

## Evaluación de la fotólisis, fotólisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como tratamientos para la reducción de *Salmonella* spp en aguas de granjas porcícolas

Evaluation of photolysis, photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as treatments for the reduction of *Salmonella* spp in water of pig farms

Cynthia Lorena Valencia<sup>1,2</sup>, Aura M. Pedroza-Rodríguez<sup>2</sup>, Iliana Constanza Chamorro-Tobar<sup>3</sup>, Diana Corina Zambrano<sup>3</sup>, Ana Karina Carrascal-Camacho<sup>1,2,4</sup>

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar tres procesos para la remoción de materia orgánica e inactivación de *Salmonella* spp re inoculada en agua proveniente de granjas porcícolas. Se hicieron muestreos puntuales del agua para realizar la caracterización física, química y microbiológica. A continuación, se seleccionaron las condiciones de operación que favorecieran el proceso de fotólisis a través de un diseño factorial 2x2. Finalmente se realizaron cinéticas de inactivación/remoción valorando fotólisis UV<sub>254</sub> nm, fotólisis UV<sub>254</sub> nm con peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm y peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm. La inactivación de *Salmonella* spp se favoreció al emplear una aireación de 1 L/min y con una concentración de *Salmonella* spp de 1x10<sup>4</sup> UFCml<sup>-1</sup> obteniendo una inactivación de 97.3±1.9% a los 10 minutos de tratamiento. Por otro lado, para las cinéticas de inactivación se estableció que los mejores tratamientos fueron fotólisis y fotólisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin que hubiera diferencias significativas. A los 30 segundos de exposición la inactivación de *Salmonella* fue del 99.9±2.4% en T1, con una remoción de la demanda

<sup>1</sup> Semillero de Inocuidad Alimentaria, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia

<sup>2</sup> Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

<sup>3</sup> Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología del Sector Porcícola – CENIPORCINO, Asociación Porkcolombia, Fondo Nacional de la Porcicultura, Bogotá D.C., Colombia

<sup>4</sup> E-mail: [acarrasc@javeriana.edu.co](mailto:acarrasc@javeriana.edu.co)

Recibido: 11 de diciembre de 2019

Aceptado para publicación: 15 de octubre de 2020

Publicado: 21 de diciembre de 2020

química de oxígeno (DQO), NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> del 30±2, 27±3, 83±4, 41±1,0 y 99±5% para T1 y T2 respectivamente. La bacteria se recuperó en T2 y T3 y los tratamientos no tuvieron efecto residual, determinando que las poblaciones finales fueran de 8 UFC/ml y 3x10<sup>3</sup> UFC/ml, respectivamente.

**Palabras clave:** fotólisis UV, fotólisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inactivación de *Salmonella* spp, aguas, industria porcina

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate three processes for the removal of organic matter and inactivation of *Salmonella* spp re inoculated in water from pig farms. Specific water samples were obtained to perform physical, chemical and microbiological characterization. Next, the operating conditions that favored the photolysis process were selected through a 2x2 factorial design. Finally, inactivation/removal kinetics were carried out, assessing UV254 nm photolysis, UV<sub>254</sub> nm photolysis with hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 15 ppm and hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 15 ppm. The inactivation of *Salmonella* spp was favored by using an aeration of 1 L/min and with a concentration of *Salmonella* spp of 1x10<sup>4</sup> UFC/ml obtaining an inactivation of 97.3±1.9% after 10 minutes of treatment. On the other hand, for the inactivation kinetics it was established that the best treatments were photolysis and photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, without significant differences. At 30 seconds of exposure, the inactivation of *Salmonella* was 99.9±2.4% in T1, with a removal of chemical oxygen demand (COD), NO<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub> of 30±2, 27±3, 83±4, 41±1.0 and 99±5% for T1 and T2 respectively. The bacteria recovered in T2 and T3 and the treatments had no residual effect, determining that the final populations were 8 CFU/ml and 3x10<sup>3</sup> CFU/ml, respectively.

**Key words:** photolysis UV, photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Salmonella* spp inactivation, water, porcine industry

## INTRODUCCIÓN

*Salmonella* es una bacteria que puede causar salmonelosis no tifoidea en humanos, siendo la segunda causa de enfermedades esporádicas y brotes alimentarios en el Este de Europa (EFSA & ECDC, 2017). En Colombia, según la información reportada por el Instituto Nacional de Colombia en 2018, fue la primera causa de brotes de origen alimentario (INS, 2018). Esta bacteria, al infectar animales de sangre caliente, puede contaminar los productos cárnicos, de allí que se le considera como un serio problema para la salud pública (Rönnqvist *et al.*, 2018), donde los cerdos y los productos cárnicos son una fuente importante de salmonelosis.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) atribuye el 8.9% de los casos de salmonelosis humana al consumo de carne de cerdo (EFSA & ECDC, 2016). En ciertos casos, el agua contaminada resulta ser el principal factor de riesgo para que los cerdos se infecten con *Salmonella* (Andres y Davies, 2015; Jensen *et al.*, 2006; Gotter *et al.*, 2012; Giraldo *et al.*, 2019). La calidad del agua se puede mantener con el uso de compuestos clorados y ácidos orgánicos, entre otros; no obstante, pueden generar efectos adversos, tanto en la salud humana y animal como en el medio ambiente (Sedlak y von Gunten, 2011). Los agentes desinfectantes más empleados son los compuestos a base de cloro, dióxido de cloro o peróxido de hi-

drógeno, siendo la eficacia de la desinfección dependiente del agua a ser tratada, la dosis del desinfectante y la frecuencia de su aplicación (Li *et al.*, 2017).

El hipoclorito de sodio, el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno son los principales productos empleados por la desinfección de las aguas. Entidades internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2008) aceptó su implementación en granjas de animales. Estos agentes favorecen la disminución de la carga microbiana presente en las superficies de equipos y en procesos que incluyen agua (Li *et al.*, 2017). Por otro lado, la FAO indica que el uso de desinfectantes a base de cloro no debe exceder concentraciones de 20-50 ppm al adicionarse al agua y el ácido peracético no puede exceder las 150 ppm, ya que es una sustancia corrosiva y comburente a concentraciones superiores al 10% (v/v) (FAO, 2008).

Los problemas que acarrear el uso de este tipo de sustancias químicas han llevado a la búsqueda e 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 generación de especies reactivas de oxígeno con elevado poder oxidante, baja selectividad y elevada acción bactericida sobre diferentes tipos de microorganismos y estructuras de resistencias (Lydakis 2010; Guo *et al.*, 2017a; Demirel *et al.*, 2018). Esta tecnología podría ser una alternativa eficaz para disminuir el uso de compuestos químicos que pueden tener un efecto adverso para el ser humano y el medio ambiente.

Una de las tecnologías más utilizadas en los procesos de oxidación avanzada empleados para la inactivación de microorganismos es la fotólisis con luz ultravioleta (Moreno *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2018; Hinds *et al.*, 2019). La inactivación por fotólisis UV se realiza en cortos periodos de

tiempo y es eficiente porque genera daños directos o indirectos sobre diferentes componentes celulares. Estos absorben la radiación UV generando un incremento en su energía (estado excitado), lo que ocasiona ruptura de enlaces y pérdidas de la integridad celular (fotólisis directa). En la fotólisis indirecta se producen radicales altamente reactivos o especies reactivas de oxígeno, que causan daños oxidativos a nivel de pared y peroxidación de fosfolípidos de membrana, así como de daños irreversibles en el ADN (Nelson *et al.*, 2018). Esto es causado porque las bases purinas y pirimidinas absorben fuertemente la radiación ultravioleta promoviendo transiciones en las bases nitrogenadas que constituyen los nucleótidos, alteran la formación de enlaces, forman dímeros e hidratos que no son funcionales. 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 (Guo *et al.*, 2017b; Butot *et al.*, 2018; Nelson *et al.*, 2018).

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar tres tratamientos (UV<sub>254</sub> nm, fotólisis UV<sub>254</sub> nm con peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 ppm y peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm), para la inactivación de *Salmonella* spp inoculada artificialmente y remoción de materia orgánica en agua provenientes de granjas porcícolas. Se espera determinar una alternativa a la desinfección química que se realiza de forma rutinaria en granjas alejadas de los grandes centros urbanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo y Caracterización del Agua

El muestreo se realizó en dos granjas porcícolas ubicadas en el departamento de Cundinamarca, Colombia. En cada granja se tomaron muestras del sitio de captación (punto de ingreso de agua a la granja) y punto de disposición (salida del agua en los corrales).

Se seleccionaron estos puntos por ser los lugares donde ingresa el agua a las granjas y el agua final de bebida de los cerdos. Para cada muestra se tomaron 5 L para realizar la determinación de pH, conductividad, demanda química de oxígeno en mg/l (DQO) (Standard Method 5220), nitratos en mgL<sup>-1</sup> (Kit HACH 8039 para NO<sub>3</sub>), nitritos en mgL<sup>-1</sup> (Kit HACH 8192 para nitritos) y detección de *Salmonella* spp usando el 3M™ Sistema de detección molecular (MDS), donde previamente se hizo filtración por membrana de acuerdo al método descrito por la American Public Health Association (A.P.H.A., 2017).

### Cepa de *Salmonella*

En los ensayos se empleó una cepa de *Salmonella* spp previamente aislada de una granja porcícola (Giraldo *et al.*, 2019). La bacteria se reactivó a partir del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, empleando caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubando por 24 h a 35 °C.

### Condiciones para el Proceso de Inactivación y Remoción de DQO

Para evaluar el efecto de la aireación y la concentración inicial del microorganismo que favorecen la inactivación por fotólisis, se realizó un diseño factorial de 2x2 con tres puntos centrales (PC) (Cuadro 1). Para tener mayor control del experimento, dado que en el agua de las granjas no se detectó *Salmonella* spp, el agua se esterilizó y se inoculó con una suspensión de *Salmonella* spp, que tenía una concentración de 1x10<sup>8</sup> UFC/ml. Al finalizar el proceso, se realizó la dosificación del agua para tener las concentraciones a evaluar en el factor B y los puntos centrales. De esta forma se pudo evaluar la inactivación y el efecto de la carga de la materia orgánica presente en el agua y expresada como DQO.

Para el experimento, se utilizaron dos reactores cúbicos de 20x40x5 cm (ancho, largo y profundidad), divididos en dos secciones

similares (20x20x5 cm). En cada sección se colocaron difusores de vidrio de aire de 19 cm<sup>2</sup>, con un diámetro interno de 2 mm y orificios de 1 mm separados cada 5 cm. Los reactores fueron colocados dentro de una caja hecha de láminas de metal galvanizado (60x50x30 cm). 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 (Blanco *et al.*, 2018). En cada reactor se colocaron 500 ml de agua inoculada y las lámparas fueron encendidas durante 60 minutos; luego se retiró el agua, la cual fue utilizada para determinar el porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp (Ecuación 1), la remoción de DQO (Ecuación 2) y el pH final.

(Ecuación 1)

$$\% \text{ inactivación} = \frac{\text{UFC/ml inicial} - \text{UFC/ml final}}{\text{UFC/ml inicial}} \times 100$$

(Ecuación 2)

$$\% \text{ de remoción} = \frac{\text{DQO inicial} - \text{DQO final}}{\text{DQO inicial}} \times 100$$

donde, en la Ecuación 1, UFC/ml iniciales corresponden a los recuentos iniciales y UFC/ml finales son los recuentos a los 10 minutos de exposición a la luz ultravioleta, y en la Ecuación 2, DQO inicial es la concentración en mg/l y DQO final es la concentración en mg/l final a los 10 minutos de exposición a la luz ultravioleta.

### Cinéticas de Inactivación y Remoción a Escala de Reactor Fotolítico

De acuerdo con los resultados del diseño factorial se seleccionaron las condiciones para las cinéticas de inactivación y remoción, empleando el mismo reactor y el agua se re inoculó con *Salmonella* spp. Cada cinética se realizó por triplicado y se evaluaron tres tratamientos (T<sub>1</sub>: fotólisis UV<sub>254</sub> nm, T<sub>2</sub>: fotólisis UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm y T<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm (producto químico usado en la granja).

Cuadro 1. Factores y niveles evaluados en el diseño factorial 2<sup>2</sup> con tres puntos centrales

Tratamiento	Factor A Aireación (l/min)	Factor B Concentración inicial (UFC/ml)
1	0	1x10 <sup>4</sup>
2	1.0	1x10 <sup>4</sup>
3	0	1x10 <sup>8</sup>
4	1.0	1x10 <sup>8</sup>
PC	0.5	1x10 <sup>6</sup>

A cada uno de los reactores se adicionaron 1500 ml del agua re inoculada. Se tomaron muestras iniciales cada 15 segundos para el primer minuto, hasta completar 15 minutos. Se realizaron recuentos de las bacterias sobrevivientes en agar de xilosa, lisina, desoxicolato (XLD), se estimó el porcentaje de inactivación y se determinó la concentración final de DQO, NO<sub>3</sub> y pH. Las concentraciones se transformaron a porcentaje de remoción siguiendo la metodología reportada por Blanco *et al.* (2018).

#### Análisis Estadístico

Para el diseño factorial 2x2 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 cuatro tratamientos, empleando una prueba de Tukey con un alfa 0.05 utilizando el programa SAS 9.0. Para las cinéticas de inactivación se realizó una comparación de medias entre tratamientos a los 15 minutos. Adicionalmente, se realizaron correlaciones entre las variables porcentaje de inactivación, remoción de DQO, NO<sub>3</sub> y pH, empleando el programa SAS 9.0.

## RESULTADOS

### Caracterización del Agua Residual

En las aguas obtenidas de las granjas no se detectó la presencia de *Salmonella* spp. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos, del pH y de la conductividad estuvieron dentro de los rangos aceptables para aguas provenientes de acueductos veredales (Cuadro 2). Se detectaron concentraciones variables para DQO, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, lo cual puede relacionarse con el origen del agua empleada para las granjas porcícolas, ya que en algunas regiones de Colombia no se utilizan el agua potable para la cría y levante de ganado porcino.

### Condiciones que Favorecen el Proceso de Inactivación

El modelo de regresión porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp fue significativo ( $R^2 = 0.95$ ;  $p=0.025$ ). El factor que tuvo el porcentaje de contribución más alto fue la concentración inicial de *Salmonella* spp (B) con 96.02% y un valor de  $p=0.008$ . El factor aireación (A) y la interacción de AB no fueron significativos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua colectadas en dos granjas porcícolas del departamento de Cundinamarca, Colombia

Muestra	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	DQO ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$\text{NO}_2$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$\text{NO}_3$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )
Zona recolección	6.5 $\pm$ 0.9	69.4 $\pm$ 1.2	370 $\pm$ 14	1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.5
Zona disposición	6.3 $\pm$ 0.7	78.3 $\pm$ 2.5	90 $\pm$ 6	3 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.2

DQO: Demanda química de oxígeno

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza y coeficientes de regresión para el diseño factorial 2<sup>2</sup> con tres puntos centrales

Factor	Inactivación de <i>Salmonella</i> spp (%)			Remoción de DQO <sup>1</sup> (%)		
	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado	Valor p	Contribución	Efecto estandarizado
Modelo	<b>0.025</b>		+70.27	0.347		+10.18
A	0.051	2.00	+0.24	0.305	22.51	+4.09
B	<b>0.008</b>	96.02	-27.13	<b>0.042</b>	27.67	-4.17
AB	0.567	1.98	-0.33	0.26	23.34	-4.54
Precisión	12.8			5.1		
CV	7.1			4.0		
R <sup>2</sup>	0.95			0.75		

<sup>1</sup> Demanda química de oxígeno

A: Kit HACH 8039; B: Concentración inicial (UFC/ml); AB: Interacción de los factores

En negrilla se presentan el modelo y los factores que fueron significativos con un valor de p&lt;0.05

En el caso de la remoción de DQO el R<sup>2</sup> del modelo fue de 0.75 (p=0.347), donde en forma similar, el factor significativo fue la concentración inicial (p=0.042). El factor A y la interacción AB tampoco fueron significativos (Cuadro 3).

En la Figura 1 se presentan los resultados para el porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp, remoción de DQO y pH final en función de los cuatro tratamientos. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos (p<0.0001) con respecto al

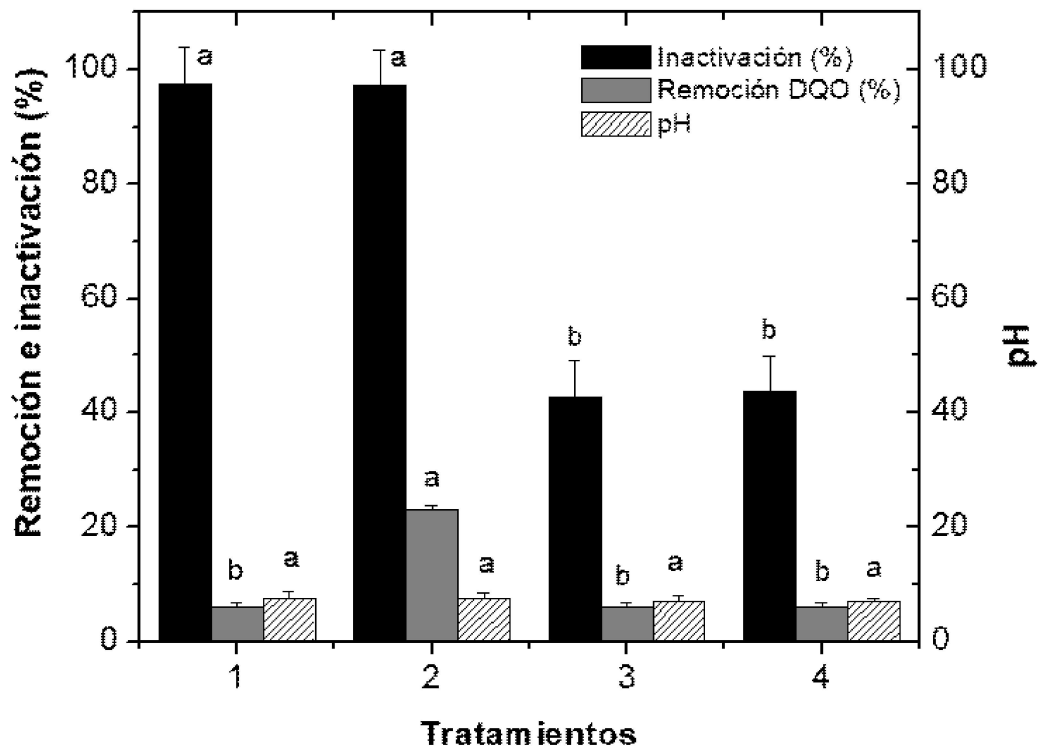


Figura 1. Resultados obtenidos para el diseño factorial  $2^2$  con tres puntos centrales. Los resultados presentados en esta figura corresponden al promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre tratamientos

porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp, siendo mejores en T<sub>1</sub> ( $97.5 \pm 2.0\%$ ) y T<sub>2</sub> ( $97.3 \pm 1.9\%$ ) con respecto a T<sub>3</sub> ( $42.6 \pm 1.1\%$ ) y T<sub>4</sub> ( $43.7 \pm 2.1\%$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> ni entre T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> (Figura 1).

El mejor porcentaje de remoción de DQO se presentó en T<sub>2</sub> ( $23 \pm 2\%$ ), seguido por T<sub>3</sub> ( $6.5 \pm 0.9\%$ ), T<sub>2</sub> ( $5.7 \pm 0.5\%$ ) y T<sub>1</sub> ( $5.6 \pm 0.4\%$ ), no habiendo diferencias significativas entre estos últimos (Figura 1). Los valores finales de pH oscilaron entre  $7.1 \pm 0.8$  y  $7.6 \pm 0.5$ .

### Cinéticas de Inactivación y Remoción a Escala de Reactor Fitolítico

El agua reinoculada con *Salmonella* spp tuvo un pH de 7.9, conductividad de  $68.8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , DQO 250 mg/l, nitritos 1.0 mg/l, nitratos 0.6 mg/l y una concentración inicial de *Salmonella* spp de  $24 \times 10^5$  UFC/ml.

La inactivación de *Salmonella* spp por UV<sub>254</sub> nm (T<sub>1</sub>) y UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T<sub>2</sub>) fue del  $99.9 \pm 2.4\%$  a los 30 s de exposición a la luz ultravioleta sola y luz ultravioleta con peróxido de hidrógeno. La inactivación con solo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no superó el 50% a los 15 min, siendo T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> significativamente diferente a T<sub>3</sub> a los 30 s y

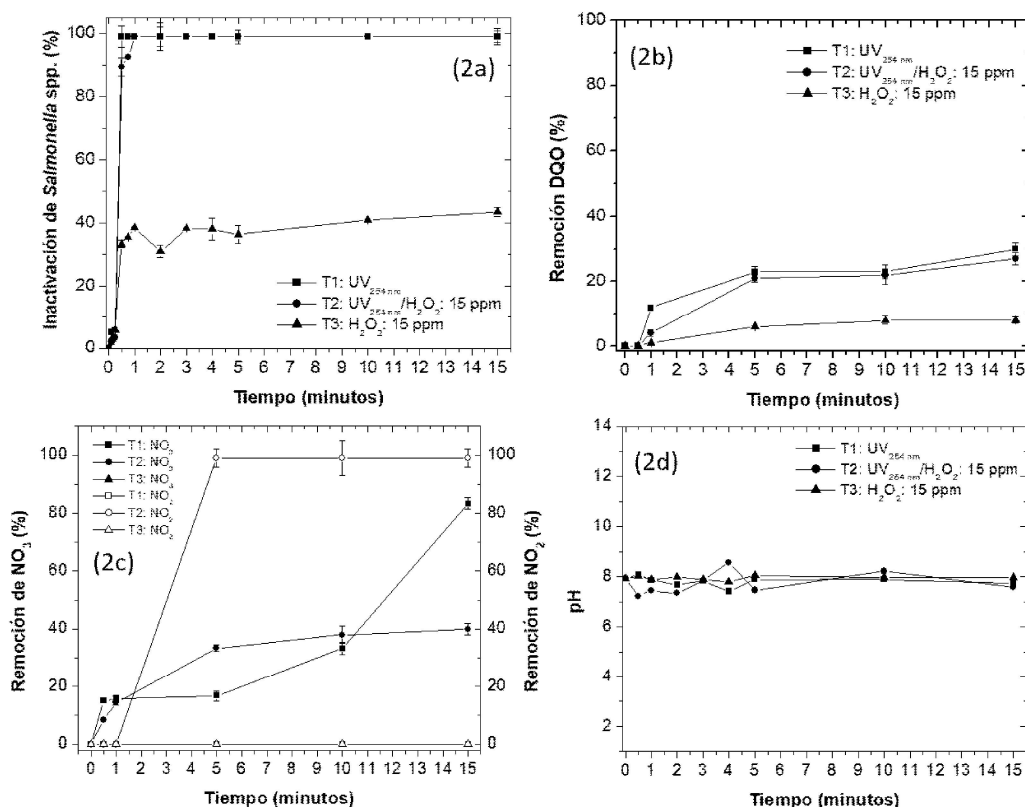


Figura 2. Cinéticas de inactivación para *Salmonella* spp y remoción de parámetros químicos en reactor fotolítico. (A) Porcentaje de inactivación de *Salmonella* spp (B) Porcentaje de remoción de DQO, (C) Remoción de NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> (%). (D) pH. Promedio ± DE de tres réplicas

a los 15 min ( $p < 0.0001$ ; Figura 2a). Por otro lado, al evaluar si presentaban procesos de reactivación al finalizar los tratamientos (15 min), se logró recuperar *Salmonella* spp en T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> con recuentos de 8 UFC/ml y  $3 \times 10^3$  UFC/ml, respectivamente.

La remoción de DQO (inicial 250 mg/l) se incrementó en función del tiempo en los tres tratamientos (Figura 2b). Sin embargo, los valores más altos fueron en T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> a los 15 min ( $30 \pm 2\%$  y  $27 \pm 3\%$ , respectivamente), siendo significativamente superior ( $p < 0.0001$ ) que en T<sub>3</sub> ( $8 \pm 1\%$ ).

La remoción de NO<sub>3</sub> solo se evidenció en T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (inicial 0.6 mg/l), alcanzando porcentajes máximos de  $83 \pm 4\%$  y  $41 \pm 1\%$ , respectivamente, a los 15 minutos, siendo significativamente inferior menos en T<sub>3</sub> ( $p < 0.0001$ ; Figura 2c). En relación con los NO<sub>2</sub> (inicial 1 mg/l) solo hubo remoción en T<sub>2</sub> ( $99 \pm 5\%$ ) desde los 5 min, siendo significativamente en T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub> ( $p < 0.0001$ ) (Figura 2c). Por otra parte, el pH (inicial 7.9) no presentó cambios significativos en el tiempo entre los tres tratamientos (Figura 2c).



## DISCUSIÓN

Las muestras analizadas, si bien no se detectó *Salmonella* spp, se evidenció la presencia de bacterias de la familia Enterobacteriaceae (datos no mostrados). Las aguas analizadas provenían de acueductos veredales donde no se cuentan con todos los controles que se realizan en los acueductos municipales. Además, el uso de mangueras que reposan en el suelo y con acoples con materiales defectuosos favorecen la contaminación del agua. La presencia de DQO se relaciona con el contenido de materia y carbono orgánicos, los cuales deberían ser bajos (5.0 mg/l para carbono orgánico total si el sistema de potabilización es eficiente), corroborando que el agua empleada en las granjas no es potable (Resolución 2115 del 2007). Asimismo, las bacterias Enterobacteriaceae reducen el  $\text{NO}_3$  a  $\text{NO}_2$ , bajo condiciones reducidas de oxígeno. Estos iones disueltos y la DQO son los responsables de la conductividad inicial encontrada en estas aguas.

Al evidenciar que el agua presentó algunas alteraciones de tipo químico, se evaluó si con estas características y re inoculando el agua con *Salmonella* spp era factible implementar a escala de laboratorio tres tratamientos para la inactivación de esta bacteria y remoción de materia orgánica. El uso de luz ultravioleta de alta energía (254 nm) requiere de una serie de condiciones de operación (tipo y energía de las lámparas, concentración de oxígeno, concentración inicial del microorganismo, iones disueltos y pH, entre otros) para que el tratamiento sea eficiente en cortos periodos de tiempo (Moreno *et al.*, 2016). En este sentido, se determinó que la concentración inicial de *Salmonella* spp tuvo un efecto significativo ( $p < 0.005$ ) sobre el porcentaje de inactivación, ya que se demuestra que a concentraciones bajas ( $1 \times 10^4$  UFC/ml) se favorece la inactivación (99.9% a los 10 min), en tanto que a concentraciones altas ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) las bacterias actuaron como sólidos en suspensión y generaron turbidez en el agua. Bajo estas condi-

ciones la radiación UV no penetra en forma eficiente y no todas las células absorben los fotones, responsables de iniciar el daño directo sobre los componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, entre otros) (Nelson *et al.*, 2018; Hinds *et al.*, 2019).

Por otro lado, la fotólisis indirecta mediada por las especies reactivas de oxígeno (ROS) también es afectada por la concentración inicial del microorganismo a inactivar. Al tener concentraciones altas, parte de ellas no son afectadas por las ROS que se producen en los primeros minutos de tratamiento y que son las responsables de iniciar el daño oxidativo a nivel de membrana. Hay una protección por apantallamiento entre células (las más cercana a la luz UV protegen a las que están en la parte más interna de la suspensión); además, las células afectadas por los radicales libres pueden generar procesos de auto recuperación (Benabbou *et al.*, 2007; Butot *et al.*, 2018). Esto también ha sido observado al evaluar la inactivación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium re inoculada en aguas de chiller provenientes de industria avícola (Hernández, 2012; Hernández *et al.*, 2013). La inactivación de las bacterias fue de 99.9% cuando la concentración inicial no supera  $1 \times 10^4$  UFC/ml; por el contrario, a concentración de  $1 \times 10^4$  UFC/ml<sup>6</sup> y elevadas cargas de grasas y DQO, la inactivación fue inferior al 50% a los 5 min de exposición a la luz UV (Hernández 2012; Hernández *et al.*, 2013).

Por otro lado, aunque la aireación no tuvo un efecto significativo sobre la inactivación (Cuadro 3), los datos sugieren que la inyección de aire al reactor contribuyó en menor proporción sobre la inactivación de *Salmonella* spp. La aireación de 1 L/min permitió que las células estuvieran en suspensión, no se sedimentaran y pudieran ser expuestas a la radiación UV. Además de esto, la inyección de aire aporta oxígeno al sistema que se necesita para la producción de ROS, radicales que son claves en las reacciones de oxidación, inactivación de microorganismos y mineralización de los com-

puestos hasta dióxido de carbono y agua (Demirel *et al.*, 2018; Hinds *et al.*, 2019).

Al realizar las cinéticas de inactivación y remoción para evaluar el UV<sub>254</sub> nm (T<sub>1</sub>), UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T<sub>2</sub>) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T<sub>3</sub>) se encontró que la inactivación de *Salmonella* spp fue igual y eficiente desde los 30 s de exposición para T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (99.9±2.4%). Dado que la disminución de la población se observó en menos de 1 min, se podría inferir que el proceso en T<sub>1</sub> se inició por foto-inactivación directa de las células por la adsorción de los fotones de alta energía y continuó con la foto-inactivación indirecta vía radicales libres (Nelson *et al.*, 2018; Hinds *et al.*, 2019). Al combinarse los dos mecanismos de inactivación durante todo el tiempo de evaluación no se observó recuperación de las bacterias postratamiento, lo cual demuestra la eficiencia de la fotólisis de alta de energía sobre la inactivación de *Salmonella* spp.

En T<sub>2</sub> (UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la inactivación de *Salmonella* spp se dio por la combinación de un proceso físico y químico; es decir, una inactivación directa e indirecta, asociadas con la luz UV y la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual incrementa la formación de ROS al descomponerse en presencia de luz UV para formar radicales hidroxilos (Guo *et al.*, 2017b). Estos resultados coinciden con lo reportado por Koivunen y Heinonen-Tanski (2005), quienes observaron que al emplear fotólisis UV y aditivos químicos se incrementa la inactivación de *S. Enteritidis* si se compara con el solo uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los resultados del T<sub>3</sub> demostraron que el uso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm no fue eficiente para eliminar la bacteria (40% a los 15 min). Guo *et al.* (2017) reportaron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es susceptible a la degradación por oxígeno, agua y materia orgánica en aguas frescas y a concentraciones de 1-2% (v/v). La baja eficiencia de inactivación obtenida en este estudio fue similar al estudio realizado por Hernández *et al.* (2013) quienes observaron que durante

las cinéticas de inactivación con este compuesto la disminución de la población no superó el 5% a los 65 min de tratamiento al iniciar con una concentración de 1x10<sup>6</sup> UFC/mL de *S. Typhimurium*.

La remoción de DQO no fue tan elevada (30±2% y 27±3% para T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>) como la inactivación de *Salmonella* spp (99.9%), sugiriendo que para la oxidación de la materia orgánica y mineralización hasta CO<sub>2</sub> se requiere mayor tiempo de proceso. Por otro lado, se debe considerar que al realizarse la inactivación de *Salmonella* spp, se liberan componentes celulares que a su vez se convierten en materia orgánica potencialmente oxidable que podría ser eliminada si se incrementa el tiempo de proceso. Hernández *et al.* (2015) observaron que independiente de la composición química del agua, los tiempos para remover la DQO son más prolongados que los utilizados para inactivar bacterias, ya que fueron necesarias 14 horas de tratamiento para eliminar el carbono orgánico total y color y solamente 50 minutos para inactivar bacterias, cuando se utiliza solamente luz ultravioleta.

Al revisar la remoción de NO<sub>3</sub> observada en T<sub>1</sub>, los resultados sugieren que se llevó a cabo la transformación foto-inducida de NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>. Por esta razón, la concentración de NO<sub>3</sub> disminuyó en función del tiempo y la concentración de NO<sub>2</sub> incrementó (0% de remoción). En T<sub>2</sub> también se observó remoción de NO<sub>3</sub>, pero en menor porcentaje, lo que podría relacionarse con una inhibición por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o radicales libres que actúan sobre este compuesto que es más susceptible a la oxidación que un ion metálico (Gonzalez *et al.*, 1996). Se ha demostrado que a través de procesos de fotólisis bajo condiciones de vacío y fotólisis tradicional se puede obtener la transformación de NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> y se forman compuestos ROS que a su vez podrían potencializar la conversión oxidativa de otros compuestos (Gonzalez *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2014).

Un aspecto fundamental que debe considerarse cuando se emplean estos procesos es evaluar si las bacterias pueden generar procesos de reactivación. En el estudio se observó reactivación de *Salmonella* spp en T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, con valores de 8 UFC/ml y 3x10<sup>3</sup> UFC/ml, respectivamente. Esta bacteria tiene varios mecanismos de defensa que han evolucionado para protegerse del estrés oxidativo, como por ejemplo la activación de regulón soxR/S que está compuesto de al menos 10 genes con diferentes funciones como la neutralización de la superoxidación y absorción de compuestos oxidantes (Janssen *et al.*, 2003). Adicionalmente, *Salmonella* spp induce mecanismos de reparación que le permite cambiar sus estructuras, de tal manera que pueden iniciar su proceso de duplicación. Se observó que después de 15 min de exposición al proceso de fotólisis UV recuperó su viabilidad y nuevamente crece formando colonias más pequeñas (Robertson *et al.*, 2005). Asimismo, se ha encontrado que algunas cepas de *Salmonella* que toleran pH ácidos presentan una menor proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana celular, lo que podría favorecer la reparación celular (Kang J y Kang D, 2019).

## CONCLUSIONES

- Los tratamientos T1: fotólisis UV<sub>254</sub> nm y T2: fotólisis UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15 ppm fueron eficientes para el tratamiento del agua usada en granjas porcícolas re inoculadas con *Salmonella* spp, los cuáles podrían ser una alternativa para productos que no cuentan con un abastecimiento de agua adecuado en las granjas porcícolas
- La fotólisis con UV eliminó el 99.9% de *Salmonella* spp, removió el 30% de la DQO presente y el 80% de la concentración de materia orgánica, siendo una mejor opción frente a los métodos convencionales.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Leonel Beltrán Díaz por su apoyo en la toma de muestras en las granjas. El proyecto fue financiado por la Asociación Porkcolombia - Fondo Nacional de la Porcicultura.

## LITERATURA CITADA

1. **Andres VM, Davies RH. 2015.** Biosecurity measures to control *Salmonella* and other infectious agents in pig farms: a review. *Compr Rev Food Sci F* 14: 317-335. doi: 10.1111/1541-4337.12137
2. **Benabbou AK, Derriche Z, Feliz C, Lejeune P, Guillard C. 2007.** Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Appl Catal* 76: 257-263. doi: 10.1016/j.apcatb.2007.05.026
3. **Butot S, Cantergiani F, Moser M, Jean J, Lima A, Michot L, Putallaz T, et al. 2018.** UV-C inactivation of foodborne bacterial and viral pathogens and surrogates on fresh and frozen berries. *Int J Food Microbiol* 275: 8-16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.016
4. **Blanco A, Ramirez C, Duarte M, Beltrán M, Medina LK, Florido AE, Cardona J, et al. 2018.** A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO<sub>2</sub>. *Univ Sci (Bogota)* 23: 437-468. doi: 10.11144/Javeriana.SC23-3.antw
5. **Demirel CS, Birben NC, Bekbolet M. 2018.** A comprehensive review on the use of second generation TiO<sub>2</sub> photocatalysts: microorganism inactivation. *Chemosphere* 211: 420-448. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.121
6. **[EFSA & ECDC] European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. 2016.** The European Union summary

- report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14: 4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
7. **[EFSA & ECDC] European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. 2017.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15: 5077. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077
  8. **[FAO/WHO]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 2008.** 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: FAO/WHO. 276 p.
  9. **Giraldo CJP, Gualdrón D, Chamorro IC, Pulido A, Santamaría N, Castañeda R, Zambrano C, et al. 2019.** *Salmonella* spp, prevalence, antimicrobial resistance and risk factor determination in Colombian swine farms. *Pesqui Vet Brasil* 39: 816-822. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-6156
  10. **Gonzalez M, Braun A. 1996.** Vacuum UV photolysis of aqueous solutions of nitrate. Effect of organic matter II. Methanol. *J Photoch Photobio A* 95:67-82. doi: 10.1016/1010-6030(95)04228-8
  11. **Gotter V, Klein G, Koesters S, Kreinbrock L, Blaha T, Campe A. 2012.** Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. *Prev Vet Med* 106: 301-307. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.03.016
  12. **Guo S, Huang R, Chen H. 2017.** Application of water-assisted ultraviolet light in combination of chlorine and hydrogen peroxide to inactivate *Salmonella* on fresh produce. *Int J Food Microbiol* 257: 101-109. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.017
  13. **Guo C, Wang k, Hou S, Wan l, Lv J, Zhang Y, Qu X, Chen S, Xu J. 2017.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or TiO<sub>2</sub> photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes. *J Hazard Mater* 323: 710-718. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.10.041
  14. **Hernández-Molnao A. 2012.** Evaluación de fenton y fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> para el control de *Salmonella* sp en aguas utilizadas en plantas de beneficio avícola. Tesis de Maestría. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. 121 p.
  15. **Hernández-Molano A; Villanueva-Jaramillo C, Pedroza-Rodríguez, A.M, Carrascal Camacho A.K, Guerrero, M, Soto-Guzmán AB. 2013.** Evaluation and characterization of CuO/TiO<sub>2</sub> film with antibacterial activity. En: Congreso Interamericano de Microscopía CIASEM. Cartagena- Colombia.
  16. **Hinds LM, O'Donnell CP, Akhter M, Tiwari BK. 2019.** Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications. *Innov Food Sci Emerg Technol* 56: 102-153. doi: 10.1016/j.ifset.2019.04.006
  17. **[INS] Instituto Nacional de Salud de Colombia. 2018.** Enfermedades transmitidas por alimentos. Boletín epidemiológico semanal del INS. 29 p.
  18. **Janssen R, van der Straaten T, van Diepen A, van Dissel JT. 2003.** Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* 5: 527-534. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00069-8
  19. **Jensen A, Dalsgaard A, Stockmarr A, Nielsen E, Baggesen DL. 2006.** Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. *Appl Environ Microb* 72: 1833-1842. doi: 10.1128/AEM.72.3.1833-1842.2006
  20. **Kang J, Kang D. 2019.** Increased resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 to 222-Nanometer kryp-

- ton-chlorine excilamp treatment by acid adaptation. *Appl Environ Microb* 85: e02221-18. doi: 10.1128/AEM.02221-18
21. **Kim D, Lee J, Ryu J, Kim K, Choi W. 2014.** Arsenite oxidation initiated by the UV photolysis of nitrite and nitrate. *Environ Sci Technol* 48: 4030-4037. doi: 10.1021/es500001q
  22. **Koivunen J, Heinonen-Tanski H. 2005.** Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Res* 39: 1519-1526. doi: 10.1016/j.watres.2005.01.021
  23. **Li C, Dong F, Feng L, Zhao J, Zhang T, Cizmas L, Sharma VK. 2017.** Bacterial community structure and microorganism inactivation following water treatment with ferrate (VI) or chlorine. *Environ Chem Lett* 15: 525-530
  24. **Lydakis N, Riga D, Katsivel E, Mantzavinos D, y Xekoukoulotakis N. 2010.** Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination* 250: 351-355. doi: 10.1016/j.desal.2009.09.055
  25. **Moreno-Andrés J, Romero-Martínez L, Acevedo-Merino A, Nebot E. 2016.** Determining disinfection efficiency on *E. faecalis* in saltwater by photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for ballast water treatment. *Chem Eng J* 283: 1339-1348. doi: 10.1016/j.cej.2015.08.079
  26. **Moreira NF, Narciso-da-Rocha C, Polo-Lopez MI, M. Pastrana-Martínez L, Faria J, Maniaia C, Fernandez-Ibañez P, et al. 2018.** Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photoFenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Res* 135: 195-206. doi: 10.1016/j.watres.2018.01.064
  27. **[MPS-MAVDT] Ministerio de la Protección Social y Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2007.** Resolución número 2115. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. [Internet]. Disponible en: <http://www.minvivienda.gov.co/viceministerios/viceministerio-de-agua/gestioninstitucional/calidad-del-agua-para-consumo-humano>
  28. **Nelson KL, Boehm AB, Davies-Colley RJ, Dodd MC, Kohn T, Linden KG, Liu Y, et al. 2018.** Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. *Environ Sci Process Impacts* 20: 1089-1122. doi: 10.1039/c8em00047f
  29. **Robertson J, Robertson P, Lawton L. 2005.** A comparison of the effectiveness of TiO<sub>2</sub> photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *J Photoch Photobio A* 175: 51-56. doi: 10.1016/j.jphotochem.2005.04.033
  30. **Rönnqvist M, Välttilä V, Ranta J, Tuominen P. 2018.** *Salmonella* risk to consumers via pork is related to the *Salmonella* prevalence in pig feed. *Food Microbiol* 71: 93-97. doi: 10.1016/j.fm.2017.03.017
  31. **Sedlak DL, von Gunten U. 2011.** The chlorine dilemma. *Science* 331: 42-43 doi: 10.1126/science.1196397
  32. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.** 9260 detection of pathogenic bacteria. doi: 10.2105/SMWW.2882.201