



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento e identificación de microorganismos de sedimentos y aguas de piscinas camaroneras y su posterior inactivación mediante procesos de oxidación avanzada.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Jaramillo Zamora, Elma Gyselle

DIRECTOR: Aguilar Ramírez, Silvio David, M. Sc.

LOJA - ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Silvio David Aguilar Ramírez.

DONCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Aislamiento e Identificación de microorganismos de sedimentos y aguas de piscinas camaroneras y su posterior inactivación mediante procesos de oxidación avanzada” realizado por Jaramillo Zamora Elma Gyselle, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Elma Gyselle Jaramillo Zamora declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Aislamiento e identificación de microorganismos de sedimentos y agua de piscinas camaroneras y su posterior inactivación por procesos de oxidación avanzada**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Silvio David Aguilar Ramírez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad.

f.
Autora: Jaramillo Zamora Elma Gyselle
Cédula: 1500631864

DEDICATORIA

A Dios por bendecir y cuidar cada paso que he dado en el transcurso de mi carrera.

A mis padres, Edwin y Miriam por ser un pilar fundamental en mi vida, por las enseñanzas y consejos que me motivaron a cumplir con este objetivo.

A mis hermanos, Bernardo, Alex y Cristofer quienes a lo largo de mi vida han sabido brindarme su apoyo para seguir adelante, hasta alcanzar este, mi sueño.

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi confidente y fiel compañero durante todos estos años de constante preparación, esfuerzo y dedicación.

A mis padres y hermanos por los valores de amor y gratitud que me han llevado a luchar y trabajar por conseguir mis ideales.

Al M. Sc. Silvio Aguilar director de la presente investigación y al Dr. Daniel Rosado quienes con sus consejos y orientación supieron guiar este proyecto. De manera especial al M. Sc Luis Cartuche por su apoyo a este proyecto de investigación, por la confianza en mí para desarrollarlo y por sus conocimientos para terminarla.

A mis amigos por su apoyo, dentro de este caminar que no resultó fácil, pero que con fe y perseverancia vamos culminando.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I MARCO TEÓRICO	5
1.1. Principales microorganismos aislados de piscinas camaroneras.	6
1.1.1. Enfermedades asociadas.	6
1.1.2. Aislamiento y caracterización de microorganismos de efluentes marinos.	7
1.1.3. Medios de cultivo.	7
1.2. Identificación molecular mediante secuenciación de la región ARNr 16S.	8
1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa.	8
1.3. Análisis Filogenético.	9
1.4. Procesos de oxidación avanzada para la inactivación de bacterias.	10
1.4.1. Inactivación por UV y UV/H ₂ O ₂	10
1.4.2. Inactivación por reacción de Fenton.	11
1.4.3. Inactivación por foto-Fenton.	11
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Recolección de las muestras.	13
2.2. Análisis Físicoquímicos.....	14
2.3. Tratamiento de la muestra.	14
2.4. Aislamiento de microorganismos.	14
2.5. Identificación molecular.	15
2.6. Procesos de inactivación.	15
2.7. Preparación de la muestra.....	16
2.8. Recuento en placa por siembra en superficie.	17
2.9. Análisis de resultados.....	17

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Composición de agua de mar en piscinas camaroneras.	20
3.2. Aislamiento e identificación bacteriana mediante el análisis de la región ARNr 16S. 21	
3.3. Tratamientos de inactivación.	27
3.3.1. Inactivación por UV.....	27
3.3.2. Inactivación por UV/H ₂ O ₂	27
3.3.3. Inactivación por Foto-Fenton (UV/H ₂ O ₂ /Fe).	29
3.4. Análisis comparativo de resultados.....	32
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS	41
Anexo 1. Técnicas utilizadas.	42
Anexo 2. Secuencias de las cuatro bacterias identificadas.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos aplicados a la solución sintética equivalente a agua de mar con <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Tabla 2. Parámetros de calidad de agua de mar en las piscinas camaroneras.....	20
Tabla 3. Bacterias identificadas en los puntos de toma de muestras.	21
Tabla 4. Análisis comparativo de resultados con pruebas no paramétricas.	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caparazón de camarón con manchas blancas.	7
Figura 2. Mapa de ubicación de la camaronera	13
Figura 3. Piscina Camaronera en el Cantón Huaquillas	13
Figura 4. Procedimiento realizado a las muestras de piscinas camaroneras.	14
Figura 5. Reactor Continuo (Cole-Parmer Master Flex L/S Digital Drive Model 7523-80) ...	16
Figura 6. Recuento en placa de <i>K. pneumoniae</i>	17
Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. Género <i>Exiguobacterium</i>	23
Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. <i>Vibrio fluvialis</i>	24
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. Género <i>Bacillus</i>	25
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
Figura 11. Inactivación de <i>K. pneumoniae</i> con tratamiento UV	27
Figura 12. Inactivación de <i>K. pneumoniae</i> con tratamiento UV/ H ₂ O ₂ a concentración de 10 ppm	28
Figura 13. Inactivación de <i>K.pneumoniae</i> con tratamiento UV/ H ₂ O ₂ a concentración de 30 ppm	28
Figura 14. Inactivación de <i>K. pneumoniae</i> con tratamiento UV/H ₂ O ₂ /Fe a una concentración de 10 ppm.....	29
Figura 15. Inactivación de <i>K. pneumoniae</i> con tratamiento UV/H ₂ O ₂ /Fe a una concentración de 30 ppm.....	30
Figura 16. Inactivación de <i>K. pneumoniae</i> con tratamiento UV/H ₂ O ₂ /Fe a una concentración de 60 ppm.....	31

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento de cuatro bacterias obtenidas de muestras de agua de piscinas camaroneras del cantón Huaquillas, provincia de El Oro y, mediante el análisis molecular de la región ARNr 16S se las identificó como *Exiguobacterium* sp., *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, y *Vibrio fluvialis*. Se valoró la inactivación de la bacteria *K. pneumoniae* mediante tratamientos de oxidación avanzada con UV: (UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/Fe) a diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno (10, 30 y 60 ppm) y tiempos de irradiación (0, 16, 26, 36, 46 ,56 segundos) a pH neutro. Se determinó, que la adición de 10 ppm de peróxido de hidrógeno (UV/H₂O₂) y 10 ppm de peróxido de hidrógeno con 2 ppm de hierro (UV/H₂O₂/Fe) resultaron ser los tratamientos más efectivos, al permitir una inactivación mayor con menor tiempo de irradiación. Los restantes tratamientos resultaron ser menos efectivos con tiempos de inactivación más prolongados y tasas de eliminación bacteriana similares. Los procesos de oxidación avanzada en relación a otros tratamientos resultan ser una técnica eficiente para la desinfección de cultivos de camarón.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, inactivación, PAO's, ARN 16S, piscinas camaroneras.

ABSTRACT

In the present study was performed the isolation four types of bacteria from water samples from shrimp farms in the Huaquillas canton, El Oro province, through molecular analysis of the region 16S rRNA were identified them as *Exiguobacterium* sp, *Bacillus* sp, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio fluvialis*. Was evaluated the inactivation of bacteria *Klebsiella pneumoniae* through advanced oxidation treatment with UV (UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/Fe) different concentrations of hydrogen peroxide (10, 30 and 60 ppm) and irradiation times (0, 16, 26, 36, 46, 56 seconds) at neutral pH. It was determined, that the addition of 10 ppm hydrogen peroxide (UV/H₂O₂) and 10 ppm of hydrogen peroxide with 2 ppm of iron (UV/H₂O₂/ Fe) were the most effective treatments by allowing greater inactivation in less irradiation time. The remaining treatments were less effective with inactivation times longer and bacterial clearance rates similar. Advanced oxidation processes compared to other treatments prove to be an efficient technique disinfection of shrimp farming.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, inactivation, PAO's, 16S rRNA, shrimp farms.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en los últimos años ha sido una actividad acuícola que genera beneficios sociales y económicos significativos dentro de la exportación y el mercado interno.

Esta actividad se ha visto afectada por diversos tipos de contaminantes como pesticidas que en su mayoría provienen de la agricultura, actividades industriales, contaminantes emergentes y microorganismos provenientes de aguas residuales y del medio. Es por esto que los camarones sufren estrés, no se alimentan bien, su crecimiento es lento y desarrollan enfermedades.

A partir de la aparición de numerosas enfermedades asociadas al camarón como la mancha blanca, síndrome del taura, necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética, los granjeros han visto la necesidad de aplicar metodologías de tratamiento y desinfección en sus aguas, a fin de reducir la carga bacteriana; ayudando a evitar el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos que afectan el entorno del cultivo, y su posterior afectación a la salud humana.

Tradicionalmente se aplicaba antibióticos o productos químicos como metodologías de desinfección para las piscinas camaroneras, lo que conduce en ciertos casos a que las bacterias se vuelvan resistentes a los antibióticos. Por otro lado, el abuso de productos químicos genera la intoxicación del camarón, debido a su acumulación en el fondo de las piscinas y la misma contaminación del medio.

En la actualidad los procesos de oxidación avanzada resultan ser técnicas apropiadas de desinfección para la inactivación de bacterias en el sector camaronero del país ya que conducen a la mineralización tanto de químicos como de microorganismos. Estos procesos involucran la generación de agentes oxidantes muy energéticos, principalmente los radicales hidroxilo (OH^\bullet), ya que poseen la capacidad de reaccionar más rápido que oxidantes alternativos (Pey, 2008).

Los radicales OH^\bullet son formados *in situ* por la aplicación directa o por la combinación de agentes oxidantes, como la combinación de ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación ultravioleta y fotocatalisis (García, Gortáres, & Droguí, 2011)

En la presente investigación se realizó el aislamiento, caracterización morfológica y molecular de cuatro bacterias presentes en las aguas de piscinas camaroneras. Su identificación mediante el análisis molecular de la región ARNr 16S y la descripción de

árboles filogenéticos permitieron contar con cepas puras para evaluar la inactivación de al menos una de las cuatro bacterias aisladas mediante procesos de oxidación avanzada.

Se trabajó con la bacteria *K. pneumoniae* evaluando la inactivación de la misma mediante tres tratamientos (UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂ / Fe) determinando la inactivación y por ende la efectividad del método aplicado. Estos resultados fueron graficados en función del recuento microbiano (ufc/mL) expresado en unidades logarítmicas, versus tiempos de exposición en el reactor. Mediante las gráficas se determinó el valor de r^2 para observar la linealidad del proceso, y se utilizaron tres pruebas no paramétricas para confirmar cuál tratamiento es el más efectivo.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Principales microorganismos aislados de piscinas camaroneras.

Las piscinas camaroneras contienen un nivel importante de microorganismos, ya sea en el sedimento como en el agua provocando enfermedades estomacales en las poblaciones aledañas y disminuyendo la calidad del camarón. Por estos motivos, es necesario aplicar metodologías de tratamiento y desinfección que reduzcan la carga bacteriana, o que eviten el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos que afecten al medio ambiente y la salud humana (Cuéllar, Lara, Morales, De Gracia, & García, 2010).

Se han aislado especies patógenas como el género *Vibrio* (*Vibrio penaeicida*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*), género *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*), *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Mycobacterium* sp., *Brucella* sp., *Legionella* sp.; indicadores fecales (*E. coli*, *Enterococcus* sp., *Clostridium* sp.) y otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, e incluso, hongos y levaduras (Park & Ha, 2015).

Un alto número de cepas *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* se han aislado de muestras de agua de mar, sedimentos y contenido intestinal de camarones, e incluso, en peces de agua dulce fuera de las camaroneras causando enfermedades en el camarón reduciendo la eficiencia del cultivo (Gundogan, 2014). Se ha probado resistencia de estos microorganismos a los antibióticos reduciendo la eficacia de los fármacos utilizados en la desinfección de piscinas camaroneras (Nawaz et al., 2012).

1.1.1. Enfermedades asociadas.

Entre los problemas de patogenicidad bacteriana del camarón *Litopenaeus vannamei* utilizado en la acuicultura se encuentra el síndrome de descamación del epitelio del tracto digestivo cuyo agente causal es *Vibrio harveyi*. La muerte masiva que ha tenido el Ecuador en cultivos de camarones ha sido por el "Síndrome de las Gaviotas" en 1989 a 1990 debido a la presencia de bacterias del género *Vibrio*, con infecciones caracterizadas por septicemia y en 1995 por el síndrome de zoea, debido a que afecta especialmente a la forma larvaria del camarón dejando totalmente a la larva sin comida ni lípidos (Maldonado, 2012).

Otras de las enfermedades que afectan al camarón provocando una reducción en el consumo de alimentos son la mancha blanca, Síndrome del Taura, Necrosis infecciosa hypodermal y hematopoiética, Necrosis Baculoviral de la Glándula Intestinal, produciendo alta mortalidad en postlarvas y camarones juveniles, contaminando el agua y sedimentos del fondo de los estanques (Bravo, 2003).

En la producción acuícola el control de enfermedades de origen bacteriano es requerido para evitar mortalidades masivas, este proceso requiere un estudio para evaluar la predominancia de bacterias patógenas en los camarones y así determinar la incidencia de cepas que pueden tener efecto negativo en la salud de la población, producción y comercio internacional (Maldonado, 2012).



Figura 1. Caparazón de camarón con manchas blancas.
Fuente. Lightner, 2011

1.1.2. Aislamiento y caracterización de microorganismos de efluentes marinos.

El medio donde se desarrolla el camarón contiene una diversidad de bacterias Gram negativas y Gram positivas, las mismas que constituyen un foco de contaminación provocando epidemias como el cólera —desarrollada por la bacteria del genero *Vibrio cholerae*— y cargas microbianas causantes de enfermedades tanto del camarón en los cultivos como enfermedades gastrointestinales en las personas (Kopper, Calderón, Schneider, Domínguez, & Gutiérrez, 2009).

Uno de los métodos para el aislamiento de microorganismos a partir de muestras de sedimentos y agua proveniente de piscinas camaroneras se la realiza mediante la técnica de concentración de microorganismos en membrana de filtración de 0,5 μ m y posterior cultivo en medios nutritivos, selectivos y diferenciales (Huq, Grim, Colwell, & Nair, 2006).

1.1.3. Medios de cultivo.

Un medio de cultivo es aquel que proporciona las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para la reproducción de los microorganismos. Podemos diferenciar medios de cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes (Madigan et al., 2004).

Los medios de cultivo son fuentes naturales o sintéticas, en donde se desarrollan los microorganismos como si estuvieran en su hábitat natural. Estos medios pueden ser un

sustrato o una solución de nutrientes y componentes que permiten el crecimiento en las condiciones adecuadas de laboratorio (Narrea & Malpartida, 2006).

Para el cultivo de microorganismos en el laboratorio existen medios comerciales como el Agar MacConkey, este medio permite distinguir los gérmenes productores de lactosa de aquellos que no lo hacen. El Agar Tiosulfato Citrato de Sales Biliares (TCBS) para el crecimiento de bacterias como *Vibrio*. Agar Glutamato rojo fenol y almidón (GSP) permite diferenciar el crecimiento de bacterias como *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Medina, Torrico, & Casado, 2012).

El crecimiento de las bacterias en el medio permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial. Pero no todos los microorganismos presentes en las muestras ambientales son cultivables, se estima que del 1% de las bacterias del suelo, el 0,1-0,01% de las bacterias marinas son cultivables (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

1.2. Identificación molecular mediante secuenciación de la región ARNr 16S.

El ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs o ADN ribosomal de aproximadamente 1.500 pb, se encuentra incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. El ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación (Rodicio & Mendoza, 2004).

El análisis de secuencias del ARNr 16S ha sido estudiada para la identificación de especies bacterianas. El ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, definida por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla y generalmente contienen nueve "regiones hipervariables". Las regiones hipervariables están rodeadas por tramos conservados en la mayoría de las bacterias, lo que permite la amplificación por PCR de secuencias diana utilizando cebadores universales (Tomalá, 2011).

Las secuencias nucleotídicas constantes del ARNr 16S poseen la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación para la elongación de los cebadores y así aplicar la técnica de secuenciación. Durante el análisis de las secuencias del ARNr 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Cuadra, 2007).

1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada en la amplificación in vitro de secuencias de ADN específicas. La amplificación se logra mediante la extensión de los cebadores los cuales son complementarios a secuencias de los extremos 3' del segmento bicatenario que se pretende amplificar (Tomalá, 2011).

La utilización de la Taq polimerasa —enzima aislada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*— permitió perfeccionar la técnica debido a que puede resistir altas temperaturas, como las necesarias para la desnaturalización del ADN (95°C) y, adicionalmente, permite aplicar temperaturas de extensión e hibridación, que dejan margen para manejar la astringencia de la reacción y así amplificar únicamente las secuencias de ADN específicas (Tomalá, 2011).

La elección de los cebadores de la PCR es esencial en los resultados de los análisis utilizando bibliotecas de genes y la huella de ADN, Como el par de cebadores 27F y 1492R, o variantes de la alineación de las mismas regiones del gen ARNr 16S, debido a que estos sirven para la amplificación de secuencias de esta región (Fredriksson, Hermansson, & Wilén, 2013).

1.3. Análisis Filogenético.

El ARNr 16S permite la medida de relaciones filogenéticas entre taxas cercanos o distantes y la capacidad de resolver el dominio, división, familia, clase, orden, género y especie de los microorganismos analizados. El objetivo final de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio (Rosado, Duarte, Seldin, & Elsas, 1997).

Existen tres métodos utilizados en estudios filogenéticos: el primero es el método de la Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP), el segundo el de Maximum Likelihood (ML) y el tercero la Inferencia Bayesiana (IB). Pero hace algunos años se viene utilizando un cuarto método para el estudio filogenético denominado Neighbor Joining (NJ)

El método de Máxima Parsimonia (MP) utiliza árboles filogenéticos que implican la mínima cantidad de cambios evolutivos que se requieren para explicar una determinada matriz de caracteres. Los métodos de Maximum Likelihood y la Inferencia Bayesiana son modelos estadísticos basados en la evolución molecular. El método ML estima la probabilidad de qué tan bien la matriz de caracteres es explicada por los árboles filogenéticos, mientras que el método IB, estima la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos (Peña, 2011).

El método Neighbor Joining es frecuentemente utilizado en estudios de “código de barras molecular” (DNA barcoding). El objetivo de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Además, existe la posibilidad de descubrir especies parecidas en grupos de morfología compleja o inaccesible (Peña, 2011).

1.4. Procesos de oxidación avanzada para la inactivación de bacterias.

Los Procesos de Oxidación Avanzada (POA) son procesos fisicoquímicos que involucran la generación y uso de especies momentáneas con un elevado poder oxidante como es el radical hidroxilo (OH^\bullet). Este radical permite procesos termodinámicamente más favorables y velocidades de oxidación superiores a otros métodos de oxidación (Pey, 2008).

Los radicales OH^\bullet se forman in situ por la aplicación directa o por la combinación de agentes oxidantes, como el ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación ultravioleta y fotocátalisis (García et al., 2011).

En los últimos años, los POA se han aplicado a efluentes industriales difíciles de tratar con procesos biológicos convencionales. Por ejemplo, aquellos con una carga orgánica elevada o muy baja (ya que el sustrato no permitiría mantener un proceso biológico), y compuestos tóxicos no biodegradables muy altas ($> 1 \text{ g/l}$), (Urkiaga, Gómez, Gutiérrez, & de las Fuentes, 2005).

Los POA son tecnologías respetuosas con el medio ambiente y no producen residuos tóxicos, es por eso que son considerados actualmente como uno de los mejores tratamientos en la desinfección y eliminación de contaminantes de agua y para la inactivación de bacterias, parásitos y virus pese a los escasos estudios en agua marina (D. Rubio, Nebot, Casanueva, & Pulgarin, 2013).

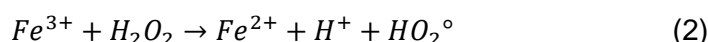
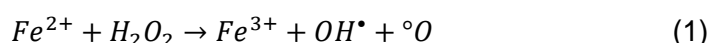
1.4.1. Inactivación por UV y UV/ H_2O_2 .

La radiación ultravioleta (UV), generada con una lámpara de vapor de mercurio, se utiliza como desinfectante debido a que daña el ADN de los microorganismos, no produce subproductos y no afecta a la estabilidad biológica de las aguas. El H_2O_2 junto con la luz UV o hierro forma radicales hidroxilo que atacan directamente a la pared celular, aumentando la permeabilidad y sensibilidad bacteriana. La combinación de UV con H_2O_2 conduce a un proceso de oxidación avanzada con propiedades oxidativas mejoradas, los cuales no causan daños al medio ambiente y se han estudiado como alternativas a tratamiento de desinfección de agua marina (Moreno, Romero, Acevedo, & Nebot, 2015).

La región espectral más efectiva para la inactivación de los microorganismos está a una longitud de onda de 240 a 280 nm, siendo la radiación más germicida la de 254 nm. La ventaja de esta oxidación es que los subproductos de reacción son H_2O y CO_2 (Pololo, Fernandez, & Oller, 2013).

1.4.2. Inactivación por reacción de Fenton.

El proceso de reacción Fenton tiene su origen en el año de 1894. Este proceso consiste en la adición de sales de hierro en presencia de H_2O_2 , en medio ácido, para la formación de radicales OH^\bullet (1). Además generan radicales perhidroxilo (HO_2°) (2), los cuales inician una reacción de oxidación en cadena para eliminar la materia oxidable. Sin embargo, los radicales HO_2° presentan menor poder oxidante que los OH^\bullet (A. Rubio, Chica, & Peñuela, 2014).



En los últimos años algunos autores han descrito la inactivación de diferentes bacterias por medio de este proceso tales como *E. coli*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp, y los hongos como *Fusarium solani* con resultados notables (Rodríguez, Mosteo, Ormad, & Ovelleiro, 2012).

La reacción de Fenton puede tener variaciones, como el uso de radiación UV, proceso que es llamado foto-Fenton que en comparación con el método Fenton 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 (Gonzalez, Mazille, Benitez, & Pulgarin, 2011).

1.4.3. Inactivación por foto-Fenton.

El proceso Foto-Fenton se usa cuando se requiere una alta reducción de demanda química de oxígeno. En este proceso el Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} descomponiendo el H_2O_2 para formar el radical OH^\bullet (3), el empleo de la radiación UV incrementa el poder de oxidación principalmente por la foto reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} la cual produce más OH^\bullet (4) y de esta forma se establece un ciclo en el reactivo de Fenton y se producen los OH^\bullet para la oxidación de compuestos orgánicos (5) (Hincapié, Ocampo, Restrepo, & Marín, 2011).



CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de las muestras.

Se recolectaron muestras de agua y sedimento de una piscina camaronera situada en Huaquillas (Lat. 3° 28' 52.97" S y Long. 80°14'36"O), cantón ubicado al sur oeste del Ecuador en la provincia del Oro. El clima de esta zona es cálido seco con una temperatura de 20 a 35°C durante todo el año.

Se seleccionaron cuatro puntos de toma de muestra: a la entrada, dentro y a la salida de la piscina y, el cuarto punto fuera de las camaroneras en el Puerto Hualtaco. Cada muestra de agua fue recolectada en bidones plásticos de 20 litros, y los sedimentos marinos fueron recolectados en bolsas de recolección Ziploc de un tamaño de 40 cm x 48 cm. Finalmente las muestras se transportaron en condiciones de frío (4,5°C) al Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

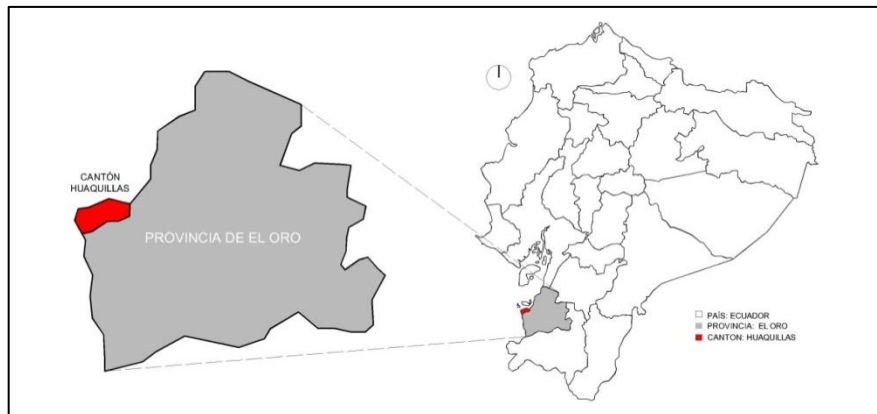


Figura 2. Mapa de ubicación de la camaronera
Fuente. Autora



Figura 3. Piscina Camaronera en el Cantón Huaquillas
Fuente. Autora

2.2. Análisis Físicoquímicos.

El análisis de la calidad de agua en las piscinas camaroneras se realizó mediante mediciones *in situ*, de oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad con un medidor multiparámetro portátil (multímetro hq40d, HACH) de diferente sonda. Se utilizó el multímetro con sonda de oxígeno disuelto luminiscente resistente (LDO intelliCAL LDO101), electrodo de pH resistente con relleno de gel (intelliCAL), y una sonda de conductividad resistente (intelliCAL, CDC401). Además, en el laboratorio se analizaron sólidos totales, nitritos, nitratos, cloruros y Coliformes totales.

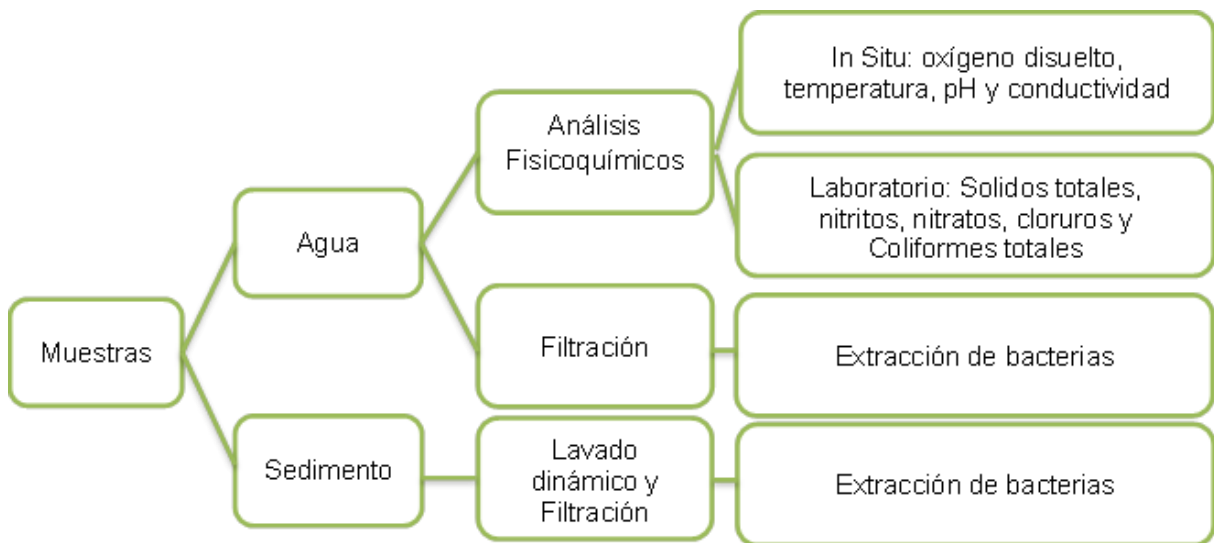


Figura 4. Procedimiento realizado a las muestras de piscinas camaroneras.
Fuente: Autora

2.3. Tratamiento de la muestra.

Se realizaron dos filtraciones a las muestras recolectadas de las piscinas camaroneras. Donde se empleó un primer filtrado con tres litros de muestra para eliminar residuos vegetales y sedimentos, empleando filtración al vacío, con papel filtro Whatman N° 1. El segundo filtrado se realizó sobre filtro de membrana (Neogen Filter) de 0,45 µm, empleando vacío. Se adicionó 5 ml de medio de cultivo agua peptonada alcalina (APA Merck KGaA, pH 8,5) al residuo contenido en la membrana y se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurrido este período de tiempo, se realizaron reservas criogénicas (-75°C) de las muestras con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

2.4. Aislamiento de microorganismos.

El aislamiento de bacterias se realizó a partir de las reservas criogénicas mantenidas a -75°C, mediante el método de siembra por agotamiento, realizando un estriado por cuadrantes en placas de agar medio nutritivo, agar APA, agar sangre, Agar MacConkey,

Agar TCBS y Agar GSP; finalmente las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Las placas donde se observó crecimiento de colonias diferenciadas se resembraron en los mismos medios de cultivo anteriormente indicados. La identificación de la pureza de los cultivos se realizó mediante observaciones morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas (observación en fresco y tinción Gram) y, adicionalmente se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa e indol.

2.5. Identificación molecular.

La identificación de cada uno de los microorganismos aislados fue posible mediante la extracción de ADN, PCR, secuenciación y análisis filogenético. El ADN fue extraído con el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), mediante el protocolo para bacterias Gram negativas. La amplificación del ADN ribosomal se llevó a cabo por PCR con la combinación de primers universales para bacterias 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) de la región 16S.

Se purificó los productos de PCR con el kit Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System y se verificó la presencia de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed® (colorante de ácidos nucleicos, Biotium, Hayward, CA, USA).

El proceso de secuenciación se llevó a cabo en el país de Corea mediante secuencias Macrogen con los mismos primers utilizados en PCR. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en busca de secuencias referentes más cercanas. Las secuencias obtenidas en este estudio en conjunto con las más cercanas desde la base de datos fueron alineadas usando el programa MAFFT (estrategia G-INS-I). Los árboles filogenéticos obtenidos fueron generados a través del análisis Maximum likelihood (ML) desarrollados en el programa MEGA v5.

2.6. Procesos de inactivación.

Los experimentos de inactivación se llevaron a cabo usando un reactor continuo que consta de un sistema de alimentación con bomba peristáltica (Cole-Parmer Master Flex L/S Digital Drive Model 7523-80) con lámpara de mercurio UV-C central en un tubo de cuarzo y acero inoxidable con armazón de plástico cuya longitud de onda de es 254 nm (Ultraviolet Sterilization Filter, Model: OPP-625).

Se realizaron tres tratamientos: Oxidación por UV, Oxidación UV/H₂O₂ y Oxidación por Foto-Fenton tal como se indican en la Tabla 1.



Figura 5. Reactor Continuo (Cole-Parmer Master Flex L/S Digital Drive Model 7523-80)
Fuente. Autora

2.7. Preparación de la muestra.

Se tomó 0,1 ml de las reservas criogénicas de *Klebsiella pneumoniae*, se inoculó en medio de cultivo líquido (Caldo tripticosa soya BD, pH 7,3 ± 0,2) y se incubó a 37°C por un lapso entre 12-14 horas. A partir del cultivo overnight, se realizó una dilución en soluciones sintéticas de NaCl en 1 litro de agua destilada estéril (equivalente a agua de mar) hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 UFC/ml. A partir de esta dilución se realizaron los procedimientos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a la solución sintética equivalente a agua de mar con *Klebsiella pneumoniae*

Matriz	Bacteria utilizada	Tratamiento	Concentración de H ₂ O ₂ (ppm)	Concentración de Fe (ppm)	Tiempo de reacción (s)	pH
Solución sintética (25g/l NaCl)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UV 254nm	0	0	0,16,26, 36,46,56	7
		Irradiación UV 254nm + H ₂ O ₂ (SIGMA 30%)	10	0	0,16,26, 36,46,56	
		Irradiación UV 254nm + H ₂ O ₂ (SIGMA 30%)	30	0	0,16,26, 36,46, 56	
		Irradiación UV 254nm + H ₂ O ₂ (SIGMA 30%) + Fe	10	2	0,16,26, 36,46,56	
		(cloruro férrico hexahidratado, MERCK)	30	6	0,16,26, 36,46,56	
			60	12	0,16,26, 36,46,56	

Fuente: Autora

2.8. Recuento en placa por siembra en superficie.

Para cuantificar la eficiencia de cada proceso de inactivación, a la salida del reactor se tomaron las correspondientes alícuotas de 10 ml en tubos estériles y se sembró en placas Petri con agar tripticasa soya (tripticasa soya BD, pH $7,3\pm 0,2$). La cuantificación de las unidades formadoras de colonias presentes en el agua tratada, se realizó mediante recuento en placa por siembra en superficie. Para ello, se sembró 100 μ l de la alícuota correspondiente sobre la superficie del agar y se extendió la muestra con un asa de Drigalski en forma de "L" estéril hasta que el medio lo absorba por completo, se invirtieron las cajas para incubar a 37°C por 24 horas. Este procedimiento se lo realizó por duplicado. En el caso de que el recuento sea muy elevado se realizaron diluciones apropiadas en diferentes factores hasta obtener un conteo óptimo.



Figura 6. Recuento en placa de *K. pneumoniae*.
Fuente. Autora

2.9. Análisis de resultados.

Para poder visualizar la cinética de eliminación y por ende la efectividad del método aplicado, se construyeron gráficas donde se representó el logaritmo del recuento microbiano, $\log(\text{ufc/mL})$, versus los tiempos de exposición en el reactor. Se trazó una línea de tendencia a través de los datos obtenidos para calcular el valor de R^2 o coeficiente de determinación. Para ensayos biológicos un R^2 mayor a 0.7 es aceptable.

El tratamiento de los resultados se llevó a cabo mediante estadística descriptiva e inferencial y como programas informáticos se usaron SPSS 14.0, STATISTICA 5.0 y para las gráficas y bases de datos, se utilizó Microsoft Office Excel 2007.

El análisis estadístico se lo realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, el cual permitió determinar la existencia de una distribución normal de los datos para emplear el modelo de ANOVA de una vía. En caso de que no se haya encontrado una distribución normal, se empleará modelos no paramétricos para evaluar la eficacia de los tratamientos y decidir cuál de ellos es el más efectivo.

Se contrastó tres factores, Tratamiento A, Tratamiento B y Tratamiento C, considerando las posibles combinaciones entre tratamientos analizados. Los tratamientos efectuados en este experimento fueron:

- Tratamiento 1. Oxidación por UV
- Tratamiento 2. Oxidación UV+H₂O₂ 10ppm, Oxidación UV+H₂O₂ 30ppm
- Tratamiento 3. Oxidación UV+H₂O₂+Fe 10ppm, Oxidación UV+H₂O₂+Fe 30ppm, Oxidación UV+H₂O₂+Fe 60ppm.

Para la interpretación de los resultados se trabajó con el modelo paramétrico descrito, donde se realiza las siguientes hipótesis:

- H₀. No existen diferencias entre el tratamiento A y el tratamiento B y C.
- H₁. Existe diferencia entre el tratamiento A y el tratamiento B y C.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se da a conocer y discuten los resultados obtenidos en este estudio. La presentación y discusión de los resultados se realizó comparando los diferentes tipos de tratamientos realizados en agua sintética de mar; a continuación se compararon los tres tratamientos (UV, UV/H₂O₂, y UV/H₂O₂/Fe).

3.1. Composición de agua de mar en piscinas camaroneras.

En la Tabla 2 se muestran las características físico-químicas de la matriz estudiada.

Tabla 2. Parámetros de calidad de agua de mar en las piscinas camaroneras.

Parámetros	Unidades	Entrada a la Piscina	Dentro de Piscina	Salida de Piscina	Puerto Hualtaco
Oxígeno disuelto	mg/l	6,15	11,29	6,27	6,53
	% de saturación	79,20	148,70	80,70	85,00
Temperatura	°C	28,40	29,60	28,50	27,70
pH		7,50	8,75	8,55	7,67
Conductividad Eléctrica	uS/cm	2431,64	44236,50	44503,70	1339,73
Solidos totales	mg/l	1656,00	35438,00	35696,00	1050,00
Nitrito	mg/l	0,15	0,33	0,28	0,15
Nitrato	mg/l	11,00	1,00	2,00	15,00
Cloruro	mg/l	818,01	19254,67	19758,06	812,97
Coliformes totales	NMP	2258,99	1715,11	2258,99	5522,32

Fuente: Autora

Los parámetros fisicoquímicos de pH y conductividad fueron comparados con el estudio realizado por Moreno et al. (2015), el cual nos indica que el parámetro de pH entre 7,5 y 8,75 leído en nuestro estudio se encuentra dentro de los niveles de referencia. El parámetro de conductividad a la entrada de la piscina, a diferencia del parámetro de pH, se encuentra muy por debajo de los niveles de referencia que están entre $50\ 443.30 \pm 1107.06$; lo cual se puede deber a la cercanía con efluentes de agua dulce, tal como se evidencia en el dato de conductividad en el Puerto Hualtaco.

3.2. Aislamiento e identificación bacteriana mediante el análisis de la región ARNr 16S.

De los cuatro puntos de muestreo se logró aislar 6 especímenes. Las cepas bacterianas fueron agrupadas mediante su morfología macroscópica (forma y coloración de la colonia) y microscópica (mediante tinción de Gram). Se realizó una codificación por cada espécimen aislado, según varios criterios que se describen a continuación: La procedencia de la muestra, es decir, si la muestra se obtuvo dentro de la piscina (DP), fuera (FP) o en la entrada de la piscina (EP); de acuerdo a la fuente de recolección, si fue de agua (A) o de sedimento (S) y según el medio en el que se cultivó y el color de la colonia formada. Cada una de estas características se detalla en la Tabla 3.

Las 6 cepas aisladas fueron identificadas mediante el análisis molecular. Dos de ellas corresponden al género *Exiguobacterium*, una al género *Bacillus*, otra cepa corresponde a la especie *Vibrio fluvialis* y dos cepas corresponden a la especie *Klebsiella pneumoniae*, tal y como se escribe en la Tabla 3. Especímenes de los géneros *Vibrio* y *Klebsiella* ya han sido aisladas de piscinas camaroneras, como se demuestra en los estudios descritos por Rodríguez & Sandoval, (2010).

Tabla 3. Bacterias identificadas en los puntos de toma de muestras.

Procedencia	Fuente	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción Gram	Código de cepa†	Nombre de la especie
Fuera de piscina camaronera	Agua	Colonia convexa brillante, color naranja, Crecimiento en agar APA	Bacilos cortos	Gram positivos	FPAP FPAN	<i>Exiguobacterium</i>
Fuera de piscina camaronera	Agua	Colonia redonda pequeña, color crema en agar APA, colonia amarillo en agar TCBS	Bacilos cortos	Gram negativos	FPAC	<i>Vibrio fluvialis</i>
Dentro de piscina camaronera	Agua	Colonias circular moderadamente convexas, de apariencia seca, color crema opaco, Crecimiento en agar APA	Bacilos largos	Gram positivos	DPAP	<i>Bacillus</i>
Dentro de piscina camaronera	Agua	Colonia brillante mucosa, color rosa,	Bacilos cortos	Gram negativos	DPAN DPAC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

crecimiento en
agar
MacConkey

Fuente: Autora

- † **FPAP:** Fuera de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Tinción Gram **P**ositivo.
- † **FPAN:** Fuera de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Colonia **N**aranja.
- † **FPAC:** Fuera de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Bacilos **C**ortos.
- † **DPAP:** Dentro de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Tinción Gram **P**ositivo.
- † **DPAN:** Dentro de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Tinción Gram **N**egativos.
- † **DPAC:** Dentro de **P**iscina, Aislado de **A**gua. Bacilos **C**ortos.

Del total de cepas aisladas, las cepas codificadas como FPAP y FPAN mostraron ligeras diferencias morfológicas. Luego del análisis de la región parcial ARNr 16S se determinó que ambos especímenes pertenecían al género *Exiguobacterium* (Figura 7). El análisis reveló dos clados soportados entre el 98 y 99% de similitud. La cepa con código FPAP muestra un 98% de probabilidad de que el nodo más cercano se encuentre entre *E. aurantiacum*, *E. mexicanum* y *E. aquaticum*. Para poder establecer la especie se requiere de la identificación fenotípica y genotípica, así como hibridaciones ADN-ADN volviéndose obligatorias si se encuentran por debajo del 97% de similitud como lo explica Hanage, Fraser, & Spratt, (2006) debido a que por encima del 97% las cepas representativas y sus vecinos más cercanos se asume que pertenecen al mismo género.

Las bacterias del genero *Exiguobacterium* son gram positivas. Su aislamiento se ha realizado de diversas fuentes de agua, especialmente de quistes de *Artemia salina* y *Artemia franciscana*, un crustáceo que mide de 17-18 mm en estado adulto, y sirve de alimento para peces, camarones u otros crustáceos más grandes. Estudios proporcionados por Orozco, Maeda, & Lopez, (2002) demuestran la capacidad benéfica de *Exiguobacterium* en el desarrollo y crecimiento de *Artemia franciscana* sin afectar su supervivencia. Esta bacteria sirve de protección contra agentes patógenos como *Vibrio*.

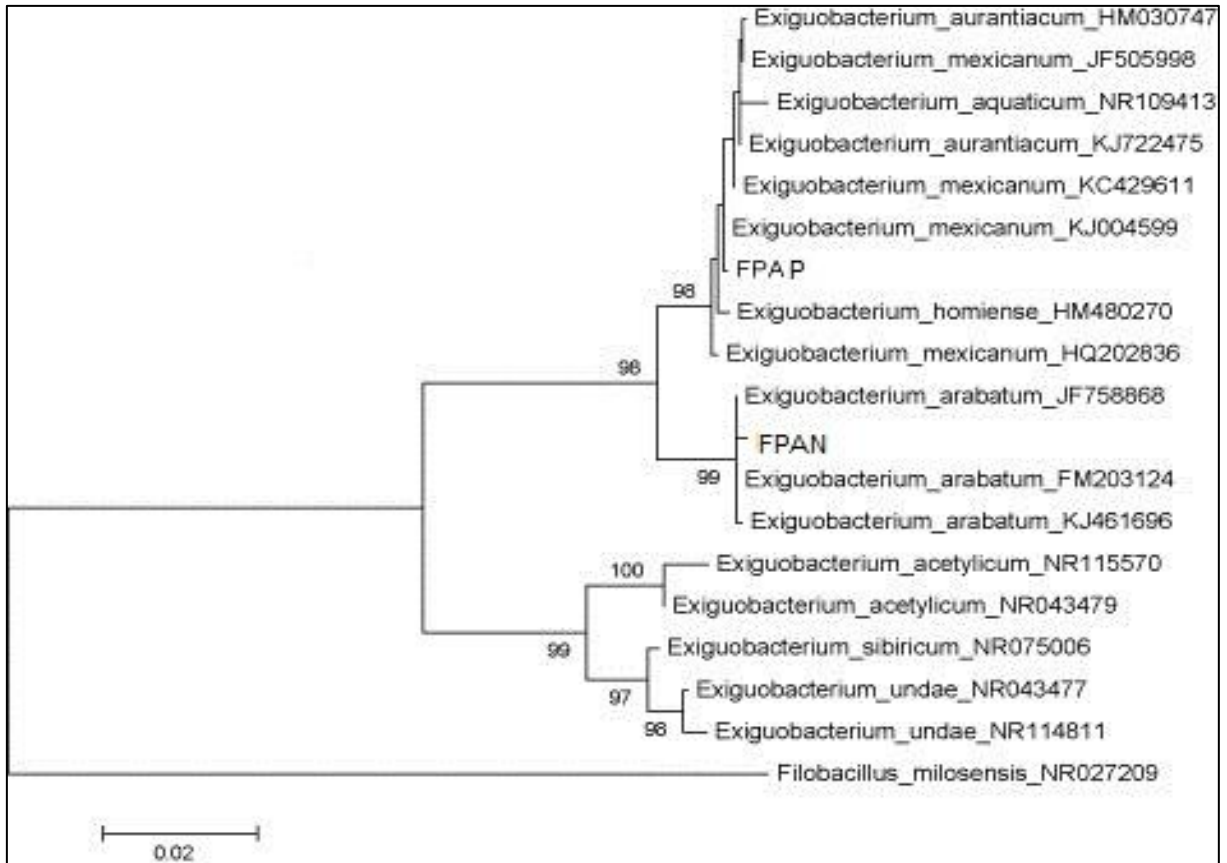


Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. Género *Exiguobacterium*

Fuente. Autora

La cepa codificada como FPAC revelo dos clados soportado en un 98-99% de confianza perteneciendo al género *Vibrio* (Figura 8), y un 98% que la especie relacionada al cultivo sea *Vibrio fluvialis*, debido a que nuestra secuencia en el árbol filogenético se encuentra distante de sus parientes.

Vibrio es una bacteria patógena, gram negativa, aislada principalmente de agua y sedimento marino y en algunas ocasiones de peces, mariscos y crustáceos. Son responsables de muchas enfermedades tanto para el ser humano como para la acuicultura del camarón causando una elevada mortalidad y graves pérdidas económicas en todos los países productores (Alavandi et al., 2004).

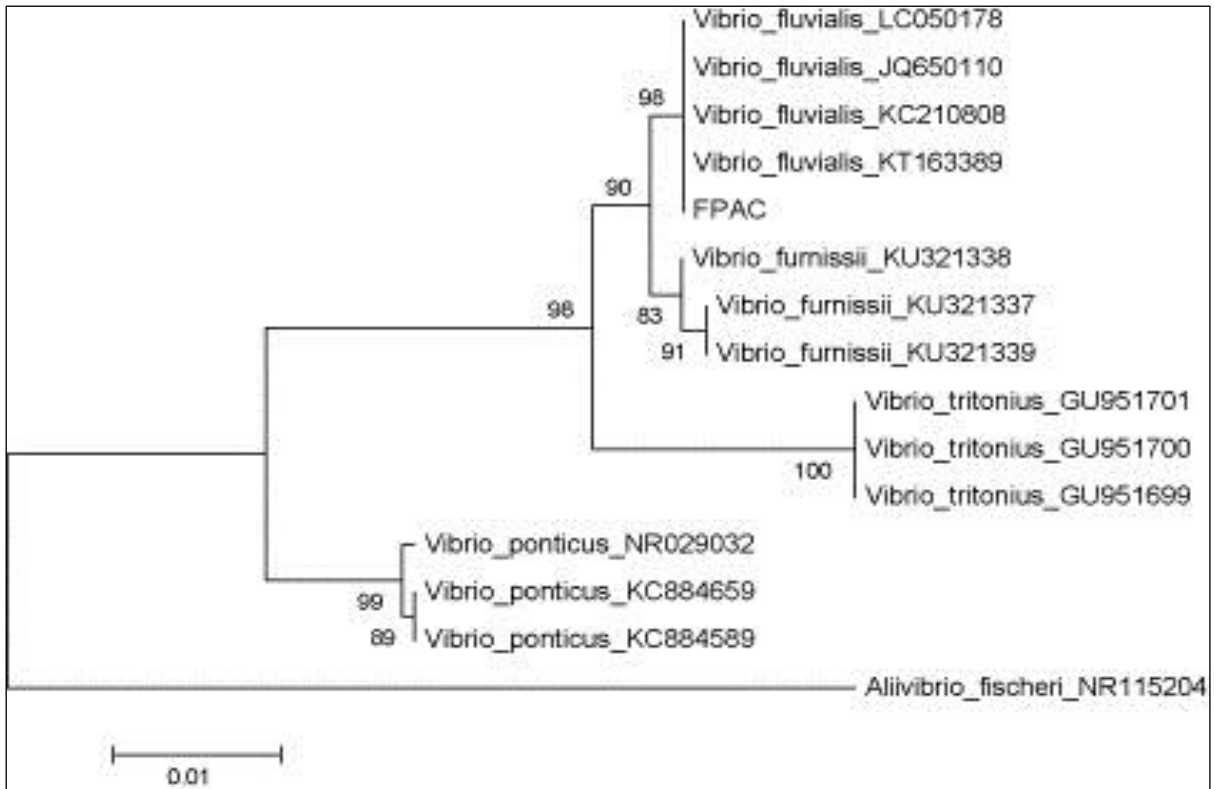


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. *Vibrio fluvialis*
Fuente. Autora

La cepa con código DPAP reveló dos clados, uno con 99% y otro con 100% de probabilidad de pertenecer al género *Bacillus* (Figura 9). El nodo más cercano para la cepa DPAP se encuentra entre los especímenes *B. cereus* y *B. thuringiensis* con un 99%. Según estudios realizados por Zheng et al. (2013) estos dos especímenes son miembros del grupo de bacterias de *Bacillus cereus* ya que tienden a mezclarse entre sí, pero difieren en sus fenotipos y efectos patológicos.

Los miembros del género *Bacillus* contienen una gran diversidad de especies bacterianas en el medio ambiente, son gram positivas, poseen la capacidad de producir moléculas de importancia comercial y algunos de estos miembros son patógenos como *B. cereus*; debido a que se transmite a través de una intoxicación alimentaria, pero otros como *B. thuringiensis*, sirven como una alternativa biológica al uso de plaguicidas (Hemalatha & Banu, 2010).

Los resultados morfológicos macro y microscópico realizados a esta cepa están relacionados con lo descrito por Hemalatha & Banu (2010) en agua de mar, con las características de la colonia que es de color crema, opaca, y circular.

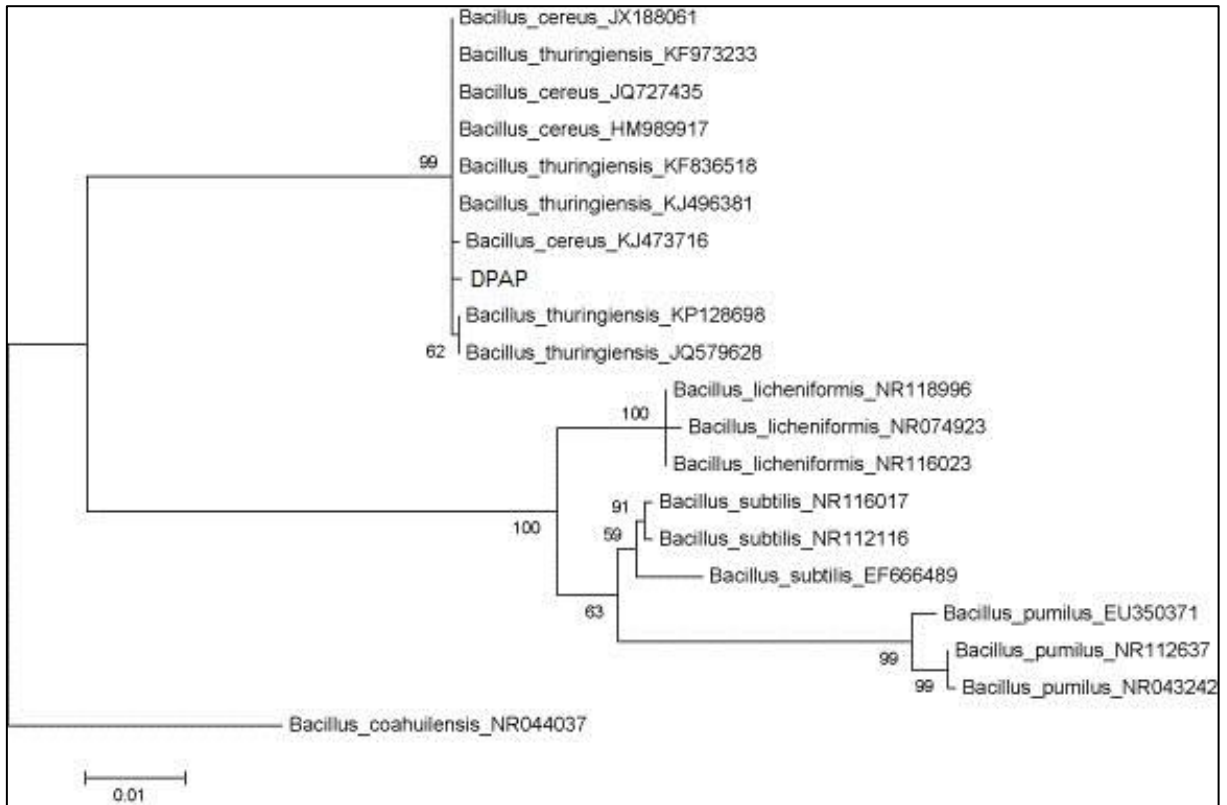


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. Género *Bacillus*
Fuente. Autora

Las cepas codificadas como DPAN y DPAC pertenecen al género *Klebsiella* y el nodo más cercano se encuentra en el 85% de similitud con la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (Figura 10). Los resultados de identificación coinciden con lo descrito por Sikarwar & Batra, (2011) utilizando las características en agar macconkey las cuales son colonias brillosas mucoides, y de color rosa.

Es una bacteria patógena oportunista, gram negativa. Se encuentra en el ambiente y en el tracto gastrointestinal de algunos animales, especialmente en aquellos que sirven de alimento para el hombre (Gundogan, 2014). Algunos estudios han aislado cepas del genero *Klebsiella* del agua de mar, sedimentos y contenido intestinal de camarones y peces de agua dulce. La bacteria tiene la capacidad de formar cápsulas y biopelículas para sobrevivir a la desinfección del agua (Nawaz et al., 2012). Por lo tanto en la acuicultura ha generado una serie de daños en la producción del camarón.

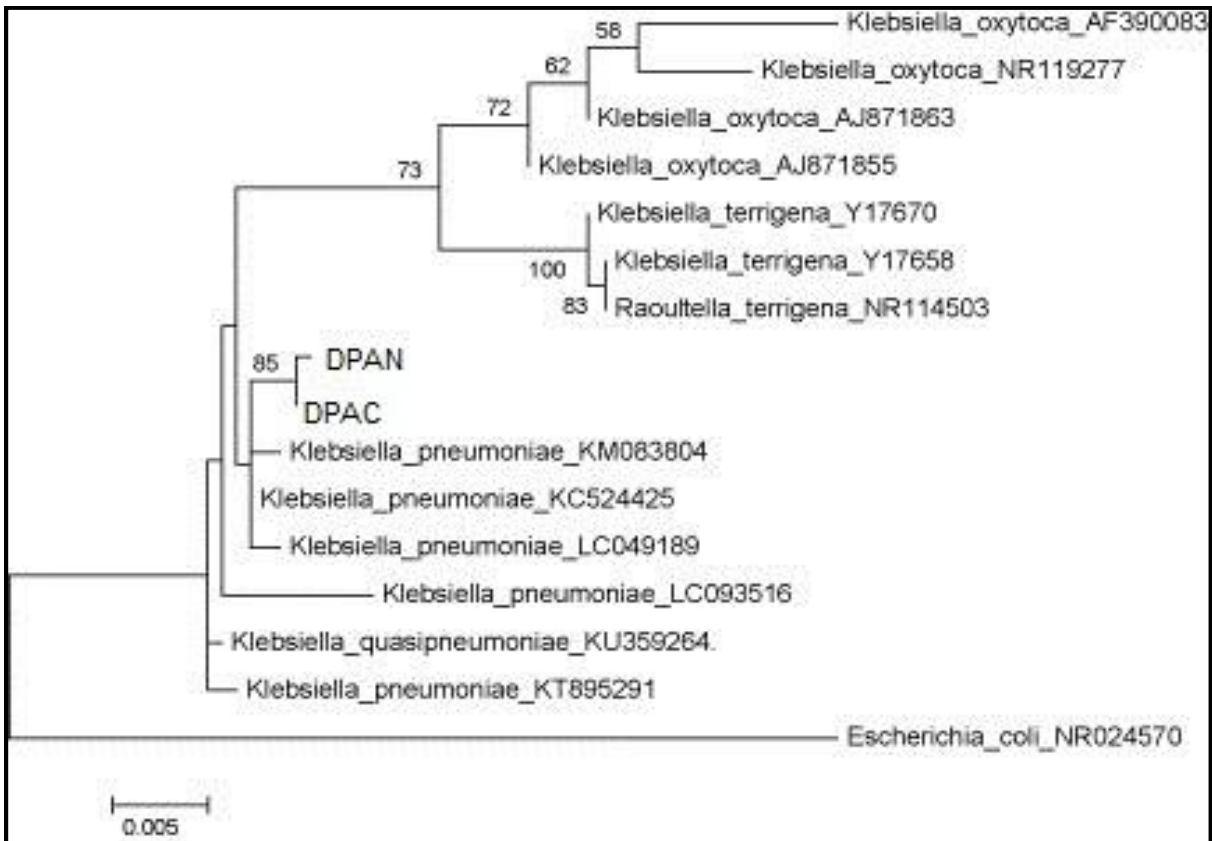


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud analizado desde la región 16S. *Klebsiella pneumoniae*

Fuente. Autora

Las cuatro cepas identificadas en este estudio, fueron aisladas de dos de los cuatro puntos de muestreo de las piscinas camaroneras. El género *Exiguobacterium* se aisló del agua que ingresa a la piscina y de adentro de la piscina, *Vibrio* se obtuvo del agua que ingresa a la piscina, los géneros *Bacillus* y *Klebsiella* se aislaron del agua que se encuentra dentro de la piscina. De las cuatro bacterias aisladas, *Klebsiella* y *Vibrio* son de riesgo para la salud del camarón y para el consumidor.

Exiguobacterium y *Bacillus* son bacterias beneficiosas para el camarón ya que dificultan el ataque de bacterias patógenas. La ubicación de donde se obtuvo. *Klebsiella* es importante ya que se aisló dentro del agua y esto puede generar serios problemas económicos para el cultivo del camarón debido que es una bacteria patógena, que de ser ingerida afecta la salud del ser humano.

Hay que tener especial atención a la bacteria *Vibrio* ya que al momento de que el agua ingresa a la piscina va arrastrando la bacteria hacia el interior contaminándola, provocando vibriosis en el cultivo del camarón, desencadenándose así un problema en la economía de los acuicultores.

3.3. Tratamientos de inactivación.

De las cuatro cepas purificadas de la piscina camaronera, se escogió para el proceso de inactivación a la bacteria patógena *Klebsiella pneumoniae* utilizando tres procesos de oxidación avanzada: UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/Fe.

3.3.1. Inactivación por UV.

En la Figura 11 se muestran los resultados de inactivación de *K. pneumoniae* después de la aplicación del tratamiento UV. En la gráfica se representa la concentración de bacterias en logaritmo de base 10 (UFC/ml), en relación con los tiempos de exposición en el reactor. Cada color (azul, rojo y verde) representa cada una de las 3 réplicas que se llevaron a cabo. Se puede observar que la concentración inicial de bacteria en las distintas réplicas está entre 5,60 y 6,88 unidades logarítmicas (10^{5,60} y 10^{6,88} UFC/ml respectivamente). También se observa que la concentración de bacterias disminuye al aumentar el tiempo de exposición a la luz UV hasta llegar a una inactivación completa (ausencia de bacterias) en un tiempo de 46 segundos en dos de las tres replicas. El coeficiente de determinación (R²) para este tratamiento es de 0,94. Se determinó que en un tiempo de 26 segundos la concentración de carga bacteriana se reduce aproximadamente en un 50%.

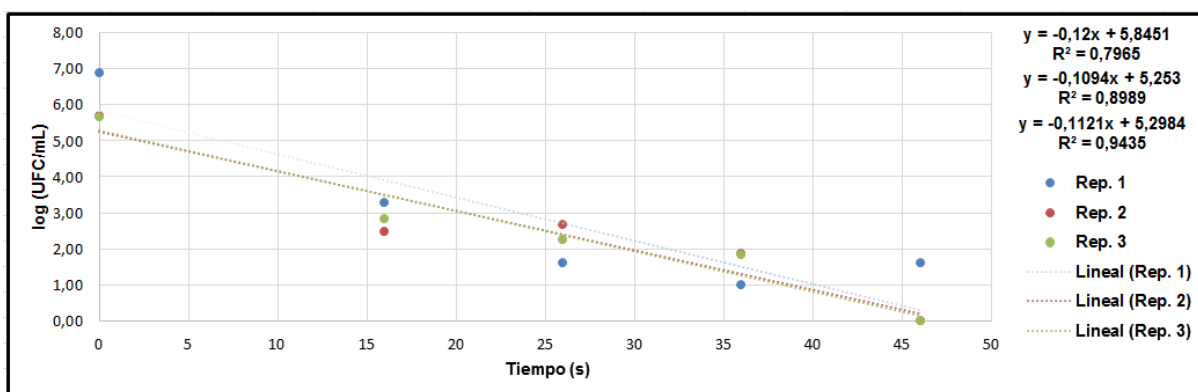


Figura 11. Inactivación de *K. pneumoniae* con tratamiento UV
Fuente. Autora

3.3.2. Inactivación por UV/H₂O₂.

Se evaluó la eficiencia gráficamente de la inactivación de *K. pneumoniae* mediante el tratamiento UV/H₂O₂, utilizando concentraciones de H₂O₂ de 10 y 30 ppm. En la Figura 12 Se puede observar que la concentración inicial promedio de bacteria en las distintas réplicas es de 6,54 unidades logarítmicas (10^{6,54} UFC/ml). También se observa que la concentración de bacterias disminuye a una concentración de H₂O₂ de 10 ppm hasta llegar a una inactivación completa (ausencia de bacterias) en un tiempo de 16 segundos en una de las dos replicas.

El coeficiente de determinación (R^2) para este tratamiento es de 0,86. Se determinó que en un tiempo de 16 segundos la concentración de carga bacteriana se reduce aproximadamente en un 50%.

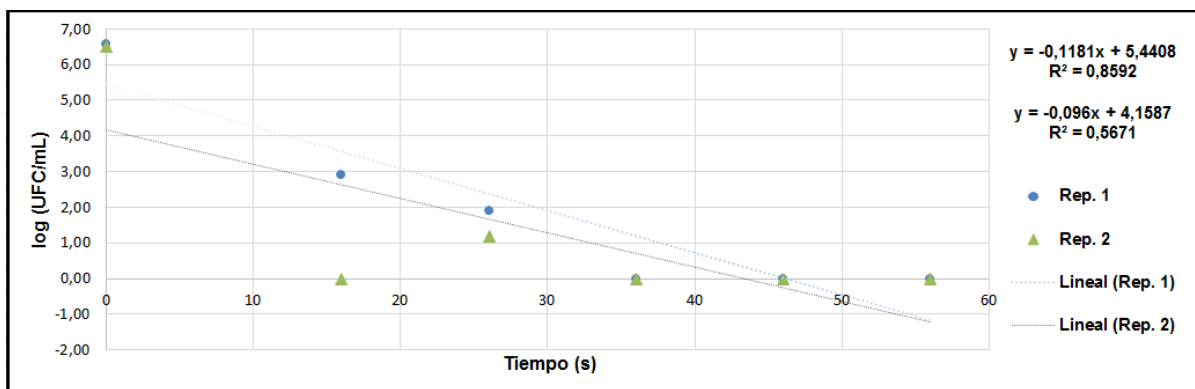


Figura 12. Inactivación de *K. pneumoniae* con tratamiento UV/ H₂O₂ a concentración de 10 ppm
Fuente. Autora

En la Figura 13 Se puede observar que la concentración inicial promedio de bacterias en las distintas réplicas es de 6,66 unidades logarítmicas (10^{6,66} UFC/ml). También se observa que la concentración de bacterias disminuye 5 unidades logarítmicas en dos de las tres replicas a una concentración de H₂O₂ de 30 ppm. Hubo una inactivación en comparación a la concentración inicial pero no fue la suficiente como para alcanzar la ausencia de bacterias. El coeficiente de determinación (R^2) para este tratamiento es de 0,87. Se determinó que en un tiempo de 16 segundos la concentración de carga bacteriana se reduce 3 unidades logarítmicas.

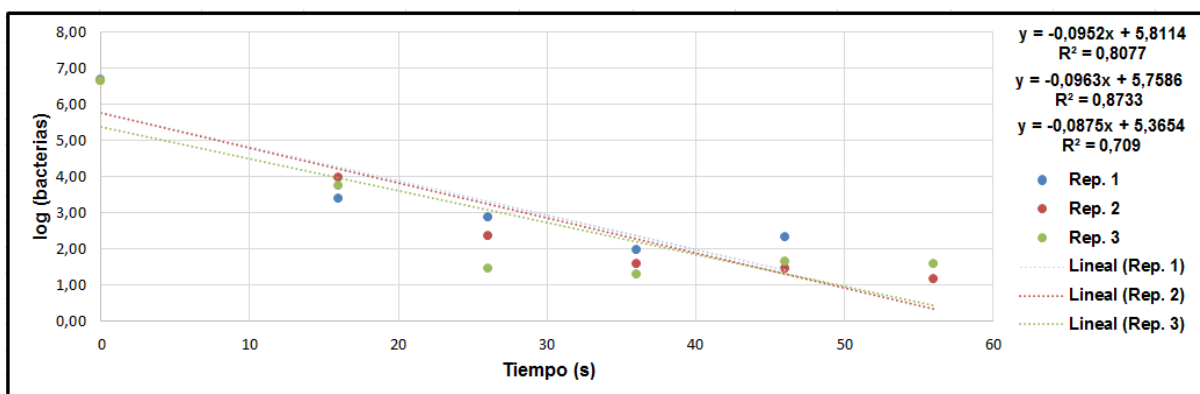


Figura 13. Inactivación de *K.pneumoniae* con tratamiento UV/ H₂O₂ a concentración de 30 ppm
Fuente. Autora

La adición de H₂O₂ mejora la eficacia de desinfección de algunas bacterias debido a que forma radicales OH^{*} que atacan directamente a la pared celular aumentando la permeabilidad y sensibilidad bacteriana.

Sin embargo, un estudio realizado por Moreno et al. (2015) indica que existe un óptimo de concentración de H₂O₂, de forma que la adición de más peróxido no mejora el rendimiento del tratamiento. Esto se debería a que el peróxido puede actuar no solo como un promotor del radical OH[•], sino, a partir de un óptimo de concentración también como un eliminador, porque pasa a formar [•]HO₂ y O₂, que tienen menos poder oxidante. El estudio de Moreno et al. (2015) sugiere unos óptimos de desinfección en concentraciones de H₂O₂ de 5 y 10 mg/L.

Comparando este estudio de inactivación de la bacteria *K. pneumoniae* con el de Moreno et al. (2015) Para la inactivación de la bacteria *E. faecalis*, se obtienen resultados similares, ya que la dosis efectiva de H₂O₂ para la inactivación de la bacteria es de 10 ppm, al igual que la obtención de rangos nulos con la aplicación de mayores cantidades de H₂O₂ se observa en la Figura 13 con el tratamiento de 30 ppm.

3.3.3. Inactivación por Foto-Fenton (UV/H₂O₂/Fe).

Para el tratamiento UV/H₂O₂/Fe se usaron concentraciones de H₂O₂ de 10, 30 y 60 ppm y de hierro de 2, 6 y 12 ppm respectivamente. En la Figura 14 Se puede observar que la concentración inicial promedio de bacteria en las distintas réplicas es de 6,58 unidades logarítmicas (10^{6,58} UFC/ml). También se observa que la concentración de bacterias disminuye a una concentración de H₂O₂ de 10 ppm y de hierro de 2 ppm hasta llegar a una inactivación completa (ausencia de bacterias) en un tiempo de 16 segundos en las tres replicas. El coeficiente de determinación (R²) para este tratamiento es de 0,56.

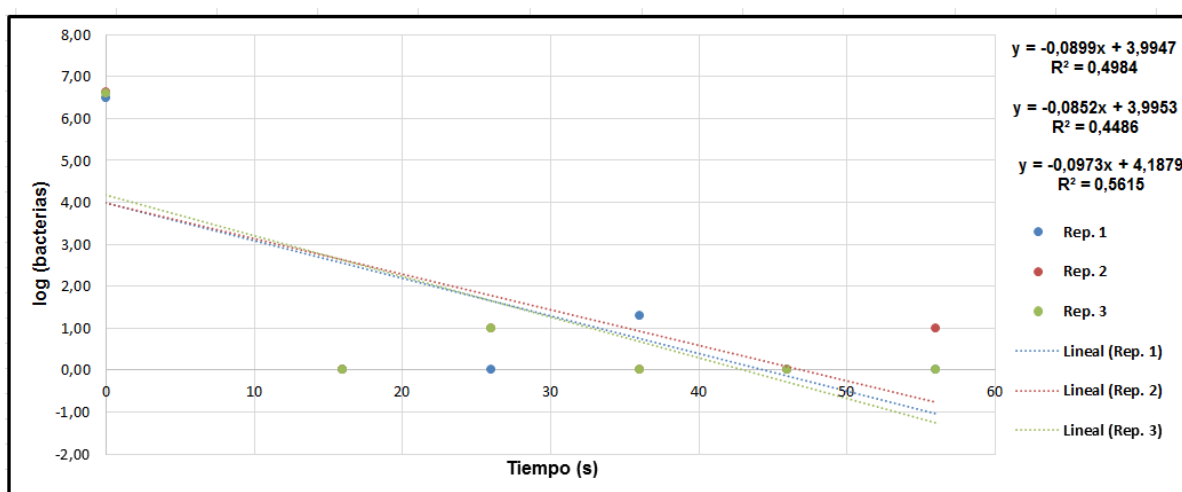


Figura 14. Inactivación de *K. pneumoniae* con tratamiento UV/H₂O₂/Fe a una concentración de 10 ppm

Fuente. Autora

En la Figura 15 Se puede observar que la concentración inicial promedio de bacteria en las distintas réplicas es de 6,62 unidades logarítmicas ($10^{6,62}$ UFC/ml). También se observa que la concentración de bacterias disminuye a una concentración de H_2O_2 de 30 ppm y de hierro de 6 ppm hasta llegar a una inactivación completa (ausencia de bacterias) en un tiempo de 56 segundos en dos de las cuatro replicas. El coeficiente de determinación (R^2) para este tratamiento es de 0,91. Se determinó que en un tiempo de 16 segundos la concentración de carga bacteriana se reduce aproximadamente en un 50%.

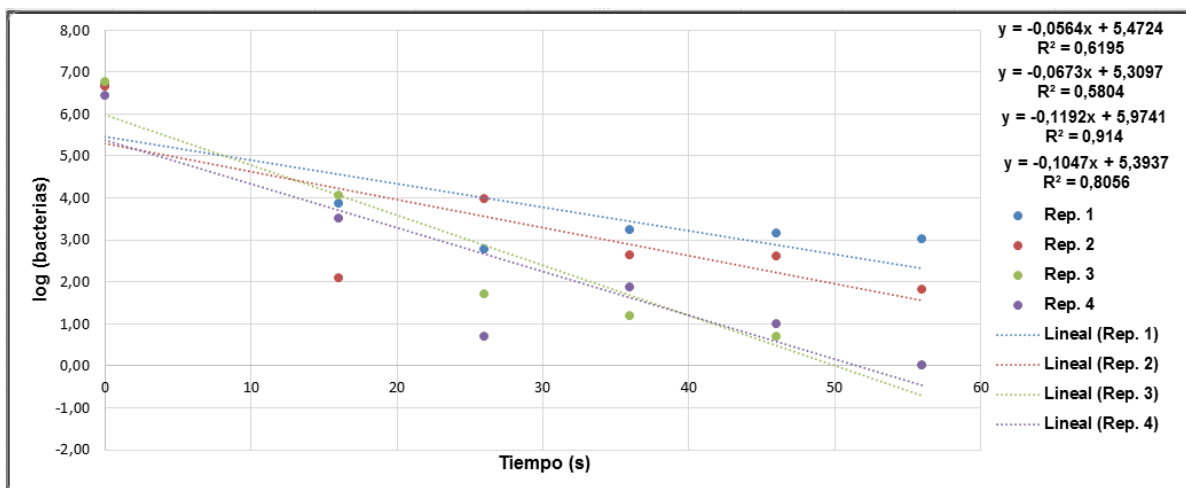


Figura 15. Inactivación de *K. pneumoniae* con tratamiento UV/ H_2O_2 /Fe a una concentración de 30 ppm Fuente. Autora

En la Figura 16 Se puede observar que la concentración inicial promedio de bacteria en las distintas réplicas es de 6,67 unidades logarítmicas ($10^{6,67}$ UFC/ml). También se observa que la concentración de bacterias disminuye a una concentración de H_2O_2 de 60 ppm y de hierro de 12 ppm hasta llegar a una inactivación completa (ausencia de bacterias) en un tiempo de 56 segundos en una de las tres replicas. El coeficiente de determinación (R^2) para este tratamiento es de 0,78. Se determinó que en un tiempo de 16 segundos la concentración de carga bacteriana se reduce aproximadamente en un 50%.

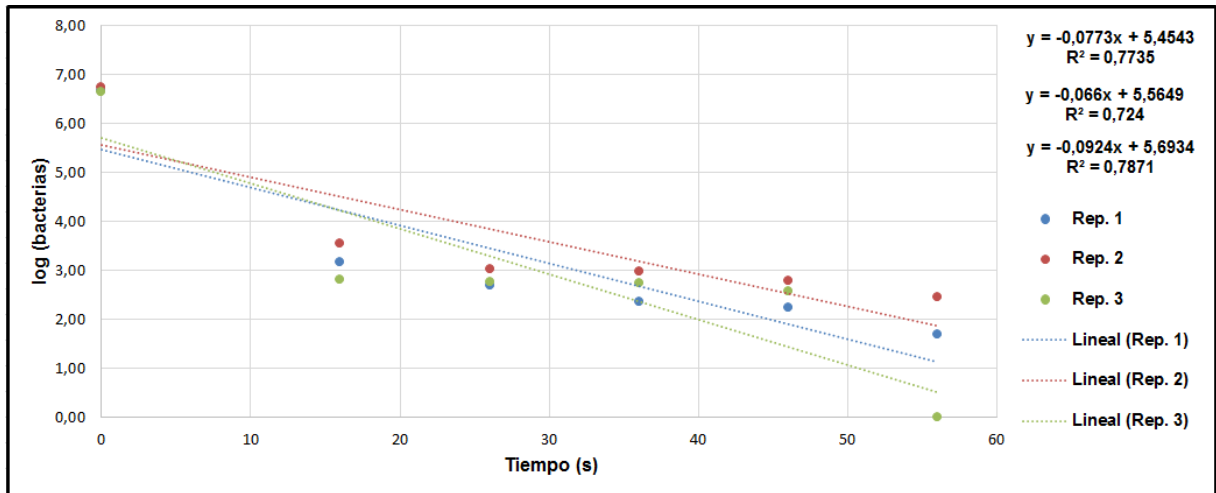


Figura 16. Inactivación de *K. pneumoniae* con tratamiento UV/H₂O₂/Fe a una concentración de 60 ppm
Fuente. Autora

En el proceso Foto-Fenton, el hierro es un catalizador que forma parte de la reacción pero no se consume ni se genera, solo forma un camino alternativo más corto para generar una reacción más rápida. El H₂O₂ es una sustancia con acción desinfectante, mientras que el hierro no es tóxico para las bacterias.

El tratamiento Foto-Fenton con el de UV/H₂O₂ en concentraciones de 10 ppm es efectivo para la inactivación de la bacteria *K. pneumoniae*. La aplicación de mayores cantidades de H₂O₂ y de Fe en los siguientes tratamientos dio como resultado una inactivación lenta ya que se reduce la cantidad de radical OH^{*} por el mecanismo explicado en el apartado anterior.

El pH es una variable importante en la reacción de Foto-Fenton. Un estudio anterior al de Rodríguez, Ormad, Mosteo, & Ovelleiro (2015) sobre la supervivencia de *E. coli* y *Enterococcus* sp. Indicaron que la acidez del medio a un pH por debajo de 5 las poblaciones bacterianas no sobreviven más de 48 h. Es por esto que los experimentos de oxidación realizado por Rodríguez et al. (2015) se llevaron a cabo a pH 5 cerca de pH neutro. Sin embargo, a este pH, la mayoría del hierro activo se pierde a partir de la solución debido a la precipitación. En nuestro estudio los tratamientos se llevaron a cabo a niveles de pH 7 para evitar la muerte de la bacteria, además de evitar realizar gastos innecesarios para acidificar las aguas residuales antes del foto-Fenton y para neutralizar el agua después del tratamiento.

En los últimos años, el aumento de enfermedades del camarón en las camaroneras ha llevado a la implementación de diversas técnicas de desinfección que mejoren la producción y las ganancias para el acuicultor, es por esto que se ha desarrollado una gran cantidad de antibióticos para retardar la incidencia de enfermedades, pero el uso indiscriminado de antibióticos en las piscinas camaroneras puede hacer que las bacterias se vuelvan

resistentes a los antibióticos (Nawaz et al., 2012). Otro tipo de desinfección son los productos químicos, como el cloro, pero el abuso de dichos productos se pueden acumular en el fondo de las piscinas e intoxicar al ser vivo (Mantzavinos & Venieri, 2015). Por eso es que en la actualidad los procesos de oxidación avanzada resultan ser una de las mejores técnicas de desinfección, debido a que no generan subproductos tóxicos y son menos costosos.

3.4. Análisis comparativo de resultados.

Los resultados de los tratamientos que se llevaron a cabo se compararon con tres pruebas no paramétricas en el programa IBM SPSS Statistics. La prueba de relaciones Wilcoxon nos ayudó a comparar la mediana de dos muestras relacionadas y así poder determinar si hay o no diferencia significativa entre ellas, la prueba de Mann-Whitney se aplicó a dos muestras independientes y la prueba de Kruskal-wallis sirvió para verificar si el grupo de datos analizado proviene de la misma población. Realizamos el análisis con estas tres pruebas no paramétricas para saber cuál de los tres tratamientos resulta ser el mejor para la inactivación de la bacteria *K. pneumoniae*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis comparativo de resultados con pruebas no paramétricas.

TRATAMIENTOS	TEST	SIGNIFICANCIA	CONCLUSIÓN
UV-UVH ₂ O ₂ 10 ppm	Related samples Wilcoxon	0,036	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ 10 ppm)
UV-UVH ₂ O ₂ 30 ppm	Mann-Whitney	0,378	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,355	
UV-UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm	Mann-Whitney	0,001	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm)
	Kruskal-wallis	0,001	
UV-UVH ₂ O ₂ Fe 30ppm	Mann-Whitney	0,174	No hay diferencia significativa
		0,163	
UV- UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm	Mann-Whitney	0,005	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm)
	Kruskal-wallis	0,006	
UVH ₂ O ₂ 10 ppm- UVH ₂ O ₂ 30 ppm	Mann-Whitney	0,006	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,006	
UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 30ppm	Mann-Whitney	0,000	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm)
	Kruskal-wallis	0,000	
UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm	Mann-Whitney	0,000	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm)
	Kruskal-wallis	0,000	
UVH ₂ O ₂ Fe 30ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm	Mann-Whitney	0,802	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,798	
UVH ₂ O ₂ 10 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm	Mann-Whitney	0,178	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,111	
UVH ₂ O ₂ 10 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 30ppm	Mann-Whitney	0,003	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ 10 ppm)
	Kruskal-wallis	0,004	
UVH ₂ O ₂ 10 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm	Mann-Whitney	0,000	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ 10 ppm)
	Kruskal-wallis	0,000	
UVH ₂ O ₂ 30 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm	Mann-Whitney	0,000	Si hay diferencia significativa (Mayor eliminación UVH ₂ O ₂ Fe 10ppm)
	Kruskal-wallis	0,000	
UVH ₂ O ₂ 30 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 30ppm	Mann-Whitney	0,802	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,781	
UVH ₂ O ₂ 30 ppm- UVH ₂ O ₂ Fe 60ppm	Mann-Whitney	0,128	No hay diferencia significativa
	Kruskal-wallis	0,126	

Fuente: Autora

Según los resultados obtenidos a través de estas tres pruebas no paramétricas se determinó que los tratamientos de UV/H₂O₂ y Foto-Fenton superan al tratamiento de UV, debido a que la inactivación se realizó en menor tiempo y concentraciones bajas de H₂O₂ y hierro.

Según los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, que nos indica que si existe diferencia significativa entre el tratamiento A y los tratamiento B y C. Entre estos dos últimos no existe diferencia significativa.

En nuestro estudio se corrobora los resultados obtenidos por Rodríguez et al., (2015) donde demuestra que los tratamientos de UV/H₂O₂ y Foto-Fenton son más eficientes que el tratamiento de UV ya que no hubo un rebrote y la tasa de inactivación de las bacterias (*E. coli* y *Enterococcus* sp.) fue mayor.

Si comparamos los resultados obtenidos con los estudios de Rubio et al., (2013) hemos logrado inactivar a *K. pneumoniae*, en periodos de 16 segundos, tiempo mucho menor al reportado por Rubio et al. (2013) en los cuales son mayores a un minuto, considerando también que se trata de bacterias diferentes.

CONCLUSIONES

- Mediante el análisis molecular de la región ARNr 16S y la descripción de árboles filogenéticos se identificaron cuatro géneros (*Exiguobacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Vibrio*) de las piscinas camaroneras, dos de ellas patógenas para el camarón y para el ser humano.
- Los cuatros géneros identificados se aislaron de las muestras de agua que se obtuvieron al ingreso y a dentro de las piscinas camaroneras y no se logró identificar ningún género bacteriano del sedimento de las piscinas camaroneras.
- Los tratamientos de UV/H₂O₂ y Foto-Fenton provocaron una mayor eficacia de desinfección frente al tratamiento de UV según el modelo estadístico empleado debido a que hubo una eliminación más rápida en un tiempo de irradiación más corto.
- En función de las gráficas pudimos observar que los tratamientos de UV/H₂O₂ y Foto-Fenton también logran una mejor eficacia en la inactivación de *Klebsiella pneumoniae*
- Se determinó que para inactivar *Klebsiella pneumoniae* una menor dosis de peróxido de hidrógeno 10 ppm es más eficiente que cuando se utilizan concentraciones altas 30 y 100 ppm ya que su exceso, actúa más como un agente de barrido.

RECOMENDACIONES

- Optimizar la concentración de peróxido de hidrogeno ya que en este estudio se determina el comportamiento respecto a la dosis pero no se llega al óptimo que requiere la bacteria *K. pneumoniae* Realizar posteriores estudios con la bacteria *Vibrio* aislada de la piscina camaronera debido a que causa diversas enfermedades al camarón.
- Generar una socialización del estudio con los acuicultores para que conozcan la importancia de desinfección con los procesos de oxidación avanzada en las piscinas camaroneras.
- Generar un estudio de costos de este proyecto para ayudar a los acuicultores a diferenciar los tratamientos comunes de los procesos de oxidación avanzada.
- Para un posterior análisis sería bueno un estudio de consumo energético y la posibilidad de alimentar el sistema con energía renovable y llevarlo a una escala industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alavandi, S., Vijayan, K., Santiago, T., Poornima, M., Jithendran, K., Ali, S. A., & Rajan, J. J. S. (2004). Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 17(2), 115–120. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.11.007>
- Bravo, E. (2003). La industria camaronera en Ecuador. *Globalización Y Agricultura. Jornadas Para La Soberanía Alimentaria*, (April), 1–11.
- Cuadra, M. (2007). Filogenia bacteriana mediante el análisis del RNAr 16S. *Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM*.
- Cuéllar, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., & García, O. (2010). *Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo del Camarón Blanco Penaeus vannamei*. Oirsa Ospesca.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Fredriksson, N. J., Hermansson, M., & Wilén, B.-M. (2013). The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e76431. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076431>
- García, C., Gortáres, P., & Drogui, P. (2011). Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental, 6(71).
- Gonzalez, L., Mazille, F., Benitez, L., & Pulgarin, C. (2011). Photo-Fenton degradation of resorcinol mediated by catalysts based on iron species supported on polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217(1), 201–206. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.10.009>
- Gundogan, N. (2014). *Klebsiella*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2, 383–388. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00172-5>
- Hanage, W., Fraser, C., & Spratt, B. (2006). Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), 1917–27. <http://doi.org/10.1098/rstb.2006.1917>
- Hemalatha, S., & Banu, N. (2010). DNA fingerprinting of *Bacillus cereus* from diverse

- sources by restriction fragment length polymorphism analysis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(02), 136–144. <http://doi.org/10.4236/abb.2010.12019>
- Hincapié, G., Ocampo, D., Restrepo, G., & Marín, J. (2011). Fotocatálisis heterogénea y foto-fenton aplicadas al tratamiento de aguas de lavado de la producción de biodiesel. *Informacion Tecnologica*, 22(2), 33–42. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642011000200005>
- Huq, A., Grim, C., Colwell, R., & Nair, G. (2006). *Detection, Isolation, and Identification of Vibrio cholerae from the Environment. Current Protocols in Microbiology*. *Current Protocols in Microbiology*. <http://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06a05s26>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.*
- Lightner, D. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 110–130. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Brock, T., Rodriguez, C., & Sanchez, M. (2004). *Brock Biología de los microorganismos*. (E. Pearson, Ed.) (octava edi).
- Maldonado, M. (2012). Aislamiento e identificación de cepas bacterianas de ambientes nativos y su aplicación biorremediadora en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Mantzavinos, D., & Venieri, D. (2015). Inactivation of *Klebsiella Pneumoniae* in Sewage By Solar Photocatalysis and Investigation of Changes in Antibiotic Resistance Profile, (September), 3–5.
- Medina, M., Torrico, G., & Casado, C. (2012). Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. *Revista de Investigación*, 2(4), 1–42.
- Moreno, J., Romero, L., Acevedo, A., & Nebot, E. (2015). Determining disinfection efficiency on *E. faecalis* in saltwater by photolysis of H₂O₂: Implications for ballast water treatment. *Chemical Engineering Journal*, 283(September), 1339–1348. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.079>
- Narrea, M., & Malpartida, J. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria*

brongniartii, *Estomal*, 145–147.

- Nawaz, M., Khan, S., Tran, Q., Sung, K., Khan, A., Adamu, I., & Steele, R. (2012). Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 179–184.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.002>
- Orozco, C., Maeda, A., & Lopez, A. (2002). Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture*, 213(1-4), 15–29. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00026-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00026-1)
- Park, S. Y., & Ha, S. Do. (2015). Reduction of *Escherichia coli* and *Vibrio parahaemolyticus* Counts on Freshly Sliced Shad (*Konosirus punctatus*) by Combined Treatment of Slightly Acidic Electrolyzed Water and Ultrasound Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1762–1770.
<http://doi.org/10.1007/s11947-015-1512-1>
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética, 18(2), 265–267.
- Pey, J. (2008). Aplicación de procesos de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para el tratamiento y reutilización de efluentes textiles, 198.
<http://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2241>
- Pololo, M., Fernandez, P., & Oller, I. (2013). *Inactivación de fitopatógenos presentes*. Madrid.
- Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245.
<http://doi.org/10.1157/13059055>
- Rodríguez, J., Mosteo, R., Ormad, M., & Ovelleiro, J. (2012). Factorial experimental design applied to *Escherichia coli* disinfection by Fenton and photo-Fenton processes. *Solar Energy*, 86(11), 3260–3267. <http://doi.org/10.1016/j.solener.2012.08.015>
- Rodríguez, J., Ormad, M., Mosteo, R., & Ovelleiro, J. (2015). Kinetic modeling of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. inactivation in wastewater treatment by photo-Fenton and H₂O₂/UV-vis processes. *Chemical Engineering Science*, 138, 730–740.
<http://doi.org/10.1016/j.ces.2015.08.051>
- Rodriguez, N., & Sandoval, M. (2010). Caracterización de bacterias marinas presentes en

suelos de piscinas camaroneras en tiempo de post-cosecha y pre-siembra, luego de la preparacion de suelos mediante el metodo de aplicacion de fuentes de nitrogeno.

- Rosado, A. S., Duarte, G. F., Seldin, L., & Elsas, J. D. Van. (1997). Molecular microbial ecology: a minireview. *Rev. Microbiol*, 28(3), 135–147.
- Rubio, A., Chica, E., & Peñuela, G. (2014). Aplicación del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquímico Application of Fenton process for treating petrochemical wastewater, 223(2), 211–223.
- Rubio, D., Nebot, E., Casanueva, J., & Pulgarin, C. (2013). Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H₂O₂ and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H₂O₂/Fe²⁺,³⁺) in the Escherichia coli inactivation in artificial seawater. *Water Research*, 47(16), 6367–6379. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.006>
- Sikarwar, a. S., & Batra, H. V. (2011). Identification of Klebsiella Pneumoniae by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2(2), 130–134. <http://doi.org/10.7763/IJCEA.2011.V2.89>
- Tomalá, C. (2011). Analisis de la composición de productos probióticos comerciales empleados en la larvicultura de camarón Penaeus (Litopenaeus) vannamei, usando una metodología de analisis molecular, pcr-dgge.
- Urkiaga, A., Gómez, L., Gutiérrez, M., & de las Fuentes, L. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada al tratamiento de efluentes de diferentes sectores industriales, 18. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Zheng, J., Peng, D., Song, X., Ruan, L., Mahillon, J., & Sun, M. (2013). Differentiation of bacillus anthracis, B. Cereus, and B. Thuringiensis on the basis of the csaB gene reflects host source. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3860–3863. <http://doi.org/10.1128/AEM.00591-13>

ANEXOS

Anexo 1. Técnicas utilizadas.

Nombre de la técnica	Kit utilizado
Extracción de ADN	kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen
PCR	kit Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System
electroforesis en gel de agarosa al 1%	GelRed® (colorante de ácidos nucleicos, Biotium, Hayward, CA, USA)

Anexo 2. Secuencias de las cuatro bacterias identificadas.

- FPAN- *Exiguobacterium*

TGCAGTCGAGCGCAGGAATCGACGGAACCCTTCGGGGGGAAGTCGACGGAATGAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGAACCCTGCCCTCAGGTCTGGGATAACCACGAGAA
 ATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCATCGGACCGCATGGTCCGAGGATGAAAGGCGCTT
 CGGCGTCGCCTGGGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCA
 CCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
 CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTA
 AGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
 GCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
 CGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC
 CCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGC
 TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTA
 CCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC

- FPAC- *Vibrio*

TGCAGTCGAGCGGCAGCGACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCGAGC
 GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAA
 ACGATGGCTAATACCGCATGATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTC
 GCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGGCTACCAAGGC
 GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCC
 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
 GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGA
 AGGAGGTATCGTTAATAGCGGTATCTTTTACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAA
 CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTTCGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGG
 CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAAGTGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTC
 GGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTG
 GACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTT

CGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCA
AATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTT
CGGGA ACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGT

- PAAS- *Bacillus*

GCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
CGGATAACATTTTGA ACTGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTAT
GGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AA ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
GTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAGGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGC
AGAGTGACAGGTGGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTTGGGTTAA
GTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTA

- PAMR- *Klebsiella*

TGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTG
AGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA
CCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT
GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGT
TAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTC
GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTG TAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCG
TTAAATCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGACATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
TGGTCTTGACATCCACAGA ACTTACCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAAA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTT