los coliformes fecales (*Escherichia*) son de origen intestinal [23], las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, están sometidas a un estrés fisiológicos y pierden gradualmente la capacidad de producir colonias en medios diferenciales y selectivos. La presencia de coliformes en el agua indica la contaminación bacteriana reciente y constituye un indicador de degradación de los cuerpos de agua. [16], basados en la figura 6 se observa que hay presencia de *E.coli* en los tanques 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12 y 13 esto es un fuerte indicio de una reciente contaminación por aguas residuales o por contaminación de residuos de animales. [52] Es importante tener en cuenta que *E. coli* y los residuos de animales pueden entrar en el agua de muchas maneras diferentes. Durante la lluvia *E. coli* por efecto de lixiviados puede ser arrastrada a ríos, arroyos, lagos o aguas subterráneas de la superficie de la tierra. Otras formas son la fauna silvestre, fosas sépticas defectuosas, actividades recreativas y prácticas locales de uso del suelo (por ejemplo, estiércol utilizado como y ganado). [53] Las fuentes de contaminación fecales de humanos y animales representan un grave riesgo para la salud debido a la alta probabilidad de la existencia de agentes patógenos en los residuos fecales. Los cerdos pueden acarrear patógenos que pueden causar enfermedades y pueden transmitirse de animales a humanos. La presencia de *E. coli*

puede ser indicativo de la contaminación con otras bacterias, virus o protozoos que pueden causar enfermedades [54].

En la figura 6A se observa el pH de todos los tanques, estos no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,0001$ ) y el valor osciló entre 7,08 y 6,5. El cual cumple con la resolución 2115 de 2007 comprendido entre 6,5 y 9,0 y el decreto 0631 de 2015 con valores entre 6,0 a 9,0.

Asociado con parámetros químicos para la DQO (Figura 6B) esta se encuentra dentro de límite de vertimiento para 0631 (900 mg/L), si se observaron diferencias significativas entre tanques ( $p < 0,0001$ ) obteniendo los más altos en los números 4, 2, 1 y 11 con valores de 320, 295, 210 y 110 respectivamente, que puede atribuirse a la cantidad de materia orgánica biodegradable y no biodegradable, generada por los residuos encontrados en las unidades de producción porcícola, que, incluyen las aguas utilizadas para limpiar los corrales, los residuos de la alimentación, así como las excretas de los animales (heces y orina).

Con respecto a la DBO<sub>5</sub> (Figura 6B) los valores más altos se detectaron en 4, 5, 7, 11 con valores de 35, 17,3, 18,2, 20 respectivamente. Es un parámetro indispensable cuando se necesita determinar el estado o la calidad del agua de ríos, lagos, lagunas o efluentes. Cuanto mayor cantidad de materia orgánica contiene la muestra, más oxígeno necesitan sus microorganismos para oxidarla (degradarla).

La relación de tratabilidad DBO<sub>5</sub>/DQO para los 14 tanques estuvo entre el rango de 0 a 4, siendo más altos la de los tanques 5, 7, y 10 con valores de 4,3, 4,04, y 1,37 respectivamente. Es importante conocer la DQO debido a la relación que se tiene con la DBO (Figura 6B), ya que muestra una idea de la biodegradabilidad del agua estudiada. El análisis de la demanda química de oxígeno incluye el análisis de la demanda bioquímica de oxígeno. Por tanto, la DBO<sub>5</sub> es un porcentaje de la DQO propio de la biodegradabilidad de la sustancia. Para valores muy elevados en tanto por uno ( $> 0,8$ ), se trata de un agua muy biodegradable, ya que la mayor parte de materia a oxidar es orgánica y por tanto puede ser descompuesta por microorganismos.

En relación con la resolución 2115 del 2007, no se establecen valores máximos para DQO y DBO<sub>5</sub>, pero si se determina el valor máximo aceptable de 5 mg/L de Carbono Orgánico Total (COT). En este sentido se parte de una aproximación teórica de que el COT es aproximadamente 20 veces menor que la DQO. Al realizar el cálculo teórico se evidencia que para los 14 tanques hubo cuatro tanques que se salieron del valor máximo permitido siendo las muestras 1, 2, 4, 11 con valores de 10,5, 14,75, 16, 5,5 respectivamente, los valores de los parámetros medidos en la caracterización demuestran que el agua requiere de un tratamiento inmediato de remediación antes de ser descargada a cualquier efluente manifestado por los valores de DQO obtenidos.

Los valores de nitratos y nitritos (Figura 6D) no se establecen en el decreto 0631, sin embargo, en la resolución 2115 se establecen valores máximos aceptables en mg/L de nitratos (NO<sub>3</sub>): 10 mg/L y nitritos (NO<sub>2</sub>): 0,1 mg/L para los 14 tanques los valores de nitratos estuvieron por debajo del valor máximo aceptado mientras que para nitritos los tanques 4, 5, 6, 7 y 14 estuvieron por encima del valor máximo aceptado presentándose diferencias significativas entre tanques ( $p < 0,0001$ ).

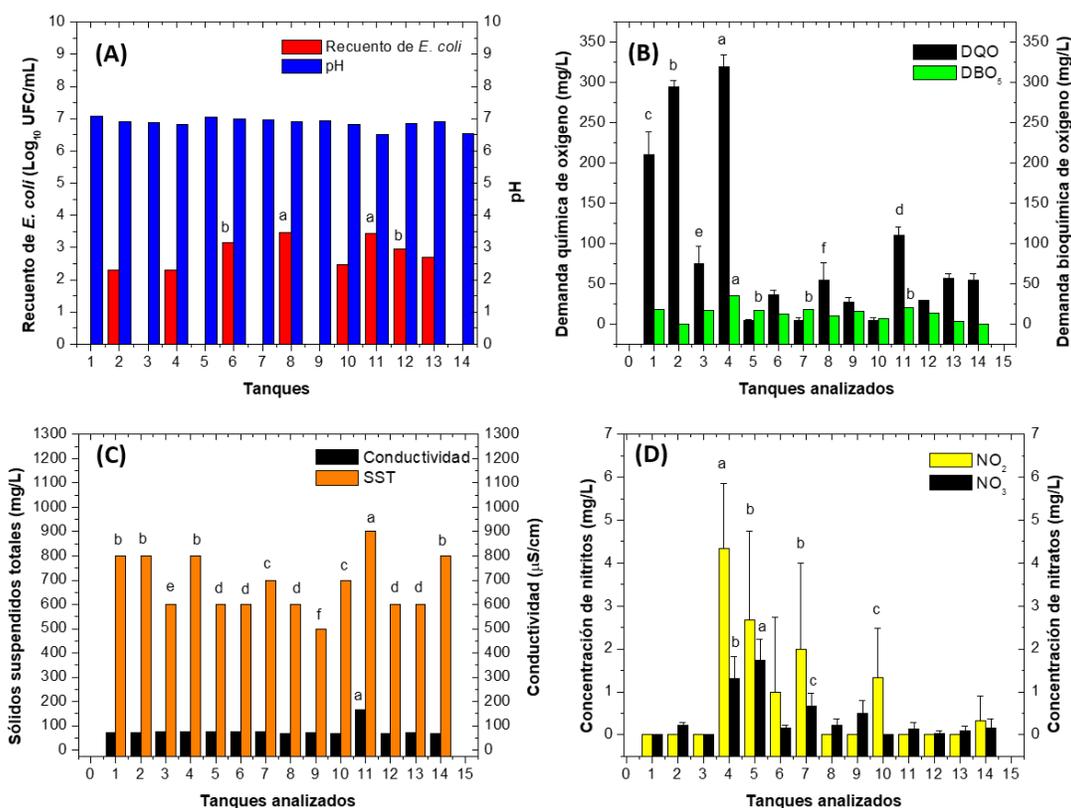
El decreto no establece parámetros de conductividad de vertimientos de agua para esta industria, sin embargo, en la resolución 2115 de 2007 el valor máximo aceptable para la conductividad puede ser hasta 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , los 14 tanques se encuentran por debajo del valor permitido (Figura 6C) y no son diferentes estadísticamente ( $p > 0,0001$ ).

Por último, para SST la resolución 0631 establece un valor máximo de sólidos suspendidos totales (SST) de 400 mg/L se evidencia que para los todos los 14 tanques los valores están por encima del nivel máximo aceptable (Figura 6C), esto puede asociarse a la mineralización de las aguas (sólidos disueltos) y conjuga los cationes sodio, potasio, calcio, magnesio, así como los aniones carbonates, bicarbonatos, sulfatos y cloruros, principalmente existe una estrecha relación entre la concentración de los sólidos suspendidos y la calidad del agua, debido a su capacidad de adsorción de contaminantes como plaguicidas y nutrientes, al control que ejercen sobre la turbiedad del agua, las altas concentraciones de sólidos en suspensión disminuyen la eficacia de agentes desinfectantes del agua; por proveer a los microorganismos de un sitio protector frente la presencia de desinfectantes y su absorción de calor que aumenta la temperatura del agua. También puede

atribuirse a que estas aguas tienen una mayor cantidad de sólidos sedimentables, y materia orgánica en suspensión y/o coloidal [40].

La variabilidad entre los catorce tanques puede atribuirse a la diferencia entre la limpieza y la desinfección de cada uno, en un estudio realizado por Henao [2] evidenció que en un 85 % de 29 granjas estudiadas, esta labor es realizada, pero no se evidencia la estandarización de los procesos y la correcta ejecución de los mismos, pues no se trata sólo de lavar y aplicar un desinfectante, esto debe realizarse con una frecuencia determinada, a una concentración específica por unidad de área y con principios activos acordes a las condiciones de la producción. De esta manera se recomienda elaborar dichos protocolos para garantizar el fin de los mismos y que en el caso de cambio de personal las labores se continúen realizando correctamente. De la misma manera, en trabajos de Gotter [8] se describe la importancia de definir tanto en la encuesta (como instrumento de obtención de datos) como en la práctica, todo aquello que se define como limpieza o desinfección, eliminando el sesgo producido por la interpretación del concepto así como la verificación de cada proceso, la limpieza y desinfección debe estar protocolizada para un correcto desarrollo de la misma.

Finalmente también se atribuye la variabilidad a la cantidad de desinfectante añadido a cada uno y a la distribución que existe entre tanque y tanque.



**Figura 6.** Caracterización inicial de los 14 tanques de agua de uso porcícola de la granja en San Antonio de Tequendama

### 9.8 Cinética a escala de laboratorio en reactor cúbico

Se realizó caracterización fisicoquímica y microbiología del agua que se utilizó para la cinética de inactivación, los resultados se presentan en la tabla 12

**Tabla 12.** Caracterización física, química y microbiológica del agua empleada para las cinéticas de inactivación en el reactor cúbico

Parámetro	Valor	Resolución 0631 de 2015	Resolución 2115 de 2007
pH	8,873	6,00 - 9,00	6,5 - 9,0
Conductividad (μS/cm)	68,8	Sin reporte	1000
SST (mg/L)	1600	400	Sin reporte
DQO (mg/L)	50 ± 28	900	Sin reporte
Nitratos (mg/L)	1	Análisis y	10

		reporte	
Nitritos (mg/L)	0,6	Análisis y reporte	0,1
Recuento <i>Salmonella spp</i> (UFC/mL)	26x10 <sup>5</sup>	Sin reporte	Sin reporte
Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/mL)	24x10 <sup>5</sup>	Sin reporte	0
Recuento totales (UFC/mL)	45x10 <sup>5</sup>	Sin reporte	Sin reporte

En la figura 7A,B,C se presentan los tratamientos que se realizaron y el control de la tecnología convencional empleada en la granja de estudio. En color azul está el T1 que corresponde a fotólisis, en color rojo el T2 que corresponde a fotólisis/peróxido y en negro (símbolos sin relleno) se encuentra el T3 correspondiente al control con peróxido de hidrógeno, para *E. coli*, *Salmonella spp* y bacterias totales refiriéndose a *Salmonella spp* en agar TSA.

En el tratamiento con sólo fotólisis (T1) la concentración inicial de los tres grupos de microorganismos estudiados oscilo entre 6,39 y 6,65 Log<sub>10</sub> que equivale a 24x10<sup>5</sup> y 45x10<sup>5</sup> UFC/mL. La mayor inactivación se dio para *Salmonella spp* a los 30 segundos de exposición (33 UFC/mL) (Figura 7B) seguido con *E. coli* a los dos minutos (1 UFC/mL) (Figura 7A) y recuento de bacterias totales a los 15 minutos (2 UFC/mL) (Figura 7C). Se determinaron diferencias significativas entre este tratamiento y el control, para los tres grupos estudiados. Que demuestran que T1 fue superior a la tecnología química convencional implementada por la finca (p<0,0001) (tabla 13).

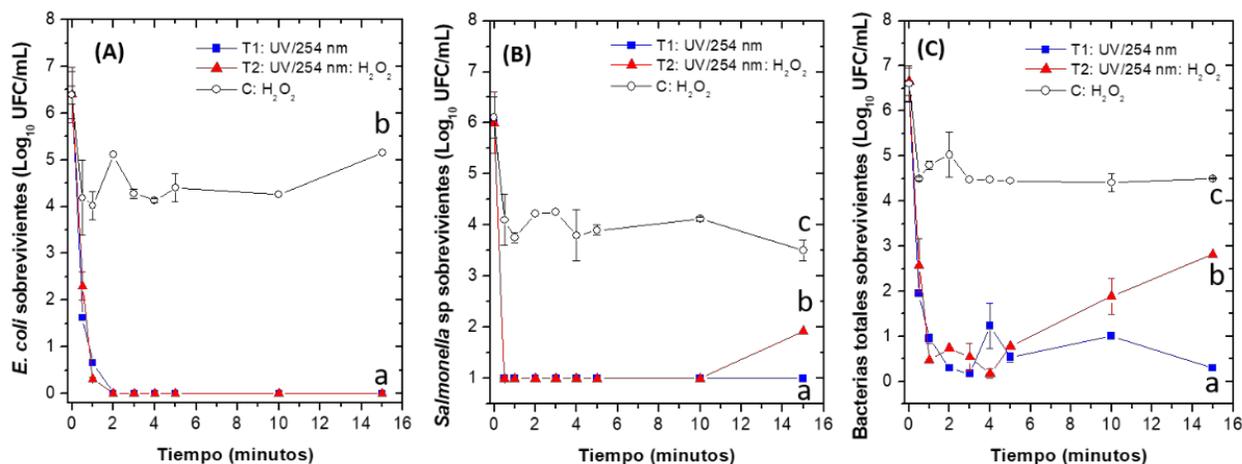
En relación con fotólisis asistida químicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Foto-Fenton modificado: T2), los resultados fueron similares al T1 la inactivación fue igual de eficiente en los mismos tiempos y para los tres grupos, obteniendo valores de <10 UFC/mL para *Salmonella spp* (Figura 7B), para *E. coli* <10 UFC/mL (Figura 7<sup>a</sup>) y para bacterias totales 6,6x10<sup>2</sup> UFC/mL (Figura 7C) a los 30 segundos, dos y 15 minutos respetivamente. Siendo estadísticamente diferente que el control con solo peróxido (p<0,0001) (tabla 13).

En el control con solo peróxido la concentración inicial fue de 17x10<sup>3</sup>, a medida que transcurre el tiempo se observa disminución de las poblaciones, pero no se alcanza la

inactivación total, finalizando con valores  $21 \times 10^3$ ,  $14 \times 10^3$ ,  $44 \times 10^3$ , para *Salmonella* spp (Figura 7B), *E. coli* (Figura 7A) y totales (Figura 7C), a los 15 minutos de exposición. Para determinar cuál de los tratamientos fue más eficiente se tuvieron en cuenta las constantes de inactivación fotolítica (T1), Foto-Fenton modificada (T2) y se compararon contra el control con sólo peróxido (C). De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 13 y la figura 7A, por grupo de microorganismos se determinó que para *E. coli* el mejor tratamiento es T1, seguido por T2 y control con constantes de  $0.00057$ ,  $0.0044$  y  $0.0023 \text{ min}^{-1}$ . Para *Salmonella* spp (Figura 7B) los mejores tratamientos fueron T2 y T1 con valores de  $0.0011 \text{ min}^{-1}$ . Para las bacterias totales el mejor tratamiento es T1 y T2 con valores de  $0.0057$  y  $0.0055 \text{ min}^{-1}$  (Figura 7B). Analizando los resultados el T1 podría ser seleccionado porque en menor tiempo inactiva a *E. coli* y bacterias totales (constantes más pequeñas). Para *Salmonella* spp también puede ser seleccionado este tratamiento porque no tuvo diferencias con T2 ( $p > 0,0001$ ).

Una vez se determinadas las constantes se realizó el análisis para identificar en cuál de los tratamientos se presentaron mecanismos de reparación en función del tiempo. Como se puede observar en la (Figura 7B) *E. coli* generó reparación solamente en el control con peróxido ( $14 \times 10^3$ ). *Salmonella* spp (Figura 7B) se recuperó solamente en el T2 entre los 10 y 15 minutos con valores de 8 UFC/mL. Para el recuento de totales la reparación se hizo evidente nuevamente en el T2 con valores de  $6 \times 10^1$  a  $6 \times 10^2$  entre los tiempos 5 y 15 minutos (Figura 7C). Estos resultados indican que el efecto residual de los radicales oxidantes y el peróxido es menor en el T2 que en el T1 en el cual solo se tiene el efecto

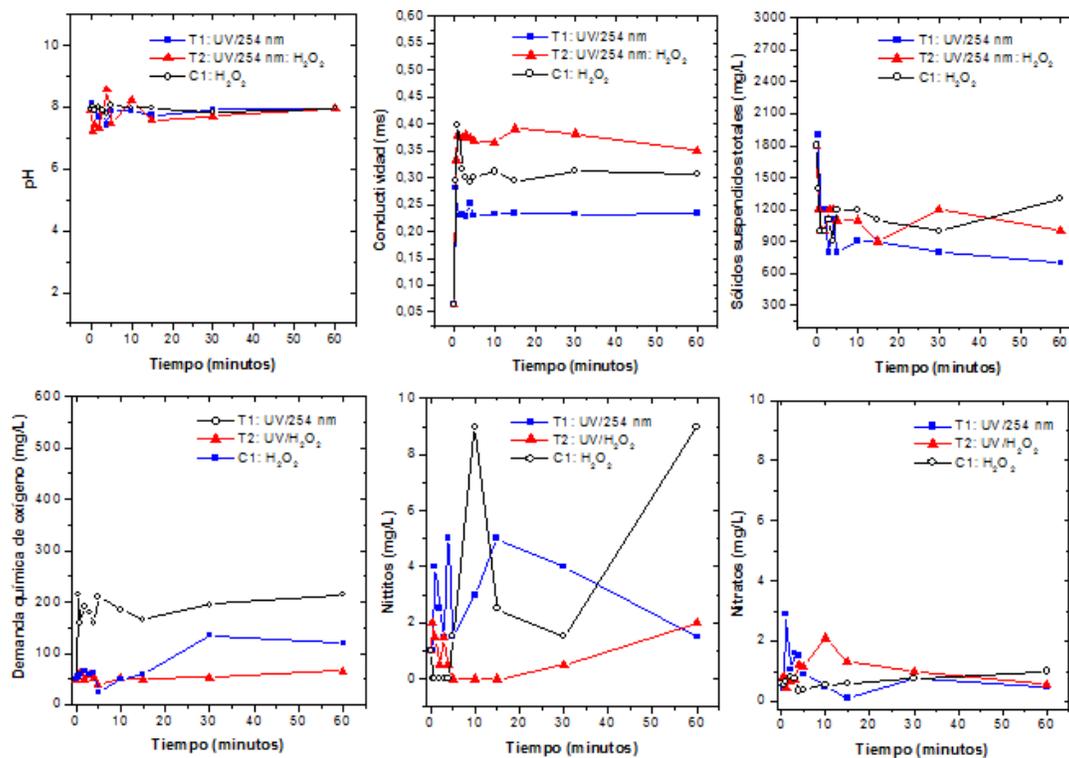
directo e indirecto de la luz UV, Mamane [57] reportaron ligera mejoría en la inactivación de *E. coli* con longitudes de onda de 245 a 295 nm y dosis de 10 y 25 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Tabla 13.** Contantes cinéticas de inactivación calculadas por modelos de pseudo primer orden

Tratamiento o control	<i>E. coli</i> min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	<i>Salmonella</i> spp min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	Bacterias totales min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
Fotólisis UV (T1)	0.0057 <sup>a</sup>	0.99	0.0011 <sup>a</sup>	0.99	0.0057 <sup>a</sup>	0.99
Foto-Fenton (T2)	0.0044 <sup>b</sup>	0.99	0.0011 <sup>a</sup>	0.99	0.0055 <sup>b</sup>	0.99
Fotólisis-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>						
Control H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0023	0,85	0.00041	0.9	0.00078	0.85

Por otro lado, en la figura 8 se presenta la cinética de inactivación a escala de laboratorio con el reactor cubico de la PUJ para cada uno de los tratamientos, estos análisis se realizaron para determinar si había una disminución de dichos parámetros durante los 60 minutos de ensayo, cabe aclarar que para la caracterización fisicoquímica de la cinética se alargó el tiempo de ensayo.



**Figura 8.** Cinéticas de inactivación a escala de laboratorio en reactor cúbico. En negro tratamiento fotolítico UV, en rojo tratamiento fotolítico UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en azul tratamiento control con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El pH de los tratamientos respecto al control básicamente fue el mismo y no hubo cambios significativos entre tratamientos los valores estuvieron entre el rango de 7-8. Los tratamientos cumplen con la resolución 2115 de 2007 y la resolución 0631 de 2015 que permiten valores de 6-9.

Asociado con parámetros químicos para la DQO, se encuentra por debajo del límite de vertimiento para la resolución 0631 (900 mg/L), si se observaron diferencias significativas entre los tratamientos obteniendo valores de DQO más altos en el T1 con valores entre 50-215. En relación con la resolución 2115, no se establecen valores máximos para DQO.

Otros autores como Bhatti combinaron los procesos de  $H_2O_2$  con luz UV encontrando que es muy eficaz para disminuir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y bacterias coliformes en aguas residuales

Los valores de nitratos y nitritos no se establece en el decreto 631, sin embargo en la resolución 2115 se establecen valores máximos aceptables en mg/L de nitratos ( $NO_3$ ): 10 mg/L y nitritos ( $NO_2$ ): 0,1 mg/L para el T1 los valores de  $NO_2$  siempre estuvieron por fuera del valor máximo aceptado mientras que para  $NO_3$  siempre estuvieron por debajo del valor máximo, para el T2 los  $NO_2$  en el tiempo cero empezaron por fuera del límite máximo aceptable y solo hasta el tiempo cinco y quince estuvo por dentro del valor, hacia el final del ensayo el valor fue de 2 mg/L valor que no cumple con el decreto. En el tratamiento control se vio un comportamiento similar para  $NO_2$  y  $NO_3$  al tratamiento uno pero con la diferencia que a partir del minuto diez estos dos parámetros aumentaron de manera significativa.

El decreto no establece parámetros de conductividad de vertimientos de agua para esta industria, sin embargo, en la resolución 2115 de 2007 el valor máximo aceptable para la conductividad puede ser hasta 1000  $\mu S/cm$ , en cuanto a los dos tratamientos y el control los valores de conductividad se comportaron de manera similar y se encuentran por debajo del valor máximo aceptable.

De acuerdo con el decreto 631 se establece un valor máximo de sólidos suspendidos totales (SST) de 400 mg/L se evidencia que para los todos los tratamientos siempre ha estado por fuera del límite máximo entre un rango de 700-1800 aceptable esto puede atribuirse a la cantidad de materia orgánica e inorgánica de las aguas de la granjas y la turbidez con las que se encontraban las aguas.

### **9.9 Cinética a escala de laboratorio en reactor portátil CAMOCOL**

En la **tabla 14** se observan las constantes de inactivación, estas 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 fotólisis UV para *E. coli* y *Salmonella* spp fueron de  $k= 0,00125 \text{ min}^{-1}$  y  $k= 0,00101 \text{ min}^{-1}$  respectivamente

**Tabla 14.** Contantes cinéticas de inactivación calculadas por modelos de pseudo primer orden

Tratamiento	<i>E. coli</i> $\text{min}^{-1}$	R <sup>2</sup>	<i>Salmonella</i> $\text{min}^{-1}$	R <sup>2</sup>
Fotólisis UV	0.00125 <sup>b</sup>	0.92	0.00101 <sup>a</sup>	0.97

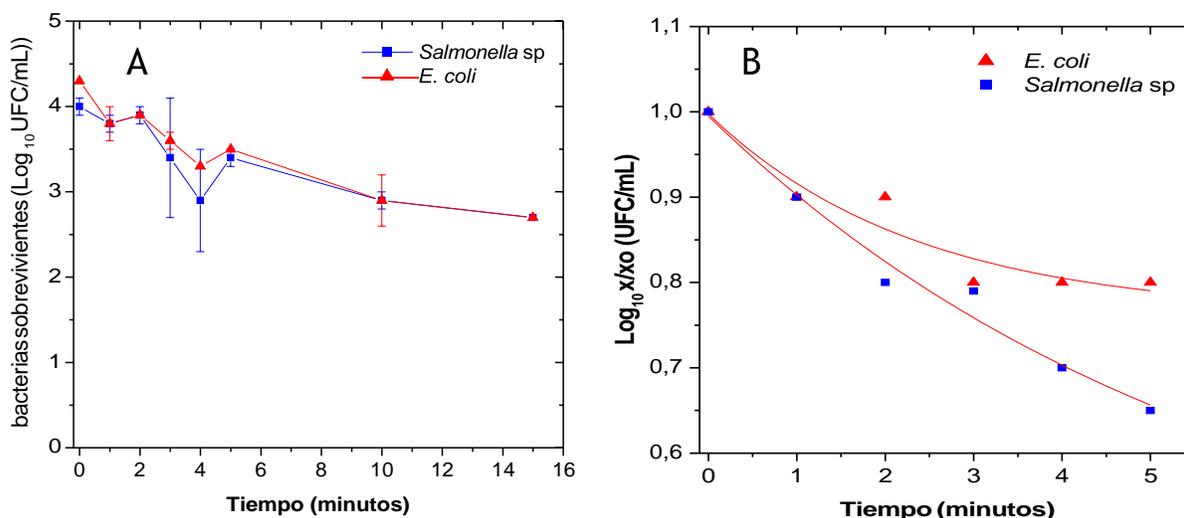
En la figura 9 se presenta la caracterización microbiológica del ensayo utilizando el reactor prototipo portátil en laboratorio, durante 15 minutos y en condiciones de UV.

En cuanto la inactivación de *Salmonella* spp, basados en los valores de constantes de inactivación presentados en la tabla 14, es correcto afirmar que la inactivación de esta es más rápida y eficiente frente al proceso fotolítico, se logró la disminución de tres unidades logarítmicas partiendo de una valor de 6,17 Log<sub>10</sub> de UFC/mL hasta 2,65 Log<sub>10</sub> de UFC/mL (figuras 9A y 9B), esto puede atribuirse a los mecanismos de defensa de *Salmonella* spp para protegerse de estrés oxidativo por medio de la expresión de diferentes genes.

Los procesos de inactivación fotolítica, pueden generar stress, como se mencionó antes, en las bacterias donde se afecta principalmente la síntesis del mRNA con la consecuente reducción en la síntesis de proteínas, adicionalmente afectan la capacidad de las bacterias de obtener nutrientes del medio externo; estos fenómenos también impiden la recuperación de las células estresadas en los medios de cultivo, por lo que en tiempos cortos de estudios, es frecuente encontrar recuentos cercanos a cero, sin embargo se ha demostrado que las bacterias después de un tiempo puede inducir mecanismos de reparación que permiten a las bacterias cambiar sus estructuras, de tal manera que las bacterias inician su proceso de duplicación, estos mecanismos se han demostrado en *Salmonella*, donde se ha observado que después de 15 minutos de exposición al proceso de inactivación, *Salmonella* es recuperada, según Bautista [58] durante los 15 y 30 minutos de tratamiento, tiempo después del cual se presenta un leve incremento en la población.

En relación con la inactivación de *E. coli* se logró la disminución de tres unidades logarítmicas partiendo de un valor de 6,2 Log<sub>10</sub> de UFC/mL hasta 2,71 Log<sub>10</sub> de UFC/mL

(figura 9A y 9B). Esto puede deberse a que los ataques de las especies oxidativas dañan paulatinamente la pared de las bacterias, pues estas se resisten: los mecanismos de defensa y recuperación de *E. coli* son más efectivos cuando solo se utiliza UVA. Por lo tanto, se obtiene un porcentaje de inactivación menor. Puede proponerse que, durante la fotólisis, no hay etapas tan fácilmente diferenciables como en la fotocatalísis: las bacterias pasan de activas estresadas y luego a lisadas a una tasa menor y en forma relativamente constante. Estos resultados son comparables con los de Rosenberg [59] donde aún podían contabilizar colonias al final del ensayo experimental de inactivación de *E. coli* (t=30) mediante fotocatalísis heterogénea y fotólisis lográndose un porcentaje de inactivación mayor (99.587 %) que cuando solo se utiliza fotólisis (90.536 %). Por otro lado, se investigó la influencia de la intensidad de la luz en el proceso de inactivación bacteriana. Estos ensayos mostraron que, en todos los casos, mediante la fotocatalísis se logra una mayor inactivación de *E. coli* que por medio de la fotólisis.

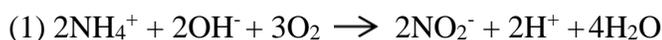


**Figura 9.** Cinéticas de inactivación fotolítica de *Salmonella* spp y *E.coli* empleando radiación UV/254 nm. (A) recuento de bacterias sobrevivientes en función del tiempo Log<sub>10</sub> UFC/mL (B) Log<sub>10</sub> X/X<sub>0</sub> de UFC/mL bacterias sobrevivientes

En la figura 10 se presenta la caracterización fisicoquímica del ensayo utilizando el reactor prototipo portátil en laboratorio, durante 15 minutos y en condiciones de UV.

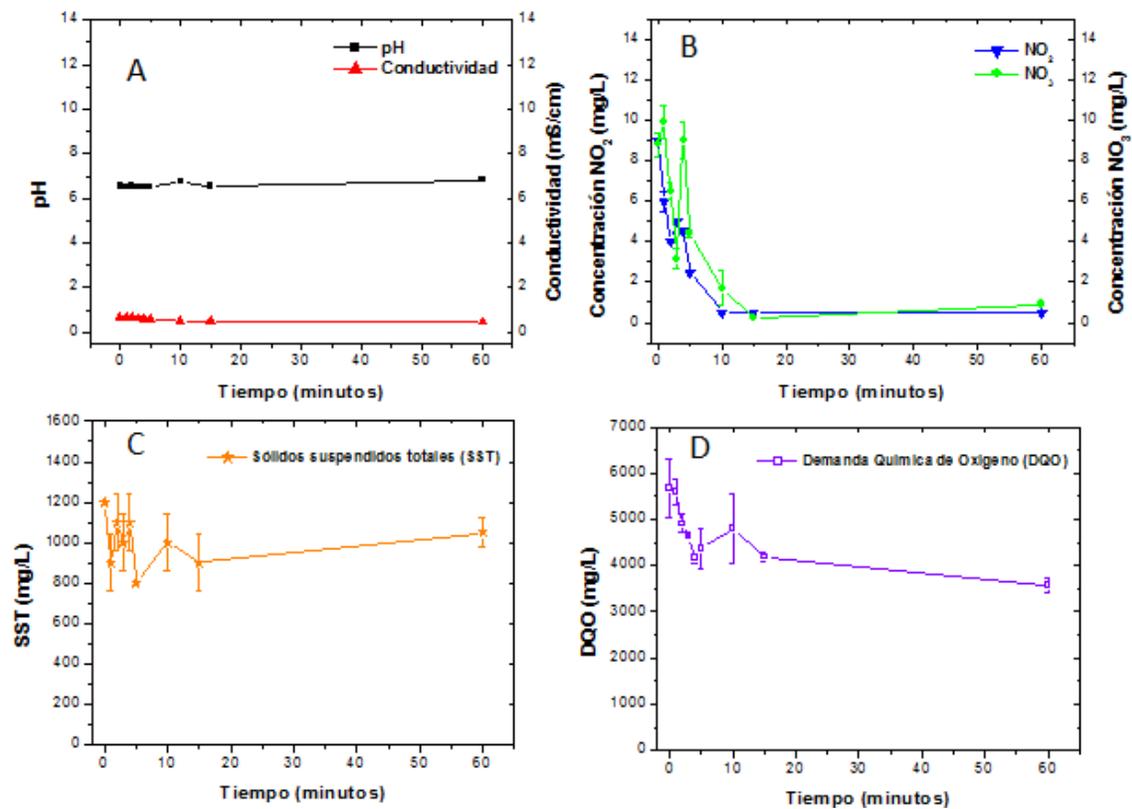
De acuerdo con la normatividad vigente en Colombia según la resolución 0631 del 2015 se menciona el rango permitido de pH que debe estar en un rango de (6.5 y 9.0). Luego del tratamiento los valores de pH estuvieron en rango de 6,5 y 6,83, cumpliendo con el máximo permitido. Respecto a los valores de conductividad se obtuvo un valor de 453 y 678  $\mu\text{S}/\text{cm}$  respectivamente. La resolución 2115 de 2007 menciona que el valor máximo aceptable para la conductividad puede ser hasta 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  evidenciando que el agua tratada cumple con los valores máximos permitidos. Por otra parte los sólidos suspendidos, aportan turbidez al agua generando mayor tiempo en el proceso y no garantiza que el agua tratada salga con un porcentaje mayor de remoción basada en los valores de DQO.

Los valores de nitratos y nitritos tampoco se establecen en la resolución, solo requiere análisis y reporte, sin embargo en la resolución 2115 se establecen valores máximos aceptables en mg/L de nitratos ( $\text{NO}_3$ ): 10 mg/L y nitritos ( $\text{NO}_2$ ): 0,1 mg/L. la diferencia en cuanto a la cantidad de nitratos, puede deberse probablemente a que a pH ácidos se causa oxidación de los iones nitritos a nitratos, además que el  $\text{NO}_2$ , es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a  $\text{NO}_3$ , o bien reducido originando diversos compuestos, los nitritos se forman por la oxidación bacteriana incompleta del nitrógeno en el medio acuático o terrestre, o por la reducción bacteriana del nitrato. Son productos intermedios del ciclo completo de oxidación-reducción y sólo se encuentran presentes en condiciones de baja oxidación. El nitrito en comparación con el nitrato, es menos soluble en agua y menos estable. [55] Los nitratos en las aguas superficiales y subterráneas se derivan de la descomposición natural, por microorganismos, de materiales nitrogenados orgánicos como las proteínas de las plantas, animales y excretas de animales. El ion amonio formado se oxida a nitritos y nitratos según un proceso de oxidación biológica (nitrificación) en dos fases: [56]



Para SST la resolución 0631 establece un valor máximo de solidos suspendidos totales (SST) de 400 mg/L, durante todo en ensayo los valores de solidos no cumplieron con los valores máximos aceptables.

En cuanto a valores de Demanda Química de Oxígeno (DQO) la resolución 0631 establece un valor de 900 (mg/L), en cuanto al valor de DQO del agua tratada los valores tomados a través del tiempo (60 minutos) no cumplen con la normativa ya que se encuentran en un rango de 3563 y 5683 mg/L, los altos valores de DQO están asociados a la presencia de bacterias como lo son *E. coli* y *Salmonella* spp, también estos resultados elevados de la DQO se deben a la naturaleza de producción de ganadería de porcinos (cría) por las diferentes etapas del proceso.



**Figura 10.** Caracterización fisicoquímica de las cinéticas de inactivación a escala de laboratorio en prototipo piloto. (A) En negro pH y en rojo conductividad (mS/cm) (B) En azul nitratos y en verde nitritos (mg/L), (C) Sólidos suspendidos totales (mg/L) (D) Demanda química de oxígeno (mg/L)

Se considera que la fotólisis UV como proceso de oxidación avanzada (POAs) es efectivo en la inactivación de *E. coli* y *Salmonella* spp obteniéndose inhibiciones totales del (100 %) la fotólisis podría ser utilizada como tecnología para el tratamiento de aguas de consumo de granjas porcícolas con el fin de garantizar la calidad y el control del agua.

## 10 CONCLUSIONES.

- Se obtuvo porcentajes de inactivación de *Salmonella* spp del 97.5%, porcentajes de remoción de DQO del 23%, la concentración de bacterias puede influenciar la efectividad del tratamiento fotolítico, teniendo un porcentaje de contribución del tratamiento del 98%, mientras que la aireación y la interacción de estos dos factores no son significativos en el tratamiento.
- Fotólisis y fotólisis más peróxido de hidrógeno fueron eficientes para la inactivación de *Salmonella* spp, y *Escherichia coli*, tanto en agua de captación y en la de disposición, sin embargo el proceso fotolítico pudo ser afectado por la presencia de materia orgánica, obteniendo menor inactivación.
- Se obtuvo una disminución en la DQO al tratar el tipo de aguas de origen porcícola empleando fotólisis y fotólisis más peróxido de hidrogeno determinando que las dos estarían cumpliendo con los límites de vertimiento estipulados para este tipo de industrias
- El uso del reactor prototipo logró disminuir tres unidades logarítmicas de *E.coli* y *Salmonella* spp, es posible utilizar la fotólisis como una alternativa para el tratamiento de aguas de origen porcícola.

## 11 BIBLIOGRAFIA

1. Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, Barral M. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). Rev Sci Tech OIE 2004; 23 (3): 905-911
2. Henao JS, Ramírez E, Rondón-Barragán I. Análisis de las Buenas Prácticas de Producción en granjas porcícolas del departamento del Tolima y factores de riesgo

- asociados a la presencia de *Salmonella* spp. Rev CES Med Zootec 2012; Vol 7(2): 11-20.
3. Henzler DJ, Opitz HM. *Salmonella* enterica serovar enteritidis in humans and animals, epidemiology, pathogenesis and control. Chapter 30. 1992. 331-340.
  4. Censo Porcino 2018. ICA: INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO
  5. Giraldo Juan, Gualdrón Daniela. Identificación de los factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* spp., en granjas porcinas de cuatro regiones productoras de Colombia. 2017
  6. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 43, Enfermedades transmitidas por alimentos.
  7. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlslose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. Foodborne Pathog Dis, 2011; 8: 887-900.
  8. Gotter V, Klein G, Koesters S, Kreinbrock L, Blaha T, Campe A. Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. Prev Vet Med 2012; 106: 301-307
  9. 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.
  10. Jorgensen L, Kjaersgaard H, Wachmann H, Jensen BB, Knudsen KEB. Effect of pelleting and of use of lactic acid in feed *Salmonella* prevalence and productivity in weaners . In: Proceedings of the 4th International Symposium of the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Leipzig, Germany. 2001; 109-111.
  11. Arias J. Métodos en microbiología farmacéutica. 1ª edición. Centro editorial CEJA. Bogotá Colombia, 2006; 165.
  12. 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.

13. 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.
14. Lydakis N, Riga D, Katsivel E, Mantzavinos D. Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination* 2010; 250, 351-355
15. Brunia A. Foodborne Microbial Pathogens. 2008. Ed Springer. USA pp 201-216.
16. Ellermeier C, Slauch J. The genus *Salmonella* in: Prokaryotes 2006: 6; 123-158
17. Chin D. El control de las enfermedades transmisibles. 17 ed. Publicación científica y técnica 581. Washington: OPS/OMS, 2001. pág 552-560
18. E Creus, F Baucells, E Mateu. *Salmonella* infection in a multiple-site swine production system in Catalonia. Proceedings of the 18th IPVS Congress. 2004. (2):675
19. Davies PR, Funk JA, Morrow WEM. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health Prod.* 2000;8(1):25-29.
20. Funk JA, Gebreyes WA. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J. Swine Health Prod.* 2004; 11:89-90
21. Jensen A, Dalsgaard A, Stockmarr A, Nielsen E, Baggesen DL. Survival and transmission of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:1833.
22. Lydakis N, Riga D, Katsivel E, Mantzavinos D. Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination* 2010; 250, 351-355
23. Prados G. Tratamiento de aguas para la eliminación de antibióticos nitroimidazoles mediante la adsorción sobre carbón activado y tecnologías avanzadas de oxidación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, España, 2009, 340.
24. LI J, Uchida T, Todo T, Kitagawa T. Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonante raman spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281 (25): 25551- 25559

25. Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water research* 2010; 44 (10): 2997– 3027
26. 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.
27. 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
28. 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
29. Jaroenworarluck A, Pijarn N, Kosachan N, Stevens R. Nanocomposite TiO<sub>2</sub>– SiO<sub>2</sub> gel for UV absorption. *Chemical Engineering Journal* 2012; 181-18: 45– 55.
30. Blanco A, Ramírez C, Duarte M, Beltrán M, Medina LK, Florido AE, Cardona J, Campos C, Pedroza AM. A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO<sub>2</sub>. *Universitas Scientiarum*, 23 (3): 437-464, 2018
31. Rauf M, Ashraf S. Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal* 2009; 151 (1-3): 10-18.
32. Molano A. EVALUACIÓN DE FOTOCÁTALISIS HETEROGÉNEA CON TiO<sub>2</sub> Y PROCESO FENTON PARA EL CONTROL DE *Salmonella* spp EN AGUAS GENERADAS EN PLANTAS DE BENEFICIO AVÍCOLA. 2012
33. Rincón AG, Pulgarín C. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub> Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* 2004; 51: 283-302.
34. Pal A, Pehkonen S, Yu L, Ray M. Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2007; 186 (2-3): 335-341
35. Dwyer D, Kohanski M, James J Collins, Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2009; 12 (5): 482-489

36. Liu H-L, Yang T. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry* 2003; 39 (4): 475-481
37. Scallan E, Hoekstra R, Frederick J, Angulo R, Sharon L. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA *Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens* 2011; 1-21.
38. 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.
39. Shen S, Fang FC. International Journal of Food Microbiology Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 152 (3): 75–81.
40. Fu P, Pengyi Z, Jia L. Photocatalytic degradation of low concentration formaldehyde and simultaneous elimination of ozone by-product using palladium modified TiO<sub>2</sub> films under UV254+185nm irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* 105 2011; 1-2.
41. Mathews NR, Morales ER, Cortés M, Toledo J. TiO<sub>2</sub> thin films influence of annealing temperature on structural, optical and photocatalytic properties. *Solar Energy*, 2009; 83: 1499-1508.
42. American Publics Health Association. *Standar methods for the examination of water and wastewater*. 2005. 21 Edition. United States of America
43. De Laat J, Giang-Le T. Effects of chloride ions on the iron (III)-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide and on the efficiency of the Fenton-like oxidation process. *Applied Catalysis* 2006; 66 (1-2):137-146.
44. Li J, Luan Z, Yu L, Ji Z. Pretreatment of acrylic fiber manufacturing wastewater by the Fenton process. *Desalination* 2012; 284: 62–5.
45. Ramirez J, Maldonado F, Pérez A, Moreno C, Costa C, Madeira L. Azo-dye Orange II degradation by heterogeneous Fenton-like reaction using carbon-Fe catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental* 2007; 75 (3-4): 312-323.

46. Alrousa D, Dunlop PS. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO<sub>2</sub> films 2009; 43, 8: 47 – 54.
47. Benabbou A, Derriche Z, Feliz C, Lejeune P, Guillard C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* Effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis* 2007; 76: 257-263.
48. 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 TiO<sub>2</sub>. *Dyes and Pigments* 2008; 76 (1): 226–30.
49. Hamilton D, Bobbitt J, Dahl J, Coates K, Lester S, Pointon A. Risk factors for within herds *Salmonella* infection of pigs in Australia. In: Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 2000; 204
50. Van Grieken R, Marugán J, Pablos C, Furones L, López A. Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram-negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis* 2010; 100 (1-2): 212-220.
51. Pal A, Pehkonen S, Yu L, Ray M. Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2007; 186 (2-3): 335-341.
52. 61. Kühn K, Chaberny I, Massholder K, Stickler M, Benz V, Sonntag H, Erdinger L. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* 2003; 53 (1): 71-77.
53. Liu H-L, Yang T. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry* 2003; 39 (4): 475-481
54. Benabbou A, Derriche Z, Feliz C, Lejeune P, Guillard C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* Effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis* 2007; 76: 257-263.
55. Rincón AG, Pulgarín C. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub> Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* 2004; 51: 283-302.

56. Mathews NR, Morales ER, Cortés M, Toledo J. TiO<sub>2</sub> thin films influence of annealing temperature on structural, optical and photocatalytic properties. *Solar Energy*, 2009; 83: 1499-1508.
57. Mamane H, Shemer H, Linden KG. (2007). Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 146: 479–486.
58. Bautista AG. Evaluación en 3 microambientes diferentes de la termorresistencia de una cepa de *Salmonella* spp aislada de compost. Bogotá. 2009. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial) Tesis Universidad Javeriana. Facultad Ciencias. Microbiología Industrial.
59. Rosenberg N. INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* AEROTRANSPORTADA EN AMBIENTES INTERIORES MEDIANTE FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA. 2018
60. Lopez C. Procesos físico-químicos de oxidaciones avanzadas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; Fe<sup>+2</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) y la mejora con un sistema de coagulación-floculación previo, en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de colorantes. Granada. 2016. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ingenierías. Departamento de Ingeniería Civil.
61. Gómez L. Fotooxidación de vertidos químicos: Revisión y experiencias de procesos de oxidación avanzada. En: *Ingeniería Química*. Madrid. No. 371; 211-216.
62. Rodríguez D, Suárez M. (2014). *Salmonella* spp. in the pork supply chain: a risk approach. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 27(2), 65-75.

## ANEXOS

### 1. Encuesta

#### I. Información general de la granja.

1. Departamento:
2. Municipio/Vereda
3. Código de la granja porcícola
4. Información del encuestado
  - Nombre
  - Documento
  - Número de teléfono la granja o celular
5. Tipo de granja
  - Multiplicadora/Reproductora
  - Crecimiento y engorde
  - Ciclo completo
6. Número de trabajadores aproximados que trabajan al año
  - Permanentes
  - Ocasionales

#### II. Condiciones de la granja y corrales

7. Dispone la granja de los siguientes servicios
  - Red municipal de agua
  - Agua captada de ríos, lagos o pozos
  - Energía eléctrica de red pública
  - Energía eléctrica de planta privada
  - Vía de acceso de primer orden
  - Vía de acceso de segundo orden
8. Nombre de la fuente hídrica
9. Si se almacena en tanques ¿Cuál es su capacidad?
10. Si se encuentra en tanque de almacenamiento ¿Cada cuánto se realiza el lavado y la desinfección?
11. ¿Qué tipo de tratamiento se realiza al agua?
12. ¿Efectúan controles de calidad del agua?

- No

- Si

13. ¿Con qué frecuencia?

14. Si se realiza controles, indique cuales

15. Usos del agua

- Lavado de corrales

- Lavado de manos de operarios

- Consumo animal

- Procesos de limpieza y desinfección

16. Emplean agua reciclada por ejemplo agua lluvia, para alguna actividad