



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas



**Evaluación de la retención de bacterias Gram negativas
entéricas lactosa positivo en columnas de suelo franco limoso,
tras aplicación de purín de cerdo tratado anaeróbicamente y sin
tratamiento**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
de Concepción, para optar al título de Bioingeniero**

Constanza Arlette Chartier Espinoza

Tutora: Dra. Gladys Vidal Sáez

Concepción, 2011

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes generales	3
1.2 Industria porcina y purín	4
1.2.1 Caracterización del purín de cerdo	5
1.3 Purín de cerdo y su uso como biofertilizante	6
1.3.1 Riego de predios con purín de cerdo y sustentabilidad	6
1.3.2 Normativa ambiental aplicable a la disposición de purines	7
1.3.3 Comportamiento del nitrógeno en un suelo agrícola	8
1.3.4 Implicancias ambientales asociadas al riego de purín porcino	11
1.3.4.1 Impacto en el suelo	11
1.3.4.2 Impacto en el agua	12
1.3.4.3 Impacto en la atmósfera	13
1.4 Tratamiento del purín porcino	13
1.4.1 Eliminación de microorganismos patógenos	14
1.5 Patógenos e indicadores de contaminación fecal	15
1.5.1 Patógenos en el purín porcino	15
1.5.2 Enterobacterias e indicadores de contaminación fecal	16
1.6 Suelo y actividad microbiana	17
1.6.1 El suelo	17
1.6.2 Materia orgánica en el suelo	19
1.6.3 Compactación del suelo	19
1.6.4 Interacción entre microorganismos y el suelo	20

1.6.5 Estudio de componentes del purín mediante columnas de suelo como modelo experimental	21
2 HIPOTESIS	23
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Variables y diseño experimental	24
4.1.1 Tipo de purín	24
4.1.2 Suelo	24
4.1.3 Columnas de suelo	27
4.1.3.1 Confección y montaje	27
4.1.3.2 Puesta en marcha del sistema	29
4.1.3.3 Operación del sistema	30
4.2 Métodos analíticos	31
4.2.1 Caracterización físico-química del purín y suelo	31
4.2.2 Determinación de coliformes fecales y bacterias entéricas Gram (-) lactosa (+) en purín y suelo	34
4.2.2.1 Determinación del número más probable (NMP) por tubos múltiples en purín	34
4.2.2.2 Recuento viable en placa	35
4.3 Balance de nitrógeno y de materia orgánica	35
4.4 Determinación de la concentración de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Caracterización del purín	38
5.2 Caracterización del suelo	39
5.3 Comportamiento del sistema	40
5.3.1 Compactación	40
5.3.2 Saturación hídrica	41

5.3.3 Curva de humedad	44
5.4 Balance de nitrógeno en las columnas de suelo	46
5.4.1 Retención de N-amonio	48
5.4.2 Lixiviación de N-nitrato	49
5.5 Balance de materia orgánica en las columnas de suelo	50
5.6 Determinación de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo	51
5.6.1 Recuento de de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los sistemas	52
5.6.2 Bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en lixiviados	56
5.7 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+)	59
5.7.1 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo	59
5.7.2 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por superficie de suelo	59
6 DISCUSIÓN	62
7 CONCLUSIONES	70
8 AGRADECIMIENTOS	71
9 BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Comportamiento del nitrógeno en el suelo	10
Figura 2	Superficie de suelo regada con purín	25
Figura 3	Fracciones obtenidas mediante tamizado	27
Figura 4	Columna de suelo	28
Figura 5	Equipos utilizados para la medición de parámetros físico-químicos	33
Figura 6	Montaje de las columnas de suelo en el laboratorio piloto	37
Figura 7	Análisis granulométrico del suelo determinado con Gradistat 4.0	40
Figura 8	Curva de compactación de suelo en columna de porosidad igual a 30%	41
Figura 9	Compactación final en columnas de suelo tras saturación hídrica	42
Figura 10	Lixiviados de las columnas de suelo	43
Figura 11	Curvas de humedad en columnas de suelo alimentadas con agua destilada	45
Figura 12	Curvas de humedad en columnas de suelo alimentadas con purín	46
Figura 13	Alimentación y retención de $N-NH_4^+$ en las columnas de suelo	49
Figura 14	Lixiviación de $N-NO_3^-$ en las columnas de suelo	50
Figura 15	Placas con crecimiento de coliformes fecales	52
Figura 16	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año	53
Figura 17	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año	54
Figura 18	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con purín crudo de 350 kg N/ha/año	55
Figura 19	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año	56
Figura 20	Bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el lixiviado en los días 1 y 15	57
Figura 21	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) alimentada y recuento total en los lixiviados	58
Figura 22	Relación entre la DQO_T aplicada y retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por hectárea de suelo	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tamaño de los diferentes tipos de partículas que componen el suelo	18
Tabla 2	Tamices utilizados para fraccionar el suelo	26
Tabla 3	Características de una columna de suelo	29
Tabla 4	Caracterización físico-química del purín crudo y tratado anaeróbicamente	38
Tabla 5	Caracterización del suelo inmovilizado en las columnas	39
Tabla 6	Caracterización granulométrica del suelo inmovilizado en las columnas	39
Tabla 7	Pruebas de compactación de suelo inmovilizado	41
Tabla 8	Saturación hídrica de las columnas	42
Tabla 9	Lixiviación en columnas alimentadas con purín	43
Tabla 10	Balance de nitrógeno en las columnas de suelo	48
Tabla 11	Balance de materia orgánica en las columnas de suelo	51
Tabla 12	Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el purín alimentado	51
Tabla 13	Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los sistemas	59
Tabla 14	Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por superficie de suelo	60

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

EA	Efluente Anaeróbico
DQO_T	Demanda Química de Oxígeno Total
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
INE	Instituto Nacional de Estadísticas de Chile
INIA	Instituto de Investigaciones Agropecuarias
LST	Lauril Sulfato Triptosa
NMP	Número Más Probable
PC	Purín Crudo
STD	Sólidos Totales Disueltos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
Lac (+)	Lactosa positivo
Gram (-)	Gram negativo

RESUMEN

En la industria porcina, el residuo de mayor impacto ambiental es el purín de cerdo, mezcla de excretas del animal y agua de limpieza de los plantales. Los purines se caracterizan por presentar riesgo de presencia de patógenos y una alta concentración de sólidos, nutrientes y de materia orgánica. Debido a estos últimos, el purín puede ser reutilizado como biofertilizante. La problemática ambiental nace a raíz del excedente de purín generado y aplicado sobre los suelos, hecho que produce además un impacto negativo sobre la atmósfera y cuerpos de agua superficiales como subterráneos. La posible presencia de microorganismos patógenos en el purín aplicado en el suelo, aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades a través de la cadena alimentaria. La digestión anaeróbica, es el tipo de tratamiento más utilizado dentro del sector porcino, para eliminar materia orgánica y así generar un purín de menor potencial contaminante.

Esta tesis tiene como objetivo evaluar la capacidad de un suelo agrícola inmovilizado en columnas, para retener bacterias entéricas Gram negativo lactosa positivo alimentado con purín crudo y tratado anaeróbicamente con diferentes cargas de nitrógeno total (carga nitrogenada de 350 y 700 kg N/ha/año para cada tipo de purín). Además, se determinó la presencia de estas bacterias a diferentes alturas de las columnas, durante 15 días de ensayo. Se realizó un estudio del balance de nitrógeno y de materia orgánica en este sistema.

Como resultado se encontró que el mayor porcentaje de retención de bacterias entéricas Gram negativo lactosa positivo (99,9%) se presentó en el sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año, mientras que la menor retención (86,2%) se presentó en el sistema alimentado con efluente tratado de 350 kg N/ha/año. Se observó una relación directa entre la retención bacteriana y el contenido en materia orgánica presente en los tipos de purín. Por otra parte, casi la totalidad del nitrógeno total lixiviado correspondió a nitratos provenientes del suelo. En éste, se retuvo el 99% del amonio alimentado en todos los sistemas.

ABSTRACT

The most important waste in the pig industry is pig slurry, a mixture of excreta and washing water of confinement facilities. It is characterized for showing pathogen presence risk, solids, nutrients and organic matter. Pig slurry can be reused as an organic fertilizer because of its nutrient and organic content. The problem is related to the excess of slurry which is land spread onto soils. This produces a negative impact on air, soil and groundwater bodies. The possible presence of pathogens in pig slurry, increases human food chain contamination risk and sanitary problems. Nowadays, anaerobic digestion is the most utilized technology among the pig industry for organic matter removal, which produces slurry with lower pollution potential.

The main objective of this study was to evaluate Gram negative lactose positive enteric bacteria retention in an agricultural soil packed in columns, fed with raw and anaerobically treated pig slurry (total nitrogen load rate of 350 and 700 kg N/ha/year for each type of slurry). Besides, bacteria presence was determined in three different depths of the columns, in a time of 15 days. A nitrogen and organic matter balance was studied.

The highest Gram negative lactose positive enteric bacteria retention (99.9%) was found in the system fed with raw pig slurry of 700 kg N/ha/year, while the lowest retention (86.2%) was found in the system fed with anaerobically treated slurry of 350 kg N/ha/year. A direct relation between bacteria retention in soil and organic matter content present in the different types of slurry was observed. On the other hand, more than 99% of ammonium-N fed in slurry was retained in all columns. Nitrate-N from soil was the main component of total nitrogen concentration present in leachates from columns.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

Debido al crecimiento de la industria porcina, el volumen de residuos generados crece y por consiguiente, mejores prácticas y tecnologías de tratamiento han tenido que ser gestionadas. El principal residuo de la industria de producción de carne de cerdo es el purín, constituido por excretas y agua del lavado de los planteles. Sin embargo, más que un residuo, el purín es un subproducto de la industria, ya que puede ser reutilizado como biofertilizante y debido a que su gestión genera productos de valor comercial e industrial, tales como compost y biogás (Peralta y col., 2005). El uso del purín como fertilizante es una manera apropiada y natural para llevar a cabo su reutilización, lo que lleva a cerrar el ciclo de materia y energía, devolviendo al suelo la materia orgánica y nutrientes extraídos para la alimentación de los cerdos. Asimismo, el purín como biofertilizante permite el ahorro de fertilizantes químicos que son una fuente de contaminación importante y que además representan una gran inversión económica para la agricultura (Plaza, 2004; Sánchez y González, 2005).

El purín de cerdo ha sido empleado tradicionalmente como abono agrícola debido a su alto contenido en materia orgánica. Sin embargo, dada la alta concentración de planteles porcinos intensivos existentes hoy en día, son causa de un grave problema ambiental al provocar el deterioro en la calidad de las aguas y de los suelos. En su composición se encuentran altas concentraciones de los llamados macrocontaminantes, que son los nutrientes (nitrógeno y fósforo) y materia orgánica, los que pueden dañar al medio ambiente si su aplicación no es controlada y planificada (Sánchez y González, 2005; Feder y Findeling, 2007). Por otro lado, se encuentran los microcontaminantes, donde se agrupan antibióticos, metales pesados y microorganismos patógenos (bacterias, parásitos y virus). Estos también pueden potencialmente contribuir a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas al transportarse a través del suelo (Joy y col., 1998; Unc y Goss, 2003; Guber y col., 2005; Hutchison y col., 2005; Rufete y col., 2006). Es por ello, que previo a la disposición de purín en el suelo, se le debe aplicar algún sistema de tratamiento de manera de eliminar la carga de los componentes mencionados.

El comportamiento de microorganismos patógenos en el suelo ha sido estudiado de dos maneras principalmente: en condiciones de terreno, donde las variables son naturales y en condiciones de laboratorio, utilizando columnas de suelo, donde las variables climáticas pueden ser controladas. Mediante la utilización de columnas de suelo, se ha estudiado principalmente el

transporte de patógenos (Guber y col., 2005; Mosaddegui y col., 2009). Las columnas con suelo inmovilizado, son un modelo experimental útil para el estudio de la contaminación de napas subterráneas por componentes del purín, como el nitrógeno, antibióticos y diversos microorganismos.

El impacto de los microcontaminantes, como los patógenos, ha sido enmascarado por el impacto de los macrocontaminantes, por lo que existe poco conocimiento de su real potencial contaminante, a nivel mundial y a nivel nacional. De ahí la importancia de evaluar el impacto del purín y de los compuestos específicos debido a que se les responsabiliza de la contaminación tanto de aguas superficiales como de las napas subterráneas. Sumado a lo anterior, se encuentra la gran proyección de crecimiento que presenta el sector porcino, lo que se traduce en mayores volúmenes de descargas hacia el medio ambiente. Por lo anteriormente mencionado, se planteó el evaluar la retención de componentes como nitrato, amonio, materia orgánica y bacterias Gram negativas entéricas, provenientes de purín de cerdo, con y sin tratamiento, a través de un suelo agrícola inmovilizado en columnas.

1.2 Industria porcina y purín

En el marco mundial de la oferta de carne, el 40% corresponde a la carne de cerdo. Esto en parte debido al crecimiento de la producción de China, la que genera alrededor de la mitad de la producción mundial (FAO, 2009). China produce el 49% de la carne de cerdo en el mundo, seguida por Estados Unidos con un 9%, Alemania (4,3%) y Brasil (3%) (INE, 2009).

En Chile, segundo productor a nivel sudamericano, la producción porcina ha tenido un crecimiento del 6% anual durante los últimos 5 años, siendo actualmente el segundo tipo de carne de mayor producción con un 38%. La producción tuvo un crecimiento del 9% para el año 2009 y se espera un crecimiento del 14% para el año 2011. Este crecimiento aumenta principalmente debido al aumento en la exportación y aumento del consumo interno. La exportación se dirige a mercados de alta exigencia, principalmente Japón y Corea del Sur, y otros 40 países en todos los continentes. La exportación representa el 40% de la producción total con un 14% de crecimiento anual. El 60% restante corresponde al consumo en el país, siendo la segunda carne de mayor consumo con un 28%, tras la carne de ave (ASPROCER, 2009). La producción porcina chilena se concentra en la zona central del país, entre la Región Metropolitana y la Región de la Araucanía con un 80%. La Región del Biobío produce el 13,3% del total producido en Chile,

concentrado en la provincia de Ñuble. En la región existen 16 planteles, de los cuales 9 son de confinación extensiva y 7 de confinación intensiva (INE, 2009).

La confinación extensiva o producción de pastoreo, consiste en mantener a los cerdos dentro de un área al aire libre. No involucra un posterior proceso de las excretas, es ambientalmente viable y recomendable. Por otro lado, la confinación intensiva consiste en concentrar en un espacio reducido un gran número de animales, generalmente en planteles cerrados, desde los cuales se genera una descarga de purín, la cual demanda un manejo posterior (Peralta, 2005). La creciente demanda de productos cárnicos y los cambios tecnológicos han ocasionado amplias transformaciones en los sistemas de producción que han afectado de forma radical su estructura. En respuesta a la creciente demanda, la tendencia es la transformación hacia la producción industrializada, lo que tiene repercusiones en la capacidad de incremento de la producción sostenible, de manera que se garantice la seguridad alimentaria, la salud de los animales, la salud pública e impactos al medio ambiente (FAO, 2009).

1.2.1 Caracterización del purín de cerdo

El incremento del número de criaderos de cerdo de tipo intensivo, conlleva al aumento de los residuos generados por esta industria. El principal residuo es el purín de cerdo, constituido por las excretas del animal y agua de lavado de pisos de los planteles. Esta mezcla presenta un 45-55% del volumen total, de orina y heces respectivamente. Un cerdo produce un volumen diario de purín de 30-90 litros, tomando en cuenta que excreta 2 litros de heces y 3 litros de orina, y se necesitan 6 a 18 litros de agua de lavado por litro excretado aproximadamente. La humedad es cercana al 90%, el contenido de materia seca es el 10% restante y el pH varía entre 6 y 8, tendiendo a la neutralidad en la medida que el excremento sea más fresco (Peralta, 2005; Choi, 2007).

El purín trae consigo microcontaminantes, que abarcan el contenido en metales pesados (como cobre y zinc) provenientes de la administración de factores de crecimiento, antibióticos de tipo bactericidas y bacteriostáticos que son excretados, desinfectantes (formaldehído, cloro y amonio cuaternario) y detergentes del lavado de planteles y también un contenido en indicadores de contaminación microbiológica fecal (como coliformes fecales o *Escherichia coli*) que indican el riesgo de presencia de microorganismos patógenos. Los microorganismos patógenos, se presentan en el purín ya que tienen como principal fuente, el tracto gastrointestinal de animales de ganado como los cerdos. Desde el purín porcino, se han identificado bacterias patógenas para

el humano como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* y protozoos como *Cryptosporidium parvum* (Hutchison y col., 2005). La concentración de bacterias patógenas es variada y esporádica, que al presentarse se mantiene entre 1×10^3 y 1×10^8 ufc/g de purín. De acuerdo a Mosaddeghi y col., (2009), de la concentración de 1×10^{10} bacterias encontradas en un gramo de excremento seco con contenido patogénico, 1×10^5 bacterias corresponderían a bacterias patógenas.

Por otro lado, el purín presenta macrocontaminantes, donde se comprenden el alto contenido en materia orgánica y nutrientes como nitrógeno y fósforo. Se generan alrededor de 0,25 y 0,75 kg/día de DBO₅ y de DQO_T por cada 100 kg de peso respectivamente. Respecto a los nutrientes, se generan 4,5 y 1,5 g/kg de materia fresca de nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺) y fósforo, respectivamente (Peralta, 2005; Bonmatí y Magrí, 2007).

En Chile se genera una cantidad superior a los 23.000 m³ diarios de purín de cerdo como promedio, lo que se traduce en un problema relacionado a la gestión de estos residuos (Peralta, 2005). La materia orgánica y nutrientes, hacen que el purín pueda ser reutilizado para enmendar suelos, como alimento para rumiantes, materia prima para generar energía como biogás, como insumo en la elaboración de compost, sustrato en lombricultura y como fertilizante orgánico.

1.3 Purín de cerdo y su uso como biofertilizante

1.3.1 Riego de predios con purín de cerdo y sustentabilidad

Dada la composición del purín de cerdo, rica en materia orgánica y nutrientes, estos son hoy clasificados como un material totalmente aprovechable, convirtiéndolo así en un subproducto para la industria (Joy y col., 1998; Fischer y Whalen, 2005). El riego de purín en predios de cultivo, devuelve al suelo los nutrientes esenciales, materia orgánica y parte del agua de riego que necesitan las plantas para crecer. Estos cultivos pueden representar el alimento suministrado a los cerdos, cerrando de esta manera el ciclo de producción. El valor agronómico de las deyecciones porcinas puede ser considerado alto principalmente por mejorar las cosechas, ya que la aplicación de purín aumenta la fertilidad y la capacidad del suelo para retener agua, otorga elasticidad al suelo disminuyendo la compactación y previene la erosión de éste (Hamza y Anderson, 2005; ASPROCER, 2008).

En Chile, más del 95% del riego en la agricultura se realiza mediante riego superficial, incluyendo la técnica de inundación o técnica por surcos, cuya eficiencia varía entre un 10 y

30%. En los últimos años, Chile ha hecho uso del riego superficial para la disposición del purín (INIA, 2005; Peralta, 2005). El purín se dispone mayoritariamente mediante riego superficial en forma de fertirriego por inundación, mientras el menor porcentaje del purín es aplicado mediante inyección en la tierra. La fertirrigación, corresponde a la aplicación de fertilizantes químicos u orgánicos disueltos en agua de riego. La inyección es un método de mayor sofisticación e incipiente a nivel nacional, capaz de reducir las emisiones gaseosas provocadas por la mineralización del purín en el suelo. La fertirrigación es un método barato en comparación a la inyección de purín, sin embargo, la eficiencia del agua infiltrada es bastante menor, la evaporación y escurrimiento de agua es alta, provocando compactación del suelo y aumentando la salinidad del mismo.

1.3.2 Normativa ambiental aplicable a la disposición de purines

En Chile, la legislación ambiental se presenta aún muy dispersa, con distintos tipos de regulaciones (leyes, decretos supremos, resoluciones ministeriales, resoluciones de distintos servicios). Lo siguiente, es la normativa que puede aplicarse a la disposición de purines en el suelo.

- Ley 19.300 "Bases Generales del Medio Ambiente". Esta ley tiene como fin entregar protección al medio ambiente y a las comunidades afectadas por los procesos productivos.

- Decreto Ley N° 3.557. Del Ministerio de Agricultura, establece disposiciones sobre protección del suelo, agua y aire (protección agrícola). Se refiere únicamente a la aplicación de fertilizantes de tipo inorgánicos.

- Decreto Supremo N° 867. Del Ministerio de Obras Públicas, añadido a la NCh 1.333, establece requisitos de calidad de agua para diferentes usos. Esta norma aplica para el consumo humano, de animales, de recreación, y es directamente aplicable al riego de predios. Define requisitos químicos y bacteriológicos como la concentración de coliformes fecales que debe ser menor o igual a 1000 NMP/100mL en aguas de riego destinadas al cultivo de frutas y verduras que se desarrollen a ras de suelo y que habitualmente se consumen en estado crudo. No se regula el nitrógeno (Fávero y Katz, 1998).

A diferencia de Chile, la normativa europea regula la gestión de residuos como el purín y estiércol basado en la Directiva 91/156/CCE. Cuando los residuos ganaderos tengan un uso agrícola, dejan de considerarse como residuos y su regulación se basa bajo la Directiva 91/676/CEE. En otras palabras, la normativa europea considera el valor agrícola y reciclaje de un

producto como las deyecciones ganaderas, las que se regulan parecido a otros tipos de fertilizantes (Ternicier, 2005).

Bajo esta perspectiva, se han establecido tasas fijas para el riego del purín. Estas dosis de aplicación recomendadas, se basan en el aporte de nitrógeno total en una hectárea de suelo por año, de acuerdo a un balance de nitrógeno global y de carácter general que tiene como fin evitar pérdidas de nitrógeno y contaminación subterránea. El nitrógeno es el nutriente limitante en el desarrollo de las plantas, por lo que es muy importante conocer su dinámica en el suelo y tener control del mismo (IFA, 2002).

En Europa, la normativa general establece que para un suelo vulnerable a la lixiviación de nitratos, la aplicación de purín debiera regularse de acuerdo a una tasa de 170 kg N/ha/año (INIA, 2005; Ternicier, 2005) y 170 a 210 kg N/ha/año según Asprocer (2004). En el Reino Unido, el código de Buenas Prácticas Agrícolas para la protección del agua establece que la aplicación no debiera sobrepasar la dosis de 250 kg N/ha/año (INIA, 2005). En Italia, la regulación se realiza en conjunto a las comunidades agrícolas, siendo la tasa de 340 kg N/ha/año, la carga limitante en la aplicación de purín para una de las regiones (Provolo, 2005).

Se sabe que en Chile, el fertirriego con purín se realiza en muchos predios de cultivo a razón de 1:5 o 1:4 con agua de riego, lo que se traduce en aplicaciones de 700 kg N/ha/año como valor mínimo. En Chile, no existe una legislación que regule la aplicación de residuos orgánicos a suelos agrícolas o forestales, estando en discusión un anteproyecto de ley que fija dosis máximas de aplicación de lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas (INIA, 2005, Diocaretz, 2010). Estos antecedentes explican la razón principal del porqué en muchos predios de Chile, el riego de purines se realiza sin control de estacionalidad, carga hídrica o carga nitrogenada.

1.3.3 Comportamiento del nitrógeno en un suelo agrícola

La necesidad de la aplicación de fertilizantes, radica en que con ellos el rendimiento de los cultivos puede duplicarse o triplicarse. La fertilización puede proveer a los cultivos de los nutrientes que el suelo escasea. Los nutrientes extraídos del suelo pueden clasificarse como macronutrientes y micronutrientes. El nitrógeno, fósforo y potasio son macronutrientes primarios, los que se necesitan en grandes cantidades y tienen que ser aplicados si el suelo se encuentra deficiente para alguno de ellos. Los micronutrientes, por el contrario, se requieren en cantidades ínfimas para un desarrollo adecuado (IFA, 2002).

En los agrosistemas, el nitrógeno, constituyente esencial de las proteínas, se encuentra presente en el suelo, atmósfera y en las plantas, generándose flujos de nitrógeno entre estos niveles que en su conjunto representan el ciclo de este elemento. Las salidas y entradas de nitrógeno son importantes desde un punto de vista agronómico y económico, ya que la acumulación o pérdidas extensas desde el agrosistema tienen efectos perjudiciales sobre el ambiente y la eficiencia del cultivo. A nivel mundial, la eficiencia de utilización del nitrógeno en la fertilización de cereales se aproxima al 40% (El Sitio Agrícola, 2011).

El porcentaje aplicado y no aprovechado, se pierde a través de diferentes caminos dentro del ciclo del nitrógeno (Figura 1). Las vías de pérdida más importantes son:

-Volatilización de amonio: el amonio en el suelo se transforma a amoníaco gaseoso.

-Desnitrificación: el nitrógeno de los nitratos es reducido a nitrógeno molecular u óxidos de nitrógeno, que se emiten del suelo a la atmósfera. En suelos bien drenados la desnitrificación no es una vía importante de pérdida de nitrógeno, excepto cuando se generan condiciones de alto contenido de agua en el suelo.

-Lixiviación: consiste en la pérdida de nitrógeno en la solución del suelo que se mueve por gravedad y por el arrastre debido al agua que percola. La lixiviación afecta principalmente a los nitratos, forma nitrogenada que se mueve verticalmente en el perfil de suelo. El N-NO_3^- no es adsorbido por las partículas de suelo a menos que ellas generen cargas positivas (Sánchez y González, 2005). Para controlar las pérdidas de nitrógeno, la aplicación de fertilizantes químicos o de origen orgánico, puede realizarse junto con el agua de riego, es decir, mediante fertirrigación (El Sitio Agrícola, 2011).

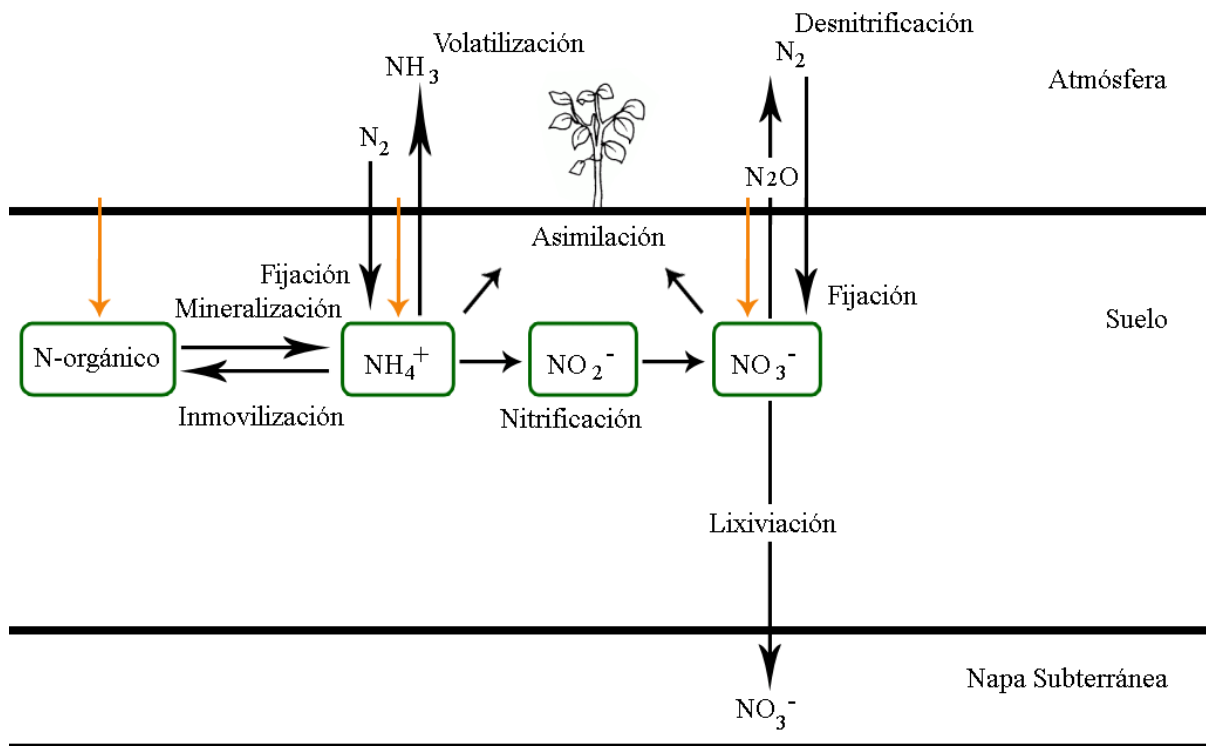


Figura 1. Comportamiento del nitrógeno en el suelo. Las flechas anaranjadas representan las entradas de nitrógeno de mayor importancia a un suelo agrícola.

El amonio ($N-NH_4^+$) se comporta de manera distinta en el suelo, ya que no lixivia con facilidad. Más bien, es retenido en el suelo debido a su carga que genera atracción por la arcilla, formando un complejo de adsorción. Los procesos que regulan la retención son:

-Fijación de $N-NH_4^+$: en el complejo coloidal del suelo (que actúa como cemento entre las partículas de suelo y otorgan estructura) no estando disponible para las plantas en el corto plazo.

-Adsorción de $N-NH_4^+$: retenido en estructuras arcillosas entrelazadas, estando disponible para el cultivo. En este caso el $N-NH_4^+$ se encuentra en forma intercambiable en complejos de adsorción, es decir, cuando la solución del suelo (nutrientes disueltos) pierde amonio debido a la absorción por las raíces, el complejo de adsorción libera los nutrientes a la solución del suelo haciéndolos disponibles.

-Inmovilización de $N-NH_4^+$: corresponde al paso del nitrógeno mineral ($N-NH_4^+$ y $N-NO_3^-$) a nitrógeno orgánico. Esta transformación es realizada por microorganismos del suelo con el fin de aumentar la población. Cuando éstos mueren, el nitrógeno orgánico permanece en el suelo y está sujeto a ser mineralizado nuevamente. Más del 90% del nitrógeno presente en la primera capa

del perfil de suelo se encuentra en forma orgánica, como N-ácidos insolubles, N-aminoácidos, N-aminoazúcares, entre otros (IFA, 2002; Silva, 2004; ASPROCER, 2005).

1.3.4 Implicancias ambientales asociadas al riego de purín porcino

El purín como fertilizante puede generar excedentes de nitrógeno, materia orgánica y microcontaminantes, si no se hace un adecuado balance y una adecuada aplicación. De las consecuencias de esto, se ha observado la infiltración de nitrógeno en forma de nitrato (Fischer y Whalen, 2005; Feder y Findeling, 2007) debido a que el alimento consumido por los cerdos, contiene un alto porcentaje de proteína, que al ser hidrolizada y mineralizada, puede ser transformada en amonio, nitrito o nitrato (Peralta, 2005). Por lo tanto el purín, como subproducto de la producción ganadera, debe ser tratado antes de ser dispuesto en suelos, ya que los impactos de una gestión inapropiada pueden manifestarse directamente sobre los productos agrícolas y fuentes de agua subterráneas y superficiales (Joy y col., 1998; Holley y Guan, 2003; Hutchison y col. 2005). Además, un manejo inadecuado del purín puede afectar la calidad del suelo, agua y aire y por consiguiente a la calidad de vida de los animales y seres humanos.

1.3.4.1 Impacto en el suelo

En los últimos años, la tendencia mundial del sector porcino ha ocasionado una reestructuración en la actividad, generando un número menor de predios, pero de mayores dimensiones, sumado a métodos intensivos y especializados de producción. Esto ha llevado a que se estén generando grandes aportes de nutrientes provenientes del estiércol, concentrados en áreas geográficas relativamente pequeñas. Es frecuente detectar altas concentraciones de nutrientes en la tierra de cultivo, las cuales son difíciles de asimilar (ASPROCER, 2008). Estos nutrientes sufren transformaciones en el suelo generándose emisiones de gases como el gas amoníaco, o transporte de nitrato hacia aguas superficiales o subterráneas. Por su lado, el nitrato y el cloruro, entre otros iones y sales, provocan la salinización del suelo.

Los grandes planteles requieren de una alimentación uniforme para producir carne de alta calidad, y para ello, generalmente se utilizan suplementos alimenticios que aportan nutrientes y minerales (Fe, Zn, Ca, y Cu). Estos metales pueden acumularse en el suelo produciendo cambios en la biota por problemas de toxicidad (Choi, 2007). Un efecto similar se ha detectado con los antibióticos suministrados a los cerdos, ya que estos, al acumularse en el suelo dan paso a la selección de bacterias, generando bacterias resistentes a antibióticos, produciendo un riesgo

potencial a la salud humana y animal, como también al ecosistema (Kay y col., 2005). El exceso de materia orgánica y sólidos puede obstruir el paso de aire por los poros del suelo, interfiriendo en los procesos aeróbicos, en la retención de agua del suelo y en su nivel de saturación. Las capacidades de cultivo pueden verse disminuidas, así como también la porosidad del suelo y la tasa de infiltración (Seoáñez, 1999).

Los microorganismos patógenos son otro problema asociado a la contaminación de suelos. Éstos pueden sobrevivir en los cultivos con la posibilidad de generar brotes de enfermedades zoonóticas, interactuar con la diversidad presente y transportarse a cuerpos de agua (Guber y col., 2005, Mosaddeghi y col., 2009).

1.3.4.2 Impacto en el agua

Los contaminantes pueden llegar a los cuerpos de agua mediante dos procesos: por escurrimiento a aguas superficiales y por lixiviación y transporte a cuerpos de agua subterráneos. El nitrato es uno de los elementos que presenta mayor importancia, debido principalmente a su alta tasa de movilidad, produciendo mayores riesgos de contaminación en aguas subterráneas. El consumo de nitrato puede causar metahemoglobinemia, o “síndrome del niño azul”. La formación de nitritos a causa de la reducción de nitratos que ocurre en el sistema digestivo, puede provocar la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobinemia, la cual es incapaz de transportar oxígeno en el torrente sanguíneo (Henry y Heinke, 1999; Ternicier, 2005).

El exceso de nutrientes como amonio, nitratos y fosfatos, produce eutrofización en el agua, que consiste en una excesiva proliferación de algas y cianobacterias. Este fenómeno afecta a la biodiversidad presente, ya que la eutrofización altera la luminosidad del cuerpo de agua, y también el oxígeno disponible, ya que es utilizado en la descomposición de estas algas (Ji, 2008). Por otro lado, el alto contenido de materia orgánica (entre 15 y 45 g/L de DQO_T), disminuye el oxígeno del medio acuoso, debido a que utiliza el oxígeno presente para mineralizarse. Así, los organismos acuáticos se ven afectados ya que disminuye el oxígeno disponible para ellos, provocando toxicidad aguda por hipoxia (Choi y col., 2004).

La contaminación de aguas por patógenos provenientes del purín se encuentra asociada principalmente a dos factores: transporte en el suelo y sobrevivencia en el medio acuoso (Gessel y col., 2004; Rufete y col., 2006). El agua contaminada puede ser usada directamente por personas y animales, o bien, puede ser usada para riego de cultivos, que luego pueden ser también consumidos por personas y animales.

1.3.4.3 Impacto en la atmósfera

La aplicación de purín en suelo genera problemas de olores, los que atraen organismos capaces de transmitir enfermedades como roedores y moscas, transformándose en vectores. La liberación de gases al ambiente consiste principalmente en emisiones de gases de efecto invernadero, GEI (Ternicier, 2005). El gas metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) y los hidrocarburos halogenados, son ejemplos de gases de efecto invernadero emitidos por la generación y mineralización del purín. Las emisiones de GEI pueden proceder de todas las etapas de producción. Por ejemplo, la producción de forraje está vinculada a la producción y a la aplicación de fertilizantes químicos. También, durante el almacenamiento de las excretas, éstas liberan N_2O y en condiciones anaeróbicas, se genera CH_4 principalmente (FAO, 2009). Hoy en día, se reconoce cada vez más que el sector ganadero es a la vez contribuidor y víctima potencial del proceso de calentamiento global.

Para disminuir el impacto ambiental, es necesario realizar un diseño con criterios agronómicos y ambientales en el sistema de aplicación directa al suelo. Un tratamiento adecuado o la combinación simultánea de varios, puede disminuir considerablemente la carga de los componentes de los purines, como el nitrógeno, materia orgánica y patógenos (Peralta, 2005).

1.4 Tratamiento del purín porcino

El crecimiento de la industria intensiva en sectores geográficos reducidos, en Chile e internacionalmente, aumenta el desequilibrio entre las actividades agrícolas y el medioambiente (Provolo, 2005; Feder y Findeling, 2007). Crece de esta manera, la necesidad de disponer de tecnologías eficaces y sustentables para el manejo de subproductos. El purín puede someterse a una línea de gestión que consiste en un tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario. El tratamiento primario consiste fundamentalmente en mezclar el purín mediante homogenización para luego por el proceso de separación (donde se integran procesos como filtración y centrifugación) obtener las fases líquida y sólida (Peralta, 2005; Bonmatí y Magrí, 2007). Generalmente la fase sólida se reutiliza para la producción de compost. La fase líquida puede dirigirse directamente al riego de predios de un mismo plantel o transportarse a otras zonas agrícolas. También puede ser descargada a cuerpos de agua superficiales, ríos fundamentalmente, lo que sin duda es dañino ambientalmente debido a las características contaminantes del purín crudo.

Para una gestión apropiada del purín, la fracción líquida debe someterse a un tratamiento secundario, cuyo objetivo principal es disminuir la concentración de materia orgánica presente (Peralta, 2005). La tecnología más usada para este tratamiento es la digestión anaeróbica, ya que en comparación con la digestión aeróbica, ésta no necesita mayor gasto energético para la proporción de oxígeno y a la vez, genera menor volumen de lodos a gestionar. Por otro lado, la digestión anaeróbica entrega un beneficio económico y energético debido a la generación de biogás, producto de la descomposición de la materia orgánica (Peralta y col. 2005; Bonmatí y Magrí, 2007).

El efluente generado en el tratamiento secundario sin embargo, aun contiene una alta concentración de nutrientes, lo cual hace que se requiera de un tercer tratamiento que disminuya el contenido de estos. Las tecnologías que se usan en este tratamiento pueden ser lodos activados, humedales, lombrifiltro, nitrificación-desnitrificación, entre otras.

1.4.1 Eliminación de microorganismos patógenos

El almacenamiento del purín previo a la disposición en suelos, se reporta como una alternativa eficaz para la reducción de microorganismos patógenos. Tres meses de almacenamiento a 25°C son las condiciones para el almacenaje de purines de vacuno que podría servir para abatir distintas bacterias (Holley y Guan, 2003). Autores reportan que la sobrevivencia de patógenos en purín almacenado puede observarse hasta en varios meses. Hutchison y col. (2005), recomiendan un tiempo de almacenamiento de seis meses en forma discontinua, es decir, sin agregar cargas de purín adicionales. Zhai y col. (1995) reportan que tras dos semanas de almacenamiento e incubación de estiércol avícola, se redujo más de un 99% de coliformes fecales. Sin embargo, esta estrategia convencional es dificultosa en su desarrollo, por lo que la digestión anaeróbica, como el tipo de tecnología avanzada de mayor uso en las empresas del rubro, corresponde al tratamiento en donde los microorganismos patógenos presentan una reducción más efectiva (Kearney y col., 1993; Hutchison y col., 2005).

Durante la digestión anaeróbica mesofílica, ocurren fenómenos y existen factores que provocan estrés, que en su conjunto reducen la concentración de patógenos. Parámetros tales como temperatura, tiempo, pH, irradiación, concentración de sólidos, compuestos orgánicos simples derivados de la degradación de la materia orgánica (ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, entre otros), presencia de otros microorganismos y generación de amoníaco se reconocen como factores importantes en la sobrevivencia de de patógenos durante la digestión

anaeróbica (Kearney y col., 1993; Smith y col., 2008; Watcharasukarn y col., 2009). Esta tecnología ha mostrado poder reducir microorganismos patógenos en un rango de una a dos unidades logarítmicas (90 a 99% de reducción) (Sobsey y col., 2006).

El suelo ha sido ampliamente utilizado como medio de tratamiento para la depuración, biodegradación y retención de contaminantes y carga microbiana. La falta de información científica acerca de la sobrevivencia de patógenos humanos en purines porcinos especialmente, ha sido un impedimento para el desarrollo de nuevas direcciones en el mejoramiento de la gestión de purines (Sobsey y col. 2006).

1.5 Patógenos e indicadores de contaminación fecal

1.5.1 Patógenos en el purín porcino

En el purín porcino se pueden encontrar diferentes tipos de organismos patógenos para el ser humano. Virus como VHE, causante de la hepatitis E y reovirus, pueden causar enfermedades, aunque de este tipo de patógenos se encuentra la menor cantidad de información certera respecto a la infectividad en humanos. También se encuentran bacterias patógenas, como *Escherichia coli* (serotipo más reconocido es 0157:H7), *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella* spp. *Ascaris suum* (nemátodo), *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* (protozoos), son parásitos que causan enfermedad en humanos mediante la ingesta de agua infectada principalmente, los que tienen la habilidad de formar huevos (oocystos en el caso de protozoos) como etapa del ciclo de vida, que permite la protección ante condiciones ambientales desfavorables. Dependiendo de la dosis infecciosa y de la especie (también cepa y serotipo), las bacterias patógenas pueden provocar cuadros gastrointestinales que pueden llegar a ser mortales. Personas infectadas por parásitos, pueden no presentar síntomas, aunque la enfermedad puede derivar en cuadros gastrointestinales mortales al igual que la infección bacteriana (Sobsey y col., 2006; Venglovsky y col., 2009).

La disposición de purín en la agricultura, puede convertirse en una amenaza dentro de la salud pública, si se llevan a cabo tres fenómenos. Primero, una dosis infecciosa debe alcanzar a un cuerpo de agua, o el patógeno debe reproducirse en un hospedador intermediario residente en el ambiente acuático para generar una dosis infecciosa. A continuación, la dosis infecciosa debe alcanzar un hospedador humano mediante contacto o consumo de los productos acuáticos. Por último, el hospedador debe infectarse debido a la dosis patogénica (Venglovsky y col., 2009).

1.5.2 Enterobacterias e indicadores de contaminación fecal

El grupo de coliformes fecales son los indicadores de contaminación fecal de mayor uso para el monitoreo dentro de la salud pública (Watcharasukarn y col., 2009). Se usan como indicadores biológicos de contaminación fecal ya que su punto de origen es el tracto intestinal de animales de sangre caliente (incluyendo al ser humano) y salen al medio ambiente por medio de las fecas (APHA, 1992). El grupo de coliformes fecales es un subgrupo del grupo coliforme, cuya clasificación en bacteriología es operacional y no taxonómica, aunque la mayoría de estos organismos pertenecen al grupo de las bacterias entéricas. Se definen como bacterias bacilares, no esporuladas, Gram negativas, aeróbicas o aeróbicas facultativas, fermentadoras de lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35°C por 48 horas (Madigan y col., 2004). El subgrupo coliforme fecal, se diferencia principalmente por fermentar lactosa a 44,5-45,5°C dentro de 24±2 horas, siendo *Escherichia coli* el organismo de mayor predominancia dentro del subgrupo (Maier y col., 2008).

Patógenos y coliformes fecales muestran un comportamiento similar durante el proceso de potabilización del agua. Los coliformes fecales mueren durante el proceso pero no tan rápido como otros microorganismos patógenos. Por ende, si se presenta un número de coliformes fecales sobre el límite permitido en la norma, hay una gran probabilidad de que patógenos estén presentes en el agua (APHA, 1992). En otras palabras, la presencia de coliformes fecales indica contaminación fecal en el agua, señalando la presencia de otros posibles microorganismos patógenos.

Las Enterobacterias, o bacterias entéricas, son un grupo de bacterias Gram negativas, no esporuladas y estructura bacilar, con movilidad variable, que crecen en medios enriquecidos (agar sangre o agar chocolate), o medios selectivos (agar MacConkey o agar EMB). Las enterobacterias, tienen amplia distribución ambiental: suelo, plantas, agua y tracto digestivo de humanos y animales. Algunas son potencialmente patogénicas para el humano. Debido a la presencia dentro y fuera del cuerpo humano, pueden causar infecciones oportunistas. Algunos géneros como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia* y *Serratia* causan infecciones oportunistas, y algunos de estos microorganismos además causan enfermedades adquiridas en la comunidad de personas aparentemente sanas. El grupo de coliformes, pertenece a este grupo de bacterias, así como también los indicadores de contaminación fecal, coliformes fecales y *Escherichia coli*. *E. coli* es una bacteria Gram negativa, fermentadora de lactosa y otras fuente de carbono (Atlas y Bartha, 2002; Madigan y col., 2004).

1.6 Suelo y actividad microbiana

1.6.1 El suelo

El suelo es un cuerpo tridimensional, compuesto por una mezcla de minerales, materia orgánica, agua y aire, que forma la superficie de la tierra. Cumple diferentes roles: es el medio para el crecimiento de muchos tipos de vegetación, modifica la atmósfera emitiendo y absorbiendo gases, purifica y retiene gran parte del agua, recicla nutrientes, provee de hábitats para organismos, entre otros (Seoáñez, 1999).

La actividad orgánica y microbiológica abunda en las capas superficiales del suelo, siendo las interacciones entre organismos y materia orgánica con la porción mineral importante. Plantas, animales y microorganismos aportan con materia orgánica, la cual es mineralizada por hongos y bacterias, formando el humus. Esta sustancia de color oscuro, se encuentra principalmente en la capa superior del suelo en proporciones relativamente estables dependiendo del tipo de suelo. El humus mejora la capacidad para retener humedad, disminuye la lixiviación de nutrientes solubles, es la fuente más importante de carbono y nitrógeno para las plantas y mejora la estructura del suelo, necesaria para el desarrollo de la vegetación (Pidwimy y Jones, 2010).

La mayoría de los suelos presentan un perfil de capas horizontales paralelas, que resultan de los procesos de formación del suelo. Los horizontes se establecen en función de tres propiedades principalmente: color, estructura y textura. Para designar a los horizontes se usa un conjunto de letras y números. De manera general, de la capa superficial hacia lo profundo se puede distinguir el horizonte O, A, B, C y R.

-Horizonte O: Corresponde a la capa superficial del suelo. Contiene humus y depósitos de materia orgánica sin descomponer en un 20 a 30% en distintos niveles de descomposición.

-Horizonte A: Zona compuesta principalmente por partículas minerales, las que se mezclan con humus y materia orgánica. En esta altura del perfil ocurre la eluviación o lixiviación de partículas minerales finas y otras sustancias solubles.

-Horizonte B: En esta capa se deposita gran parte del material transportado desde las capas superiores, proceso llamado eluviación. Sólo por este proceso este horizonte puede tener materia orgánica. Hay enriquecimiento de minerales y arcillas.

-Horizonte C: Capa de material original. Se encuentran partículas de tamaños muy variables, desde arcillas hasta rocas. Es un suelo blando, sin estructura y sin influencia de tipo orgánica.

-Horizonte R: Capa más profunda en el perfil del suelo. Consiste en material original, en su totalidad roca dura (Pidwimy y Jones, 2010; Dorronsoro, 2010).

La porción mineral del suelo, distribuida de distinta manera a través del perfil, se compone por tres grandes grupos de partículas que son la arcilla, limo y arena (Tabla 1). La distribución porcentual o proporción de estas partículas presentes en el suelo (composición granulométrica), determina el tipo de textura, la que otorga diferentes propiedades (Rucks y col., 2004).

Tabla 1. Tamaño de los diferentes tipos de partículas que componen el suelo.

Partícula	Unidad	Rango de tamaño
Grava	mm	20 - 2
Arena	mm	2,0 - 0,02
Limo	mm	0,02 - 0,002
Arcilla	mm	< 0,002

Clasificación correspondiente al Sistema Internacional (Dorronsoro, 2010).

La granulometría ejerce efectos sobre la estructura de un suelo, el color, consistencia, retención de compuestos y agua, porosidad, aireación y permeabilidad. Un suelo arcilloso retiene agua y nutrientes, tienen baja permeabilidad y alta porosidad. Un suelo limoso tiene baja aireación y mayor permeabilidad que un suelo arcilloso. Por último, un suelo arenoso no presenta retención de agua o nutrientes, tiene alta permeabilidad y aireación. Por otro lado, un suelo que posee fracciones relativamente equivalentes de los tres tipos de partículas, se les denomina francos. Éstos presentan equilibrio en sus propiedades. Desde un punto de vista agrológico, un suelo franco tiene mayor efectividad (Dorronsoro, 2010; Rucks y col., 2004).

El movimiento del agua por el suelo se denomina percolación. Ésta puede llevar consigo diversos componentes del suelo, como sustancias solubles, microorganismos, o partículas finas de suelo, proceso denominado como filtración. Estos componentes pueden atravesar largas distancias en el suelo, llegar a napas subterráneas, y viajar hasta cuerpos de agua como ríos, lagos, u océanos.

1.6.2 Materia orgánica en el suelo

La materia orgánica en el suelo se presenta en cantidades muy inferiores a la fracción mineral, sin embargo, la función que cumple es importante en la evolución y propiedades de los suelos. Los constituyentes de la materia orgánica constantemente sufren transformaciones que involucran a las distintas partes del ecosistema y pueden clasificarse en dos grupos:

-Restos orgánicos frescos: Son transformados por microorganismos diversos y además por miembros de la microfauna edáfica (ácaros, insectos y lombrices). Constituyen entre el 10 y 15 % de la materia orgánica total, que incluye productos de descomposición y productos de la actividad microbiana. Representado por proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, ceras, resinas, lignina, entre otros.

-Sustancias húmicas: Constituyen entre el 85 y 90% de la materia orgánica total. Derivan de la transformación de los restos orgánicos, cuya composición química inicial y las condiciones del medio marcan la actividad microbiana y el proceso de descomposición (Silva, 2004; Dorronsoro, 2010).

La actividad microbiana y el proceso de descomposición son influenciados por el tipo y la granulometría del suelo (Silva, 2004). La unión entre las partículas minerales se produce por medio de los productos de descomposición. En consecuencia, el efecto de la materia orgánica comparado al efecto de las arcillas sobre la formación de agregados de suelo, es mayor. Es decir, por medio de la materia orgánica, el suelo puede presentar mejor estructura, permeabilidad y cementación. Por otro lado, la materia orgánica refuerza la retención de agua en el suelo, evitando el desecamiento, y otorgando humedad a las raíces y organismos del suelo. También entrega nutrientes a las plantas al mineralizar en sus componentes más simples, tales como CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} y SO_4^{-2} (Rucks y col., 2004).

1.6.3 Compactación del suelo

Desde el punto de vista del cultivo, la estructura del suelo es importante ya que define la hidráulica del mismo, la movilidad de los nutrientes y la parte gaseosa necesaria para la actividad de las raíces. La compactación del suelo altera la estructura y porosidad, por tanto la productividad del cultivo se puede ver afectada. La porosidad de un suelo es la representación del porcentaje total de huecos o poros que existe entre su material sólido. De la porosidad dependen las fases líquida y gaseosa, y por consiguiente, la actividad biológica. La compactación es la reducción del espacio entre los poros del suelo cuando estos se someten a presión. La presión

adicional puede tener diferentes fuentes, tales como la fuerza aplicada por: maquinaria pesada (tractores o camiones purineros), operaciones de labranza, rotación de cultivo escasa, riego exagerado y precipitaciones. Individualmente o bien la mezcla de estos factores, pueden incurrir a la compactación del suelo en diferentes grados dependiendo de la granulometría, tipo de cultivo y condiciones ambientales (Jensen y col., 1996; University of Minnesota, 2011).

Un cultivo en un suelo altamente compactado, tiene problemas para desarrollarse pues las raíces no crecen adecuadamente, de manera que la extracción de nutrientes y agua se ve limitada. Una capa superficial de suelo compactada puede aumentar la escorrentía superficial aumentando también las pérdidas de agua y suelo. Por otro lado, la compactación en un suelo húmedo reduce la aireación, lo que deriva en un aumento de la desnitrificación. La aplicación en suelos agrícolas de fertilizantes orgánicos como el purín de cerdo puede otorgar elasticidad al suelo disminuyendo la potencial compactación (Hamza y Anderson, 2005). Sin embargo, la aplicación exagerada e intensa, puede aumentar la compactación de los suelos agrícolas debido a la alta presión aplicada.

1.6.4 Interacción entre microorganismos y el suelo

La actividad microbiológica en el suelo es importante para su fertilidad. Sus funciones son variadas: descomponer la materia orgánica (formación de humus) y participación esencial en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes. En un suelo agrícola sometido a riego de purín de cerdo, se pueden encontrar microorganismos de la comunidad edáfica natural como algas, actinomicetos, hongos y bacterias, junto a los microorganismos provenientes del purín. La retención y el transporte horizontal y vertical de las bacterias en el perfil de suelo, son fuertemente influenciados por la adsorción a partículas de suelo. Esto depende de la granulometría y tipo de textura de mismo (Powelson y Mills, 2001; Unc y Goss, 2003; Mosaddeghi y col., 2009).

La adsorción es un proceso donde intervienen fuerzas de atracción de tipo electrostático (Seoáñez, 1999). Es un fenómeno subsuperficial ya que la materia adsorbida se concentra sobre una superficie, generalmente sólida, debido a una elevada afinidad. La adsorción de microorganismos en el suelo ocurre principalmente en las partículas de arcilla, ya que son las partículas de mayor superficie específica, la que junto a la densidad de carga de los componentes involucrados, determinan la intensidad de adsorción (Seoáñez, 1999; Rucks y col., 2004). Los suelos arcillosos presentan una retención de bacterias significativamente mayor a un suelo arenoso, ya que en las texturas arenosas prácticamente la mayoría de los componentes son

filtrados. La porosidad del suelo, es un factor importante en la retención. Es así como un suelo arenoso tiene alta capacidad de filtración y poca capacidad de retención de sustancias y agua, debido a la baja porosidad y superficie específica de las arenas en comparación a una fracción de arcilla.

Las células bacterianas tienden a crear flóculos. Las bacterias son adsorbidas por el suelo y por coloides de residuos orgánicos, formándose complejos coloidales bacterianos, los cuales pueden crear puentes entre partículas del suelo, que podrían prevenir el transporte de otras células generando obstrucción (Mosaddeghi y col., 2009). Posiblemente, algunos compuestos orgánicos solubles compitan con las bacterias por espacios cargados positivamente, en los cuales pueden retenerse (Unc y Goss, 2003). Los electrolitos orgánicos podrían aumentar la adsorción bacteriana en los compuestos orgánicos cargados, lo que aumentaría el transporte de bacterias (Unc y Goss, 2004).

Rufete y col. (2006), señalan que en el suelo la sobrevivencia de microorganismos indicadores se ve afectada por factores como pH, humedad y presencia de otros microorganismos. Zhai y col., (1995), establecen que la sobrevivencia bacteriana es mayor en el suelo superficial más que en capas inferiores (subsuelo). Es así como la fracción orgánica y horizonte A de un suelo, corresponden a las zonas donde se retiene la mayor concentración de coliformes fecales. Probablemente debido al mayor contenido en materia orgánica y humedad. En general, los patógenos de naturaleza zoonótica parecen sobrevivir más tiempo en agua, seguido de suelo y estiércol (Holley y Guan, 2003). Aun así, la contaminación del agua subterránea depende mayormente de la textura del suelo y grado de saturación hídrica del mismo, más que de la sobrevivencia de los microorganismos.

Según Joy y col. (1998), las precipitaciones parecen ser un factor importante en cuanto a inducir el transporte bacteriano hacia napas subterráneas, más influyente que la tasa de aplicación de purín y la condición del suelo antes de la aplicación. Asimismo, Powelson y Mills (2001) establecen que a un flujo de agua insaturado del suelo, comparado a un flujo saturado, el transporte bacteriano es menor.

1.6.5 Estudio de componentes del purín mediante columnas de suelo como modelo experimental

Para estudiar el comportamiento y destino de los componentes provenientes del purín en el suelo, se han realizado experimentos implementados en terreno, como también en laboratorio

utilizando columnas de suelo inmovilizado. Rufete y col. (2006), estudiaron el efecto de la aplicación de purín porcino, sobre la presencia de coliformes totales y fecales en un suelo de uso agrícola. Se concluye que existe una tendencia de disminución de coliformes fecales en el tiempo, llegando al límite de detección tras 100 días de observación.

Guber y col. (2005), estudiaron la retención de *Escherichia coli* en suelo inmovilizado en columnas, bajo el efecto del contenido de purín. Núñez-Delgado y col., (2002), utilizaron columnas para investigar el transporte de nitrógeno como amonio, cloruro, materia orgánica y otros componentes provenientes de purín de vacuno. Varios autores han utilizado columnas de suelo, ya sea alterado o intacto, con el fin de investigar los efectos de la estructura (macroporosidad) sobre el transporte. También, existen estudios referentes al transporte bacteriano en suelo de diferentes tipos de texturas.

Aunque la producción porcina a nivel mundial es mayor que la producción de ganado de vacuno y sus residuos parecen ser más peligrosos, el estudio de patógenos en purín de vacuno, es mayor que el reportado en purín de cerdos (Holley y Guan, 2003). Esto hace que la información que se tiene en relación a microorganismos bacterianos en el purín porcino se vea limitada. Por otro lado, el estudio microbiológico del suelo sometido a efluentes tratados anaeróbicamente es muy escaso, por lo que el conocimiento para concluir acerca de los efectos de esta tecnología sobre el transporte y retención de componentes del purín, es deficiente.

2 HIPÓTESIS

La fracción orgánica de un suelo franco limoso inmovilizado en columnas, permite la retención de bacterias entéricas Gram negativas lactosa positivo contenidas en un efluente tratado anaeróbicamente, pero no así, en un efluente crudo de purín de cerdo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la retención de bacterias entéricas Gram negativas lactosa positivo contenidas en un efluente de purín de cerdo crudo y un efluente tratado anaeróbicamente, por la fracción orgánica de un suelo franco limoso inmovilizado en columnas, sometido a diferentes cargas microbiológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Estudiar el balance de nitrógeno y materia orgánica en las columnas de suelo.
- Determinar bacterias entéricas Gram negativas lactosa positivo a diferentes alturas de una columna rellena con la fracción orgánica de suelo franco limoso, alimentada con diferentes cargas de nitrógeno en el purín de cerdo crudo.
- Determinar bacterias entéricas Gram negativas lactosa positivo a diferentes alturas de una columna rellena con la fracción orgánica de suelo franco limoso, alimentado con diferentes cargas de nitrógeno en el purín de cerdo tratado anaeróbicamente.
- Evaluar la relación entre carga microbiológica y tipo de purín alimentado, respecto a la retención de bacterias entéricas Gram negativas lactosa positivo por superficie de suelo.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Variables y diseño experimental

4.1.1 Tipo de purín

Se utilizaron dos tipos de purín como alimentación para las columnas de suelo. Ambos fueron caracterizados en términos de parámetros físico-químicos, como pH, conductividad eléctrica, DQO_T, NT, N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻. Se determinó la presencia de coliformes fecales mediante la técnica de tubos múltiples (NCh 2313/22 of 95).

4.1.1.1 Purín crudo

Se utilizó purín de cerdo proveniente del Plantel de Engorda de Cerdos “Fundo San Guillermo” ubicado en la comuna de Coihueco, provincia de Ñuble, Región del Biobío. Esta se colectó a la salida del tratamiento primario de la planta y corresponde a la fase líquida del purín. Se transportó en bidones de 20 litros al laboratorio y se almacenó a 4°C.

4.1.1.2 Purín tratado anaeróbicamente

Se utilizó efluente anaeróbico de purín de cerdo proveniente del tratamiento secundario en un digestor anaeróbico, alimentado con purín de cerdo crudo. El sistema anaeróbico fue instalado en el laboratorio piloto del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental del Centro EULA.

4.1.2 Suelo

El suelo utilizado fue extraído desde el “Fundo San Guillermo” perteneciente a la Sucesión Salvador Yanine Abadi, ubicado en la comuna de Coihueco, provincia de Ñuble, región del Bío Bío. En este predio se cultiva trigo (*Triticum aestivum*), el cual se riega con purín de cerdo generado dentro del mismo fundo (Figura 2).

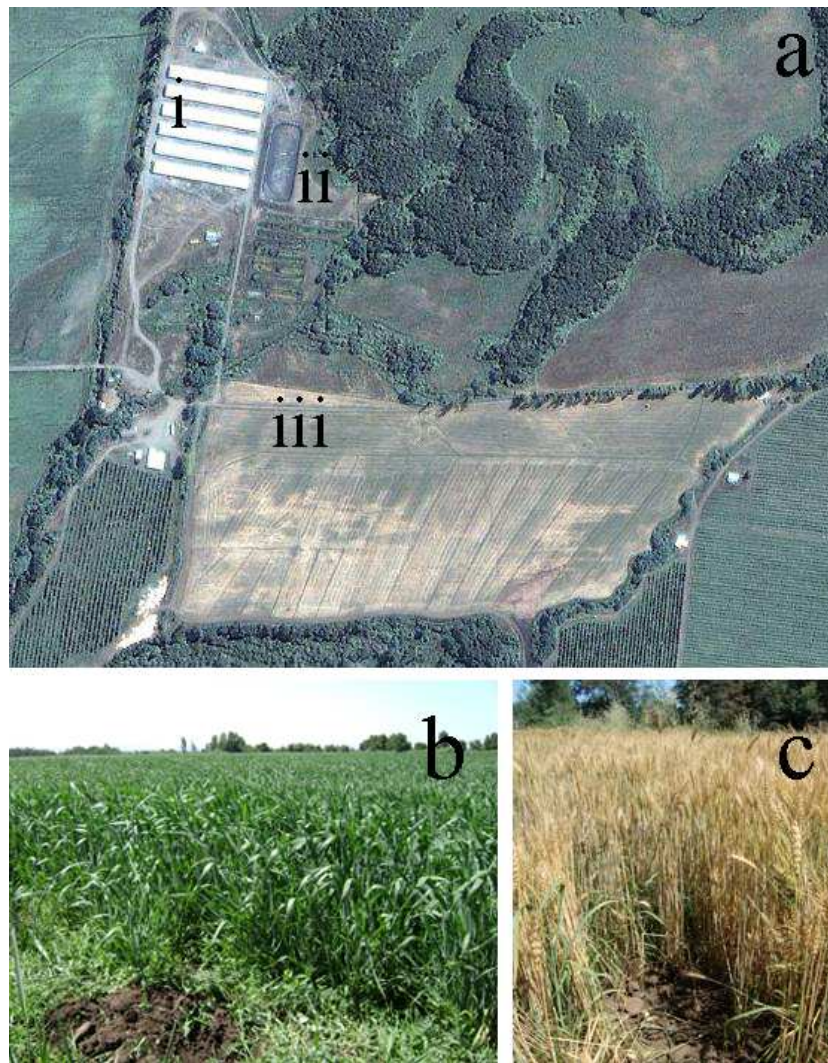


Figura 2. Superficie de suelo regada con purín; a) Vista aérea del Fundo San Guillermo. i) Planteles porcinos, ii) Laguna anaeróbica, iii) Predio de trigo; b) y c) Predio de trigo en diferentes estados de maduración. Se puede apreciar la superficie desde donde se obtuvo suelo.

El suelo en esta zona se caracteriza por ser compactado, lentamente permeable y moderadamente drenado. Hay presencia de texturas medias, de las que predomina la textura franco limosa (Qualanz, 2005). La muestra extraída correspondió a la fracción orgánica y horizonte A del suelo (30 cm de profundidad en el perfil de suelo). Ésta se extrajo utilizando una pala metálica y se transportó al laboratorio en recipientes plásticos para luego ser almacenado en bolsas y envases plásticos a 4°C (Fischer y Whalen, 2005). La extracción de muestras se realizó siempre en las mismas coordenadas del fundo y para cada ensayo se utilizó suelo nuevo.

4.1.2.1 Fraccionamiento del suelo

Los ensayos de columnas rellenas, fueron realizados con suelo homogenizado, eliminando así, los efectos de la estructura, es decir, la presencia variable y dispersa de macroporos por donde el agua percola de manera preferencial (Lewis y Sjöstrom, 2010). Tras la homogenización, el suelo se fraccionó mediante el uso de tamices (Tabla 2), para obtener una muestra representativa y eliminar el material no deseado, tal como piedras, restos vegetales, insectos y aglomerados de suelo de gran tamaño. Las fracciones obtenidas se muestran en la Figura 3, en donde se puede observar la diferencia textural de cada fracción. La fracción elegida para trabajar el suelo fue la obtenida con un tamiz de 2 mm de apertura, la que presentó mayor homogeneidad y cercanía a la realidad del predio.

La caracterización física del suelo consistió en determinar el contenido en humedad, materia orgánica, y granulometría. La caracterización microbiológica, consistió en determinar la concentración de bacterias entéricas Gram (-) lacosa (+), mediante la técnica recuento viable en placa.

Tabla 2. Tamices utilizados para fraccionar el suelo.

phi (\emptyset)	Apertura (mm)
-2	4
-1	2
0	1
1	0,5

Phi (\emptyset): parámetro de escala logarítmica referente al tamaño de partículas de una muestra de suelo.

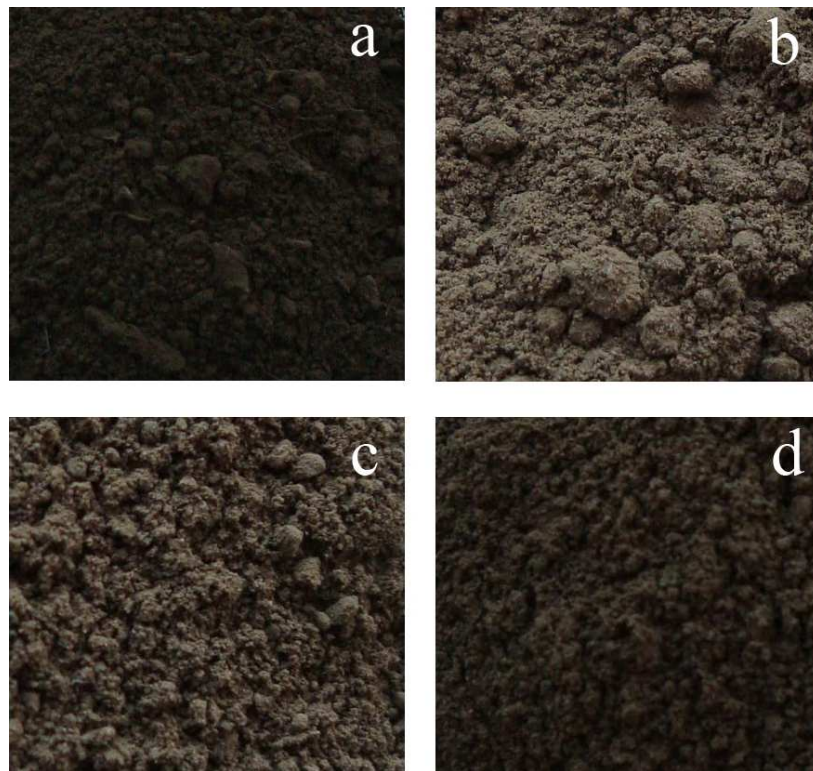


Figura 3. Fracciones obtenidas mediante tamizado. a) Muestra obtenida con tamiz $-2\emptyset$; b) Muestra obtenida con tamiz $-1\emptyset$; c) Muestra obtenida con tamiz $0\emptyset$; d) Muestra obtenida con tamiz $1\emptyset$.

4.1.3 Columnas de suelo

4.1.3.1 Confección y montaje

Una columna tiene como función inmovilizar una muestra de suelo con el objetivo principal de obtener un lixiviado. La confección de las columnas se realizó de la siguiente manera: tubos de PVC de 2 m de largo y 7,2 cm de diámetro interno fueron cortados en tubos de 25 cm de longitud para la confección de cada columna. Las dimensiones escogidas fueron basadas en los trabajos de Powelson y Mills (2001), Núñez-Delgado y col. (2002) y Guber y col. (2005), quienes utilizaron dimensiones similares para observar el transporte bacteriano. El interior de los tubos también fue lijado horizontalmente con el fin de evitar el flujo por las paredes del tubo (Lewis y Sjöstrom, 2010). En el extremo inferior se acopló y selló una tapa para tubo de PVC a la que se adaptó un dispensador metálico tipo embudo, con perlas de vidrio en su interior. Éstas cumplieron la función de evitar la obstrucción a la salida del dispensador. En la base de la tapa se fijaron dos capas de malla de nylon para también evitar el paso de suelo hacia el embudo. Todos los tubos fueron perforados utilizando una broca, desde arriba hacia abajo, a

los 8, 16 y 23 cm en la misma línea haciendo un orificio de 1 cm de diámetro, para luego insertar tapones de goma previamente raspados para su ajuste al orificio. Estos orificios correspondieron a las alturas de la columna de suelo (altura 1 a los 8 cm (A1), altura 2 a los 16 cm (A2) y altura 3 a los 23 cm (A3)) por donde se obtuvo muestra. Las columnas se instalaron en el laboratorio piloto del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental del Centro EULA (Figura 4), sujetas con abrazaderas a un soporte metálico. Las características de las columnas se muestran en la Tabla 3.

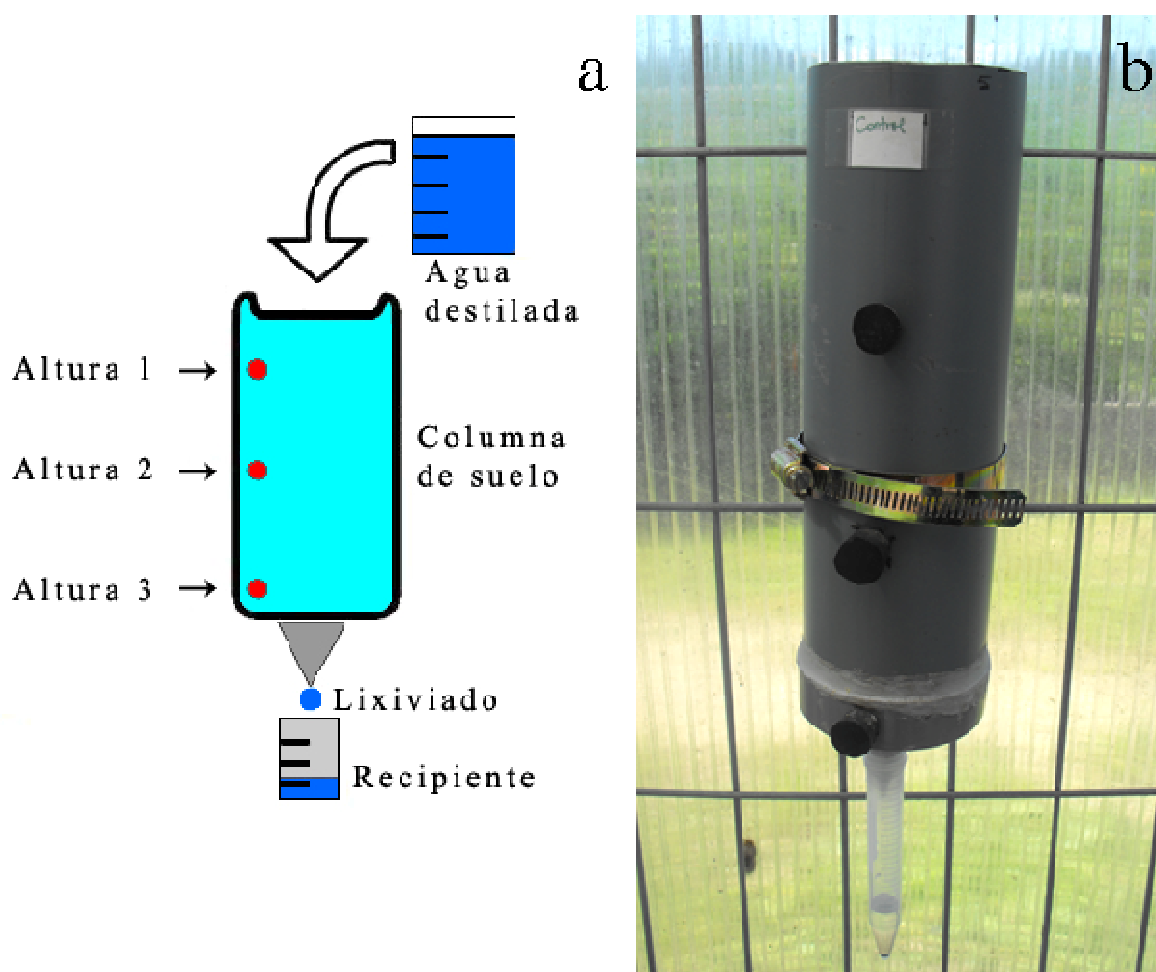


Figura 4. Columna de suelo. a) Esquema del funcionamiento de una columna de suelo; b) Fotografía de una columna de suelo instalada.

Tabla 3. Características de una columna de suelo.

Características	Unidad	Valor
Peso	g	235 ± 5
Diámetro interno	cm	7,20
Altura	cm	25
Sección transversal	cm ²	40,71
Volumen	cm ³	1017,75
Volumen suelo	cm ³	936,44

4.1.3.2 Puesta en marcha del sistema

Para interpretar y entender el comportamiento de las columnas de suelo como modelo de estudio, se evaluaron propiedades tales como porosidad y compactación.

4.1.3.2.1 Porosidad

La porosidad (η) en las columnas de suelo fue determinada de la siguiente manera:

$$\eta = \rho_b / \rho_s \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

η : porosidad (%)

ρ_b : densidad del suelo

ρ_s : densidad de la masa de la partícula

La densidad de la columna (ρ_b), se calculó dividiendo la masa de la columna de suelo (determinada mediante pesaje), por el volumen que ocupa (936,4 cm³ para 23 cm de altura de suelo) y donde la densidad de la masa de la partícula (ρ_s), corresponde a 2,65 g/cm³, valor estimativo tomado de literatura para suelos minerales (Lewis y Sjöstrom, 2010).

4.1.3.2.2 Compactación

Se determinó una densidad y porosidad adecuadas del suelo inmovilizado, con el fin de evitar la variación de altura (compactación final) del suelo tras la aplicación de agua, que afectasen la lixiviación de compuestos y movimiento bacteriano y posterior análisis de muestras. Para esto, se realizaron ensayos con suelo inmovilizado distintamente. Las columnas fueron rellenas con suelo de acuerdo a las indicaciones de Lewis y Sjöstrom (2010) para la obtención de una densidad y porosidad correspondientes a un suelo franco limoso (aplicando presión cada 2

cm de capa de suelo). Paralelamente se rellenaron columnas aplicando presión un menor número de veces (cada 5 cm de capa de suelo). De esta manera se obtuvieron columnas de densidad y porosidad diferentes, las que fueron alimentadas con agua destilada con posterior medición de la variación de altura final, utilizando una regla, en diferentes puntos del perímetro superior de la columna.

También se evaluó el efecto del tipo de purín alimentado, es decir, purín crudo y tratado anaeróticamente de 700 kg N/ha/año, sobre la compactación final del suelo. Se utilizó esta carga nitrogenada ya que corresponde a la carga utilizada en la práctica real del fertirriego.

4.1.3.3 Operación del sistema

4.1.3.3.1 Saturación hídrica

Utilizando agua destilada como alimentación al sistema, se midió el tiempo y volumen requeridos para la obtención de lixiviado de la columna. El valor obtenido, fue utilizado para lograr la saturación hídrica de las columnas en el desarrollo de los diferentes ensayos.

4.1.3.3.2 Curvas de humedad

Se evaluó la capacidad de retención de agua del suelo y la pérdida de humedad. Para esto se determinó la humedad inicial del suelo para luego realizar mediciones de humedad en el tiempo (15 días), tras la saturación de columnas de suelo con agua destilada, purín crudo y efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Se extrajeron muestras la altura 1 (A1), altura 2 (A2) y altura 3 (A3).

4.1.3.3.3 Tipos de alimentación

Para los ensayos realizados en este trabajo, las columnas de suelo fueron alimentadas por única vez (día 1) con dos tipos de purín diluidos de acuerdo a dos parámetros de riego, basados en la carga de nitrógeno total por hectárea y por año. La primera carga basada en la aplicación de purín en terrenos agrícolas chilenos sin control de nutrientes (700 kg N/ha/año). La segunda carga, basada en normativas y recomendaciones internacionales respecto al nitrógeno total que debiese aplicarse como fertilizante en riego (350 kg N/ha/año). Como sistema control, se alimentaron columnas con agua destilada. En total, se trabajó con cinco sistemas: sistema control, sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año, sistema alimentado con efluente

anaeróbico de 700 kg N/ha/año, sistema alimentado con purín crudo de 350 kg N/ha/año y por último, sistema alimentado con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año.

4.1.3.3.4 Cargas microbiológicas

A partir de las cargas de nitrógeno total, se obtuvieron cargas microbiológicas de bacterias entéricas Gram (-) lac (+), de las cuales se determinó el recuento alimentado en los diferentes sistemas de columnas de suelo. Las cargas microbiológicas extrapoladas a una hectárea de superficie, fueron determinadas mediante la ecuación 2:

$$\text{Carga microbiológica} = \frac{\text{CA} \times \text{H}}{\text{ST}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

CA: concentración alimentada

H: hectárea de superficie

ST: sección transversal de la columna de suelo (40,71 cm²)

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Caracterización físico-química del purín y suelo

4.2.1.1 Caracterización físico-química del purín de cerdo

Con el fin de establecer las características del purín crudo y purín tratado anaeróbicamente se realizaron diferentes mediciones físico-químicas, mediante las siguientes técnicas analíticas:

4.2.1.1.1 Temperatura, pH, potencial redox, conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales (SDT). Estos parámetros se determinaron utilizando electrodos conectados a un medidor multiparamétrico (OAKTON, modelo PC 650) (Figura 5a).

4.2.1.1.1.2 Demanda química de oxígeno total (DQO_T). Se determinó la materia orgánica susceptible a la oxidación por un oxidante químico fuerte, midiéndose el oxígeno equivalente. La técnica consiste en agregar 2,5 mL de muestra diluida a un tubo de digestión y añadir 1,5 mL de solución digestora (compuesta por ácido sulfúrico concentrado, dicromato de potasio y sulfato de mercurio) y 3,5 mL de solución catalítica (compuesta por sulfato de plata en ácido sulfúrico). Con agitación vigorosa se homogenizan las mezclas y se mantienen a 150°C por dos horas en un digestor (HACH/001200008338), con control de temperatura y tiempo (Figura 5b). Al enfriar las muestras a temperatura ambiente, se lee el resultado en un espectrofotómetro a 600 nm mediante

curva de calibración (Figura 5c). La DQO_T fue medida en muestras de purín y de lixiviados de las columnas, utilizando diluciones pertinentes a cada tipo de carga aplicada.

Se cuantificaron tres formas de nitrógeno, en muestras de purín y lixiviado de las columnas de suelo, mediante kit de Spectroquant NOVA-60, Merck (Figura 5d).

4.2.1.1.1.3 Nitrógeno total (NT). Los compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno se transforman en nitratos por el método de Koroleff por tratamiento con un oxidante en un termoreactor. Estos nitratos, en solución sulfúrica y fosfórica, forman con 2,6-dimetilfenol (DMP) el compuesto 4-nitro-2,6-dimetilfenol que se determina fotométricamente.

4.2.1.1.1.4 Nitrógeno como nitrato ($N-NO_3^-$). El electrodo de ión NO_3^- es un sensor selectivo que desarrolla un potencial a través de una membrana delgada, porosa, inerte, que se mantiene en posición en un intercambiador iónico en un líquido inmiscible con agua.

4.2.1.1.1.5 Nitrógeno como amonio (NH_4^+-N). El nitrógeno amónico se presenta en forma de iones amonio y en parte en forma de amoníaco. Entre ambas formas de aparición existe un equilibrio dependiente del pH. En solución fuertemente alcalina, en la que prácticamente sólo existe amoníaco, tiene lugar con un agente clonante una transformación en monocloramina. Ésta forma con timol, un derivado azul de indo fenol que se determina fotométricamente.



Figura 5. Equipos utilizados para la medición de parámetros físico-químicos del purín de cerdo y lixiviados de las columnas de suelo. a) Equipo multiparamétrico; b) Digestor para DQO_T ; c) Espectrofotómetro; d) Equipo Fotométrico NOVA-60.

4.2.1.2 Caracterización físico-química del suelo

El suelo se caracterizó determinando el porcentaje de humedad, materia orgánica y granulometría.

4.2.1.2.1 Humedad. La muestra previamente pesada en una balanza analítica (Precisa), se secó en una estufa a 105°C por 16 horas hasta masa constante (Zagal y Sadzawka, 2007).

4.2.1.2.2 Materia orgánica. Tras la determinación del contenido de agua de la muestra, se determinó el porcentaje de materia orgánica mediante calcinación en una mufla a 550°C por 4 horas (Zagal y Sadzawka, 2007).

4.2.1.2.3 Materia inorgánica. También llamado contenido mineral, corresponde a la masa inicial menos el contenido en humedad y materia orgánica

4.2.1.2.4 Granulometría: la textura de la fracción de suelo tamizada, se definió determinando la distribución de la frecuencia porcentual del tamaño de partículas arcillosas, limosas y arenosas. Una muestra de suelo se introdujo por el extremo superior de un tubo de decantación previamente llenado con agua de grifo (McManus, 1988). En el extremo inferior se detectan los

pesos de las partículas que van decantando, información que se analiza utilizando el software Gradistat 4.0, como la distribución de la frecuencia del porcentual. Este software utiliza la clasificación de Wentworth (1922) para determinar las características granulométricas de los suelos, en la que se establecen rangos de ϕ (phi: tamaño de partícula) y tipo de partícula. Establece que en el rango de 1 a 4 ϕ (0,5 a 0,0625 mm) se ubican las arenas medias, finas y muy finas. Entre el rango de 4 a 8 ϕ (0,0625 a 0,0039 mm) se ubican las partículas de limo grueso, medio, fino y muy fino. Por último, de 8 ϕ en adelante (menor a 0,002 mm), se clasifican las partículas arcillosas.

4.2.2 Determinación de coliformes fecales y bacterias entéricas Gram (-) lactosa (+) en purín y suelo

La identificación de coliformes fecales en los purines, se realizó mediante la técnica de tubos múltiples y la determinación de bacterias entéricas Gram (-) lactosa (+) en las columnas de suelo (cinco tipos de sistemas), con la técnica de recuento en placa en agar MacConkey.

4.2.2.1 Determinación del número más probable (NMP) por tubos múltiples en purín

Para determinar el NPM de coliformes fecales en el purín crudo y efluente anaeróbico, se realizó la metodología de tubos múltiples, la cual consiste en sembrar diluciones de las muestras en caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST), con campanas Durham invertidas en su interior, proceso denominado colimetría presuntiva en la cual se produce una recuperación de las bacterias viables. Ésta se realizó a partir de la inoculación, en series de 5 tubos de caldo LST, con 1 mL de diluciones de muestra (10^{-4} - 10^{-6}). Posteriormente, se procede a la incubación de los tubos a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Los tubos positivos, con formación de gas en las campanas Durham y turbidez, son traspasados mediante una asa de 0,3 mm de loop a tubos con caldo EC con campanas Durham invertidas, que confirma la presencia de coliformes fecales, una vez incubados los tubos a $44\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en baño maría por 24 ± 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, se cuantifican las series de tubos positivos de cada dilución y se lee el NMP en la tabla de la norma Chilena 2313/22 Of 95.

4.2.2.2 Recuento viable en placa

La determinación de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) se realizó mediante la técnica recuento viable en placa de agar MacConkey. Ésta permite seleccionar y cuantificar los organismos aislando colonias de color rojo y rosado de brillo metálico las que corresponderían a *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* de acuerdo a catálogo de medio MacConkey de Merck.

El agar se preparó mezclando 50 gramos de agar MacConkey para 1 litro de agua suprapura, y calentando en un termoagitador (Fisatom 735-A, 144286), hasta disolver completamente. Posteriormente, el agar se autoclavó por 15 minutos a 121°C, tras lo cual se traspasó aproximadamente 20 ml a placas estériles, manteniendo la esterilidad del medio y del área de trabajo con un mechero encendido. Una vez solidificado el medio, las placas son incubadas por 24 a 48 horas a 35 °C como control de calidad, luego fueron almacenadas en un refrigerador 4°C hasta su uso.

La siembra se realizó haciendo diluciones consecutivas de las muestras en tubos de agua tamponada (9±0,2 mL) y sembrando 0,1 mL de la dilución en superficie dentro de una cámara de cultivo previamente esterilizada con luz UV. Las placas fueron incubadas a 35±0,5°C por 48 horas, tras lo cual se hizo el recuento de colonias expresado como ufc/mL (APHA, 1992).

En el caso de las muestras de suelo y suelo de columnas, se procedió a pesar 1g de éstas que luego fue resuspendido en 9±0,2 mL de agua tamponada, a lo que se agregó una gota del detergente orgánico Twin 80 (Polisorbato 80), para desprender las bacterias adheridas a partículas de suelo. Tras mezclar el contenido del tubo, se procedió a realizar diluciones según lo anteriormente descrito, para luego sembrar.

4.3 Balance de nitrógeno y de materia orgánica

Los balances se realizaron en los cinco sistemas: columnas alimentadas con purín crudo y efluente anaeróbico de 700 y 350 kg N/ha/año, más una columna control alimentada con agua destilada. El balance consistió en determinar la concentración de nitrógeno total, nitrógeno como amonio y nitrógeno como nitrato (mediante kit de Spectroquant NOVA-60 (Merck)) en el purín alimentado y en los lixiviados de las columnas de suelo (día 1). Al finalizar los ensayos (día 15), se determinaron las concentraciones de los parámetros en el lixiviado. Por otro lado, se evaluó la materia orgánica como DQO_T en las alimentaciones de las columnas (purín crudo y efluente

anaeróbico de 700 y 350 kg N/ha/año, más la columna control) y en los lixiviados respectivos. Para realizar ambos balances, se utilizó la ecuación 3:

$$R = E - S \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde:

R: retención

E: entrada (alimentación)

S: salida (lixiviado)

4.4 Determinación de la concentración de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo

Se determinó la concentración de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los 5 sistemas de columnas de suelo, tras una única aplicación de purín crudo y tratado de 700 y 350 kg N/ha/año y agua destilada como sistema control (día 1). El volumen total alimentado correspondió al valor de la saturación hídrica de la columna de suelo, fenómeno provocado por la acción de riego superficial (fertirrigación) de una área de cultivo.

El recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) se determinó en los cinco tipos de alimentación, en las tres alturas de la columna (A1, A2 y A3) de cada sistema y en los lixiviados, en un período de 15 días, realizando mediciones cada 48 horas. La alimentación de los sistemas se realizó en el día 1 y para la obtención de los lixiviados restantes, el sistema fue alimentado con 60 mL de agua destilada con el fin de generar presión hídrica. El montaje consistió en 7 columnas de suelo para cada tipo de sistema alimentado con purín (Figura 6). Para cada medición, se analizó una columna por tipo de sistema, las cuales fueron posteriormente desechadas, ya que las tomas de muestras son destructivas (al tomar muestras de suelo desde las alturas de la columna, ésta es alterada por el muestreo). La cuantificación en la columna control se realizó en el día 1 y 15. Todas las mediciones microbiológicas se realizaron por duplicado mediante la técnica recuento viable en placa.

La retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el suelo en los sistemas alimentados con ambos tipos de purín, se determinó mediante la ecuación 4:

$$\% R = 100 - \frac{(S*100)}{E} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

R: retención

S: salida (lixiviado)

E: entrada (alimentación)



Figura 6. Montaje de las columnas de suelo (sistema alimentado con purín crudo y efluente tratado con 700 kg N/ha/año) en el laboratorio piloto del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental del Centro EULA.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterización del purín

La caracterización fisicoquímica del purín crudo y tratado se presenta en la Tabla 4. El pH del purín crudo se mantiene cercano a la neutralidad. La materia orgánica medida como DQO_T se encuentra entre 25 y 35 g/L, que al salir del digester anaeróbico se reduce entre un 75 y 85% aproximadamente. De los nutrientes, se observa que un alto porcentaje del nitrógeno total corresponde a nitrógeno como amonio, porcentaje similar en ambos tipos de purín (en el purín crudo, el N-NH₄⁺ corresponde a un 70%, mientras que en el efluente anaeróbico se presenta en un 69%). Se observa que los parámetros nitrogenados del purín tratado no varían considerablemente respecto al purín crudo.

El purín crudo presentó una concentración de coliformes fecales de 3x10⁷ NMP/100 mL, mientras que el efluente anaeróbico presentó una concentración de 2x10⁵ NMP/100 mL. La concentración disminuyó en 2,17 unidades logarítmicas (99,3%).

Tabla 4. Caracterización físico-química del purín crudo y tratado anaeróbicamente (n=7).

Parámetros	Unidad	Purín crudo	Efluente anaeróbico
pH		7,6	8,5
Conductividad eléctrica	mS/cm	16	14
Potencial Redox	mV	-292	-235
SDT	g/L	46,9	40,7
DQO _T	g/L	20-35	4-7
NT	g/L	3,5	3,3
N-NO ₃ ⁻	g/L	<1	<1
N-NH ₄ ⁺	g/L	2,5	2,3
Coliformes fecales	NMP/100 mL	3x10 ⁷	2x10 ⁵

5.2 Caracterización del suelo

La humedad del suelo inmovilizado en las columnas fue de 29% (Tabla 5). El contenido inicial en humedad del suelo no presentó efectos sobre la materia orgánica encontrada, ya que a diferentes contenidos de humedad inicial, el porcentaje orgánico no presentó variaciones. El suelo extraído resultó con un 15% de materia orgánica.

Tabla 5. Caracterización del suelo inmovilizado en las columnas.

Parámetros	Unidad	Suelo
Humedad	(%)	29
Materia orgánica	(%)	15
Materia inorgánica	(%)	56

La clasificación textural del suelo determinada por el software Gradistat 4.0 es Limo medio (Tabla 6). De acuerdo al análisis granulométrico, el suelo corresponde a un suelo de textura media lo que concuerda con lo establecido en la Declaración de Impacto Ambiental del plantel de cerdos (Qualanz, 2005), que reporta una textura Franca limosa (textura de clasificación media) para el suelo del Fundo San Guillermo.

Tabla 6. Caracterización granulométrica del suelo inmovilizado en las columnas.

Parámetros	Unidad	Suelo
Limos y arcillas	(%)	65
Arena	(%)	35
Grava	(%)	0
Clasificación textural		Limo medio

La distribución de la frecuencia del porcentaje de tamaños de partículas en el suelo utilizado en este estudio, se muestra en la Figura 7. Se puede apreciar que la frecuencia porcentual de las partículas de limo medio y fino, correspondientes al rango entre 5 a 7 ϕ , predomina por sobre la frecuencia porcentual de las partículas de arena y arcilla.

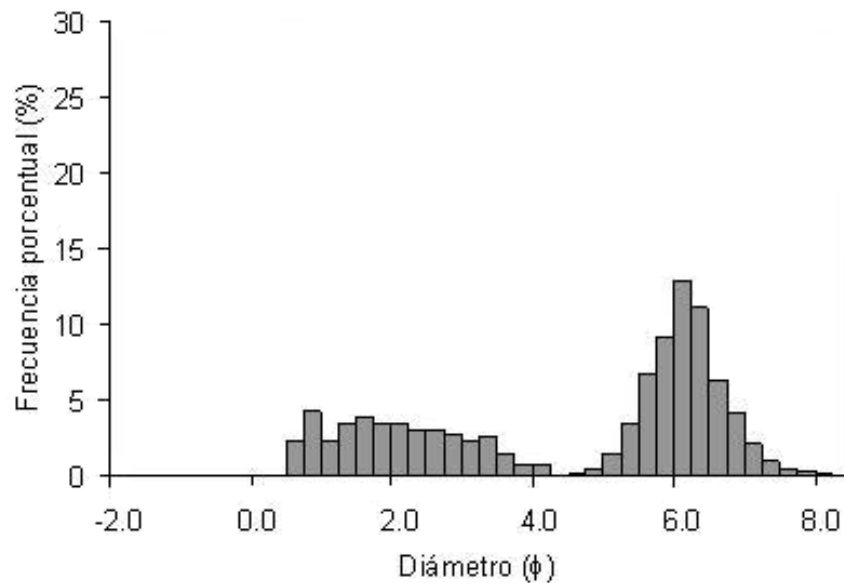


Figura 7. Análisis granulométrico del suelo determinado con Gradistat 4.0.

5.3 Comportamiento del sistema

5.3.1 Compactación

Para observar los efectos de la compactación inicial del suelo en las columnas, la que entrega valores de porosidades diferentes, se realizaron ensayos con suelo inmovilizado de manera diferente.

A medida que se fue agregando agua a las columnas, el suelo presentó una variación de altura gradual. En la Figura 8, se muestra la compactación final (variación de altura) presentada por columnas de porosidad igual a 30% (columnas 1), alimentadas con agua destilada. En un tiempo de 4 horas aproximadamente, el suelo disminuyó alrededor de 15 ± 6 mm a partir de una altura inicial de 23 cm. Por otro lado, columnas alimentadas con agua destilada y porosidad igual a 37% (columnas 2), entregaron lixiviado tras 8 ± 1 horas, mostrando una disminución de altura de 4 mm como máximo valor de compactación final. En la Tabla 7 se presentan valores de porosidad, variación de altura y tiempo para la obtención de lixiviados correspondientes a las columnas 1 y columnas 2.

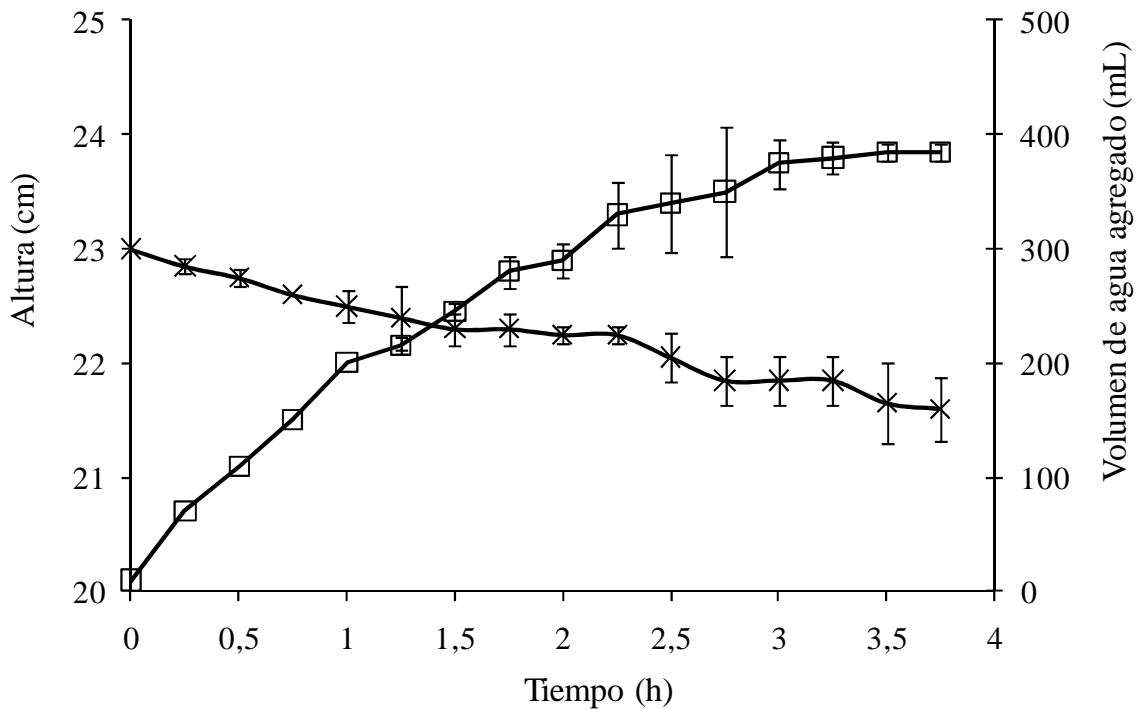


Figura 8. Curva de compactación de suelo en columna de porosidad igual a 30% (Altura (x); Volumen de agua (□)).

Tabla 7. Pruebas de compactación de suelo inmovilizado.

Parámetros	Unidad	Columnas 1	Columnas 2
Densidad	g/cm ³	0,80±0,01	0,98±0,01
Porosidad	%	30	37
Variación de altura	mm	15±6	3±1
¹ Tiempo lixiviación	h	4±0,25	8±1

¹Tiempo necesario para la obtención de lixiviado

5.3.2 Saturación hídrica

La saturación hídrica se determinó promediando los valores de saturación de dos columnas de porosidad igual a 37%, alimentadas con agua destilada (Tabla 8). El tiempo que tomó la saturación y salida de lixiviado de las columnas fue alrededor de 8 horas, con un volumen alimentado de 400 mL aproximados.

Tabla 8. Saturación hídrica de las columnas de suelo.

Parámetros	Unidad	Columna
Alimentación	mL	400±10
Tiempo	horas	8±1
Densidad	g/cm ³	0,99±0,02

Ensayos con purín crudo y efluente anaeróbico de 700 y 350 kg N/ha/año, mostraron el mismo comportamiento que los ensayos utilizando agua destilada con porosidad de 30 y 37%. En la Figura 9 se observa la variación de altura producto de la diferencia en la porosidad, tras la saturación hídrica del suelo con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Se puede apreciar que en la Figura 9b (columna de porosidad igual a 37%), la compactación final o diferencia en altura, es despreciable (menor a 1 mm).

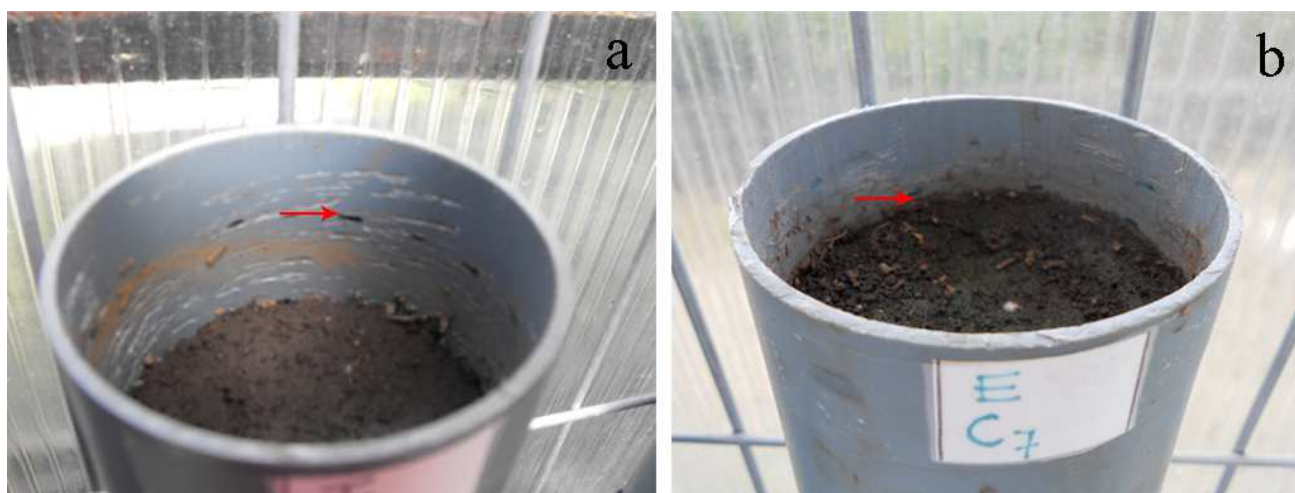


Figura 9. Compactación final en columnas de suelo tras saturación hídrica utilizando efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. a) Columna con porosidad igual a 30%; b) Columna con porosidad igual a 37%. Las flechas rojas indican la altura inicial del suelo.

En la Tabla 9 se presenta la comparación entre ambos tipos de purín de 700 kg N/ha/año. Se utilizaron columnas inmobilizadas con porosidad de 37%, lo que se traduce en 2±1 y 3±1 mm aproximados de compactación final. Para los ensayos posteriores, se trabajó utilizando suelo inmobilizado de porosidad igual a 37%, ya que ésta no genera diferencias en altura que pudieran afectar la lixiviación de formas nitrogenadas o el recuento de bacterias. Se observa una diferencia en los volúmenes lixiviados, siendo las columnas con aplicación de purín crudo las que

retuvieron mayor volumen de su alimentación, presentando un 88% de retención hídrica. El sistema alimentado con efluente anaeróbico retuvo el 80%, mientras que la columna control retuvo el 74% de la alimentación total.

Tabla 9. Lixiviación en columnas alimentadas con purín.

Parámetros	Unidad	Purín crudo	Efluente anaeróbico	Control
700 kg N/ha/año				
Variación de altura	mm	2±1	3±1	3±1
Porosidad	%	36,1±0,5	37,6±0,5	37,4±0,3
Volumen lixiviados	mL	49±19	80±15	105±3

En la Figura 10, se observa una diferencia en el color de los lixiviados obtenidos. El lixiviado de la columna de suelo alimentada con purín crudo de 700 kg N/ha/año presenta color amarillento de mayor intensidad que el lixiviado de la columna alimentada con efluente anaeróbico de la misma carga nitrogenada.

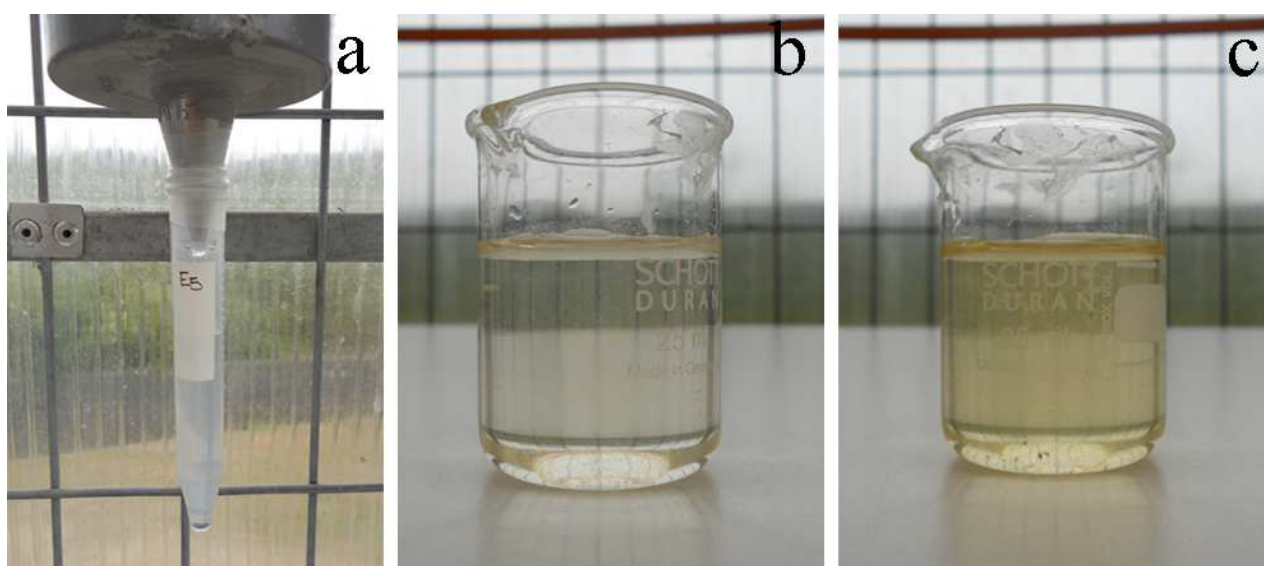


Figura 10. Lixiviados de las columnas de suelo. a) Recepción de lixiviados de las columnas; b) Lixiviado de columna alimentada con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año; c) Lixiviado de columna alimentada con purín crudo de 700 kg N/ha/año.

5.3.3 Curva de humedad

Se realizaron curvas de evaporación y transporte de agua en columnas de suelo alimentadas con agua destilada, purín crudo y efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. En la Figura 11 se presentan las curvas de humedad obtenidas alimentando 400 mL de agua destilada al suelo con diferentes porcentajes de humedad inicial y temperatura ambiente. En la Figura 11a, la curva de humedad corresponde a un suelo inmovilizado con humedad inicial igual a 5% bajo temperatura ambiente entre 10-25°C. La Figura 11b muestra la curva de humedad para el suelo control (suelo utilizado en los ensayos de evaluación de la concentración de coliformes fecales) cuya humedad inicial fue 29% y la temperatura ambiente varió entre 20-38°C.

Las curvas muestran que la temperatura ambiente influyó en la evaporación de humedad. Bajo el mismo volumen de agua agregado, A1 en la Figura 11a y b, presentó los valores de humedad de 37,4% y 41% en el día 1, respectivamente. En las columnas expuestas a menor temperatura ambiente, la disminución de humedad entre el día 1 y 15, fue de 6,63, 0,54 y -2,28% para A1, A2 y A3, respectivamente. A pesar de la humedad inicial mayor (29%) en las columnas expuestas a mayor temperatura ambiente, éstas presentaron una disminución de humedad mayor entre el día 1 y 15, siendo 37,8, 28,4 y 24,7% para A1, A2 y A3, respectivamente. En ambas curvas, se observa que la humedad en A1 desciende, lo que aumenta la humedad en A2 y A3 en los días 8 y 15.

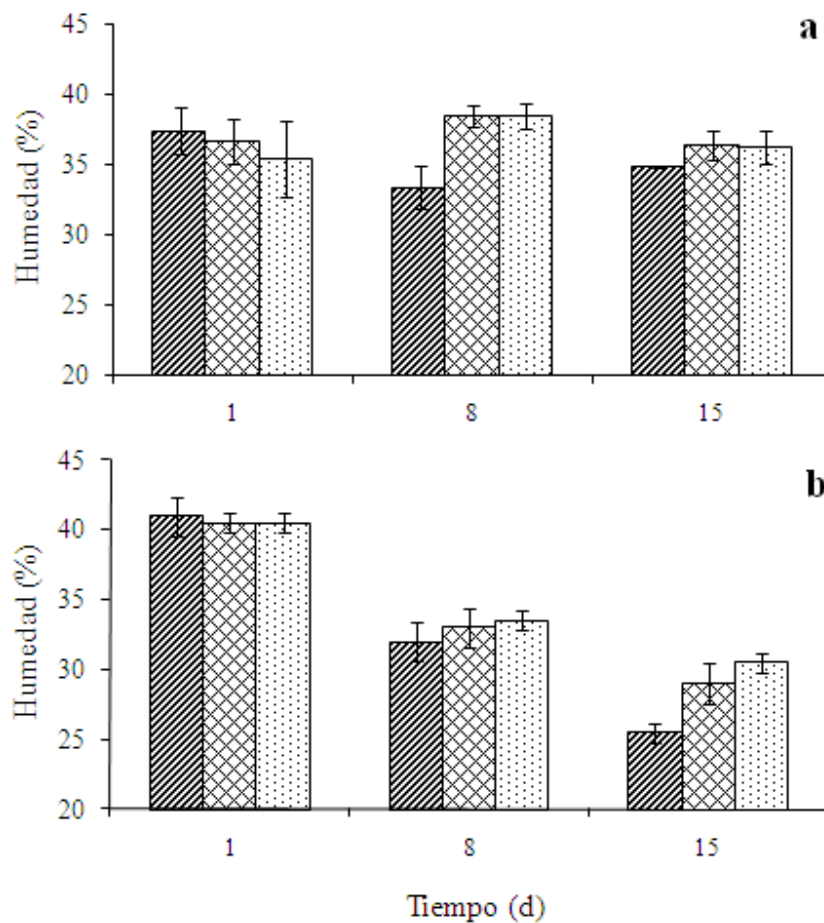


Figura 11. Curvas de humedad en columnas de suelo alimentadas con agua destilada. a) Suelo con 5% de humedad inicial; b) Suelo con 29% de humedad inicial. Los puntos: Altura 1 (▨), Altura 2 (▩) y Altura 3 (▤) son las diferentes alturas en la columna de suelo.

La Figura 12 presenta las curvas de humedad para ensayos alimentados con 400 mL de purín crudo y efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. La humedad inicial del suelo fue de 29% y la temperatura ambiente varió entre 20-38°C. En la Figura 12a, se puede observar que los ensayos con purín crudo de 700 kg N/ha/año, presenta mayor retención de agua al día 15. La disminución de humedad entre el día 1 y 15 para este sistema, fue de 22,6, 21 y 25% para A1, A2 y A3 respectivamente, comparada al sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, con porcentajes de disminución de 22,9, 26,9 y 32,7% para A1, A2 y A3 respectivamente.

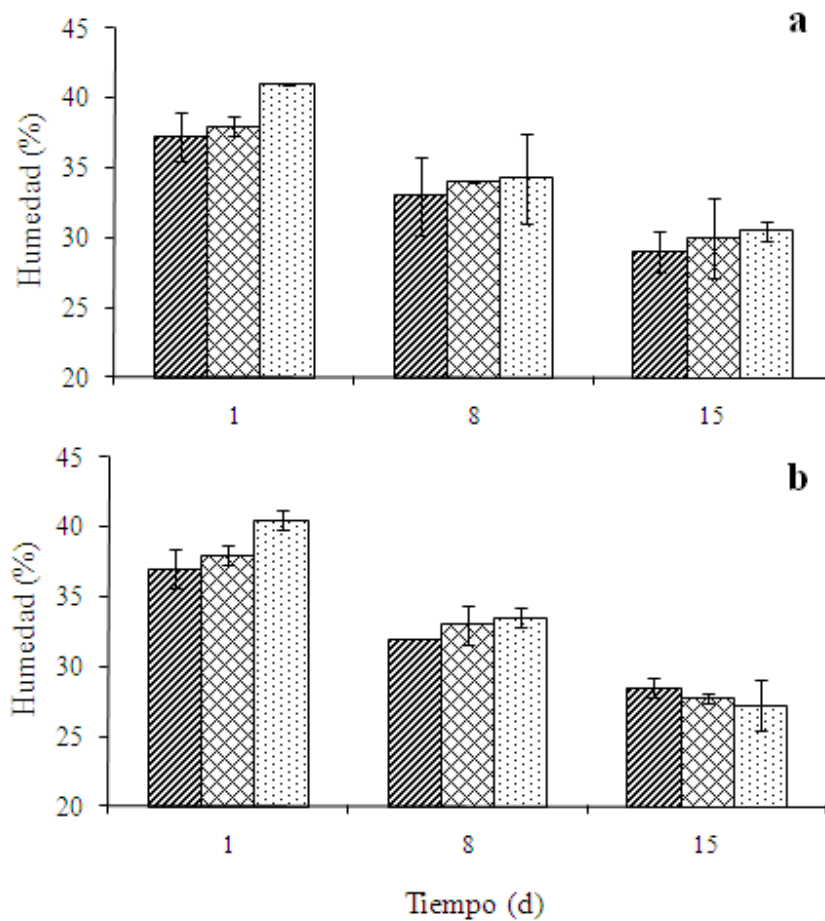


Figura 12. Curvas de humedad en columnas de suelo alimentadas con purín. a) Columnas alimentadas con purín crudo de 700 kg N/ha/año; b) Columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Los puntos: Altura 1 (▨), Altura 2 (▩) y Altura 3 (▧) son las diferentes alturas en la columna de suelo.

5.4 Balance de nitrógeno en las columnas de suelo

En la Tabla 10, se muestran las concentraciones de entrada y salida de las formas nitrogenadas para el día 1 y los valores obtenidos en los lixiviados en el día 15 (finalización del ensayo). Se observa que los valores de salida de nitrógeno total en el sistema control son menores que la suma de amonios y nitratos, en 5 mg/L para el día 1, y en 13 mg/L en el día 15. Esto puede deberse a errores de manipulación y/o detección. En el ensayo control, no se detectó lixiviación de nitrógeno orgánico. La lixiviación de nitrógeno como amonio correspondió al 0,08% del nitrógeno total lixiviado. La concentración de nitrógeno como nitratos que lixivió fue de 655 mg/L, valor que representa a la concentración inicial lixiviada del suelo.

La alimentación con purín crudo de 700 kg N/ha/año, muestra un 85% de N-NH_4^+ respecto del NT. Esta diferencia podría representar a la concentración de nitrógeno orgánico igual a 90 mg/L. La lixiviación de N-NH_4^+ para estas columnas, correspondió al 0,39% del NT lixiviado en el día 1. El valor en el día 15 para N-NH_4^+ (3,2 mg/L) aumentó en un 14% en comparación al valor del primer lixiviado (2,8 mg/L). En comparación al control, el N-NH_4^+ lixiviado del día 1, aumentó en un 80% (2,25 mg/L).

La alimentación con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, presentó un 90% de N-NH_4^+ respecto del NT. La diferencia podría representar a la concentración de nitrógeno orgánico, igual a 55 mg/L, que es aproximadamente la mitad del nitrógeno orgánico encontrado en el purín crudo de 700 kg N/ha/año. El lixiviado del día 1 tuvo un 0,4% de N-NH_4^+ , mientras que en el día 15, el N-NH_4^+ (17 mg/L) resultó como el valor mayor en comparación a todas las alimentaciones

En los ensayos con purín crudo de 350 kg N/ha/año, el NT disminuyó en un 93,4% del día 1 al día 15. El N-NH_4^+ presentó un 66% del NT alimentado, un 0,21% del NT lixiviado en el día 1 y un 12,5% del NT lixiviado del día 15. En los ensayos correspondientes al efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, el N-NH_4^+ alimentado correspondió a un 76% del NT, y a un 0,18% del NT lixiviado.

Tabla 10. Balance de nitrógeno en las columnas de suelo.

Tipo de Alimentación	Parámetro	Unidad	Día 1 Entrada	Día 1 Salida	Día 15 Salida
Control	NT	mg/L	<0,5	650	240
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	<0,5	655	253
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	< 0,05	0,55	0,45
PC (700kg N/ha/año)	NT	mg/L	610	710	55
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	1,35	693	28
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	520	2,8	3,2
EA (700 kg N/ha/año)	NT	mg/L	550	600	220
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	0,75	620	211
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	495	2,4	17
PC (350 kg N/ha/año)	NT	mg/L	300	610	40
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	0,5	627	17
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	200	1,3	5
EA (350 kg N/ha/año)	NT	mg/L	225	660	160
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	<0,5	618	130
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	170	1,2	5,5

PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico.

5.4.1 Retención de N-amonio

En la Figura 13, se presenta la concentración de N-NH₄⁺ alimentada en los sistemas y el porcentaje de retención de este parámetro, correspondiente al día 1. La retención resultó de valores similares para ambos tipos de purín: 99,46, 99,51, 99,35, y 99,29% para purín crudo de 700 kg N/ha/año, efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, purín crudo de 350 kg N/ha/año y efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, respectivamente.

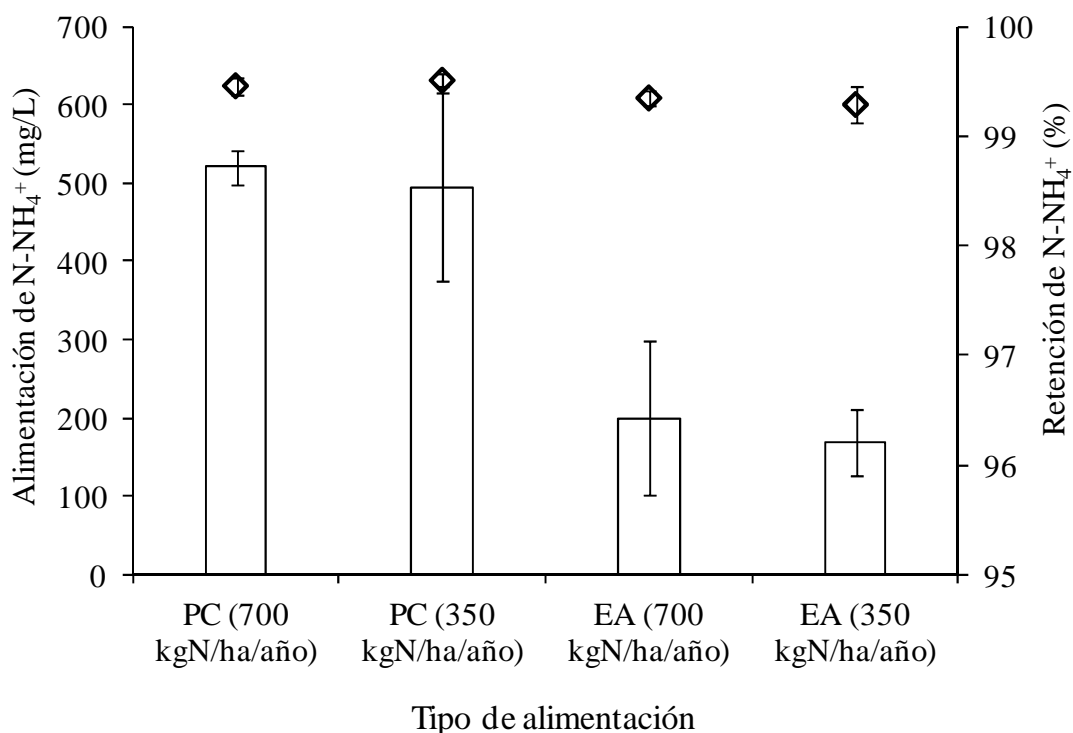


Figura 13. Alimentación (■) y retención (◆) de N-NH₄⁺ en las columnas de suelo (PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico).

5.4.2 Lixiviación de N-nitrato

Respecto a la lixiviación de N-NO₃⁻, se observa que la fuente de esta forma nitrogenada es el suelo, ya que el purín alimentado contiene muy bajas concentraciones de nitratos (entre < 0,5 y 1,35 mg/L). En la Figura 14, se presentan los valores de N-NO₃⁻ lixiviados en los días 1 y 15, donde se puede apreciar que los valores lixiviados en el día 1 son similares en todas las alimentaciones (entre 600 y 700 mg/L). Los valores de salida del día 15 de los ensayos con efluente anaeróbico de 700 y 350 kg N/ha/año y control, se asemejan ya que sobrepasan los 100 mg/L para NT y N-NO₃⁻. Al contrario, los valores del día 15 en los ensayos con purín crudo, no sobrepasan los 60 mg/L para NT y N-NO₃⁻.

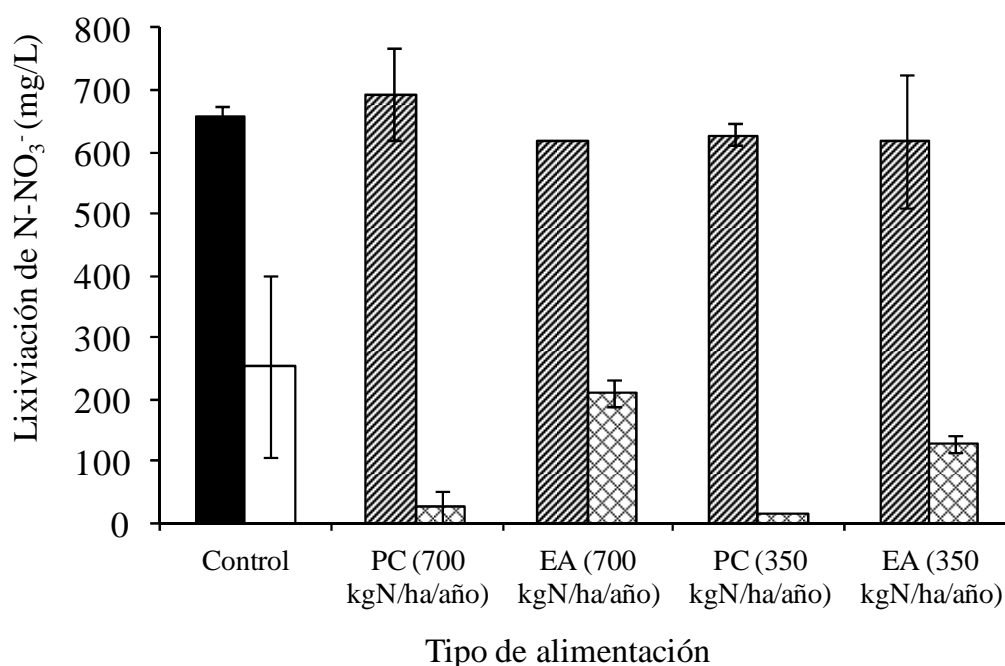


Figura 14. Lixiviación de N-NO₃⁻ en las columnas de suelo. Se presenta la lixiviación del sistema control en el día 1 (■) y día 15 (□) y la lixiviación en los sistemas alimentados con purín en el día 1 (▨) y día 15 (▩) (PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico).

5.5 Balance de materia orgánica en las columnas de suelo

El sistema anaeróbico utilizado presentó un 80% de eficiencia en la reducción de materia orgánica, de acuerdo a los valores de DQO_T obtenidos en las muestras de efluente anaeróbico comparado a los valores correspondientes al purín crudo.

La materia orgánica alimentada y lixiviada (purín crudo y tratado anaeróbicamente de 700 y 350 kg N/ha/año) medida como DQO_T, se presenta en la Tabla 11. Asimismo, se presenta la retención de la DQO_T en el suelo. El lixiviado de la columna control presentó una DQO_T igual a 101,8 ± 18,6 mg/L, valor menor a los lixiviados de las columnas alimentadas con purín, los que resultaron relativamente similares (289,1±9,8, 213,5±48,8, 266,8±56,2 y 226,4±9,8 para purín crudo de 700 kg N/ha/año, efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, purín crudo de 350 kg N/ha/año y efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, respectivamente). El valor de lixiviado control se utilizó para determinar los porcentajes de DQO_T lixiviados (lixiviado real) restándolo de los valores lixiviados brutos de las diferentes alimentaciones. Por medio de este valor, se pudo

observar un aumento en el porcentaje de DQO_T lixiviada a medida que disminuye la DQO_T alimentada.

Tabla 11. Balance de materia orgánica en las columnas de suelo.

Parámetros	Unidad	700 kg N/ha/año		350 kg N/ha/año	
		PC	EA	PC	EA
Alimentación	mg/L	4903±62,7	967±15	2215±331,6	285±14,3
Lixiviado	mg/L	289,1±9,8	213,5±48,8	266,8±56,2	226,4±9,8
Retención	mg/L	4614	753,5	1948,2	58,6
Lixiviado real	%	3,8	11,5	7,4	43,7

PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico.

5.6 Determinación de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo

Las columnas de suelo preparadas para evaluar el recuento y retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+), presentaron una porosidad entre 36 y 38%. La presencia de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) encontrada en el suelo fue de 4×10^4 ufc/mL. En la Tabla 12, se presenta el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los tipos de purín alimentados en los sistemas de columnas de suelo.

Tabla 12. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el purín alimentado.

Parámetros	Unidad	700 kg N/ha/año		350 kg N/ha/año	
		PC	EA	PC	EA
Bacterias entéricas Gram (-) lac (+)	ufc/mL	$4,3 \times 10^7$	5×10^6	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$

PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico

En la Figura 15, se muestran placas con colonias de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) desarrolladas (colonias rojas y rosadas).

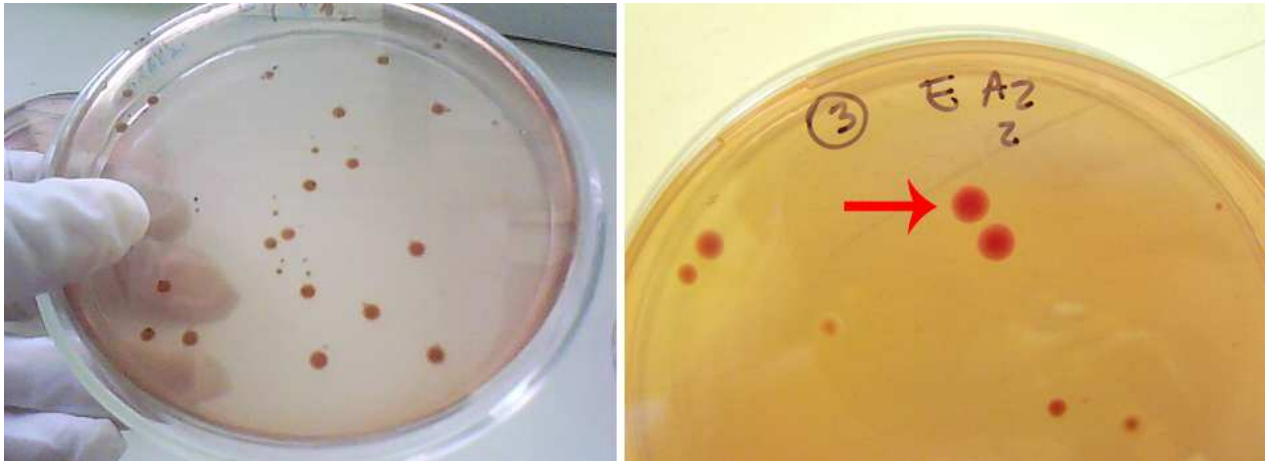


Figura 15. Placas con crecimiento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+). La flecha roja indica una colonia desarrollada.

5.6.1 Recuento de de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los sistemas

El recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en cada tipo de sistema, durante los 15 días de ensayo, se presenta en las Figuras 16, 17, 18 y 19. En la Figura 16, se presenta el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas de las columnas (A1, A2 y A3) y lixiviados del sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año. Los recuentos en A1 y A2, se presentaron similares en el tiempo (comportamiento), siendo la concentración en A2 menor en 1 \log_{10} ufc/mL en los días 3 y 5. En adelante, A1 y A2 presentaron una diferencia de 0,3 \log_{10} ufc/mL aproximadamente. Asimismo, se observó un comportamiento similar entre la curva de A3 y la curva del lixiviado. Hubo una diferencia de 1 a 1,5 \log_{10} ufc/mL entre los días 2 y 10, tras lo cual la diferencia disminuye. En el día 3, se observó un aumento en el recuento en A1 y A2, tras lo cual hubo una disminución abrupta, de 1,26 \log_{10} ufc/mL y 1,21 \log_{10} ufc/mL, respectivamente. Esto coincidió con el punto máximo en el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el lixiviado (6,3 \log_{10} ufc/mL) y además con el aumento de A3 en el día 5.

Entre el día 1 y día 15, se presentó una disminución de un 80, 90 y 35% para A1, A2 y A3, respectivamente. A partir del día 10, se observó en las curvas una tendencia de disminución en el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) (1 \log_{10} ufc/mL, aproximadamente).

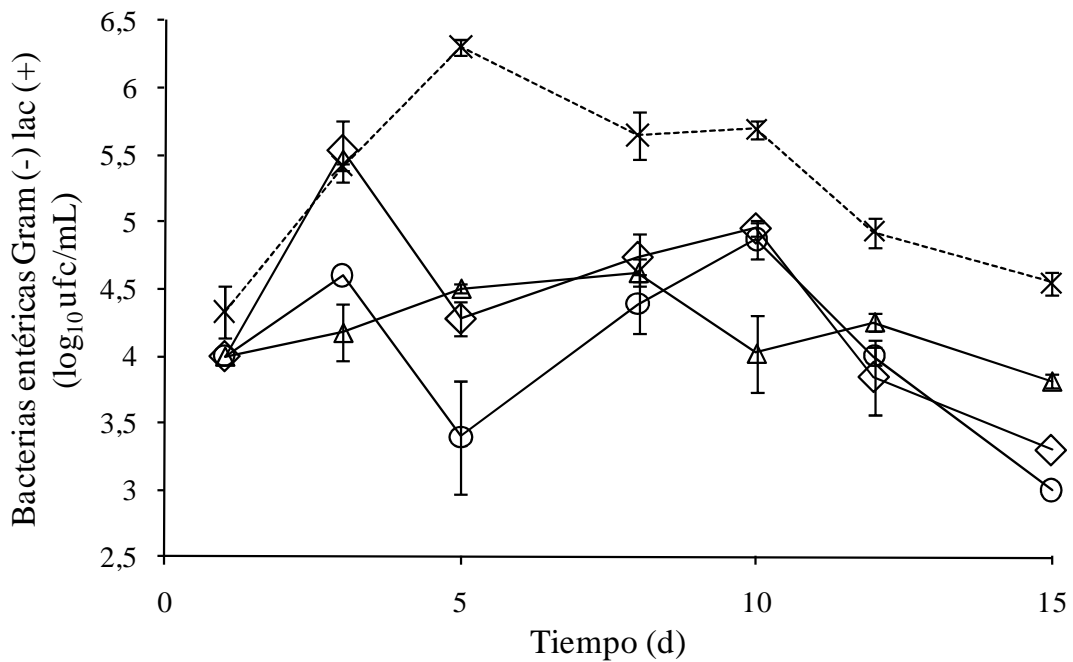


Figura 16. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año. Se presentan las curvas de A1 (◇), A2 (○), A3 (△) y lixiviado (×).

En la Figura 17, se presenta el recuento en las columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Los recuentos iniciales de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en A1, A2 y A3, resultaron menores a los recuentos iniciales en el sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año. Sin embargo, este último presentó en el día 1, un recuento en el lixiviado de 1,36 log₁₀ ufc/mL menos que la concentración en el lixiviado del sistema con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año (5,69 log₁₀ ufc/mL). Esta curva muestra una disminución de 1,6 unidades logarítmicas hasta el día 5, mientras que en el mismo día, A3 aumentó en 0,9 log₁₀ ufc/mL. En el día 8, A2 presentó el recuento más alto (4,5 log₁₀ ufc/mL), a lo que siguió una disminución hasta el día 15. Paralelamente, la concentración de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los lixiviados aumentó de 4,3 a 5,14 log₁₀ ufc/mL. Asimismo, en el día 12, A1 muestra el recuento de menor valor (3,17 log₁₀ ufc/mL), lo que coincide con un aumento en A3 y el lixiviado.

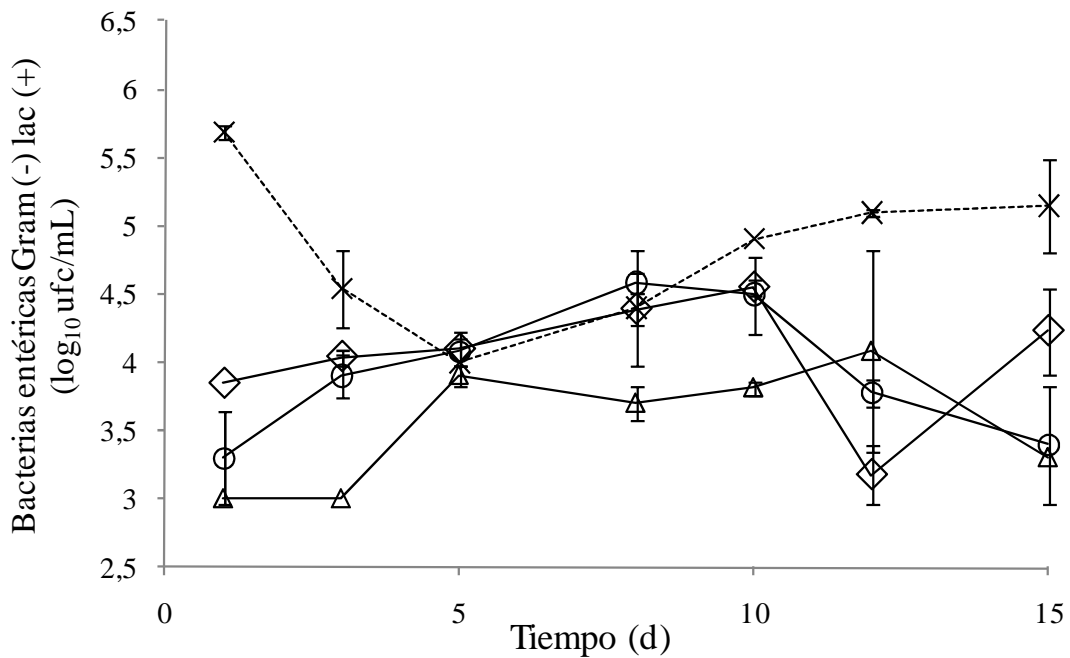


Figura 17. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Se presentan las curvas de A1 (◇), A2 (⊖), A3 (△) y lixiviado (×).

En la Figura 18, se muestra el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas alimentadas con purín crudo de 350 kg N/ha/año. Se observa una diferencia en la curva de lixiviados respecto a la curva de lixiviados del sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año. El recuento resultó uniforme en las muestras de lixiviado (entre 5,1 y 5,6 log ufc/mL), el que presenta una disminución en el día 12 de 0,4 log₁₀ ufc/mL, que coincidió con un aumento de A1, A2 y A3 en 1,2 log₁₀ ufc/mL aproximadamente. En el día 15, A1 y A2 disminuyen (A2 disminuyó 1,17 unidades logarítmicas) mientras que el recuento en la curva de lixiviados aumenta en 0,2 log₁₀ ufc/mL.

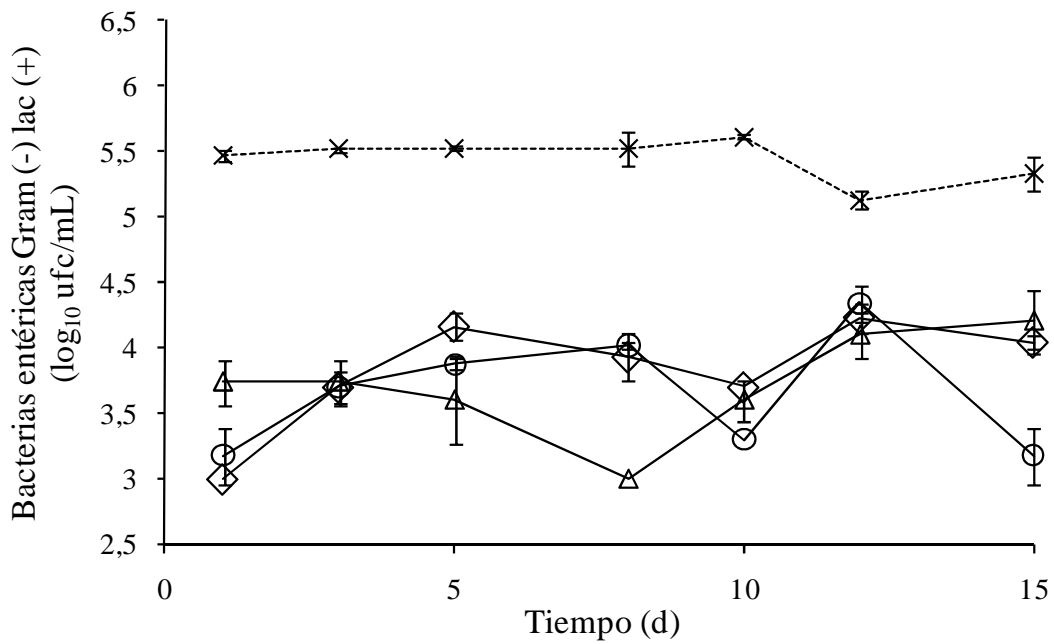


Figura 18. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con purín crudo de 350 kg N/ha/año. Se presentan las curvas de A1 (◇), A2 (○), A3 (△) y lixiviado (×).

En la Figura 19, se presenta el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema de columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año. La presencia de estas bacterias en las alturas A1 y A2 aumenta en los primeros días, comportándose de manera similar durante los 15 días de ensayo. A partir del día 8, se observó una disminución en el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas A1 y A2 (A2 disminuye 95,9% en el día 10). Entre el día 12 y 15, se presentó un aumento en el recuento del lixiviado en 0,95 unidades logarítmicas (88,6%).

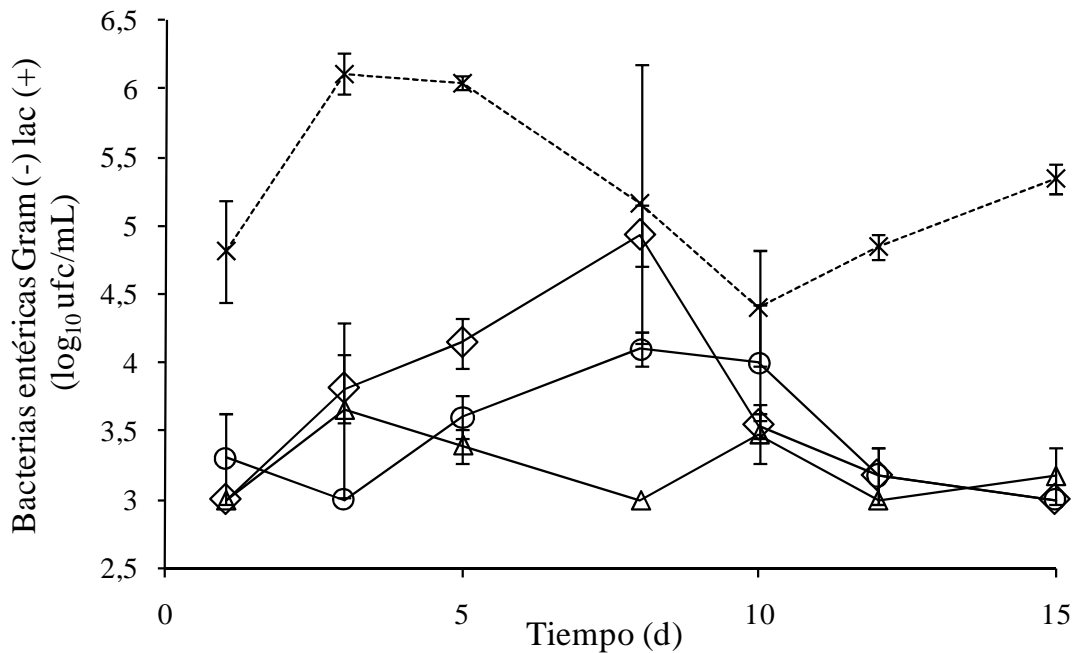


Figura 19. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año. Se presentan las curvas de A1 (◇), A2 (○), A3 (△) y lixiviado (×).

En las cuatro Figuras (16-19), se puede observar que el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) encontrada en las alturas y en el lixiviado, presentó variaciones en el tiempo. Por otro lado, se observa de manera general, que en el tiempo de 15 días, la curva de lixiviados presentó recuentos de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) mayores a los recuentos encontrados en los puntos A1, A2 y A3 de los sistemas. Por otro lado, en A1 y A2 se observó una mayor presencia bacteriana que en la altura A3.

5.6.2 Bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en lixiviados

En la Figura 20, se presenta la presencia de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) presentes en los lixiviados de las columnas de suelo, en los días 1 y 15. El sistema control presentó un recuento de 3×10^4 ufc/mL ($4,46 \log_{10}$ ufc/mL) en el día 1. Para el día 15, presentó un recuento en el lixiviado de 9×10^3 ufc/mL ($3,95 \log_{10}$ ufc/mL), mostrando una disminución de 69,4% ($0,51 \log_{10}$ ufc/mL) respecto del día 1. El sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año, presentó un comportamiento parecido al control en cuanto a presencia en el lixiviado en los días 1 y 15. En este sistema, el recuento del día 1 fue de $2,2 \times 10^4$ ufc/mL ($4,33 \log_{10}$ ufc/mL), lo que significó un 27% en disminución comparado al control. En el día 15, el recuento fue de $3,5 \times 10^4$

ufc/mL, lo que significó un aumento de 74% respecto al control del día 15. El sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, presentó el recuento más alto en el lixiviado en el día 1, de $4,9 \times 10^5$ ufc/mL ($5,69 \log_{10}$ ufc/mL), mostrando un 93,4% de aumento comparado al control y 95,6% ($1,36 \log_{10}$ ufc/mL) de aumento respecto al purín crudo de 700 kg N/ha/año. Éste último, fue el único sistema que presentó un recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el lixiviado menor al sistema control. El sistema alimentado con purín crudo de 350 kg N/ha/año, presentó 3×10^5 ufc/mL ($5,47 \log_{10}$ ufc/mL), presentando un aumento de 92,8% respecto al sistema alimentado con purín crudo de mayor carga nitrogenada. Por otro lado, el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, presentó $6,5 \times 10^4$ ufc/mL ($4,81 \log_{10}$ ufc/mL) en el lixiviado, mostrando una disminución de 86,7%, respecto al sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Las columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año y purín crudo de 350 kg N/ha/año, presentaron una disminución entre el recuento encontrado el día 1 y el día 15.

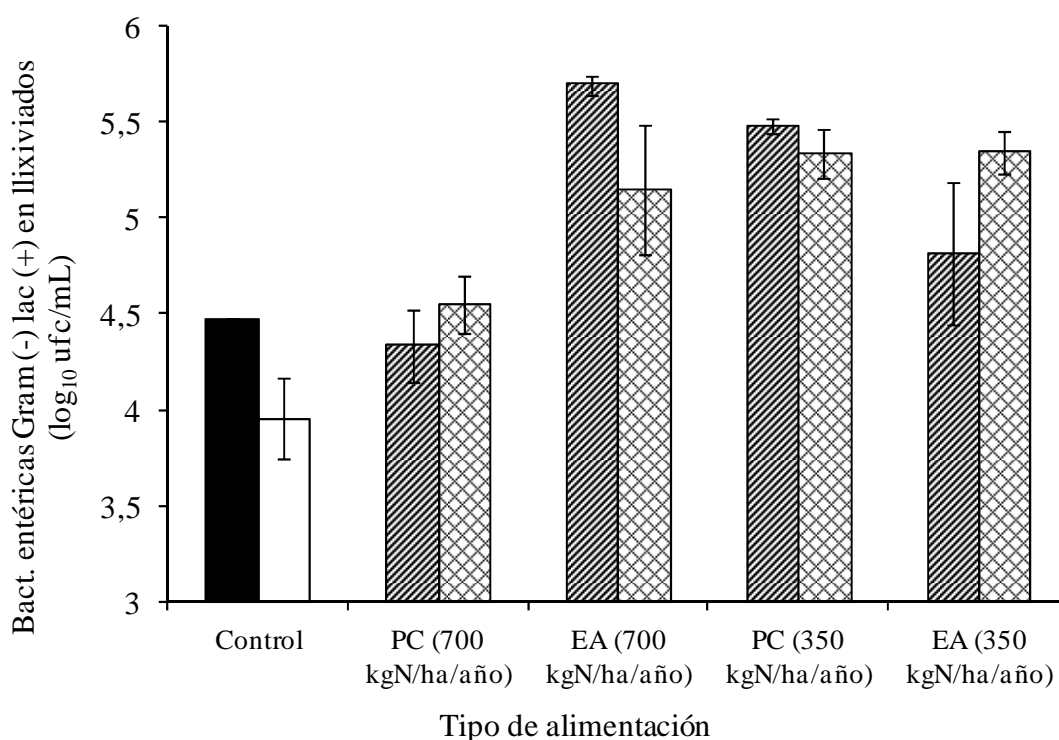


Figura 20. Bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el lixiviado correspondiente al sistema control en los días 1 (■) y 15 (□) y a los sistemas alimentados con purín en los días 1 (▨) y 15 (▩) (PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico).

La Figura 21 presenta el recuento total de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) alimentada (día 1) en los diferentes sistemas y también, el recuento total o de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) presente en el lixiviado durante los ensayos.

De mayor a menor, la presencia total de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los lixiviados fue de 6,52, 6,46, 6,31 y 5,95 \log_{10} ufc/mL para el lixiviado del sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año, efluente anaeróbico 350 kg N/ha/año, purín crudo de 350 kg N/ha/año y efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, respectivamente. El recuento total en los lixiviados tuvo una diferencia de 74% entre el purín crudo y efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año. Por otro lado, la diferencia del recuento total de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) entre el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 700 y 350 kg N/ha/año, fue de 69%. Todos los sistemas presentaron una disminución en la presencia de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los lixiviados respecto a la alimentación, a excepción del lixiviado total obtenido en el sistema alimentado con efluente anaeróbico 350 kg N/ha/año (45,4% de aumento).

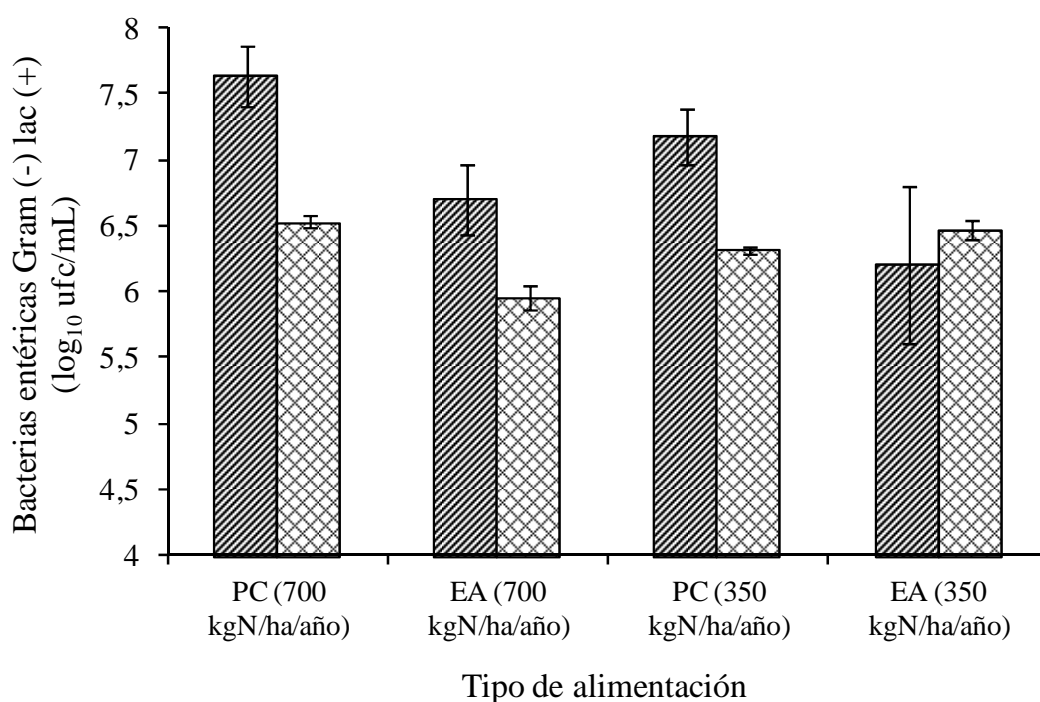


Figura 21. Recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) alimentada (▨) y recuento total en los lixiviados (▩) (PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico).

5.7 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+)

5.7.1 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las columnas de suelo

Los porcentajes de retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+), obtenidos mediante la Ecuación 4, se muestran en la Tabla 13. Los porcentajes de retención, calculados respecto a la alimentación aplicada por medio de los tipos de purín y al recuento presentado en los lixiviados, muestran que en el tiempo de 15 días, hubo mayor retención en las columnas alimentadas con purín crudo de 700 kg N/ha/año. Este sistema presentó en el día 1, una retención entre la alimentación y lixiviación, de tres unidades logarítmicas lo que entrega un porcentaje de retención de 99,9%. La alimentación con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año presentó en el día 8 la retención más alta, de casi tres unidades logarítmicas (99,5%), mientras que el porcentaje de retención más bajo, se presentó en el día 1 con un 90,2%. Los dos sistemas alimentados con purín crudo, presentaron un porcentaje de retención mayor a los sistemas alimentados con efluente anaeróbico.

En las columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, se observó un porcentaje de retención de carácter variante comparado a las otras alimentaciones. Además, este sistema presentó menor retención de bacteriana comparado a los otros sistemas, a excepción de los días 1 y 10.

Tabla 13. Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los sistemas (%).

Tiempo (d)	PC	EA	PC	EA
	700 kg N/ha/año		350 kg N /ha /año	
1	99,95	90,20	98	95,93
8	98,96	99,50	97,80	90,90
10	98,86	98,40	97,26	98,43
12	99,80	97,50	99,10	95,62
15	99,91	97,20	98,56	86,25

PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico.

5.7.2 Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por superficie de suelo

El contenido de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) alimentado y presente en los lixiviados de las columnas de suelo, se extrapola a una hectárea de superficie. En esta aproximación, se asume una superficie plana (sin presencia de pendiente) y propiedades

texturales e hídricas homogéneas. En la Tabla 14, se presentan los valores para bacterias entéricas Gram (-) lac (+) que se presentarían en cada tipo de purín aplicado en una hectárea de suelo, además, la retención de éstas en los días 1 y 15. En el día 1, se observaría la mayor retención en la superficie con purín crudo de 700 kg N/ha/año (99,9%), seguido por la superficie con purín crudo de 350 kg N/ha/año (97,9%), efluente anaeróbico 350 kg N/ha/año (96,2%) y finalmente la menor retención se presentaría en la superficie alimentada con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año (90,1%).

Tabla 14. Retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por superficie de suelo.

Parámetros	Unidad	PC	EA	PC	EA
		700 kg N/ha/año		350 kg N /ha /año	
Alimentación	ufc mL ⁻¹ ha ⁻¹	1,05x10 ¹⁴	1,22x10 ¹³	3,68x10 ¹³	3,93x10 ¹²
Lixiviado (día 1)	ufc mL ⁻¹ ha ⁻¹	5,28x10 ¹⁰	1,20x10 ¹²	7,36x10 ¹¹	1,49x10 ¹¹
Retención (día 1)	%	99,94	90,19	97,99	96,20
Lixiviado (día 15)	ufc mL ⁻¹ ha ⁻¹	8,59x10 ¹⁰	3,43x10 ¹¹	5,28x10 ¹¹	5,40x10 ¹¹
Retención (día 15)	%	99,91	97,19	98,56	86,24

PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico

En la Figura 22, se presenta la materia orgánica que se aplicaría a una hectárea de suelo (determinada mediante la extrapolación de la aplicación en las columnas) y la retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por superficie, en los días 1 y 15. La mayor retención (99,9%) se presentaría en el día 1, utilizando purín crudo de 700 kg N/ha/año, tipo de purín con mayor concentración de materia orgánica (4801±85 kg DQO_T/ha/año). La menor retención (86,2%), se presentaría en el día 15, utilizando efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año, tipo de purín con la menor concentración de materia orgánica (287±12 kg DQO_T/ha/año).

La gráfica presentada en la Figura 22, muestra que la relación entre materia orgánica y retención bacteriana, es directa. Se observa, sin embargo, una excepción en esta relación directa, que es la retención en el sistema alimentado con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año en el día 1, que presentó un 96,2% de retención.

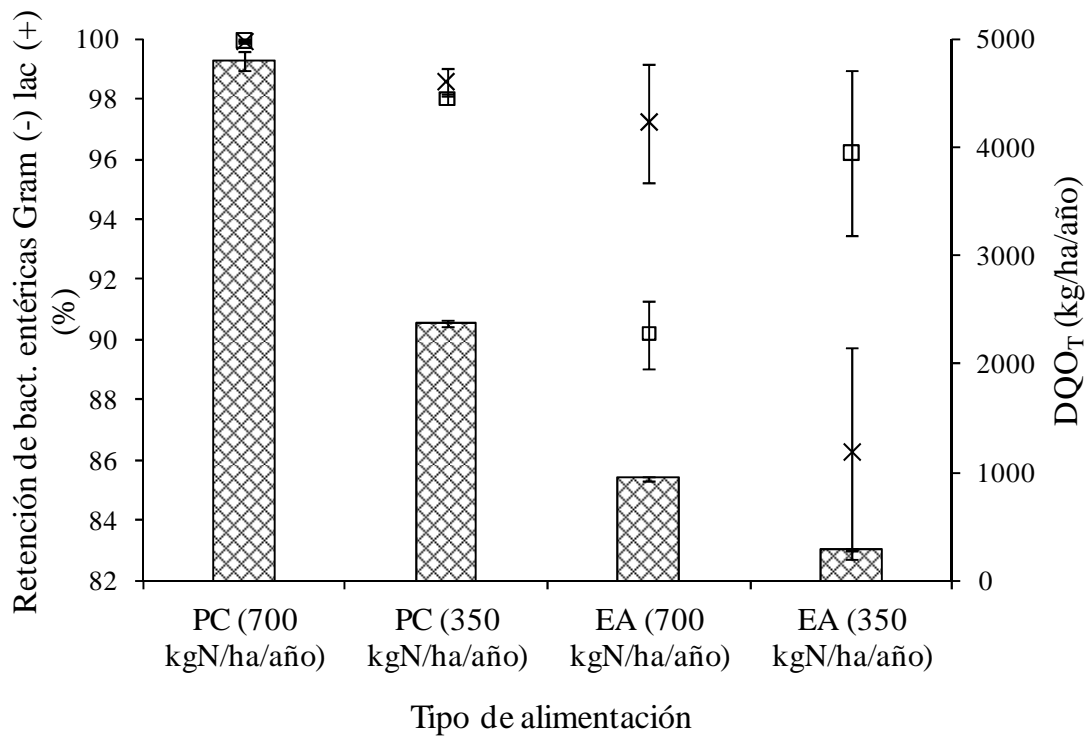


Figura 22. Relación entre la DQO_T aplicada (x) y retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) por hectárea de suelo en el día 1 (□) y 15 (x) (PC: purín crudo; EA: efluente anaeróbico).

6 DISCUSIÓN

La textura determinada para el suelo utilizado, limo medio, concuerda con la textura reportada por Qualanz (2005), que establece una textura franca limosa para el suelo del Fundo San Guillermo. Ambas determinaciones corresponden a la clasificación de texturas francas y medias para un suelo (Rucks y col., 2004). El porcentaje de materia orgánica del suelo franco limoso es 15%, lo que es alto, si se tiene en cuenta que un suelo de pradera en promedio contiene aproximadamente 6% de materia orgánica en los primeros 15 cm, y que un suelo agrícola tiene un contenido de materia orgánica entre 3 y 6% (Silva, 2004). El resultado obtenido, puede deberse al aporte en compuestos orgánicos mediante biofertilización previa del predio de donde se obtuvo el suelo. Por otro lado, debido a que al tamizar, no se rechazaron raíces o semillas, lo que se evidencia por medio del crecimiento de biomasa, como plantas pequeñas, a lo largo de los ensayos.

Tras los ensayos de compactación de suelo, se eligió trabajar con el tipo de compactación que entregó a las columnas una porosidad adecuada según bibliografía, de acuerdo al tipo de suelo inmovilizado. Lewis y Sjöstrom (2010), reportan que un suelo limoso inmovilizado debiera tener un rango de porosidad entre 34 y 61% si está compactado adecuadamente, mientras que Gregory y Walling (1985), establecen una porosidad entre el rango de 20 a 50% para suelos limosos, rangos en los que tienen lugar los valores obtenidos para el suelo de textura limo medio utilizado en las experiencias (porosidad entre 36 y 38%).

Al ser la humedad y flujo aplicado, factores de importancia respecto al grado de compactación de un suelo, no resulta recomendable aplicar purín en épocas de altas precipitaciones, ya que éstas contribuyen a aumentar el estado de saturación hídrica, y por ende, la compactación. La disminución de aire en los poros del suelo, provocada por la inundación y compactación del mismo, afecta a los organismos presentes (ya que se forma una zona completamente anaeróbica) y a las transformaciones naturales del nitrógeno. La nitrificación, proceso donde el amonio se oxida para transformarse en nitrato, puede verse desfavorecido debido a la carencia de oxígeno. Por lo tanto, bajo condiciones de extrema humedad, resulta más probable que el rendimiento de un cultivo biofertilizado se vea disminuido, no así, en un suelo de compactación moderada y con humedad apropiada para el cultivo en particular (University of Minnesota, 2011).

Respecto al balance de nitrógeno, la columna control presentó una baja lixiviación de nitrógeno como amonio igual a 0,55 mg/L, lo que indicaría que tiene un contenido igual a la

concentración lixiviada, o bien, que el suelo presentó una retención importante de este compuesto. Esto último se confirma, ya que el N-NH_4^+ presente en el purín fue retenido casi en su totalidad por la matriz de suelo en los cuatro sistemas (se obtuvieron porcentajes de retención mayores a 99%). El estudio de Núñez-Delgado y col. (2002), reporta una retención de amonio de al menos 86% en suelos francos y franco limoso, inmovilizados en columnas de 50 cm de largo, alimentadas con purín de vacuno tras lo cual se mantuvo la saturación del suelo con agua destilada. En los ensayos realizados en este trabajo, utilizando un tipo de suelo de características similares pero en columnas de menor longitud (23 cm de largo) y sin saturación hídrica posterior, la retención del compuesto fue mayor. Según Montoya y Martín (2005), la adsorción de amonio en las partículas de suelo depende esencialmente de la granulometría y del largo de la columna, por lo que este último puede ser un factor que explique la diferencia entre los porcentajes de retención obtenidos y los resultados de Núñez-Delgado y col. (2002). Según Asprocer (2005), la migración y retención de N-NH_4^+ y N-NO_3^- depende además, del grado de saturación hídrica del suelo. En un suelo no saturado con aplicación intensiva y controlada de purín, puede retenerse prácticamente el 100% de estas tres formas nitrogenadas, a una profundidad de 3 metros.

El alto porcentaje de retención de N-NH_4^+ determinado, puede considerarse como una carga potencial para la nitrificación y posterior lixiviación de nitratos a napas freáticas. En un contexto de alta pérdida de humedad, como ocurre en la estación de verano, donde por consiguiente existiría un aumento de aireación y oxígeno en los poros del suelo, la nitrificación se vería favorecida en el tiempo. Esto significa que la aplicación de purín crudo de 700 kg N/ha/año tendría mayor potencial nitrificante en períodos de temperaturas elevadas, y por consiguiente, de lixiviación de nitratos comparado a las aplicaciones de cargas con contenido menor de amonio. En todas las alimentaciones, el N-NH_4^+ aumentó comparando el primer lixiviado con el último, posiblemente debido a la hidrólisis de materia orgánica proveniente del purín, lo que genera acumulación de amonio en el suelo que pudo lixiviar. En el día 15, el sistema alimentado con purín crudo 700 kg N/ha/año presentó lixiviados de concentraciones de NT con 165 mg/L menos comparado al sistema alimentado con efluente anaeróbico de la misma carga. Asimismo, el sistema alimentado con purín crudo 350 kg N/ha/año, presentó en el lixiviado 120 mg/L menos que el lixiviado del sistema con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año. Este hecho puede atribuirse a procesos de pérdida de nitrógeno del sistema ocurridos dentro de los 15 días de ensayo, como es la inmovilización de nitrógeno por parte de microorganismos presentes en el purín crudo, en el cual se observó una mayor densidad microbiológica en comparación a sistemas

con efluente anaeróbico (al menos dos unidades logarítmicas de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) más que el efluente anaeróbico que fueron cuantificadas). Por otro lado, es posible que el proceso de desnitrificación se haya favorecido, debido a las condiciones de anaerobiosis dadas por la saturación hídrica inicial del suelo y por el taponamiento de poros causado por el alto contenido en sólidos y conglomerados orgánicos del purín crudo.

El sistema anaeróbico redujo la concentración de coliformes fecales en el purín crudo en dos unidades logarítmicas, tal como expresan Sobsey y col. (2006) y Smith y col. (2008) para sistemas anaeróbicos mesófilos. Mediante la observación en el tiempo del recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas A1, A2 y A3 y lixiviados de los sistemas, se podría establecer que el aumento de la presencia de las bacterias dentro de la columna, conllevaría a la ocupación de los espacios de adsorción bacteriana, como partículas orgánicas o de suelo, hasta un punto de saturación en ellos, que derivaría en el transporte bacteriano. Los fenómenos ocurridos dentro de los sistemas alimentados con los distintos tipos de purín, como son la variación de temperatura y humedad, tendrían estrecha relación con la presencia de bacterias en los lixiviados.

Las variaciones (fluctuación poblacional) en la concentración bacteriana dentro de las columnas de suelo, observadas durante el período de 15 días, podrían deberse a cambios en la temperatura ambiente, variación en la humedad del suelo y disponibilidad de nutrientes como factores principales (Rufete y col., 2006). Dentro del laboratorio piloto-invernadero, la temperatura durante el día se mantuvo sobre 20°C con máximos de 38°C, lo que pudo generar cambios en la temperatura del suelo inmovilizado, así como también una evidente evaporación de la humedad contenida. La pérdida de humedad entre los días 1 y 15 en la altura A3 de las columnas con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, fue de 32,7%, mayor a la pérdida de humedad presentada en las columnas con purín crudo de 700 kg N/ha/año, la que resultó en un 25%. La materia orgánica retiene humedad (Rucks y col., 2004), por lo que la pérdida de humedad en los sistemas podría explicarse debido a la mayor concentración de materia orgánica presente en el purín crudo, respecto al efluente anaeróbico con un 20% del contenido original de materia orgánica. De la misma manera, las columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, presentaron mayor transporte de agua, evidenciado por el volumen de lixiviados que resultó mayor que el volumen lixiviado de las columnas alimentadas con purín crudo en un 39%. A su vez, el mayor transporte de agua observado en los sistemas alimentados con efluente anaeróbico, estaría relacionado con la menor retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+).

La variación en el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas de las columnas, también se puede explicar mediante las relaciones interespecíficas entre organismos, como competencia y predación. Éstas afectan la sobrevivencia y comportamiento entre las diferentes especies bacterianas que conforman el grupo de las bacterias entéricas y poblaciones bacterianas endémicas del suelo u otras. Por otro lado, en condiciones ambientales adversas o inestables, las bacterias pueden presentar un metabolismo eficiente que permite la reproducción y sobrevivencia eficaces (Atlas y Bartha, 2002).

Para el contexto de los ensayos, las bacterias se encontraron en condiciones ambientales variadas que pudieron afectar el metabolismo y sobrevivencia, tales como la variación de temperatura (obtención de purín que se encuentra a temperatura ambiente, el posterior almacenamiento a 4°C, la dilución de purín a temperatura ambiente y la temperatura dentro del laboratorio piloto) y las condiciones de suelo donde principalmente se detectaron cambios en la humedad. Lo anterior, considerando una baja aplicación de materia orgánica (< 0,3 g/L), podría explicar la alto recuento total de bacterias en las columnas alimentadas con efluente anaeróbico de 350 kg N/ha/año (6,46 log₁₀ ufc/mL). Por otro lado, las condiciones ambientales dentro de este sistema pudieron haber resultado ideales para el desarrollo bacteriano (disponibilidad de nutrientes y humedad). Plaza y col. (2004) indica que la aplicación de purín de cerdo a suelos, genera una reactivación de las propiedades biológicas mediante la enmienda de sustratos (fuentes de carbono), estimulando de esta manera la proliferación microbiana.

En este estudio, la retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) presentó el mayor porcentaje (99,95%) en el sistema alimentado con purín crudo de 700 kg N/ha/año. Estos resultados indican que para una aplicación de purín, la retención bacteriana resulta menos eficiente utilizando purín tratado anaeróbicamente, en el que la materia orgánica se ve reducida, rechazándose de esta manera la hipótesis planteada. Se determinó una relación directa entre la retención bacteriana y el contenido en materia orgánica. El recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+), que incluye especialmente a *Escherichia coli*, puede sugerir la presencia de contaminación fecal, pues este organismo es el indicador de contaminación fecal más utilizado y a la vez, es el mayor exponente de este grupo indicador de patógenos (representa más del 94% del grupo de coliformes fecales) (Valenzuela, 2009). Estrada y col., 2004, realizaron un monitoreo microbiológico del suelo tras la aplicación de lodos provenientes una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Uno de estos lodos fue tratado anaeróbicamente y dispuesto en el suelo. Se realizó un recuento de Enterobacteriaceae, coliformes fecales y

Escherichia coli, presentando un recuento de $2,8 \times 10^6$, $7,4 \times 10^5$ y $2,2 \times 10^5$ ufc/g de lodo, respectivamente. Se puede decir que en una muestra de lodo principalmente se presentarán coliformes fecales como Enterobacteriaceae y dentro del grupo de coliformes fecales, principalmente se presentará *E. coli*. Por lo anterior, puede existir una relación entre el porcentaje de retención determinado en este estudio y el porcentaje de retención de indicadores de contaminación fecal.

Guber y col (2007), realizaron experimentos para evaluar el acoplamiento de coliformes fecales a partículas de suelo en presencia y en ausencia de purín de vacuno. Se determinó el coeficiente de acoplamiento K_s , entre coliformes fecales y partículas de suelo, en donde K_s resultó 513 mL/g para un suelo franco en ausencia de purín, mientras que en presencia de purín (presencia de sólidos y materia orgánica), K_s dio un valor de 27,2 mL/g, lo que significa una disminución en las uniones suelo-bacteria en presencia de purín y un aumento en las uniones purín-bacteria.

Unc y Goss (2003), plantean que las partículas orgánicas en suspensión propician sitios de adsorción apropiados para bacterias, la que en una primera instancia aumenta y facilita el transporte bacteriano. Sin embargo, las partículas orgánicas en suspensión, en adición a conglomerados entre bacterias y componentes orgánicos, eventualmente podrían causar obstrucción en los poros del suelo, aumentando la retención bacteriana. Mosaddeghi y col. (2009), compararon el transporte de *E. coli* en columnas (25 cm de altura) con diferentes texturas de suelo alimentadas con tres tipos de residuos orgánicos: estiércol de ave, estiércol de vacuno y agua residual. La mayor concentración de coliformes fecales se presentó en el estiércol de ave con 2 unidades logarítmicas más que los otros residuos. Esta alta concentración ($4,5 \times 10^8$ ufc/g), sumada a la fuerza iónica (546 mmol/L) similar a la solución de estiércol de vacuno y mucho más alta que la fuerza iónica del agua residual (67,6 mmol/L), pudieron favorecer la formación de complejos bacteria-materia orgánica (cuyo tamaño supera a las células individuales excesivamente). La filtración de estos complejos se vería facilitada comparado a las bacterias individuales, lo que explicaría la mayor filtración en columnas alimentadas con solución de estiércol de ave en una primera instancia. Al continuar la filtración, se observó un efecto contrario, debido a la obstrucción de poros mediante la acumulación de componentes orgánicos, tal como indican Unc y Goss (2003).

Se conoce que el aumento en la concentración de electrolitos aumenta la unión de bacterias a partículas sólidas. Unc y Goss (2004), Guber y col. (2007) al igual que Mosaddeghi y

col. (2009), reportan un aumento en las asociaciones entre bacterias y partículas sólidas, al aumentar también la concentración de iones y electrolitos en el suelo por medio del purín. En este trabajo, el purín crudo presentó una conductividad eléctrica mayor (16 mS/cm) a la conductividad eléctrica del efluente anaeróbico (14 mS/cm), factor que puede ayudar a explicar las diferencias en retención de bacterias en el suelo entre ambos tipos de sistemas alimentados con purín.

Mosaddeghi y col. (2009), establecen que existe una relación directa entre la concentración de bacterias en el estiércol alimentado y la concentración de bacterias presentes en el lixiviado. Esta relación, puede ser aplicada en este estudio para explicar la lixiviación total encontrada, ya que las columnas alimentadas con purín crudo de 700 kg N/ha/año, a pesar de presentar la mayor retención, presentaron también el mayor recuento total de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los lixiviados (6,52 log₁₀ ufc/mL).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la extrapolación de la retención bacteriana a una hectárea de predio, señala que ésta tras una aplicación de purín, sería mayor utilizando purín crudo de 700 kg N/ha/año (99,9%), con el que se estarían aplicando 4801 kg de DQO_T/ha/año. Es así como el suelo regado con efluente anaeróbico de 700 kg N/ha/año, con el que se estarían aplicando 948 kg de DQO_T/ha/año, presentaría una retención de 90,1%. Visto desde otra perspectiva, la aplicación de purín crudo de 700 kg N/ha/año, presentaría una contaminación por bacterias entéricas Gram (-) lac (+) mayor en el suelo, debido a la mayor retención en tres unidades logarítmicas. Estas bacterias retenidas provenientes del purín, podrían transportarse a través de la matriz de suelo con facilidad en una situación de fertirriego intenso o precipitaciones, pues el suelo con su capacidad completamente saturada, posiblemente arrastraría bacterias y lixiviaría contaminantes hasta las napas subterráneas.

Respecto al efecto del tipo de textura, Guber y col. (2007) reportan que la retención y adsorción de coliformes fecales es menor en partículas de limo en presencia de compuestos orgánicos del purín ($K_s = 10$ mL/g), en comparación a fracciones de limo en ausencia de purín ($K_s = 82$ mL/g). Igualmente, se encontraron valores más altos de K_s en un suelo limoso y en fracciones de arcilla que en fracciones de arena ya sea en la presencia o ausencia de purín. Aulenbach y col. (1974), reportaron remoción del 99% de coliformes por medio del tratamiento de un efluente de aguas servidas por 3 metros de arena. Bouwer (1974), observaron una retención en 99,99% de coliformes fecales tras un tratamiento por suelo franco arenoso de efluente de aguas servidas, de 9 metros de profundidad. Es así como la profundidad (distancia a napas

freáticas), sería un factor de importancia para la retención bacteriana y de enterobacterias patógenas en suelos.

Desde una perspectiva de impacto ambiental, es posible establecer que si en el horizonte B o C de un suelo predomina la fracción arcillosa, bajo la acción de contaminantes no controlados, probablemente se observaría una alta retención de microorganismos por el efecto del tipo de partículas. Por el contrario, si en estos horizontes predomina la fracción arenosa, se presentaría una lixiviación y transporte mayor de los elementos solubles como el nitrato, partes solubles de materia orgánica y microorganismos patógenos.

La digestión anaeróbica, cuya finalidad es reducir la materia orgánica del purín, es la tecnología de tratamiento secundario más utilizada dentro del sector de la industria porcina. Aunque de acuerdo a los resultados obtenidos, la utilización de efluente anaeróbico presentó una retención menor en dos unidades logarítmicas en comparación al sistema alimentado con purín crudo, la presencia de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en los lixiviados fue menor en 2461500 ufc/mL ($0,57 \log_{10}$ ufc/mL). La obtención de purín tratado anaeróbicamente, es la dirección que ha tomado la industria durante los últimos años, por lo que la aplicación en suelos de este efluente debe ser investigada con mayor profundidad. La eficiencia del uso del suelo franco limoso, como medio depurador de microorganismos como bacterias entéricas y coliformes fecales, tras aplicación de purín tratado, podría ser más alta que lo observado en este estudio. Para lograr esto y reducir el transporte de patógenos, sería importante mantener control sobre: la saturación hídrica del suelo, momento de aplicación y tasa de purín aplicada, como establecen Joy y col. (1998) y Powelson y Mills (2001). Sobsey y col. (2006) expresa que la reducción de patógenos en el suelo es potencialmente alta (reducción mayor a 4 unidades logarítmicas) y muy variable (depende de muchos factores ambientales), pero que aún falta información para determinar parámetros concisos como tiempo de sobrevivencia de patógenos en el suelo, flujo de aplicación, tipo de riego y tipo de suelo.

En el contexto chileno, no hay estudios relativos a la contaminación fecal por aplicación en suelos de purín porcino. No existen normativas específicas para tratar este subproducto de la industria, sin embargo, el uso incorrecto y descontrolado puede derivar en infracción a normativas chilenas relativas al cuidado de la agricultura y la salud. Se requiere más conocimiento acerca del desarrollo potencial de patógenos en condiciones ambientales proporcionadas por el riego de purín, sobrevivencia en el tiempo después de tratamientos, en adición a información relativa a la aplicación de efluentes en suelos (Venglovsky y col., 2009).

Sólo la información suficiente permitirá disponer de buenas prácticas de manejo y contención de los contaminantes provenientes del purín porcino, que permita la seguridad de la cadena alimentaria humana y a la vez, aseguren la protección del medio ambiente.

7 CONCLUSIONES

- Más del 99% del N-NH_4^+ fue retenido en el suelo, mientras que más del 90% del nitrógeno total lixiviado en el día 1, correspondió a N-NO_3^- proveniente del suelo.
- No se observó una relación entre la concentración de nitrógeno total aplicada y la retención bacteriana en el suelo.
- Por medio de la determinación de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas A1, A2 y A3 de la columna de suelo y lixiviados, se puede concluir que el aumento en el recuento de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en las alturas, estaría provocando una saturación en estos puntos, lo que conllevaría al aumento en la presencia de bacterias en el lixiviado.
- La retención de bacterias entéricas Gram (-) lac (+) en el suelo se vio afectada por el contenido en materia orgánica presente en los tipos de purín alimentados. Se determinó que la relación entre la retención y la materia orgánica dispuesta en el suelo es directa.
- El suelo franco limoso inmovilizado en columnas, fue capaz de retener bacterias entéricas Gram (-) lac (+) hasta en 3 unidades logarítmicas.
- Como proyección, se puede establecer que para resguardar las napas freáticas de contaminación por bacterias entéricas, es necesario controlar el flujo de aplicación de purín y la saturación hídrica de los suelos, especialmente en suelos de texturas gruesas (arenosas). De esta manera, el uso de efluente anaeróbico como biofertilizante, podría presentar una retención bacteriana mayor a la determinada en este estudio.
- La mayor retención de bacterias entéricas Gram (-) lactosa (+) se presentó en el sistema alimentado con purín crudo, mientras que la menor retención se presentó en el sistema alimentado con efluente anaeróbico. Se rechaza de esta manera la hipótesis planteada.

8 AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto FONDECYT 1090414. “The elimination of nitrogen utilizing natural chilean zeolites in biological treatment: nitrification via nitrite, simultaneous nitrification – denitrification and anammox system”.

Al Proyecto Innova Bio Bio 07-PC S1-198 “Generación de Información para el Diseño y operación de sistemas de tratamiento de bajo costo y ambientalmente sustentable para planteles porcinos. Director Principal J.L. Arumi Financiamiento”

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, que permitió gran parte del financiamiento del trabajo experimental de esta tesis.

9 BIBLIOGRAFÍA

- APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 18th Ed., Washington D.C.
- Atlas R., Bartha R. (2002). Ecología microbiana y Microbiología Ambiental (Capella I., Ayerra S., ed), Pearson Educación, Madrid, 677 pp.
- Aulenbach D., Glavin T., Rojas J. (1974). Protracted recharge of treated sewage into sand. Part 1. Quality changes in vertical transport through sand. *Ground Water* (12), 161-169.
- Blume E., Bischoff M., Reichert J., Moorman T., Konopka A., Turco R. (2002). Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Appl. Soil Ecology* (20), 171-181.
- Bonmatí A., Magrí A. (2007). Tecnologías aplicables al tratamiento de las deyecciones ganaderas: un elemento clave para mejorar su gestión. *Residuos ganaderos* (97), 46-69.
- Bouwer H. (1974). Renovating municipal wastewater by high-rate infiltration for ground-water recharge. *Jour. Am. Water Works Assoc.* (66), 159-162.
- Choi E., Yun Z., Chung T. (2004). Strong nitrogenous and agro-wastewater: current technological overview and future direction. *Water Sci. Technol.* (49), 1-5.
- Choi, E. (2007). Piggery waste management: towards a sustainable future. Publishing IWA, 174 pp.
- Diocaretz M. (2010). Aspectos técnicos y económicos de procesos de higienización de lodos provenientes de tratamientos de aguas servidas. Tesis de pregrado para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental, Universidad de Concepción, Chile. 118 pp.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2009). El estado mundial de la agricultura y la alimentación.
- Fávero G., Katz R. (1998). El uso de normas de calidad y de emisión en la gestión de los recursos hídricos, en Estudios Públicos (Centro de Estudios Públicos, ed.), pp. 85-104, Santiago, Chile.
- Feder F., Findeling A. (2006). Retention and leaching of nitrate and chloride in an andic soil after pig manure amendment. *Eur. J. Soil Sci.* (58), 393-404.
- Fischer E., Whalen S. (2005). Rates and controls on denitrification in an agricultural soil fertilized with liquid lagoonal swine waste. *Nutr. Cycl. Agroecosyst* (71), 271-287.

- Gesche E., Vallejos A., Saez M. (2003). Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). Arch. Med. Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Gessel P., Hansen N., Goyal S., Johnston L., Webb J. (2004). Persistence of Zoonotic Pathogens in Surface Soil Treated With Different Rates of Liquid Pig Manure. *Appl. Soil Ecol.* (25), 237-243.
- Gregory K., Walling D. (1985). Drainage Basin Form and Process; A Geomorphological approach, 7 pp.
- Guber A., Shelton D., Pachepsky Y. (2005). Transport and Retention of Manure-Borne Coliforms in Soil. *Vadose Zone J.* (4), 828-837.
- Guber A., Pachepsky Y., Shelton D., Yu O. (2007). Effect of Bovine Manure on Fecal Coliform Attachment to Soil and Soil Particles of Different Sizes. *Appl. Environ. Microbiol.* (10), 3363-3370.
- Hamza M., Anderson W. (2005). Soil compaction in cropping systems. A review of the nature, causes and possible solutions. *Soil Tillage Res.* (82), 121-145.
- Henry J., Heinke G. (1999). Ingeniería Ambiental, Pearson Educación, 800pp.
- Holley R., Guan T., (2003). Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-Review. *J. Environ. Qual.* (32), 383-392.
- Hutchison M., Walters L., Moore A., Avery S. (2005). Declines of Zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *Appl Microbiol.* (99), 58-65.
- IFA (Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes). (2002). Los fertilizantes y su uso. 77 pp.
- Jensen L., McQueen D., Sheperd T. (1996). Effects of soil compaction on N-mineralization and microbial-C and -N. I. Field measurements. *Soil Tillage Res.* (38), 175-188.
- Ji Z. (2008). Hydrodynamics and water quality: modeling rivers, lakes, and estuaries, Wiley-Interscience, New Jersey, 676 pp.
- Joy D., Lee H., Reaume C., Whiteley H., Zeling S. (1998). Microbial Contamination of Subsurface Tile Drainage Water From Field Applications Of Liquid Manure. *Can. Agric. Eng.* (40), 153-160.
- Kay P., Blackwell P., Boxall A. (2005). Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere* (60), 497-507.

- Kearney T., Larkin M., Levett P. (1993). The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* (74), 86-93.
- Lewis J., Sjöstrom J. (2010). Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *J. Contam. Hydrol.* (115), 1-13.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2004). Brock, Biología de los Microorganismos, Pearson Educación, 1011 pp.
- Maier R., Pepper I., Gerba C. (2008). Environmental Microbiology (Maier R., ed), Academic Press, Amsterdam, 624 pp.
- McManus J. (1988). Grain size determination and interpretation, en Techniques in sedimentology (Tucker M., ed) pp 63-85, Blackwell Science, Oxford.
- Montoya M., Martín M. (2005). Análisis de la Varianza (ANOVA) en Ensayos de Lixiviación de N-purín en Columnas Experimentales. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo* (7), 15-21.
- Mosaddeghi M., Mahboubi A., Zandsalimi S., Unc A. (2009). Influence of organic waste type and soil structure on the bacterial filtration rates in unsaturated intact soil columns. *J. Environ. Manage.* (90), 730-739.
- Núñez-Delgado A., López-Periágo E., Díaz-Fierros-Viqueira F. (2002). Pollution attenuation by soils receiving cattle slurry after passage of a slurry-like feed solution. Column experiments. *Bioresour. Technol.* (84), 229-236.
- Peralta J. (2005). Recomendaciones Técnicas para la Gestión Ambiental en el Manejo de Purines de la Explotación Porcina. Colección de Libros INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), N° 18: 1-204 pp.
- Plaza C., Hernández D., García-Gil J., Polo A. (2004). Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biol. Biochem.* (36), 1577-1585.
- Powelson D., Mills A. (2001). Transport of *Escherichia coli* in Sand Columns with Constant and Changing Water Contents. *J. Environ. Qual.* (30) 238-245.
- Provolo G. (2005). Manure management practices in Lombardy (Italy). *Bioresour. Technol.* (96), 145-152.
- Qualanz (2005). Declaración de Impacto Ambiental. Proyecto Plantel de Engorda de Cerdos Fundo San Guillermo.
- Rufete B., Perez-Murcia M., Perez-Espinoza A., Moral R., Moreno-Caselles J., Paredes C. (2006). Total and faecal coliform bacteria persistence in a pig slurry amended soil. *Livest. Sci.* (102), 211-215.

- Sánchez M., González J. (2005). The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* (96), 1117-1123.
- Seoáñez M. (1999). Contaminación del suelo: Estudios, tratamiento y gestión, Mundi-Prensa, Madrid, 352 pp.
- Smith J., Surampalli R., Reimers R., Tyagi R., Lohani B. (2008). Disinfection Processes and Stability Refinements to Biosolids Treatment Technologies. *J.Hazard Toxic Radioact. Waste* (12), 10-17.
- Sobsey M., Khatib L., Hill V., Alocilja E., Pillai V. (2006). Pathogens in animals waste and the impact of waste management practices on their survival, transport and fate, en *Animal Agriculture and the Environment: National Center for Manure and Animal Waste Management* (Rice J., Caldwell D., Humenik F., ed) pp. 609-666, ASABE, St. Joseph, Michigan.
- Ternicier, C. (2005). Planteamiento de un modelo teórico de indicadores para la evaluación del impacto ambiental de sistemas intensivos de producción de carne porcina de exportación. Tesis para obtener el grado de Magister, Universidad Católica de Temuco, Chile. 86 pp.
- Unc A., Goss M. (2003). Movement of faecal bacteria through the vadose zone. *Water Air Soil Pollut* (149), 327-337.
- Unc A., Goss M. (2004). Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Appl. Soil Ecol.* (25) 1-18.
- Valenzuela M. (2009). Origen, dinámica espacio-temporal y factores ambientales relacionados con la contaminación microbiológica de las aguas subterráneas de una microcuenca rural de secano. Tesis para obtener el grado de Doctor, Universidad de Concepción, Chile.
- Venglovsky J., Sasakova N., Placha I. (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour. Technol.* (100), 5386-5391.
- Watcharasukarn M., Kaparaju P., Steyer J., Krogfelt K., Angelidaki I. (2009). Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb. Ecol.* (58), 221-230.
- Wentworth, C. (1922). A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geol.* (30), 377-392.
- Zagal E., Sadzawka R. (2007). Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos. Universidad de Concepción, Chile, 103pp.

