



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD AGUDA DE PURINES DE CERDO  
A TRAVÉS DE LA METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN Y  
EVALUACIÓN DE TOXICIDAD (TIE) MEDIANTE *DAPHNIA MAGNA*

SEMINARIO DE TÍTULO PRESENTADO A LA FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

**Teresa Angélica Cañuta Flores**

Concepción, Chile 2009

**DEDICATORIA**

*...LELITA*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Teresa y Pedro, hermanos Verónica y Andrés, por su cariño y constante apoyo, sin ellos no habría podido llegar al final.

A mi gran familia, mi Lelita, mi tío Enrique, mi tío Raulito y mi tía Ine por su gran apoyo moral y económico y por haber confiado en mi hasta las últimas consecuencias.

A mis amigos Doly, Lepe, Angelito, Cesar y Paty.

A mi profesora Gladys por su constante apoyo y por darme la oportunidad de haber desarrollado una tesis fascinante, sin usted no hubiera podido terminar mi carrera.

A la Sra. Jaque, por sus largas horas de laboratorio, paciencia y cariño.

A mis compañeras del Laboratorio de Biotecnología Ambiental Sole, Pelu.y en especial a Alejandra Villamar, por su amistad y apoyo científico.

A los que se quedan en el tintero, que son muchos, no los puedo nombrar porque no terminaría nunca, pero saben que fueron parte importante de esta etapa.

Y finalmente A TI... Williams, con todo mi corazón y amor...

Para todos ustedes Gracias de Corazón

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. La Industria Porcina y sus procesos productivos .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Características de los Purines.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Impactos de los purines de cerdo al ambiente.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Gestión ambiental de la producción porcina.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5. Tecnologías aplicadas en el tratamiento de purines de cerdo.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6. Bioindicadores de la toxicidad en purines porcinos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7. Procedimiento de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE) .....</b>	<b>22</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Objetivo General.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Procedimiento de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE) .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Fase de caracterización .....	26
4.1.2. Caracterización físico-química del efluente de purín de cerdo.....	26
4.1.3. Protocolo de bioensayo agudo .....	29
4.1.4. Análisis estadístico de resultados: PROBIT .....	31
4.1.5. Fraccionamiento a través de la metodología TIE .....	32
4.1.6. Análisis de los resultados.....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>

<b>5.1. Caracterización físico-química de la muestra y toxicidad .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2. Efectos de los tratamientos sobre los parámetros físico-químicos. ....</b>	<b>38</b>
<b>5.3. Pruebas toxicológicas.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. Comparación de resultados de los fraccionamientos seleccionados.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5. Fase de Confirmación .....</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSIÒN .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1. Parámetros físico-químicos.....</b>	<b>52</b>
<b>6.2. Pruebas toxicológicas.....</b>	<b>53</b>
<b>6.3. Evaluación e Identificación de la Toxicidad (TIE) .....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>58</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> .	30
<b>Tabla 2.</b> Caracterización físico-química del efluente purín de cerdo.	36
<b>Tabla 3.</b> Valores de Toxicidad (LC50 48h) de los distintos fraccionamientos incluido el test de referencia y los valores de UT.	46
<b>Tabla 4.</b> Correlación del porcentaje de disminución de los parámetros físico-químicos sospechosos de causar toxicidad con el LC <sub>50</sub> de los fraccionamientos más significativos (I.A. I.C. C.A. y EDTA).	50

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivos de <i>Daphnia magna</i>	31
<b>Figura 2.</b> Bioensayo agudo: purín de cerdo	31
<b>Figura 3.</b> Metodología TIE	32
<b>Figura 4.</b> TIE-Fraccionamientos	32
<b>Figura 5.</b> Dosis-Respuesta de purín de cerdo	37
<b>Figura 6.</b> Dosis-LC50	37
<b>Figura 7.</b> Comparación de la variación de la DQO entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	38
<b>Figura 8.</b> Comparación de la variación de la NT entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	39
<b>Figura 9.</b> Comparación de la variación de la PT entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	40
<b>Figura 10.</b> Comparación de la variación de la DBO <sub>5</sub> entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	41
<b>Figura 11.</b> Comparación de la variación de la Cl <sup>-</sup> entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	42
<b>Figura 12.</b> Comparación de la variación de la SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	43
<b>Figura 13.</b> Comparación de la variación de la NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	44
<b>Figura 14.</b> Comparación de la variación de la CE entre los diferentes fraccionamientos y el test de referencia.	45
<b>Figura 15.</b> Perfil de reducción de la toxicidad (%RT)	47
<b>Figura 16.</b> Comparación de las concentraciones de los diferentes parámetros físico-químicos evaluados después de la selección de los fraccionamientos.	49
<b>Figura 17.</b> Correlación del porcentaje de disminución de NaCl con el LC50 para los fraccionamientos más significativos (I.A, I.C, C.A y EDTA)	50

## RESUMEN

El sector porcino en Chile, ha aumentado exponencialmente la producción de carne durante los últimos años, con un crecimiento anual del 9,3%, debido a dos factores: el aumento en las exportaciones y en el consumo interno. Este crecimiento económico ha significado aumentar la generación de purines (mezcla de excretas y agua de lavado). Los purines se caracterizan principalmente por altos contenidos en sólidos, materia orgánica, nutrientes, alta conductividad, desinfectantes y antibióticos identificados pero no cuantificados. Actualmente, los purines se están aplicando directamente al suelo y éstos podrían estar generando impactos negativos, tanto en suelo como agua, debido a su capacidad para producir eutrofización, contaminación de nitratos en aguas subterráneas, entre otros.

Para mitigar estos efectos, es necesario realizar acciones en el proceso de gestión interna, como la implementación de tecnologías adecuadas para la eliminación de materia orgánica, nutrientes y toxicidad. Sin embargo, una caracterización confiable de efluente es la base para una toma de decisión adecuada, en el uso e implementación de tecnología y/o disposición final.

En este contexto el procedimiento de Evaluación e Identificación de la Toxicidad (TIE), es una herramienta adecuada para evaluar e identificar los componentes principales en el efluente que generan toxicidad aguda. La información generada por la aplicación de esta herramienta a un efluente de las características de un purín de cerdo, es fundamental para decidir la forma de mitigar la contaminación.

Debido a todo lo antes indicado, el objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización química y toxicológica del efluente de purín de cerdo e identificar los compuestos específicos que causan toxicidad aguda, a través de la utilización del procedimiento de Evaluación e Identificación de la Toxicidad (TIE).

El purín de cerdo presenta valores para los parámetros físico-químicos como pH (7,3), DQO (20,58 g/L), DBO<sub>5</sub> (7,2 g/L), Cl<sup>-</sup> (1,78 g/L), NT (2,5 g/L) y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0,9 g/L) relativamente altos, comparados por ejemplo con aguas servidas domésticas. Es importante indicar que los valores de conductividad son mayores a 750 µmhos/cm, lo que indica la presencia de un elevado contenido de sales en este subproducto. Todos

estos parámetros se ven acusados en el valor de la toxicidad aguda ( $LC_{50} = 3,39\%$ ) realizado a través de bioensayos con *Daphnia magna*.

Aplicando 12 tratamientos de los indicados en la metodología TIE, se pudo constatar que solo 3 lograron reducir la toxicidad, siendo el más significativo, el test de Intercambio Aniónico que disminuyó la toxicidad (% RT = 22,5%), ya que redujo cloruros (45,8 %) y CE (8,82%); por otro lado, el Test de Intercambio Catiónico aumentó la toxicidad (% RT = - 624,4%), debido a que redujo  $NH_4^+$  (95,6%) y NT (96,8%) y mantuvo la concentración de cloruros (0,56%), lo que sugiere que la toxicidad se debe a compuestos aniónicos. En la fase de confirmación mediante correlación se identificó que el compuesto causante de la toxicidad son los Cloruros, ya que la correlación fue positiva y alta (0,66).

**Palabras claves:** Purín porcino, TIE, toxicidad aguda, *Daphnia magna*, caracterización físico-química.

## ABSTRACT

In the last years, the meat production of pig Chilean industry has increased exponentially, with annual growth of 9.3% due to two factors: international exportation and domestic consumption. Parallel with the economic growth, also, environmental impacts and manure production are increased.

Manure (mixture of excreta and washing water) production is mainly dependent of the animal's physiological state, food amount and quality, water consumption and the animals number on the farmer. The manure is characterized mainly by high solids content, organic matter, nutrients, high conductivity and some antibiotics identified but not quantified. Environmental impacts are related to the directly manure disposal on soil. Eutrophication problems on aquatics systems due to the high rate of nutrient and organic matter can be observed, as well as, pollution of the underground water by nitrate lixiviation.

To minimize the environmental impact, wastewater treatment of the manure can be considered. Most of them are directed to remove solid, organic matter and nutrient compounds. However, evaluation of the influent and effluent quality is necessary before final disposal of the treated effluent.

The acute toxicity assays by using daphnids and the Toxicity Identification Evaluation (TIE) tests can be a very useful tool to evaluate the ecotoxicological treated effluent to be discharged into the aquatic ecosystem.

The aim of this study was to evaluate the physico-chemical and toxicological characterization of raw manure and treated effluent using the TIE methodology.

As results physico-chemical parameters such as pH (7.3), COD (20.58 g/L), BOD<sub>5</sub> (7.2 g/L), Cl<sup>-</sup> (1.78 g/L), NT (2.5 g/L) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0.9 g/L) show the high level of pollutant contained in the manure compared with sewage wastewater, as example. LC<sub>50</sub> of the raw manure was 3.39 %, using *Daphnia magna* as indicator. Under TIE application, it was found that 3 of them were efficient for reducing acute toxicity. In special, anion exchange test was able to reduce the RT = 22.46% of acute toxicity due that it reduced Cl<sup>-</sup> (45.5%) and EC (8.82%): On the other hand, the cations exchange obtained the highest acute toxicity (RT = -624.4%) due that it reduced NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (95.6%), TN (96.8%) and it maintained the chlorides (0.56%), so it demonstrates too that anions in the

effluent are causing the acute toxicity. In the confirmation phase correlation was identified through the compound causing the toxicity is the chlorides, since the correlation was positive and high (0,66).

Keywords: Manure, TIE, acute toxicity, *Daphnia magna*, physic-chemical characterization.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. La industria porcina y sus procesos productivos**

La Industria porcina aporta con más del 39% de la producción mundial de carne para consumo humano, lo que equivale a 15,3 kg persona/año, siendo en su conjunto el sector con mayor presencia dentro de la actividad agropecuaria (FAO, 2009). Uno de los mayores países productores y consumidores es China, con un 49%, seguido por EE.UU. (9%), Alemania (4,3%) y Brasil (3%) (INE, 2008).

Chile, a pesar de no figurar como uno de los principales países productores de carne de cerdo a nivel mundial, es segundo a nivel sudamericano (9%) con un crecimiento del 9,3% anual y proyectándose en el 2010 al 14,3%. Esto se ve sustentado por un aumento en el consumo interno, incremento en las exportaciones de los últimos 4 años (38% anual) y por el Tratado de Libre Comercio (TLC) firmado y ratificado con algunos países.

Durante el año 2008, la producción de carnes blancas en Chile, fue de más de 1 millón 128 mil toneladas en vara, de las cuales un 46,3% corresponden a carne de cerdo con una producción de 522.423 toneladas de carne de cerdo en vara. Actualmente el 60% de la producción de carne de cerdo, se destina al consumo nacional, mientras que el 40 % restante es exportado. Actualmente, la exportación de carne porcina en Chile, está abarcando mercados muy exigentes (*e.g.* Corea del Sur, Japón, Alemania, Italia entre otros), siendo Corea del Sur el destino preferido de exportación del sector porcino (31.754 toneladas netas) (ASPROCER, 2009).

Alrededor del 94,5% de la actividad porcina en nuestro país, se concentra geográficamente entre la Región de Valparaíso y la Región de La Araucanía, siendo las regiones Metropolitana (14,1%) y Libertador General Bernardo O'Higgins (74,4%) las que reúnen la mayoría de los planteles de cerdo en Chile (85%) (ASPROCER, 2009; INE 2009). Por otra parte, la Región del Biobío ocupa el tercer lugar en producción (13,3 %) con 27 planteles de cerdo, concentrados básicamente en la provincia de Ñuble (81,85 %). Cabe mencionar, que el sector en la región, ha tenido un crecimiento progresivo pasando del 0,81% (2003) al 5,8% (2005) (SEIA, 2009).

La industria porcina, ha desarrollado un sistema productivo por etapas, vinculado con el desarrollo fisiológico (fases de crecimiento) de los cerdos, y diversificado de acuerdo a los requerimientos nutricionales específicos para cada estado. Dichas etapas se dividen en tres sitios: el primero, relacionado con el proceso de producción de lechones hasta la fase de destete (monta, gestación y lactancia), el segundo, asociado a fases de cría y re-cría de los lechones hasta alcanzar un peso aproximado de 60 kg y finalmente, la tercera fase, en la que los animales alcanzan un peso final de alrededor de 100 kg correspondiente a la etapa de engorde (German *et al.*, 2005).

## **1.2. Características de los Purines**

Los sistemas de producción intensiva en confinamiento, donde se concentra un alto número de animales en un espacio reducido, han generado a nivel mundial, serios problemas sociales (malos olores, vectores, otros) y medioambientales, que están referidos básicamente a contaminación, debido a la disposición final de los vertidos a los ecosistemas. Entre ellos, los efluentes pueden contener 20 g/L de Demanda Química de Oxígeno (DQO), sobre 2,08 g/L de Nitrógeno total y más de 0,18 g/L de fósforo total (Belmonte *et al.*, 2008). Específicamente, un criadero de 500 hembras reproductoras, con una producción de 20 cerdos vendidos por hembra al año, puede producir una cantidad de efluentes similar a una ciudad de 25.000 habitantes (Ternicer, 2005).

El aumento del tamaño de los criaderos de cerdo en los sistemas de producción intensiva, conlleva al incremento de los residuos generados por esta industria, principalmente purines (5,63 L/animal/d). Estos residuos están compuestos por las excretas de los animales (60% orina y 40% heces) y el agua utilizada en el proceso de lavado de los planteles (Belmonte *et al.*, 2008).

La cantidad y composición de los purines de cerdo y sus características los hace altamente variable y dependientes del tipo de plantel (*e.g.* engorde, mejora, ciclo cerrado), estado fisiológico del animal (*e.g.* cría, re-cría, engorde, gestación y maternidad), el tipo de alimentación (líquida, semi-líquida o sólida), almacenamiento de excrementos la gestión del agua en los procesos y de las características geoclimáticas de la zona, siendo esta última muy importante para hacer un correcto

diagnóstico e implementación de un adecuado plan de acción (Peralta, 2005; Ternicer, 2005). Se ha observado que la tasa de producción de excretas, puede estar influenciada por la temperatura, siendo determinante en la cantidad de agua y alimento consumido por un cerdo, en otros términos, a menor temperatura existe una mayor ingesta de alimento y una menor cantidad de agua consumida. Se estima en promedio que diariamente la demanda de agua para los procesos productivos en la industria porcina va desde los 4 a 5 L y de 2 a 3 kg alimento/ animal (Choi, 2007). En plantales de engorde, que corresponden a etapas finales del desarrollo de un cerdo, los purines generados presentan más sólidos orgánicos que en otros estados fisiológicos. Así mismo, aquellos plantales que utilicen menos agua en sus procesos presentarán efluentes más concentrados, que aquellos donde al utilizarse agua de lavado, los efluentes están más diluidos (INIA, 2005).

Los grandes plantales requieren de una alimentación uniforme, para producir carne de alta calidad, es por esto que hoy en día además del alimento convencional, se utilizan suplementos alimenticios, con gran valor en minerales y nutrientes (Fe, Zn, Ca, P y Cu), que incluyen además antibióticos para prevenir enfermedades (Choi, 2007).

El consumo de agua y alimento de un cerdo varía dependiendo de la etapa de crecimiento del animal, siendo en la fase de hembras en lactancia la que mayores requerimiento de agua se tiene (20-30 L/d) pero con menores consumos de alimento (2-5 kg/d) (Milerky y Lozada, 2004). En promedio la energía requerida por un cerdo va desde 3.400 kcal/d a 7.200 kcal/d, lo que se traduce en unos 2,1 kg aproximadamente, de comida diaria por individuo (Choi, 2007).

Moset, *et al.* (2008), en una caracterización realizada a purines de cerdo sin tratamiento (crudo), muestran que estos poseen gran variabilidad en nutrientes (6.008-2.650 mg N total/ L) y de carga orgánica (26,3-8,0 g DBO<sub>5</sub> /L), y que los máximos valores están asociados a la fase de engorde. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores de caracterización de purines, en donde se afirma que el purín procedente de plantales de engorde, presenta mayor concentración de nitrógeno que el correspondiente a plantales de maternidad (Navés y Torres, 1994; Moset, *et al.*, 2008). Investigaciones preliminares, muestran que purines de cerdo en la fase de engorde, pueden además contener altos contenidos en sólidos (20,4 g/L de sólidos totales y 14,6 g/L de sólidos volátiles), materia orgánica (DQO total: 36,8 g O<sub>2</sub>/L; DQO soluble: 20,5 g O<sub>2</sub>/L; y

DBO<sub>5</sub>: 2,6 g O<sub>2</sub>/L), nutrientes (2,08 g N total/L; 1,88 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L; y 0,18 g P/L) (Belmonte *et al.*, 2008), hormonas (3,1 g/kg Masa Seca) y antibióticos, que aunque se han estudiado, sólo han sido identificados (penicilina y tetraciclina) y no cuantificados (Kinney *et al.*, 2008).

### **1.3. Impactos de los purines de cerdo al ambiente**

La mayoría de los residuos generados por la industria porcina, no se gestiona adecuadamente, por lo que se pone en riesgo la sustentabilidad y la expansión de esta actividad agropecuaria. Por un lado, la alta recalcitrancia (DQO/DBO<sub>5</sub> > 3) y biodegradabilidad (DBO<sub>5</sub>: 2,6 g O<sub>2</sub>/L) de los purines de cerdo, y por otro, la presencia de sólidos, amoníaco (NH<sub>3</sub>), ácidos grasos volátiles (AGV) o compuestos específicos como los antibióticos y desinfectantes, puede ocasionar la inhibición en los procesos de nitrificación y actividad anaerobia (Choi *et al.*, 2007).

Distintas poblaciones de bacterias encargadas en la producción del biogás (bacterias metanogénicas), pueden ser inhibidas o disminuir su actividad por la presencia de antibióticos (Montalvo y Guerrero, 2003; Choi, 2007) a concentraciones entre 1 a 100 mg/ L (Montalvo y Guerrero, 2003). Estudios preliminares, realizados con purin de cerdo obtenido después del tratamiento primario, mostraron que estos puede inhibir en un 50% la actividad de bacterias metanogénicas (Hsieh, 2009). Flotats *et al.* (1999) observaron el efecto inhibitor del amonio sobre la producción de biogas a partir de una concentración de 2,1 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> /L en el rango termofílico; siendo la concentración típica de amonio del orden de 1,8 - 3,8 g NH<sub>4</sub><sup>+</sup> /L esto demuestra que este tipo de efluentes puede inhibir la actividad metanogénica. La adaptación del lodo metanogénico a concentraciones entre 3 a 5 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, hace viable la digestión anaerobia en régimen mesofílico, pero con velocidades específicas máximas de crecimiento menores a medida que aumenta la concentración de nitrógeno amoniacal (Van Velsen, 1979).

En Chile, un gran porcentaje de los efluentes (purines de cerdo) producidos por los planteles porcinos, están siendo aplicados al suelo en forma de riego, lo que se considera una forma de tratamiento avalada por el APL (Acuerdo de Producción Limpia) del sector.

El crecimiento de esta actividad, ha provocado que cada vez existan menos áreas de terreno disponibles para su aplicación y que además éste se vea restringido a cierto tipo de cultivos (González, 2009).

El manejo y disposición de los purines de cerdos, debe llevarse a cabo de manera controlada, ya que la aplicación de este material en suelos depende de sus características, tipos de suelo, factores abióticos (clima granulometría, régimen pluvial, entre otros), bióticos (flora y fauna) y otros que condicionan los diferentes procesos de transformación de los compuestos (contaminantes) presentes en el purín tratado. Aunque parte de los contaminantes contenidos en los purines de cerdo pueden perder su actividad a las pocas semanas o meses de su aplicación al suelo, no se descarta un efecto tóxico agudo sobre algunos componentes de la biota de suelos, y agua en el caso de lixiviación o de vertido directo a los cuerpos de agua (Andrés, 2008).

Los problemas relacionados a su disposición en el suelo, depende directamente de sus características físico-químicas (CONAMA, 2009), y en un escenario de manejo inadecuado, el purín de cerdo es un producto de alto riesgo ambiental, debido básicamente a su alta conductividad eléctrica ( $> 750 \mu\text{mhos/cm}$ ), que puede inducir no sólo a procesos de salinización de suelos sino también de fitotoxicidad (por el aporte de cloruro que es un anión fitotóxico); a su alta carga de sólidos suspendidos (20,4 g/L de sólidos suspendidos totales), que puede provocar sellado de los poros superficiales del suelo y su acumulación en superficie puede generar las condiciones ideales para la postura y eclosión de huevos de moscas; su alta carga de formas minerales de nitrógeno, que en suelos se oxidan a nitrato, anión que no es retenido por los sólidos del suelo por lo que puede moverse con el agua y contaminar así aguas subterráneas (González, 2009).

Aguas superficiales pueden verse afectadas también por vertidos de purines de cerdo, provocando contaminación de cuerpos de agua dulce, y la consiguiente pérdida en la calidad del agua, principalmente por la eutroficación en los sistemas acuáticos debido al aporte excesivo de nutrientes ( $> 300 \text{ mg/L NH}_4^+$ ,  $> 100 \text{ mg P/L}$ ), lo que cambia la estructura biótica de estos ecosistemas (*e.g.* abundancia de taxas de macroinvertebrados acuáticos tolerantes a altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes como los chironómidos), (Belmonte *et al.*, 2008); este enriquecimiento de las aguas superficiales en sustancias nutritivas estimula el crecimiento de algas y de bacterias, las que, a su

vez, utilizan como fuente de energía la materia orgánica producida por las algas. Este proceso puede provocar una fuerte disminución en el oxígeno del agua, con lo cual ésta disminuye las posibilidades de ser utilizada para determinados fines.

Las algas pueden tener efectos sobre la luminosidad y el tenor de oxígeno en las aguas, ya sea por un efecto de sombra o por la acción de bacterias que absorben el oxígeno al descomponer las algas. Este proceso es un gran peligro para los demás organismos vivos, pues resultan envenenados lo que finalmente conlleva al desequilibrio del cuerpo de agua, provocando masivas muertes por anoxias de muchos vertebrados (Ternicer, 2005).

El impacto más difícil de visualizar y cuantificar es el de la contaminación que se puede producir en los acuíferos subterráneos, principalmente por los nitratos (ion de alta solubilidad), donde sus efectos son puesto en evidencia a largo plazo (SAG, 2009).

#### **1.4. Gestión ambiental de la producción porcina**

Los Acuerdos de Producción Limpia (APL) en Chile (1999 y 2005), han tenido como objetivo la gestión ambiental, la prevención de la contaminación, el establecimiento de responsabilidades ante la generación de residuos, la utilización de nuevas tecnologías, entre otros. Esta gestión contempla, la prevención en la contaminación que involucra evitar, reducir y minimizar los impactos, recuperando los residuos generados mediante la reutilización, el reciclaje, recuperación de energía y la disposición final (APL, 1999; APL, 2005; Asprocer, 2009).

Considerando que este tipo de actividad, ha ido en incremento en las últimas décadas, para disminuir todos los impactos ambientales asociados, la gestión ambiental se enfoca no solo al tratamiento de los residuos aplicando a tecnologías, sino también a la minimización en el origen, esto conlleva la aplicación de estrategias orientadas al manejo operacional (gestión) de los recursos utilizados en el proceso (alimentación, del agua, y de las instalaciones).

Por un lado, la gestión en la alimentación, se basa en los requerimientos de los individuos, de acuerdo al estado fisiológico del animal, que difiere de acuerdo a las distintas etapas de crecimiento y desarrollo.

El ajuste de la dieta en cuanto al nivel de nutrientes, permite una reducción de nitrógeno en la excreción de 30 a 50% durante la fase de transición; un 40% en la fase de crecimiento, y entre un 30 y 40% al final de la etapa de engorde, reducción del nivel de minerales en la dieta (*e.g.* reducción en la ración de Cu y Zn a 100 mg /L, disminuyendo la acumulación de estos metales en el suelo hasta un 35%), mejoras en la digestibilidad de los nutrientes en cuanto a la utilización de enzimas (fitasas exógenas) que promueven la digestibilidad del P en los animales y reduciendo con ello la excreción de P en los purines.

Por el otro, la gestión del agua, involucra el consumo directo del animal (70-80%), el agua empleada en la refrigeración (20-25%) y limpieza de las instalaciones y equipos (3-5%). El uso de alimentos bajos en proteínas y sales, disminuye la utilización del agua por parte del animal.

Finalmente, la gestión en las instalaciones, involucra directamente la producción y liberación de gases, principalmente amoníaco, que será influenciado por la alimentación y la distribución de los individuos en las instalaciones, de iguales características fisiológicas (Babot *et al.*, 2004).

Por su parte, el tratamiento y manejo de los residuos depende de varios factores : las características de los residuos en cuanto a DBO<sub>5</sub> , DQO, pH, material en suspensión, compuestos tóxicos, entre otros; la calidad del efluente en relación a la normativa vigente; y los costos asociados al tratamiento y su disposición final (Chamy *et al.*, 2003).

### **1.5. Tecnologías aplicadas en el tratamiento de purines de cerdo**

Los purines pueden ser dispuestos directamente sobre las superficies de suelos disponibles en el plantel o ser sometidos a tratamientos para su estabilización. Los tratamientos pueden ser convencionales o naturales.

Los sistemas convencionales de tratamiento, correspondientes a operaciones mecánicas requieren de una alta inversión, por lo que son recomendables en planteles que generan altos flujos de purines, en donde no se dispone de superficies amplias para su aplicación en el terreno o que se ubican en zonas con climas de alta pluviosidad (Ternicer, 2005).

El tratamiento de purines en Chile, se lleva a cabo mediante la aplicación de sistemas tratamiento primario, para disminuir la cantidad de sólidos (*e.g.* decantadores); seguidos de sistemas biológicos para disminuir el contenido de materia orgánica (*e.g.* lagunas anaeróbicas), permitiendo obtener un residuo final que puede ser aplicado en suelos como fertilizantes o mejoradores (Belmonte *et al.*, 2008).

El tratamiento y el manejo de purines de cerdo depende de varios factores, tales como las características de los residuos en cuanto a DBO<sub>5</sub>, DQO, nutrientes, pH, material en suspensión, compuestos tóxicos, entre otros, la calidad del efluente en relación a la normativa vigente y los costos asociados al tratamiento y su disposición final (Chamy *et al.*, 2003).

El tratamiento del purín, involucra una primera etapa de tratamiento, que consiste en la reducción de su alto contenido de sólidos (>3,0 g SST/ L), mediante procesos de sedimentación, eliminando con estos el material particulado y componentes disueltos en él, debido en gran parte a la hidrólisis del material sólido generada por una fracción importante de materia orgánica y nutrientes que pasan fácilmente a la fase líquida (Plaza de los Reyes y Vidal, 2007; Ramalho, 1996).

Posterior a la eliminación de sólidos, el tratamiento secundario tiene como objetivo la reducción de la materia orgánica (DQO<sub>(Total)</sub>: 36,8 g O<sub>2</sub> /L; DQO<sub>(Soluble)</sub>: 20,5 g O<sub>2</sub> /L; y DBO<sub>5</sub>: 2,6 g O<sub>2</sub> /L), a través de unidades biológicas basadas en el uso de microorganismos, fundamentalmente bacterias, que transforman la materia orgánica en diferentes gases (CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>, entre otros), agua, biomasa (nuevos microorganismos) y materia orgánica sin degradar, dependiendo de los procesos bioquímicos involucrados (aerobios, anaerobios).

Por un lado, la biodegradación aeróbica, transforma la materia orgánica en CO<sub>2</sub>, agua y nuevos microorganismos (síntesis celular), siendo el oxígeno el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria.

Por el otro, en ausencia de oxígeno (bacterias anaeróbicas) la materia orgánica es transformada principalmente en biogás (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>), donde el aceptor final de electrones es la materia orgánica, y cuya producción de lodos es menor en comparación a los sistemas aeróbicos. Finalmente, procesos bioquímicos en los que el aceptor final de electrones es el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), promueven procesos anóxicos o desnitrificantes con

la formación principalmente de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Metcalf and Eddy, 1995; Chamy *et al.*, 2003; Henze *et al.*, 1997).

El tratamiento anaeróbico dentro de la actividad porcina, es usado tanto para la estabilización de la fracción sólida de los purines (guano) como de la fracción líquida. La productividad de los microorganismos anaeróbicos es menor en comparación con los aeróbicos. Sin embargo son capaces de depurar mayores cargas orgánicas ( $0,5 - 3,0$  kg DQO  $m^3/d$ ), dependiendo del tipo de reactor (Choi, 2007; Ramalho, 1996; Chamy *et al.*, 2003). Este proceso de biodegradación ocurre en cuatro etapas: hidrólisis, (reducción de carbohidratos y lípidos a aminoácidos, azúcares y ácidos grasos), acidogénesis (reducción a ácidos grasos volátiles, etanol,  $CO_2$  y  $H_2$ ); acetogénesis (transformación de ácidos grasos volátiles o AGV y etanol en acetato,  $CO_2$  y  $H_2$ ), y metanogénesis (transformación de acetato a  $CO_2$  y  $CH_4$ ) (Montalvo y Guerrero, 2003).

La tecnología anaeróbica, puede usar unidades de tratamiento de biomasa suspendida, tales como las lagunas anaeróbicas, estos sistemas pueden presentar desventajas relacionadas con requerimientos de grandes espacios para su implantación, producir malos olores y volatilizar el  $NH_4^+$  (tiempos de residencia  $> 17$  días); su diseño está en función de la población porcina (3.500 animales/ ha) y utiliza cargas de  $0,4$  kg DBO  $/m^2$  (Choi *et al.*, 2007). Por otro lado, sistemas anaeróbicos de biomasa adherida como las unidades UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), pueden ser más compactas que los anteriores y funcionar con cargas del orden de  $5,0$  kg DQO/  $m^3 /d$ , obteniendo eficiencias del orden del 75% en DQO (Montalvo y Guerrero, 2003). Sistemas UASB, por su parte son los más utilizados en la actualidad, operando con cargas del orden de  $720-2000$   $m^3 /d$  y eficiencias de eliminación de DBO<sub>5</sub> de 95% y DQO 87% (Deng *et al.*, 2007).

Las altas concentraciones de nitrógeno ( $2,08$  g N total/L;  $N-NH_4^+$ :  $1,88$  g  $N-NH_4^+$ /L) (Belmonte *et al.*, 2008), hacen necesario utilizar tratamientos terciarios en purines de cerdo, antes de que estos sean dispuestos tanto en medios acuáticos como suelo. La reducción del nitrógeno mediante procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación, conlleva en una primera etapa la transformación aeróbica del nitrógeno amoniacal ( $NH_4^+$ ) en nitrito ( $NO_2^-$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) (etapa de oxidación) mediante bacterias nitrificantes. La segunda etapa corresponde a la reducción del nitrógeno desde

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub> o nitrógeno molecular, bajo condiciones anóxicas y mediante bacterias desnitrificantes (Ahn, 2006; Smith *et al.*, 2001).

## **1.6. Bioindicadores de la toxicidad en purines porcinos**

Debido a los problemas ambientales que se han generado en las últimas décadas, se ha desarrollado la evaluación de riesgo ecológico de los contaminantes tanto para suelo, como para cuerpos de agua mediante el uso de bioindicadores, que permiten diagnosticar posibles daños. Dado que los purines de cerdo, están siendo dispuestos como fertilizantes o vertidos a cuerpos de agua dulce, se está utilizando diversas especies de organismos (bioindicadores) que indican la salud tanto del suelo como del agua.

### **1.6.1. Bioindicadores de toxicidad en suelo**

Las condiciones para ser considerados como bioindicadores se basan en que: a) describan procesos del ecosistema, b) integren las propiedades del suelo, c) sean sensitivos a variaciones climáticas, f) reproducibles, g) fáciles de entender, y h) sensibles a cambios en el suelo (Bautista *et al.*, 2004).

El estado de las propiedades dinámicas del suelo como contenido de materia orgánica, diversidad de organismos o productos microbianos en un tiempo particular, se constituye en los factores que evalúa la salud del suelo (Romig *et al.*, 1995; Bautista *et al.*, 2004), siendo medidos mediante bioindicadores tales como la fertilidad, productividad potencial (productividad sin afectar propiedades físico, químicas y biológicas), sostenibilidad (favorecer la salud de plantas, animales y humanos) y calidad ambiental (atenuar contaminantes), sin dejar de mencionar que son dinámicos en el tiempo (Bautista *et al.*, 2004).

Algunos de los parámetros biológicos con potencial indicador de la salud del suelo más utilizados son: biomasa microbiana, respiración basal, nitrógeno mineralizables, actividades enzimáticas, grupos funcionales de la microflora, composición, diversidad de las comunidades microbianas, abundancia, diversidad de macro, meso y microfauna, patógenos de raíces, crecimiento y diversidad de plantas, etc. (Pankhurst *et al.*, 1997).

El principal problema que causan estos residuos (purín de cerdo) a los suelos, es por enriquecimiento excesivo de P y K, donde sus excesos pueden afectar la cantidad y la calidad de las cosechas (debido a enfermedades en los cereales, reducción en el tenor de azúcar en la remolacha, etc.) (CE, 1986), y produciendo contaminación microbiana (enfermedades infecciosas), ya sea a las plantas, animales o humanos.

Algunos estudios realizados sobre los efectos causados a un cultivo de Brócoli (*Brassica oleracea*), después de la aplicación de purin de cerdo como fertilizante, muestran que a mayor concentración de purín, aumenta el pH y la concentración de nitrógeno en el suelo, desestabilizando los valores normales de éste e incrementando la concentración de nitratos en la planta (4.500 mg/kg de nitratos en planta fresca), este aspecto revela la toxicidad de purines de cerdo sobre cultivos hortícolas (Llona y Faz, 2006).

Gunadi y Edwards (2003) en estudios realizados con *Eisenia foetida*, encontraron que crecían más rápidos en sólidos de cerdo adulto y cerdos hembras, obteniendo máximos pesos individuales medios de 784,7 mg durante los primeros tres meses, sin embargo se registró además la mortalidad del 75 % de la población.

### **1.6.2. Bioindicadores de toxicidad en agua**

Para estudiar los posibles efectos tóxicos ocasionados por efluentes a cuerpos de agua, se utiliza organismos acuáticos y se evalúa la toxicidad aguda (mortalidad) o crónica (efectos). Dicho organismo, se caracteriza por su distribución cosmopolita, de fácil cultivo en laboratorio, con ciclos de vidas corto con un alto número de crías, sensibilidad a la presencia de bajas concentraciones de contaminantes y respuesta a un gran número de agentes tóxicos.

Los ensayos agudos, miden el efecto inhibitorio de un determinado contaminante al eliminar o inmovilizar el 50% de la población expresándolo como LC<sub>50</sub> en 48 horas, mientras que el ensayo crónico se fundamenta en la capacidad reproductiva o crecimiento de los individuos contaminados (EPA, 1993).

Algunos organismos comúnmente usados como bioindicadores en cuerpos de agua dulce son: algas (*Selenastrum capricornutum*), crustáceos (*Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Daphnia similis*, *Artemia sp*), peces (*Pimephales*

*promelas*), entre otros. En ensayos de toxicidad con *Daphnia magna*, invertebrados acuáticos, se ha comprobado la toxicidad de purines de cerdo puede ser incluso superior a la de los lodos procedentes de las plantas de tratamiento de aguas municipales (Díez *et al.*, 2001).

Andrade *et al.* (2009) mediante ensayos de toxicidad aguda con el crustáceo *Artemia sp.*, no observaron letalidad a concentraciones menores a 6,0 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /L. Sin embargo, amonio y nitrito mostraron toxicidad aguda a concentraciones entre 100 y 700 mg/ L (LC<sub>50</sub> 48h: 438,26 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> /L) y entre 50 y 1.200 mg /L (LC<sub>50</sub> 48h: 667,38 mg /L), respectivamente, siendo por tanto el amonio más tóxico que el nitrito. Adicionalmente, se observó que la reducción de la toxicidad después del tratamiento fue del 87%.

Según Piedras *et al.* (2006) cuando se disuelve el amoníaco en el agua, se propaga fácilmente a través de los epitelios de los organismos afectando por ejemplo a la respiración de peces y en consecuencia, impidiendo el intercambio gaseoso que se produce entre el animal y el agua.

El Nitrito, por su parte cuando se presenta en altas concentraciones, puede causar la oxidación del átomo de hierro de la molécula de hemoglobina presente en la sangre, convirtiéndola en metahemoglobina, molécula incapaz de transportar oxígeno, manifestando un cuadro de hipoxia y cianosis. Hormonas y antibióticos en el medio, pueden causar toxicidad, debido a que inciden en la resistencia de las bacterias patógenas (Kinney *et al.*, 2008).

### **1.7. Procedimiento de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE)**

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) desarrolló esta técnica para identificar de manera rápida, relativamente menos costosa y segura los compuestos tóxicos presentes en muestras complejas, como es el caso del purín de cerdo. Cabe señalar que durante el fraccionamiento se anotan todos los cambios observados, como precipitación, turbiedad, cambio de color, etc. (EPA, 1988).

La técnica TIE (Toxicity Identification Evaluation), combina pruebas toxicológicas con diversas técnicas de fraccionamientos selectivos y análisis, para detectar, identificar y confirmar los compuestos causantes de la toxicidad. Esta combinación permite que un

grupo de compuestos tóxicos con las mismas características se eliminen de tal forma que ya no sean biodisponibles.

El conocimiento de las características físico-químicas permite desarrollar en forma más fácil un plan de manejo para reducir la toxicidad, considerando los fenómenos de especiación, sinergismo o antagonismo, que juegan un papel importante en la biodisponibilidad y la toxicidad de la muestra de contaminantes.

Este procedimiento consta de tres fases:

**Fase 1 Caracterización.** En esta etapa se determinan las características físicas y químicas (como solubilidad, volatilidad, filtrabilidad, etc.) de los constituyentes tóxicos a través de la combinación de los fraccionamientos con las pruebas toxicológicas. Al comparar la toxicidad antes y después de cada fraccionamiento se puede caracterizar los compuestos tóxicos y ordenar por las siguientes categorías: cationes, aniones, metales quelantes, compuestos orgánicos apolares, componentes volátiles, materia filtrable o material particulado y oxidantes.

**Fase 2 Identificación.** Identifica y separa los compuestos xenobióticos. Basado en los resultados de la fase 1, primero se separan los compuestos tóxicos de los no tóxicos, después de los fraccionamientos se efectúan los análisis químicos, cuantificando la concentración de los contaminantes sospechosos se comparan con los valores de toxicidad aguda ( $LC_{50}$ ).

**Fase 3 Confirmación.** Confirma si los compuestos tóxicos identificados son responsables de la toxicidad observada, existen diferentes técnicas de confirmación entre las cuales se encuentran:

- correlaciones: se investiga si hay una correlación entre la concentración de los compuestos tóxicos sospechosos y la toxicidad observada.
- Observación de síntomas: se compara los síntomas del organismo indicador expuesto a los compuestos tóxicos sospechosos con los síntomas cuando está expuesto al efluente. Cuando se observan síntomas diferentes, se concluye que se trata probablemente de compuestos diferentes.

En la mayoría de los casos, un solo método no es suficiente o adecuado y se recomienda utilizar diferentes alternativas. La fase de confirmación es necesaria por las consiguientes razones: mostrar que los compuestos tóxicos sospechosos causan la toxicidad observada, también garantizar que la toxicidad es permanente en el tiempo para que se puedan planificar las medidas adecuadas.

Después de la confirmación, se pueda planificar medidas específicas para reducir la toxicidad a un nivel aceptable, por ejemplo ajustando el proceso de producción (medida preventiva) o eligiendo un tratamiento adecuado (medida curativa).

|

## **2. HIPÓTESIS**

Los purines de cerdo causan toxicidad aguda en los organismos *Daphnia magna*, debido a la presencia de materia orgánica, conductividad y nutrientes

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Identificar los componentes que están contenidos en los purines de cerdo y que producen toxicidad aguda, mediante la técnica de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE).

### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Determinar las características físico-químicas de efluentes de purín de cerdo (crudo y tratado).
2. Determinar la toxicidad aguda de efluentes de purín de cerdo (crudo y tratado) utilizando *Daphnia magna*.
3. Identificar los componentes contenidos efluentes de purín de cerdo (crudo), que pueden producir toxicidad aguda mediante la tecnica de fraccionamiento (TIE).

## **4. METODOLOGÍA**

El efluente a evaluar corresponde a la fase líquida de purín de cerdo, proveniente de un plantel de engorda de cerdos (“Fundo San Guillermo” propiedad de Sucesión Salvador Yanine Abadi). El efluente fue tomado a la salida del tratamiento primario (purín crudo). Las muestras fueron almacenadas en bidones de 50 L y conservadas a 4°C bajo condiciones de oscuridad. En el laboratorio, la muestra, previo al análisis físico-químico y toxicológico, fue filtrada.

### **4.1. Procedimiento de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE)**

#### **4.1.1. Fase de Caracterización**

Esta primera fase del procedimiento TIE se divide en 2 partes principales, análisis ecotoxicológicos a través de bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (EPA, 1993) y medición de parámetros físico-químicos según protocolo APHA (1989).

#### **4.1.2. Caracterización físico-química del efluente de purín de cerdo.**

Previo a la prueba toxicológica inicial, se efectuó análisis físico-químicos de parámetros característicos tales como: DQO soluble y total (Demanda Química de Oxígeno), DBO<sub>5</sub> (Demanda Biológica de Oxígeno), ST (Sólidos Totales), SV (Sólidos Volátiles), SST (Sólidos Suspendidos Totales), SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles), alcalinidad total, intermedia y parcial (AT, AI, AP), N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nitrógeno como Nitritos), SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Sulfatos), Cl<sup>-</sup> (Cloruros), que serán evaluados mediante el Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1985). Adicionalmente, parámetros como: COT (Carbono Orgánico Total), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Nitrógeno como Amonio), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Nitratos), NT (Nitrógeno Total Kjeldhal) y PT (Fósforo Total) son medidos mediante Kits específicos de espectrocuant NOVA-60 de la Merck. pH, CE (Conductividad Eléctrica) empleando electrodos (pHmetro: Hi tech Instruments Modelo PHB-4, conectado a un medidor de pH/mV/|C; conductivímetro: Hi Tech Instruments Modelo DDB-303A) para su determinación. La metodología para la determinación de Alcalinidad total y parcial (AT, AP), se basó en lo descrito por Rozzi (1986), obteniéndose la AI (Alcalinidad Intermedia) por la diferencia entre la total y parcial.

La metodología y protocolos empleados en la determinación de los parámetros antes mencionados, se cita a continuación.

pH: Su determinación es de medición directa con un peachímetro marca Inolab modelo pH level 1. Soluciones ácidas (HCl) y básicas (NaOH), fueron utilizadas para su ajuste y/o neutralización.

Demanda Biológica de Oxígeno: Para su determinación, la muestra se inoculó e incubó (equipo de incubación BSB-Controller Modell 1020T), a 20 °C, durante 5 días, en botellas de 200 – 300 mL con tapa de vidrio esmerilada. Se evaluó el oxígeno inicial y final (después del periodo de incubación) utilizando el método de Winckler azida modificada. Para calcular la demanda de oxígeno de la muestra, se realizó mediante la siguiente expresión matemática:

$$DBO_5 = \frac{V_t \times 8000 \times 300 \times 0.025}{100 \times V_m} = mgO_2 / l,$$

Donde:

$V_t$  = Diferencia entre la cantidad inicial y final de oxígeno medidos ( $V_i - V_f$ )

$V_m$  = Volumen de alícuota tomada de muestra.

Demanda Química de Oxígeno: Se sometió a la muestra (2,5 mL) a oxidación química con una solución de dicromato de potasio (3,5 mL) (solución digestora), catalizando la reacción con una solución de sulfato de plata (1,5 mL) (solución catalítica) por 2 horas a 105 °C en un digestor Hach. El análisis se hace por triplicado con una muestra de agua destilada (blanco) a la que también se le somete a oxidación. Los valores son evaluados mediante una curva de calibración a 600 nm.

Sulfatos: Se midieron 25 mL de cada muestra tratada por el TIE, en un vaso precipitado de 100 mL y se agregó sulfaver, se agitó por 1 minuto y se evaluó con un espectrofotómetro mediante una curva de calibración de un rango entre 0 a 40 mg/L.

Cloratos : Se colocaron 25 mL de muestra en un matraz erlenmeyer de 100 mL y se adicionó 1 mL de  $K_2CrO_4$  y se tituló con  $AgNO_3$  0,014 N. El valor de la concentración de cloratos se obtuvo de la siguiente forma:

$$Mg\ Cl /L = \frac{(A-B) \times N \times 35,45}{V}$$

Donde:

A: volumen de titulación.

B: volumen de titulación del blanco.

N: Normalidad de  $AgNO_3$

V: volumen de la muestra.

Sólidos Suspendidos Totales: Se taró una cápsula de porcelana limpia, adicionándole posteriormente un volumen medido de muestra. Se evaporó el agua en una estufa a  $103-105\ ^\circ C$  durante 24 h. Se registró el peso de cápsula y muestra deshidratada. El valor se obtuvo mediante la siguiente expresión.

$$SolidosSuspendidosTotales(g / l) = \frac{(B - A) \times 1000}{V(ml)}$$

Donde:

A: peso (g) de la cápsula vacía.

B: peso (g) de la cápsula más el residuo.

V: volumen de muestra (mL)

Sólidos Suspendidos Volátiles: La muestra deshidratada de la estufa se colocó en una mufla a  $550^\circ C$  por 1 hora. La muestra se enfría y posteriormente es pesada, siendo la siguiente expresión matemática que lo define.

$$Sólidos\ suspendidos\ totales\ (g/L): (B-C) \times 1000 / V\ (mL)$$

Donde:

B: peso de la cápsula más residuo SST.

C: peso de la cápsula con las cenizas.

V: volumen de muestra: medidos en mL.

Amonio: Se colocaron 5 mL de la muestra, 0,6 mL de reactivo de  $\text{NH}_4^{-1}$  y una microcuchara de azul rosa en un tubo de ensayo y se agitaron. La muestra se dejó reposar por 5 minutos (tiempo de reacción A). Al final, se le agregaron 4 gotas de reactivo  $\text{NH}_4^3$  y se dejó reposar por 5 minutos (tiempo de reacción B). La medición se realizó mediante espectrofotometría.

Alcalinidad: 20 mL de la muestra (V1) fueron ajustados por titulación a un pH de 5,75 con una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , posteriormente se continuó hasta el pH 4.3 registrándose también su volumen. Para el cálculo de este parámetro se usó la siguiente expresión.

$$\text{Alc. Total} = \frac{V * N * 50 * 1000}{V1}$$

Donde:

Alc. Total: alcalinidad expresada en mg/L de  $\text{CaCO}_3$

V: volumen gastado de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en mL

N: Normalidad de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

50: peso equivalente del  $\text{CaCO}_3$

V1: volumen tomado de muestra en mL

#### **4.1.3. Protocolo de Bioensayo Agudo**

La toxicidad aguda consiste en una exposición de juveniles de *D. magna* a diferentes concentraciones de efluente de purín de cerdo, por un periodo de 48 horas.

Para la realización de los bioensayos (agudo), se utilizó cladóceros de la especie *Daphnia magna*, obtenidos de cultivos del Laboratorio de Bioensayos de Centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción y alimentados con microalgas (suplemento) del género *Selenastrum capricornutum* y alimento YCT (en base a levadura, harina de pescado y alfalfa). Las condiciones generales se detallan en la Tabla I. El cultivo de dáfidos, se mantiene en envases de 1 L a 20 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad, siendo alimentados 3 veces por semana con un recambio de agua cada 48 h, lo que permite condiciones partenogénicas en el medio (Figura 1).

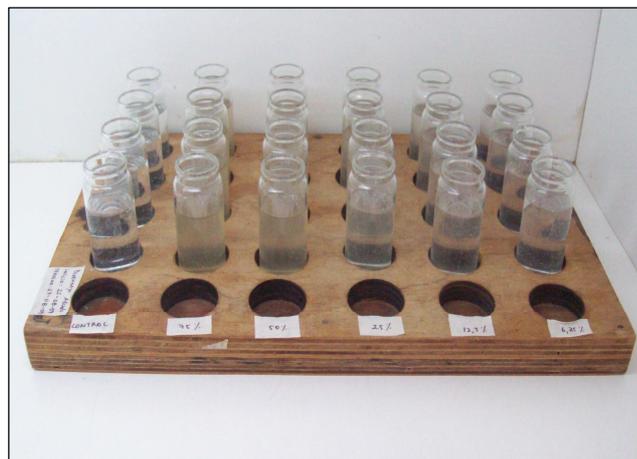
**Tabla 1.** Resumen de las condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

<b>Variable</b>	<b>Especificación</b>
Tipo de Bioensayo	Estático sin recambio
Tiempo de exposición	48 h
Temperatura	20 ± 0,2 °C
Fotoperíodo	16 h luz, 8 h oscuridad
Tamaño Cámaras	30 mL
Volumen solución	20 mL
Edad organismos	Neonatos < 24 h
Nº replicas por concentración	4
Nº concentraciones mas control	6
Nº organismos por concentración	20
Alimentación	Hasta una hora antes del ensayo
Aireación	80% saturación O <sub>2</sub>
Agua dilución	Reconstituida
Respuesta	Mortalidad, movilidad
Criterio aceptabilidad	Sobrevivencia control ≥ 90%

Dos bioensayos preeliminares utilizaron una muestra de purín diluída al 10%, en donde mediante ensayos de toxicidad aguda a las concentraciones de borde (100% y 6.25%), se determinó el rango en donde se detectará la concentración letal del 50% de la población de dafnídeos. Se procedió a la determinación de toxicidad mediante bioensayos para concentraciones intermedias (75, 50, 25 y 12,5 %).

El instrumental y material utilizado en la experiencia consta de frascos de vidrio de 30 mL (24), dispuestos en una bandeja ranurada (5 x 6 agujeros), para la evaluación de toxicidad agua para 5 concentraciones más el control (75, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0%) y en 4 réplicas cada uno (Figura 2). Muestras de 100 mL de cada concentración se distribuyeron en 4 frascos en un volumen de 20 mL en cada uno.

Las diluciones se calcularon considerando que el 100% de concentración del efluente corresponden a 80 mL. Para el control se utilizó solo agua de cultivo de *Daphnia magna*.



**Figura 1:** cultivos de *Daphnia magna*

**Figura 2:** Bioensayo agudo: purín de cerdo.

Para hacer las diferentes diluciones se utilizó probetas de 100 mL y se usó agua de cultivo de *Daphnia magna* cuando se necesitó aforar. Una vez realizadas las diluciones se procedió a vaciar 20 mL en cada frasco (4) correspondientes a cada concentración. Finalmente, se colocaron los neonatos de < 24 h de nacidos previamente separados de los cultivos, mediante una pipeta Pasteur, disponiendo 5 organismos por cada frasco, en donde finalmente se mantendrán bajo las condiciones del cultivo origen.

#### 4.1.4. Análisis estadístico de resultados: PROBIT

Procedimiento estadístico paramétrico que estima el  $LC_{50}$  a un intervalo de confianza del 95%, modificación del método tradicional. Estima la media de la distribución  $\log_{10}$  de la tolerancia al tóxico, si las proporciones de la respuesta no son crecientes respecto del incremento de la concentración, los datos son corregidos y ajustados. Este programa informático, desarrolla automáticamente ajuste de los datos observados, ajustes respecto de la mortalidad en los controles, cálculo de la  $LC_{50}$  y determinación del intervalo de confianza del 95% (EPA, 1993).

#### 4.1.5. Fraccionamiento a través de la metodología TIE

El fraccionamiento, para caracterización de compuestos tóxicos sospechosos, siguió el procedimiento que se detalla a continuación (Fig. 3 y 4). Las columnas de fraccionamiento de vidrio (35 x 2,5 cm), se rellenaron con 25 g de resinas de intercambio catiónico y aniónico, 20 g de carbón activado y el algodón hidrofóbico.



**Figura 3:** Metodología TIE



**Figura 4:** TIE-Fraccionamientos

**Test de Aireación.** Con este test se buscó caracterizar los compuestos volátiles, oxidante y/o tensoactivos. Las muestras fueron sometidas a aireación por una hora y a distintos pH (3.0, 7.5 y 11.0). Luego de 30 minutos de reposo se midieron a intervalos de tiempo constante para controlar posibles variaciones del (pH).

**Test de intercambio aniónico.** La columna de vidrio se llenó de la resina de aniones (Amberlita 4400 OH. Sigma) que reemplaza los aniones por OH<sup>-</sup>.

**Test de intercambio catiónico.** La muestra pasó por la resina catiónica (Amberlita ir-120 plus. Sigma) de iones de Na<sup>+</sup>, en donde los cationes se reemplazaron por estos iones. Al no ser la resina específica para ciertos químicos, reemplazó muchos cationes diferentes, funcionando a la vez como filtro molecular.

**Test de carbón activado.** Permite diferenciar compuestos orgánicos apolares o complejos de metales que causen toxicidad. La muestra paso a través de columnas con

10 g de carbón activado y los compuestos orgánicos reaccionaron según su solubilidad y polaridad.

**Test de Filtración.** Por un lado, permite establecer la interacción física entre los contaminantes y el material hidrófobo de filtración (algodón Hidrófobo) y por otro lado, la eliminación de los compuestos tóxicos que resulta de la precipitación y filtración. Muchos factores influyen el grado de la adsorción, entre ellos está el pH (carga de superficie, la polaridad, la solubilidad y la matriz de la muestra), se ajustaron los pH a 3,0, 7,5 (pH inicial) y 11,0, y luego se sometió a cada muestra a la columna de vidrio rellena de algodón hidrofobico, por medio de una bomba que impulsa el efluente.

**Test de Adaptación.** Este test muestra la influencia del pH sobre la toxicidad de los contaminantes. Cambios de pH pueden influir en la solubilidad, polaridad, volatilidad, estabilidad, especiación y estado iónico de los compuestos tóxicos. Se ajusto el pH de la muestra inicial a pH 3,0 y 11,0

**Test de Quelantes (test EDTA).** El test se realiza con EDTA (etilenodiaminotetracético), un quelante con afinidad a algunos cationes (Al, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn(+II), Ni, Sr y Zn), y que permite establecer la presencia de toxicidad catiónica. EDTA depende del pH de la solución, tipo y especiación del metal, presencia de otros ligandos y afinidad de combinación.

#### 4.1.6. Análisis de los resultados

Una vez obtenidas las concentraciones a las cuales se obtuvo el nivel de efecto para *Daphnia magna* de cada fraccionamiento y el test de referencia se transforman a unidad de toxicidad (UT) por medio de la siguiente expresión:

$$UT = \left( \frac{1}{EC_{50}} \right) \times 100$$

Donde:

$LC_{50}$  = Concentración del contaminante que causa la muerte del 50% de la población, mg/L.

Si se comparan las UT de los fraccionamientos con las unidades del test de referencia obtenemos el porcentaje de reducción de la toxicidad (%RT):

$$\% RT = \left( 1 - \left( \frac{UT_{FRACCIONAMIENTO}}{UT_{REFERENCIA}} \right) \right) \times 100$$

Luego se obtiene el perfil de reducción de la toxicidad (PRT) poniendo cada fraccionamiento en abscisa y la RT en la ordenada.

Comparando estos perfiles con la literatura se puede obtener el o los contaminantes sospechosos de cada muestra (EPA, 1988).

En la segunda fase (Fase de Identificación), se identificaron y separaron los compuestos tóxicos obtenidos del fraccionamiento, de los no tóxicos, esto mediante análisis químicos para determinar su concentración lo que se correlacionará con los valores de toxicidad aguda obtenida previamente.

En la última fase (Fase de Confirmación), se identificarán el/los compuestos responsables de la toxicidad observada mediante: correlación entre los compuestos tóxicos sospechosos y la toxicidad observada, observación de síntomas del organismo expuesto a compuestos tóxicos y por último investigación si un aumento en la concentración de los compuestos tóxicos sospechosos tiene como consecuencia un incremento proporcional de la toxicidad observada.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterización físico-química de la muestra y toxicidad

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para la caracterización físico-química del efluente de purín de cerdo. Se destacan valores altos en cuanto a sólidos (20,4 g /L de sólidos totales y 14,6 g/L de sólidos volátiles) y nutrientes (NT: 2,5 g N/L; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 0,9 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L; y PT: 0,19 g P/L) y que son corroborados con valores reportados en Belmonte *et al.* 2008, sin embargo se observa que el contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es menor a lo encontrado en bibliografía.

La relación DQO/DBO<sub>5</sub> de 7,9 obtenida del purín de cerdo, muestra el alto grado de recalcitrancia de este tipo de efluentes, además que la relación DQO/NT de 9,84 muestra que la eliminación de nitrógeno puede llevarse a cabo mediante procesos bacterianos de asimilación y nitrificación y desnitrificación.

Finalmente, con respecto a los datos obtenidos en relación a la caracterización físico-química de los purines de cerdo, se observó gran variabilidad en cuanto a los resultados; este comportamiento, puede estar relacionado con cambios dentro de los procesos productivos (calidad y cantidad del alimento ingerido, agua consumida) y que está influenciada por los requerimientos del animal en distintas épocas del año (*e.g.* verano, invierno) y fase de crecimiento, además las nuevas estrategias de optimización de insumos o requerimientos a mayores estándares de calidad del mercado condicionan cambios dentro de la producción animal.

Respecto a la conductividad eléctrica (CE), se observa que es elevada (23,53 mS/cm), respecto a valores citados en la literatura. Esto se atribuye a las concentraciones de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0,9 g/L), SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (0,43 g/L), Cl<sup>-</sup> (1,78 g/L), ya que algunos autores han descrito que existe correlación entre la Conductividad eléctrica y estos parámetros. Sin embargo, esta correlación es mas significativa con el nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y el Nitrógeno amoniacal total (TAN). Por otra parte la correlación entre el TAN y la conductividad eléctrica es una buena estimación de elementos iónicos como el nitrógenos y el potasio.

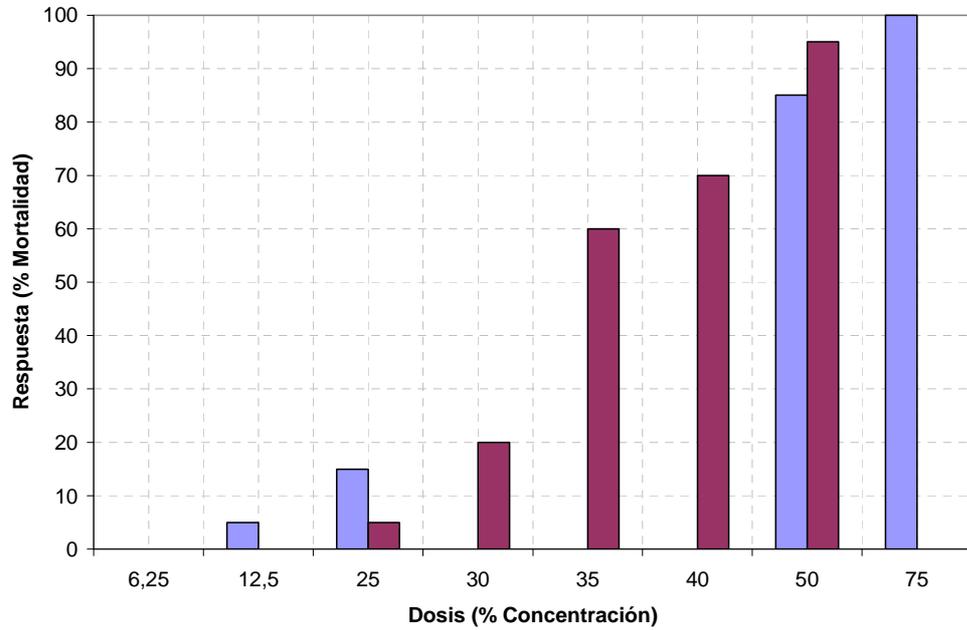
**Tabla 2.** Caracterización físico-química del efluente de purín de cerdo.

Parámetro	Unidad	Valor promedio	Ref. 1	Ref. 2
CE	mS /cm	23,53 ± 0,04	9,3	
pH		7,3 ± 0,14	7,3	8,23
Alcalinidad (T)	g CaCO <sub>3</sub> /L	11,5 ± 0,17	11,2	12
Alcalinidad (P)	g CaCO <sub>3</sub> /L	1,17 ± 0,24	6,8	
Alcalinidad I	g CaCO <sub>3</sub> /L	10,3 ± 0,32	4,5	
DQO (T)	g O <sub>2</sub> /L	20,58 ± 0,14	36,8	47,6
DBO <sub>5</sub>	g O <sub>2</sub> /L	7,2 ± 0,43	2,6	
NT	g N /L	2,5 ±	2,08	
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	g N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	0,7 ±	1,88	3,72
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	g N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	±	0,038	
PT	g P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /L	0,19 ±	0,18	
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	g/L	0,43 ± 0,01	0,38	
Cl <sup>-</sup>	g/L	1,78 ± 0,04	0,61	

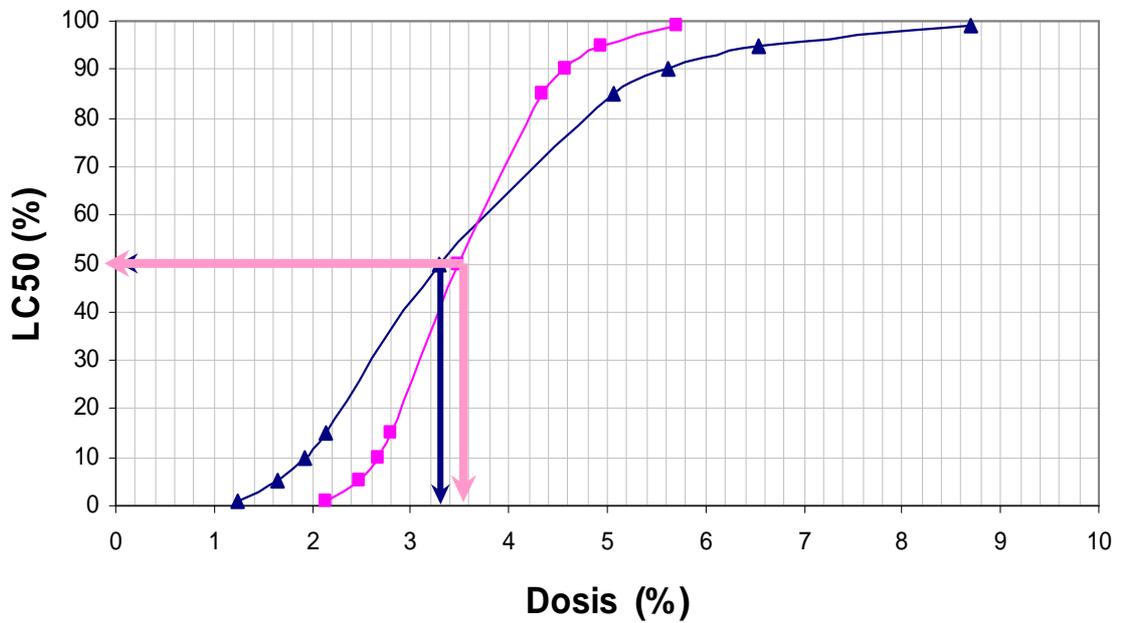
[1] Belmonte *et al.* (2008); [2] Choi, (2007).

La Figura 4, describe los rangos de concentraciones del efluente purín de cerdo, que fue sometido a los bioensayos y sus respectivas respuestas, visualizados con el % de mortalidad de organismos muertos, destacando que al obtener el primer valor de LC<sub>50</sub>, permitió restringir el rango de concentraciones para el segundo bioensayos, y así obtener un valor de LC<sub>50</sub> más certero. La Figura 3, describe las curvas Dosis-Respuesta obtenidas de los ensayos de toxicidad aguda realizados al purín de cerdo, crudo, antes de que sean sometidos a los distintos fraccionamientos de la metodología TIE. El primer ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, muestra un valor de LC<sub>50</sub> 48h de 3,3% (rango 2,7 – 3,9%) y el segundo bioensayo un valor de 3,5 (rango 3,2 – 3,7) valores que determinan que el efluente de purín de cerdo crudo, (proveniente de un tratamiento primario) es altamente tóxico. Es importante destacar que el purín sometido a estas pruebas fue previamente filtrado y diluido al 10%, lo que indica que el valor de LC<sub>50</sub> obtenido, es 10 veces más tóxico. Cabe mencionar, que el valor

promedio del LC<sub>50</sub> obtenido para los dos ensayos preliminares de toxicidad aguda fue de 3,4.



**Figura 5.** Dosis – Respuesta de purín de cerdo ■ Primer Bioensayo ■ Segundo Bioensayo



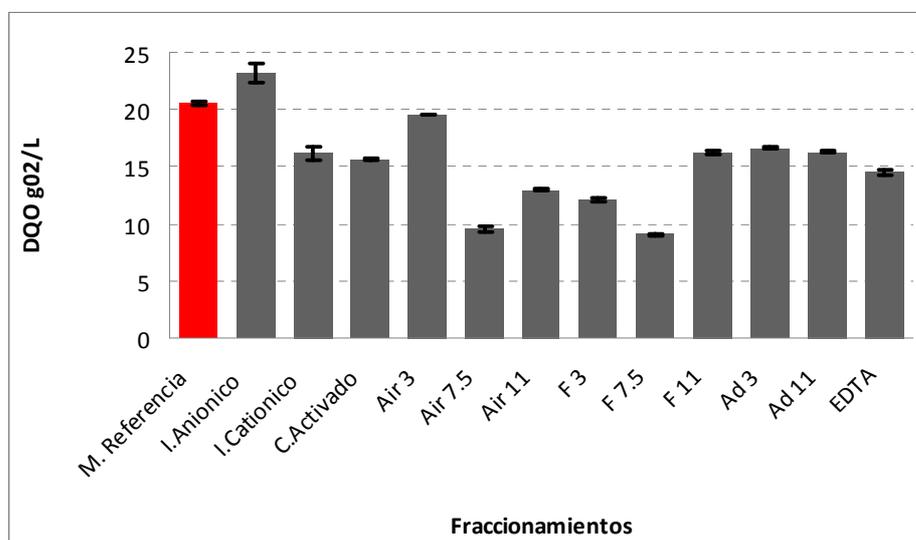
**Figura 6.** Dosis – LC<sub>50</sub>. ▲ Primer Bioensayo ■ Segundo Bioensayo.

## 5.2 Efectos de los tratamientos sobre los parámetros físico-químicos.

Una vez caracterizado el efluente, la muestra fue sometida a diferentes fraccionamientos para observar su efecto sobre las características físico-químicas medidas inicialmente.

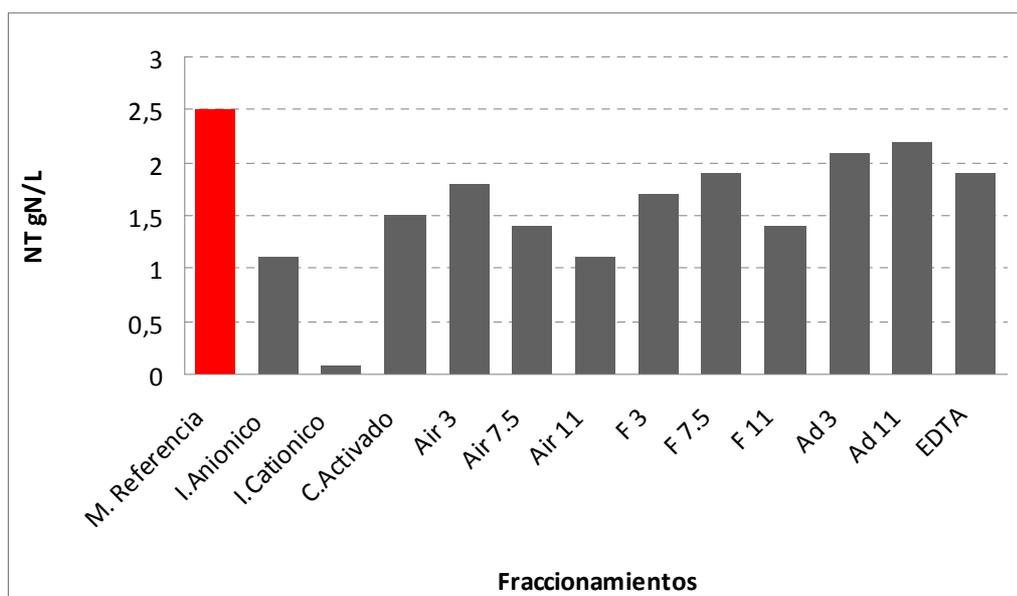
En la Figura 7 se observa, que todos los fraccionamientos del TIE, redujeron la DQO, con respecto a la muestra de referencia, destacándose los tests de aireación (52%) y filtración (56%) a pH inicial. Los demás fraccionamientos lograron reducir la DQO, en porcentaje menor, destacándose el test con carbón activado el cual permite retener una gama muy amplia de compuestos químicos (orgánicos e inorgánicos) y que sólo disminuyó en un 24%.

Sin embargo, el test de Intercambio Aniónico, aumentó (16,41%) la cantidad DQO con respecto a la muestra original. Este comportamiento puede estar relacionado con algunos aniones (Cloruros y/o Sulfatos) presentes en el purín de cerdo y que tienen influencia sobre este parámetro químico.



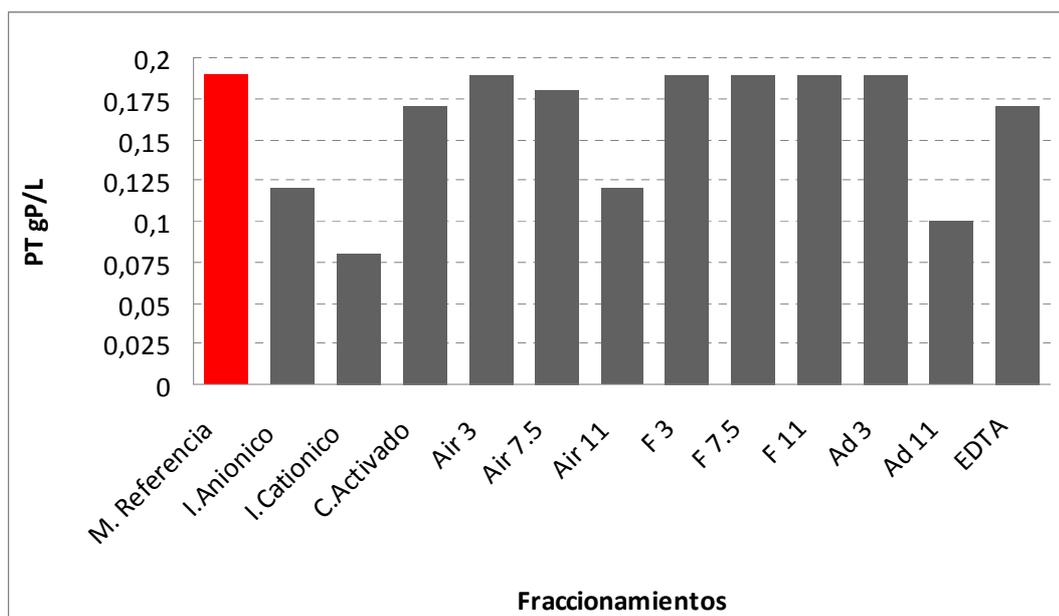
**Figura 7.** Comparacion de la variacion de la DQO entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón Activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5 ; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

Con respecto a la concentración de Nitrógeno total (g/L) se observó (Fig. 8) reducción de este en todos los fraccionamientos, destacándose el Test de Intercambio Catiónico, que redujo casi un 100% la concentración de este parámetro químico, lo que indica que el nitrógeno en forma de amonio fue retenido por la resina e intercambiado por protones.



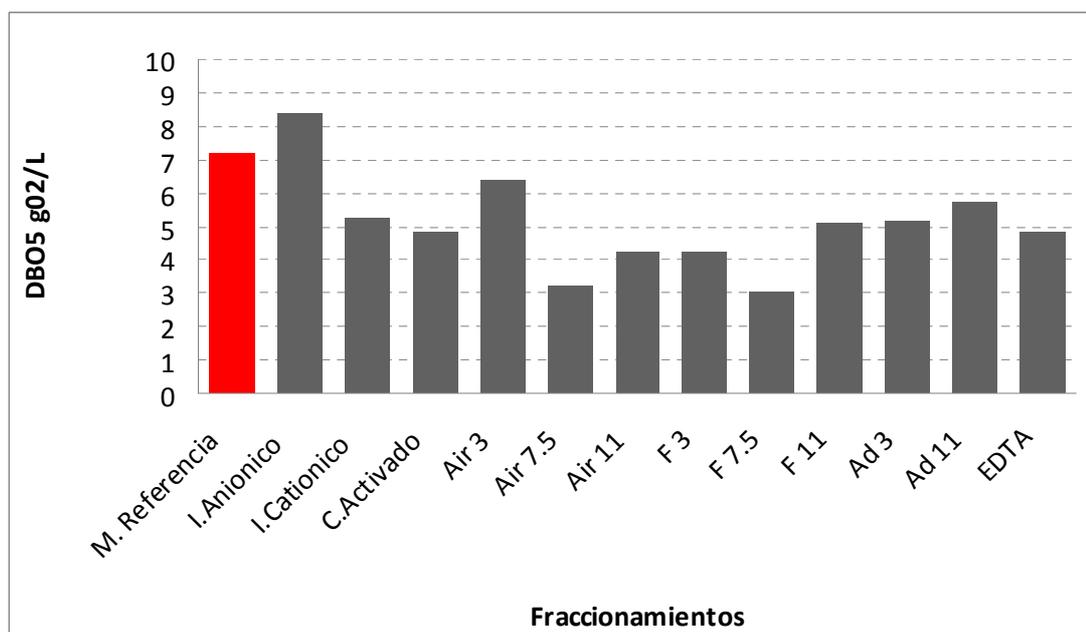
**Figura 8.** Comparacion de la variacion de NT entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón Activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

En general los valores de Fósforo total, se mantuvieron inalterables con respecto al valor observado en la muestra de referencia, es decir los tratamientos no provocaron cambios significativos en la disminución y/o aumento de este parámetro. El tratamiento fue más efectivo en la reducción de Fósforo total, para el test de Intercambio Catiónico (58%), debido a que este retiene cationes.



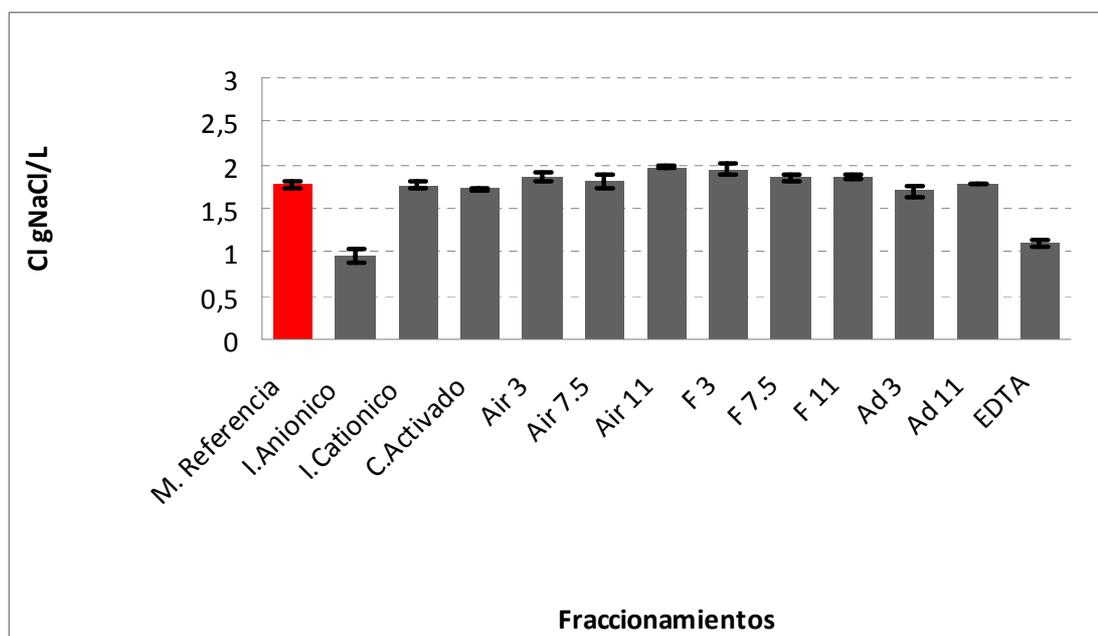
**Figura 9.** Comparacion de la variacion de PT entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

En el caso de la  $DBO_5$ , se observa que el comportamiento de los valores está relacionado en forma directa con los valores de la DQO, destacándose que los tratamientos que redujeron en mayor cantidad la materia orgánica, fueron el de Aireación (55%) y Filtración (58%) a pH inicial. También se observa, que el tratamiento de con Carbón Activado produce una disminución en la concentración de  $DBO_5$ , (27%), ya que este soporte retiene los compuestos orgánicos de la muestra, que son los principales constituyentes de este parámetro. Otro tratamiento a destacar es el test de Intercambio Aniónico, debido a que en este test se aumenta el valor de  $DBO_5$ .



**Figura 10.** Comparacion de la variacion de  $DBO_5$  entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón Activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

Por otra parte, y como se observa en la Figura 11, los cloruros, aumentaron en la mayoría de los fraccionamientos. En el caso del fraccionamiento de Carbón Activado, la concentración se mantuvo, lo que puede estar relacionado a que este compuesto presenta impurezas ( $Cl^-$  0,01%) que aportan iones de cloro a la muestra (Reyes, 2006). En el caso de los test que lograron reducir la cantidad de Cloruros presentes en las muestras, en relación a la muestra de referencia, se observa que la mayor remoción de cloruros se produce por el tratamiento de intercambio aniónico (45,79 %), debido principalmente a que la forma iónica de esta resina es en base a grupos  $OH^-$  lo que permite reemplazar todos los aniones presentes en la muestra por este grupo funcional, reteniendo los aniones de  $Cl^-$ .

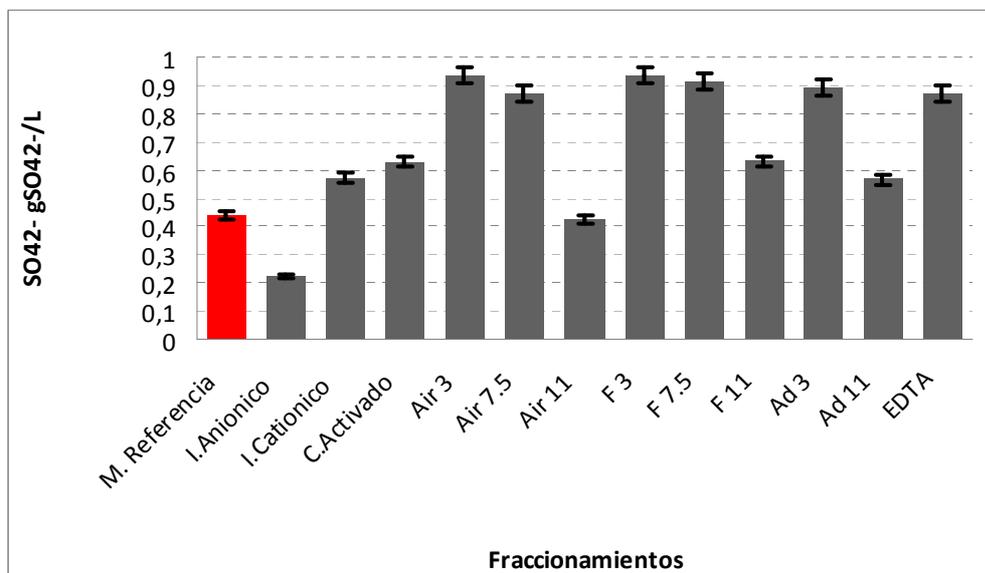


**Figura 11.** Comparacion de la variacion de  $Cl^-$  entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

Como se muestra en la Figura 12, los sulfatos se caracterizan también por estar presentes en el efluente en concentraciones bajas, y no superan 1 g/L. Estos compuestos aumentan, su concentración en casi todos los test, respecto a la muestra de referencia, por ejemplo el test de Carbón Activado debido a que este soporte, de la misma manera que para los cloruros, presentan un porcentaje de impurezas ( $SO_4^{2-}$  0,01%) alcanzando valores por sobre los 0,6 g/L.

Los tratamientos más efectivos en la reducción de sulfatos son el test Aireación a pH 11 y el test de intercambio aniónico, en este último fraccionamiento los iones sulfatos quedan retenidos y son reemplazados por los grupos OH; sin embargo, aun queda una

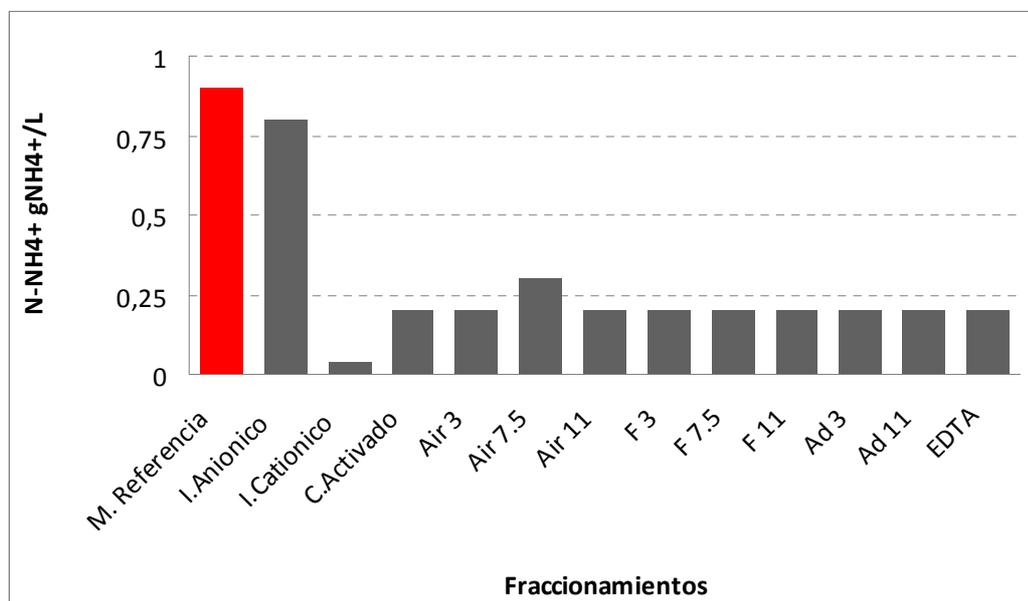
fracción remanente, lo que sugiere una saturación de la resina. Por otro lado, la disminución de la concentración de sulfatos a pH básico indica que este tipo de compuestos son fácilmente oxidables y precipitables (comportamiento similar de test de Aireación 11 y Adaptación 11).



**Figura 12.** Comparacion de la variacion de  $\text{SO}_4^{-2}$  entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

Con respecto al amonio presente en el efluente de purín de cerdo, se puede observar, que todos los tratamientos redujeron la cantidad de este parámetro, con respecto al test de referencia (>78%); sin embargo el test de Intercambio Catiónico, redujo un 95% el contenido de amonio presente en la muestra, esto debido a que la resina de Intercambio Catiónico, capta los cationes  $\text{NH}_4^+$  los retiene y los intercambia por  $\text{H}^+$ . Por otro lado, el test de Intercambio Aniónico, también presentó una reducción, que fue menor a la del intercambio cationico (11%), lo que puede estar relacionado a que esta resina no es

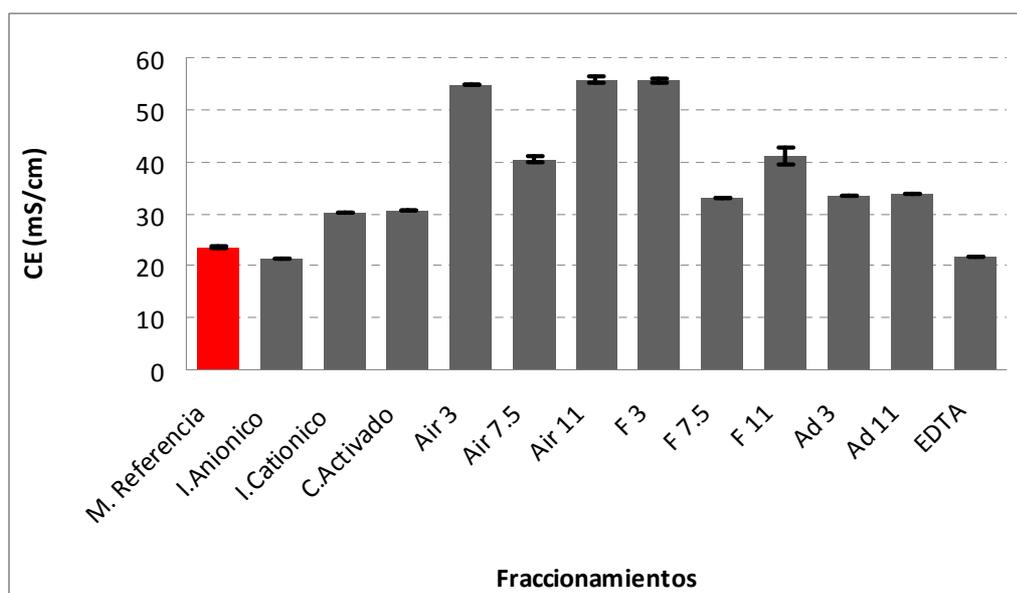
sensible a este tipo de compuestos, por lo tanto los valores obtenidos son muy similares a los de la muestra de referencia.



**Figura 13.** Comparacion de la variacion de  $\text{NH}_4^+$  entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

La conductividad eléctrica, como lo muestra la Figura 14, muestra un aumento de ella en casi todos los fraccionamientos, destacándose los valores más altos, con casi un 35% de aumento de la conductividad para los test de Filtración a pH 3 y el de Aireación a pH 11. Estos valores, se encuentran relacionados con los valores de cloruros obtenidos, que presentaron un comportamiento similar.

Por otra parte el test EDTA y el de Intercambio Aniónico presentan una disminución en la conductividad de casi un 10 %, este último se relaciona directamente con la remoción de Cloruro que tuvo este mismo test.



**Figura 14.** Comparacion de la variacion de la CE entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; I.A= Test Intercambio Aniónico; I.C = Test de Intercambio Catiónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

### 5.3. Pruebas toxicológicas

Para determinar el efecto sobre la toxicidad de la muestra se sometió a análisis por medio de bioensayos agudos estandarizados, para obtener el  $LC_{50}$  48h y sus respectivas Unidades de Toxicidad (Tabla 3), para cada uno de los tratamientos de tal manera de determinar el o los test que lograrán disminuir la toxicidad de la muestra.

Con estos valores estandarizados se procedió a construir el perfil de reducción de la toxicidad (Figura 15), para poder apreciar la acción de los distintos tratamientos a que los que fue sometida la muestra y poder identificar así el o los compuestos que causan la toxicidad del efluente.

Como se puede observar 9 de los 12 test, aumentaron la toxicidad y los restantes la redujeron, aunque en %RT bajos.

**Tabla 3.** Valores de toxicidad (LC<sub>50</sub> 48h) de los distintos fraccionamientos incluido el test de referencia y los valores de UT.

<b>Fraccionamiento</b>	<b>LC<sub>50</sub> 48 h</b>	<b>% RT</b>
Referencia	3,39 %	-
Intercambio Aniónico	4,45 %	22,46
Intercambio Catiónico	0,48 %	-624,4
Carbón Activado	3,83 %	9,87
Aireación 3	3,26 %	-5,8
Aireación 7.5	3,02 %	-14,14
Aireación 11	2,31 %	-49,47
Filtración 3	3,30 %	-4,65
Filtración 7.5	3,09 %	-11,63
Filtración 11	2,88 %	-20,07
Adaptación 3	3,14 %	-9,82
Adaptación 11	2,96 %	-16,61
EDTA	3,66 %	5,73

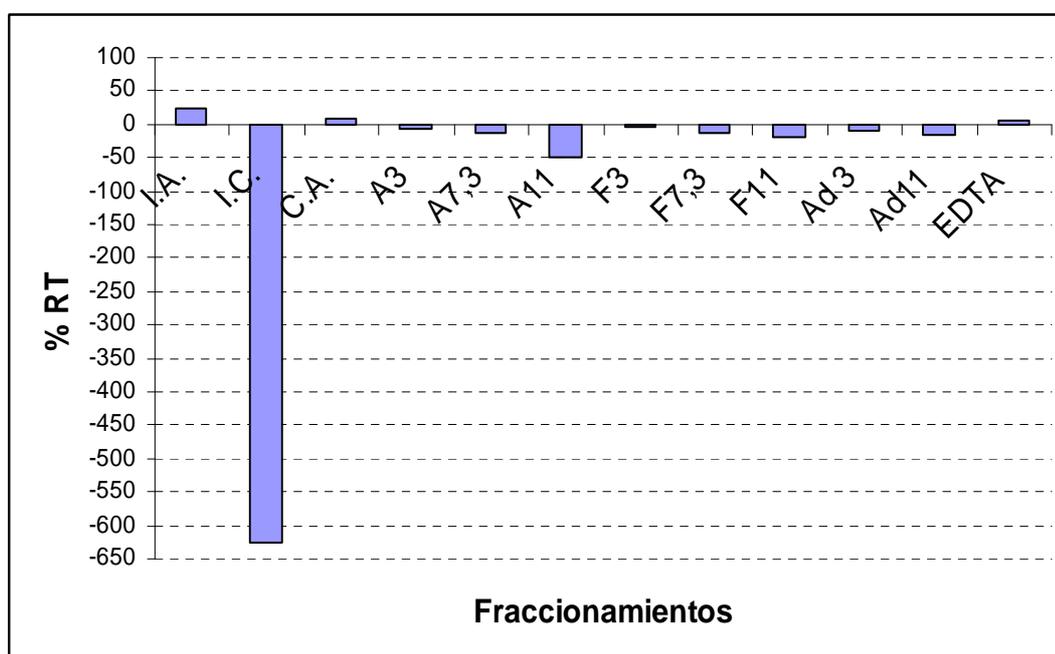
El test de Intercambio Aniónico logra el mayor porcentaje de reducción de la toxicidad (23,77%), asumiendo que la toxicidad se puede deber a la presencia de compuestos inorgánicos anionicos, como nitritos, nitratos, Cloruros y/o sulfatos. Esto coincide con la mayor eliminación de Cl<sup>-</sup> (45,8%). Sin embargo la DQO y la DBO<sub>5</sub> aumentaron en un 13% y 17% respectivamente. También se aprecia que ni el pH, ni el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, están influyendo en la toxicidad.

Otro test que presentó reducción de la toxicidad es el test de Carbón Activado, el cual mostró una reducción de nitrógeno (40%), y disminuye la cantidad de DQO, debido a que atrapa las moléculas orgánicas y también extrae metales que puedan estar presentes en la muestra. El carbón activado debido a su alta porosidad y gran superficie específica

es muy eficiente en la adsorción de metales pesados. El EDTA por su parte, forma fuertes complejos con metales divalentes y trivalentes (Reyes, 2006).

Sin embargo, el comportamiento general del perfil de reducción de toxicidad, no se relaciona con el parámetro químico DQO.

El test que menos reducción de toxicidad arrojó es el test de Intercambio Catiónico con un valor de -612,18%. Esto puede estar relacionado con un aumento del pH a 11,7 debido a la eliminación de  $\text{NH}_4^+$  (95%), y de N total (97%).



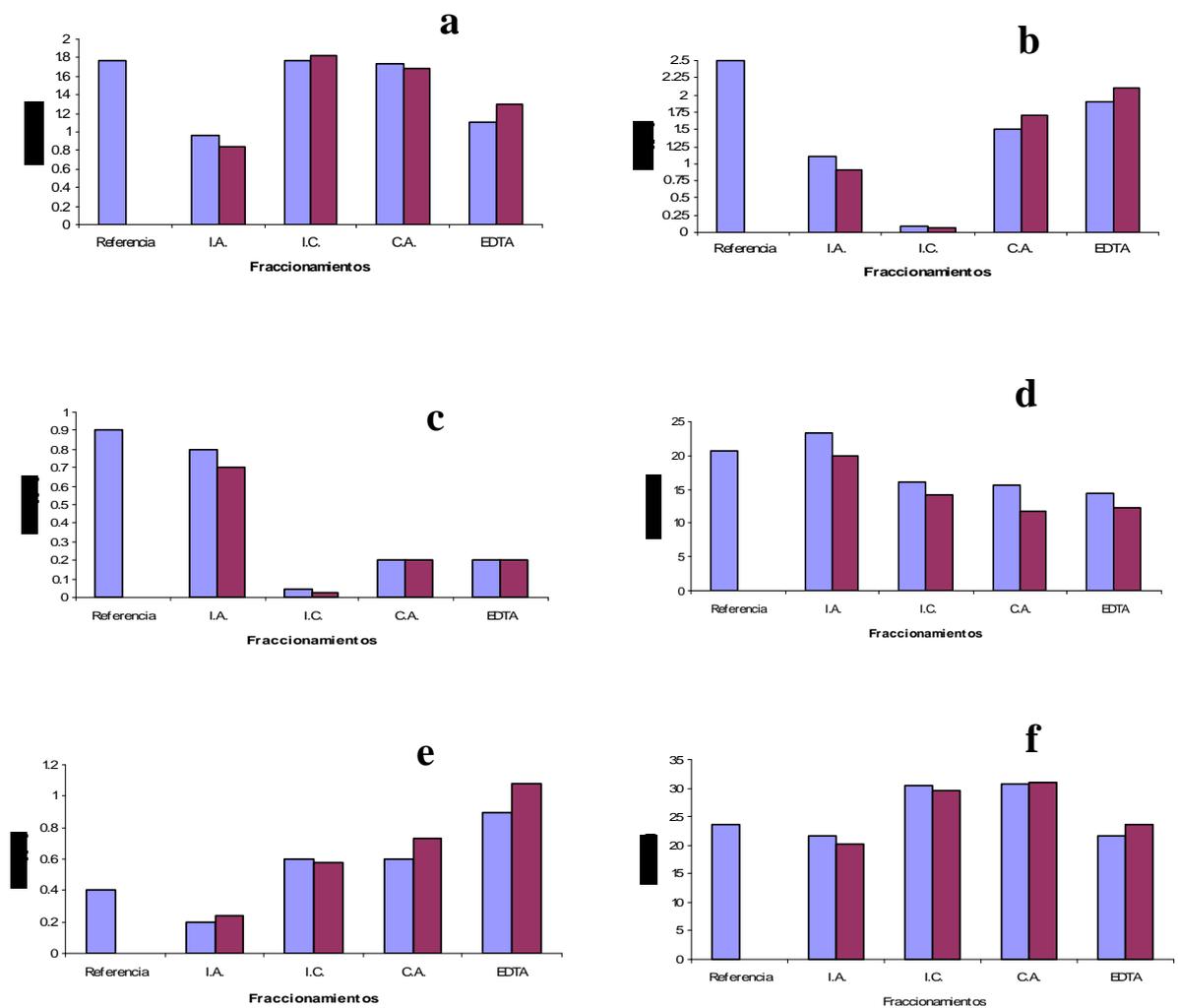
**Figura 15.** Perfil de Reducción de la Toxicidad (%RT), donde I.A.= Test de Intercambio Aniónico; C.A.= Test Carbón activado; I.C.= Test Intercambio Aniónico; Air 3= Test Aireación pH 3; Air 7,5= Test Aireación pH 7,5; Air 11= Test Aireación pH 11; Ad 3= Test Adaptación pH 3; Ad 11= Test Adaptación pH 11; F 3 = Test Filtración pH 3; F 7,5 = Test Filtración pH 7,5; F 11 = Test Filtración pH 11 y EDTA= Test EDTA.

El efluente indica una toxicidad aguda para *Daphnia magna* con valor de  $LC_{50}$  48 h de 3,4% y un valor de UT de 29,5, El efluente (purín porcino) es tóxico a concentraciones menores al 3,4% para la mitad de la población de organismos ensayados. Al reducirse la toxicidad de la muestra en los test de Intercambios Iónico, Carbón Activado y EDTA, se observa que la toxicidad esta dada por iones, moléculas orgánicas y/ complejos de metales, respectivamente presentes en la muestra.

#### **5.4. Comparación de resultados de los fraccionamientos seleccionados**

Evaluando los resultados obtenidos, se analiza aquellos fraccionamientos en donde se apreciaron mejor las variaciones de compuestos medidos tomando en cuenta también los perfiles de reducción de la toxicidad. Estos tratamientos corresponden al Test de Carbón Activado, Test de Intercambio Aniónico, Test de Intercambio Catiónico y el Test de EDTA; sin embargo y aunque se hace énfasis en aquellos fraccionamientos en donde la toxicidad se disminuye, se consideran estos cuatro test por poseer los valores más significativos (extremos) de %RT (Ver Tabla 4).

Una vez que se determinaron los fraccionamientos que reducen en forma significativa la toxicidad del efluente, se comparan los resultados de las características físico-químicas para evaluar posibles diferencias obtenidas en los valores preliminares con los obtenidos nuevamente. En la Figura 16a, se muestran los valores comparativos de Cl<sup>-</sup> para cada uno de los fraccionamientos, a pesar de que los valores obtenidos posterior a la selección de los tratamientos difieren, la tendencia es la misma, aunque el test de intercambio aniónico logra reducir aun más la concentración de Cloruros pero no en forma significativa, comportamiento que puede relacionarse con saturación de la resina o determinación analítica de parámetro. Para el N total,  $NH_4^+$ ,  $SO_4^{-2}$  y CE (Figura 11b, 11c, 11e y 11f) hay reducción o aumento en algunos casos, pero los valores son muy similares con igual tendencia En el caso de la DQO la tendencia fue una disminución en todos los test pero el comportamiento general fue el mismo



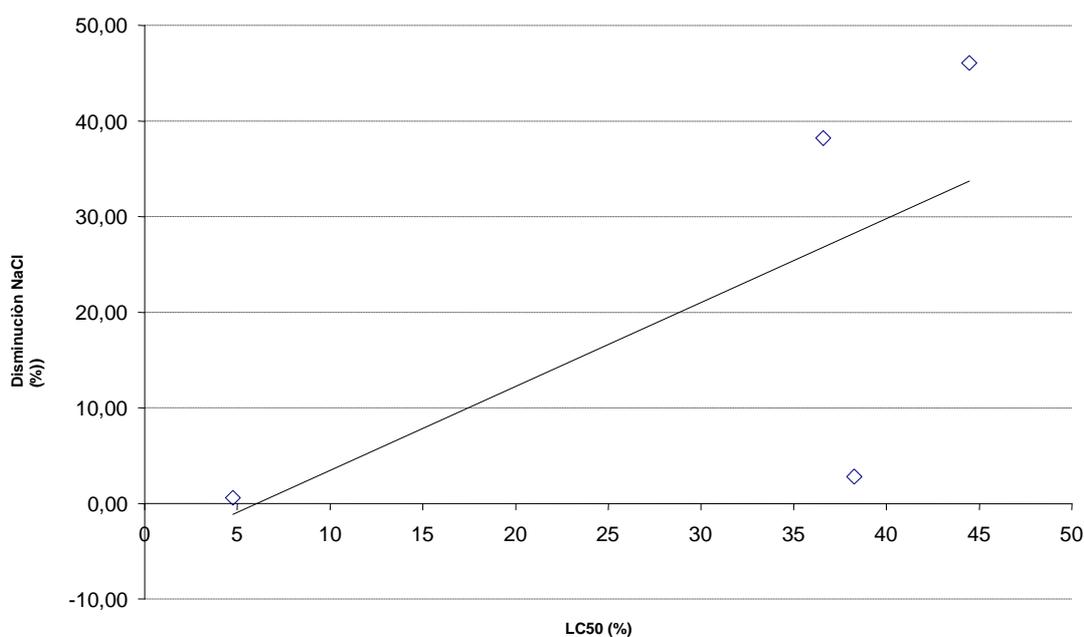
**Figura 16.** Comparación de las concentraciones de los diferentes parámetros físico-químicos, evaluados después de la selección de los fraccionamientos: donde a) Cl<sup>-</sup>; b) NT; c) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; d) DQO; e) Sulfatos; y f) CE. ■ Concentración antes de la selección; ■ Concentración posterior a la selección

### 5.5 Fase de Confirmación

Para la confirmación de los compuestos sospechosos que causan la toxicidad, se correlacionaron los compuestos responsables de la toxicidad y la toxicidad observada para los fraccionamientos seleccionados (Tabla 4).

**Tabla 4.** Correlación del porcentaje de disminución de los parámetros físico-químicos sospechosos de causar toxicidad con el LC<sub>50</sub> de los fraccionamientos más significativos (I.A. I.C. C.A. y EDTA).

Parámetro	Coef. Corr. múltiple	Ecuación	R <sup>2</sup>
NaCl	0,66	NaCl = 0,8784LC <sub>50</sub> - 5,3349	0,44
NT	-0,82	Nt = -1,4313LC <sub>50</sub> + 98,595	0,67
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0,68	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = -1,4297LC <sub>50</sub> + 109,9	0,47
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0,24	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> = 0,973LC <sub>50</sub> - 73,93	0,06
CE	0,61	CE = -0,7436LC <sub>50</sub> - 33,915	0,37



**Figura 17.** Correlación del porcentaje de disminución de NaCl con el LC<sub>50</sub> para los fraccionamientos más significativos (I.A, I.C, C.A y EDTA)

Se observa que los sulfatos tienen una baja correlación con la toxicidad, ya que el coeficiente de correlación es bajo; esto indica que este parámetro no es el causante de la toxicidad. También se destaca que para los parámetros NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NT, muestran una alta

correlación, con la toxicidad, pero no como causante de ella, sino como un elemento que en su presencia disminuye la toxicidad del efluente. Una explicación de esta correlación, es que estos compuestos en abundancia, reaccionen con compuestos que si causan toxicidad, inhibiendo su efecto por si solo. Por último, se observa en la Tabla 4 y en la Figura 17, que el compuesto sospechoso que más correlación tiene con la toxicidad del efluente es el  $\text{Cl}^-$ , lo que sugiere que la toxicidad se debe al aumento de los Cloruros que a su vez se relaciona con la Conductividad eléctrica, ya que para que los límites de tolerancia de Cloro para el organismo *Daphnia magna* deben estar en el orden de 1800 mg/L. A su vez, al aumentar la CE del medio, provoca una salinización del medio, lo que también afecta a estos organismos (EPA, 1993).

## 6. DISCUSION

### 6.1. Parámetros físico-químicos

Los efluentes de la industria porcina se caracterizan por contener cantidades significativas de materia orgánica, nutrientes y conductividad eléctrica, que derivan principalmente del tipo de dieta, ya que los animales no fijan más que una parte de los nutrientes contenidos en los alimentos. Así solamente un tercio del nitrógeno, que constituye la base de los aminoácidos y de la proteína de la dieta es metabolizada, y los dos tercios restantes son excretados a través de las heces y la orina, lo mismo sucede con el fósforo, el cual es retenido entre un 20 y un 40 %, el resto es excretado a través de las deyecciones (Pomar *et al.*, 2008). Esto puede causar efectos tóxicos agudos y crónicos sobre organismos que se encuentran en los cuerpos de aguas receptores.

Los valores registrados en este estudio para la caracterización físico-química, son corroborados por diferentes autores (Belmonte *et al.*, 2008; Choi, 2007). Sin embargo, se observaron valores inferiores de  $\text{N-NH}_4^+$  a los citados en bibliografía, lo que se puede relacionar a que estos purines poseen un elevado contenido de nitrógeno, del que aproximadamente un 60% es de tipo mineral (amonio) y otro 40% se encuentra en formas nitrogenadas fácilmente mineralizables (Labrador 2001; Diez *et al.*, 2003). Por otra parte, se sabe que los valores de la caracterización físico-química, pueden variar según el tipo de alimentación, tipo y estado de las instalaciones, estado fisiológico del animal, almacenamiento de las muestras, entre muchos otros factores (Parera *et al.*, 2008).

El pH puede variar entre 6 y 8, tendiendo a la neutralidad en la medida que las excretas sean más frescas. La alcalinidad y conductividad son propiedades más propias del agua de lavado y de bebida, que de la excreta (ACP, 1997).

La relación entre algunas propiedades físico-químicas, como pH, conductividad eléctrica o contenido de materia seca y la concentración de los principales nutrientes disponibles para los cultivos puede servir de ayuda para estimar el valor fertilizante de los purines. Algunos autores han observado correlaciones lineares altamente significativas entre el contenido total de sólidos y el nitrógeno total (Scotford *et al.*, 1998), entre la CE y el contenido de nitrógeno amoniacal (Belloti, 1997; Stevens *et al.*,

1995) o entre la densidad y los contenidos de fósforo y nitrógeno total (Scotford *et al.*, 1998).

Algunos autores, Scotford *et al.*, (1998) y Moral *et al.*, (2005), entre otros, han encontrado que la CE tiene correlación lineal con el contenido de nitrógeno amoniacal y total. Además Marqués-Miret, (2002), encontraron además una relación lineal importante entre la CE y el contenido de fósforo.

## 6.2. Pruebas toxicológicas

El ensayo de toxicidad aguda indica que el efluente de purín de cerdo presenta una alta toxicidad con un LC<sub>50</sub> promedio de 3,4%.

En general los efluentes de purín de cerdo contienen una amplia gama de compuestos tóxicos orgánicos como inorgánicos, y a pesar de que el efluente presenta toxicidad aguda es muy difícil poder afirmar que compuesto es el causante de la toxicidad.

Se ha demostrado que la tolerancia de pH para los organismos *Daphnia magna*, esta en el rango entre 5-9, valores más altos o bajos causan muerte a estos organismos. Se ha registrado que contenidos de NaCl deben estar en promedio en los 5,2 g/L (Castro *et al.*, 2002). Así mismo se ha demostrado que los cloruros son un compuesto altamente tóxico para las plantas acuáticas y algas pardas en concentraciones superiores a 0,2 y 0,5 mg/L respectivamente (van Wijk *et al.*, 1998 citado por Reyes, 2006), por lo que los valores encontrados en nuestro efluente pueden producir efectos tóxicos, si embargo estos compuestos son altamente solubles en agua (95,7 g / 100 ml a 20°C).

Ikehata and Buchanan (2000), demostraron la efectividad de una resina de intercambio aniónico en la reducción de cloratos provenientes de un efluente de celulosa kraft con proceso ECF. Esta resina con cuya forma iónica es hidróxido (OH<sup>-</sup>), logró reducir la concentración de cloratos en casi un 100%. Además los cloratos pueden ser removidos por tratamientos químicos con dióxido de azufre y biológicos en condiciones anaeróbicas (Malmqvist and Gunnarsson, 1993; van Wijk and Hutchinson, 1995).

A pesar de que en la mayoría de los tratamientos aumentó la concentración de cloruros en la muestra, no sobrepasan las concentraciones que pueden producir efectos tóxicos. Sin embargo, van Wijk *et al.* (1998) y van Wijk and Hutchinson (1995), sugieren que metabolitos del clorato como cloritos (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y cloruros (Cl<sup>-</sup>) son los causantes de la

toxicidad en microorganismos, en pequeños invertebrados y peces, que derivan de degradación enzimática (Nitrato reductasa) o de la oxidación del  $\text{ClO}_3^-$ .

Los sulfatos se caracterizan también por estar presentes en el efluente, en concentraciones bajas que no superan el 1 g/L. Estos compuestos aumentan su concentración en casi todos los test, por ejemplo el test de carbón activado debido a que este soporte, de la misma manera que para los cloruros, presenta un porcentaje de impurezas ( $\text{SO}_4^{-2}$  0,01%) alcanzando valores por sobre los 0,6 g/L, pero que no aporta toxicidad a la muestra debido a que el test de carbón activado logró reducir la toxicidad del efluente, a pesar de un aumento en la concentración de sulfatos.

En el caso del test EDTA, que también logro reducir la toxicidad, Eklund *et al.* (2002) señalan que el EDTA reduce la toxicidad de varios metales (Cu, Fe, Mn, Zn, etc.) en bioensayos utilizando *Daphnia magna* como indicador, coincidiendo con nuestros resultados ya que el fraccionamiento con este soporte redujo la toxicidad de la muestra, aunque sólo en un 5,7%.

### **6.3. Evaluación e Identificaron de la Toxicidad (TIE)**

El procedimiento TIE fue realizado para identificar potenciales compuestos que causan toxicidad aguda en un efluente de purín de cerdo. En la fase 1 los resultados sugirieron que el tóxico sospechoso es un compuesto iónico de entre los cuales se caracterizaron cloratos, sulfatos, fosfatos,  $\text{NH}_4^+$ .

Solo los tratamientos de Intercambio Aniónico, Carbón Activado y EDTA, lograron reducir la Toxicidad. Por otra parte, el test de Intercambio Catiónico aumento la toxicidad, lo que se relaciona con una nula eliminación de iones  $\text{Cl}^-$  y con una alta eliminación de  $\text{NT}$  Y  $\text{NH}_4^+$ . Esto puede ser causado, por que el Nitrógeno, cambia de estado según las condiciones, y por condiciones de almacenamiento y tiempo desde la toma de muestra el amonio puede transformarse en amoniac, así lo señala De la Torre *et al.* (2000) donde mediante análisis toxicológicos determinaron que la toxicidad evaluada con *Daphnia magna* es causada por el  $\text{NH}_3$ . Además, el nitrógeno presente en el purín se encuentra en forma orgánica y mineral. El nitrógeno mineral, a su vez, está integrado por el nitrógeno amoniacal y nítrico, viniendo a representar, en su conjunto,

aproximadamente el 60-70% del nitrógeno total. El nitrógeno orgánico representa al rededor del 22% del nitrógeno total. El resto podemos clasificarlo como nitrógeno residual. El nitrógeno amoniacal, presente en la fracción líquida, proviene de la degradación de la urea de la orina, mientras que el nitrógeno orgánico es excretado en las heces (Martínez Pereda y Carbonell, 1996).

Solo los tratamientos con carbón activado, de intercambio iónico y el test con EDTA logran reducir la toxicidad del efluente con valores mayores a 2,0 UT. Todos estos soportes tienen en común la retención de compuestos inorgánicos como cloratos, sulfatos, metales y otros compuestos catiónicos inorgánicos. Sin embargo, los %RT, no superan el 22% para el caso del test de Intercambio Aniónico que fue el que mayor redujo toxicidad, para el Test de Carbón Activado y EDTA los %RT fueron 10 y 6% respectivamente.

Como la toxicidad de las muestras tratadas con las resinas no disminuyó en su totalidad, todavía existe una fracción tóxica, lo que sugiere que la toxicidad se debe a alguno de estos compuestos.

Los cambios de toxicidad no se reflejan en todos los análisis químicos dado que el test de Intercambio Catiónico disminuye la concentración de compuestos NT y  $\text{NH}_4^+$  y éste presentó un importante aumento de la toxicidad.

Por último se determinó que los compuestos causantes de la toxicidad no se eliminaron con procesos de filtración y aireación, ni tampoco por cambios de pH. Aunque este último por sí solo, en variaciones fuera del rango de tolerancia (5-9) para *Daphnia magna*, provoca muerte de estos organismos.

## 7. CONCLUSIONES

- La caracterización físico-química de los purines crudos de cerdo, indica elevadas concentraciones de materia orgánica, nutrientes y conductividad eléctrica, debido a la presencia de cationes y aniones.

- Los purines de cerdo, crudos evaluados con *Daphnia magna* resultan ser altamente tóxicos ( $LC_{50} = 3,4 \%$ , en promedio de los dos bioensayos), por lo cual se concluye que causan toxicidad aguda en el organismo *Daphnia magna* lo que se debe a la presencia de Cloruros y CE en el efluente, ya que guardan una alta correlación entre el porcentaje de eliminación de estos, con los valores de la toxicidad ( $LC_{50}$ ) y por tanto, se acepta la hipótesis de la tesis.

- Por otra parte no se encontró en forma directa influencia de carga orgánica y nutrientes en la toxicidad aguda de *Daphnia magna*, debido a que la materia orgánica generalmente causa muerte en los organismos por inanición. En relación a los nutrientes, estos influyen en la cantidad y estado del Cloruro, que es el que causa la toxicidad, ya que el test que más redujo toxicidad (Test de Intercambio Aniónico), tuvo una concentración de  $NH_4^+$  (0,8 g/L), similar a la muestra de referencia.

- La aplicación de la metodología TIE se hace imprescindible, para poder conocer el origen de los compuestos, que son responsables de la toxicidad aguda del purín crudo de cerdo.

- Cada tratamiento aplicado fue específico pero no todos fueron efectivos para la reducción de la concentración de todos los parámetros, en definitiva los test tienen una relación cooperativa y no excluyente en la detección de contaminantes causantes de toxicidad.

- El carbón activado fue uno de los tratamientos más eficiente en la reducción de la toxicidad, sin embargo, no logró reducir en su totalidad los compuestos orgánicos presentes en la muestra.
  
- El test con EDTA logra reducir la toxicidad del efluente en solo un 5,7%, debido a que es específico para acomplejar metales pesados, es importante resaltar que en este trabajo no se determinó metales pesados.
  
- El tratamiento menos eficiente para la disminución de la concentración de los parámetros fue el Intercambio Catiónico.
  
- De acuerdo a la experiencia de este trabajo, se sugiere que la determinación de toxicidad para purines porcinos, debido a sus características físico-químicas (altas concentraciones de CE, carga orgánica y nutrientes), se realice con más de un nivel trófico (fitoplancton, zooplancton, micro y macro invertebrados), esto con la finalidad de establecer el efecto global de este tipo de efluentes, ya que el organismo utilizado (*Daphnia magna*) presenta sensibilidad extrema a la mayoría de los compuestos presentes en este tipo de efluentes, lo que hace que la determinación de toxicidad aguda sea proclive a variaciones por interferencia de efectos sinérgicos/antagonistas de compuestos.

## REFERENCIAS

Ahn, Y. H. 2005. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41: 1709-1721.

- A. I. De la Torre, J. A. Jiménez, M. Carballo, C. Fernandez, J. Roset and M. J. Muñoz. 2000. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. CISA-INIA, 28130.

- Andrade, J. C., A. Kunz, & R. Ziolli, 2009. Toxicological analysis of residuary waters of the swine creation using *Artemia* sp. I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de - Resíduos de Animais Tratamento de Dejetos de Animais. Florianópolis, SC – Brasil, 498-501.

- Andrés, P. 2008. El abonado de suelos con purines: buscando la reducción de riesgos. CREA, España, 3 pp.

- APL. 1999. Acuerdo de Producción Limpia sector productores de cerdo. 28 pp.

- APL- Asprocer. 2005. Acuerdo de Producción Limpia: implementación de buenas prácticas agropecuarias en el sector de producción porcino intensivo. 68 pp.

- Babot, D., A., N., L., De la Peña, & E. R Chávez,. 2004. Técnicas de gestión medioambiental en la producción porcina. Proyecto Trama. 135 pp.

- Chamy, R., J. Carrera, , D. Jeison, , & G. Ruiz, 2003. Avances en biotecnología ambiental: tratamiento de residuos líquidos y sólidos. Segunda Edición, Ediciones Universitarias de Valparaíso, 255 pp.

- Choi, E. 2007. Piggery waste management: towards a sustainable future. Publishing IWA, 174 pp.

- Deng L., Cai, Ch. & Z. Chen 2007. The treatment of pig slurry by a full-scale Anaerobic-Adding Raw Wastewater-Intermittent Aeration Process. *Biosystems engineering*, 98: 327-334.

- Díez, J. A., A. De La Torre, M. C. Cartagena, M. Carballo, A., Vallejo, & M. J. Muñoz, 2001. Slurry application to a crop experimental field. Agronomic and ecotoxicological approaches. *Journal Environmental Quality*, 30: 2165-2172.
- Díez, J.A., Vallejo, A., Aguayo, S. y Muñoz. M. J. 2003. Claves agronomicas para la aplicacion de purines de cerdo respetando el medio ambiente. *Porci*, 77, 39-53.
- Eklund B. Bruno E. Lithner G and Borg H. 2002. Use of ethylenediaminetetraacetic acid in pulp mills and effects on metal mobility and primary production. *Environ Toxicol Chem.* 21(5):1040-1051.
- EPA. 1993. Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia (D. pulex and Ceriodaphnia)*. 131-147.
- Hsieh, C. F. 2009. Toxicidad metanogénica de purín de cerdo mediante ensayos discontinuos. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Ambiental, Universidad de La Serena, La Serena, Chile, 94 pp.
- Flotats, X., Bonmatí, A., Campos, E. & M. Antúnez 1999. Ensayos en discontinuo de co-digestión anaerobia termofílica de purines de cerdo y lodos residuales. *Información tecnológica*, 10 (1): 79-85.
- Germán, C., J. Camacho, & J. Gallegos, 2005. Manual del participante: producción de cerdos. Secretaria de la Reforma Agraria, Institución de Enseñanza e Investigación de Ciencias Agrícola, México, 83 pp.
- Guandi, B. & C. A. Edwards, 2003. The effects of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia fetida* (Savigny) (Lumbricidae). *Pedobiología* 47. 9 p.
- Henze, M. 2006. Operación y caracterización de biomasa granular en reactores secuenciales SBR. Trabajo de Investigación Tutelado, Universidad de Santiago de Compostela, España, 140 pp.

- Ikehata K and Buchanan I. 2002. Colour and Chloride Removal from Pulp Mill Effluent Using Ion-Exchange Resins. Sustainable forest management networks. Proyectos Reports 2000-18. University of Alberta. Canada. 20 pp.
- INIA. 2005. Generación de información local en aplicación de purines de cerdo al suelo como apoyo a la implementación de los acuerdos de producción limpia. Informe Técnico final, Fondo de mejoramiento del Patrimonio Sanitario, Temuco, Chile, Proyecto 57-14-300, 225 pp.
- Kinney, Ch., E. Furlong, D. Kolpin, M. Burkhardt, S.Zaugg, , S.Werner, , J. Bossio, y M. Benotti, 2008. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science and Technology*, 42: 1863-1870.
- Labrador, J. 2001. La materia orgánica en los agrosistemas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Editorial mundi-prensa, Madrid, España. 293 pp.
- Llona, M. C., & A. Faz, 2006. Efectos en el sistema suelo-planta después de tres años de aplicación de purín de cerdo como fertilizante en un cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*). *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 6 (1):41-51.
- Malmqvist A and Welander T. 1994. Biological removal of chlorate from bleaching plant effluent. *Wat Sci Tech*. 29(5):365-372.
- Martinez, J.A. Y Carbonel, G. 1996. Riesgo medio ambiental de la utilización agraria de purines. *Porci*, 1996 (31). Pp 27-33.
- Metcalf & Eddy. 1995. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. Vol. II y II. 3° ed., Editorial McGraw-Hill, Madrid. 285 pp.
- Montalvo, S. & L.Guerrero, 2003. Tratamiento anaerobio de residuos: producción de biogás. Universidad Técnica Federico Santa María, 413 pp.
- Moset, V., Cambra, M., Beltrán M., Moya V., Láinez M. & A.Torres, 2008. Resultados pre-eliminarios de un estudio de caracterización de purines de porcino

obtenido en fosa bajo condiciones mediterráneas. *In*: Libro de Actas de I Congreso Español de Gestión Integral de Deyecciones Ganaderas, Magrí, A. , Prenafeta-Boldu, F. X., Flotats, X Barcelona, España. 77.82..

- Navés, J. & M. C.Torres, 1994. Composición fisicoquímica y valor fertilizante del purín de porcino procedente de explotaciones porcinas de la Comarca del Pla d' Urgell. *Problems Moderns en L' Us dels Sols: Nitrats*, 41-59. *Dosies Agraris ICEA*.

- Pankhurst, C. E., B. M., Doube, & V. V. S. R. Gupta, 1997. Biological indicators of soil health: synthesis. *In* *Biological Indicators of Soil Health* (eds. Pankhurst, C. E., Doube, B. M. y Gupta, V. V. S. R.), CAB International, New York, USA, 419-435.

- Parera, J., Domingo, F., Canut, N. y Serra, J. 2008. Determinación rápida de los nutrientes del purín de cerdo in situ en base a la lectura de la conductividad eléctrica para una correcta fertilización. *In*: Libro de Actas de I Congreso Español de Gestión Integral de Deyecciones Ganaderas, Magrí, A. , Prenafeta-Boldu, F. X., Flotats, X Barcelona, España. 77.82.

- Peralta, J. M. 2005. Recomendaciones técnicas para la gestión ambiental en el manejo de purines de la explotación porcina. Colección de Libros INIA (Instituto de Investigación Agropecuarias), N° 18: 1- 204 pp.

- Plaza de Los Reyes, C.& G. Vidal, 2007. Humedales construidos: una alternativa a considerar para el tratamiento de aguas residuales. *Tecnología del agua*, 228:34-44.

- Pomar, C., Pomar, J. y Babot, D. 2008. Mejora de la eficiencia y reducción del nitrógeno y del fósforo residual mediante aplicación de la alimentación de precisión en producción porcina. *In*: Libro de Actas de I Congreso Español de Gestión Integral de Deyecciones Ganaderas, Magrí, A. , Prenafeta-Boldu, F. X., Flotats, X Barcelona, España. 77.82.

- Ramalho, R. S. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverté S.A., 705 pp.

- Reyes, F. 2006. Caracterización química y toxicológica de un efluente de la etapa El de blanqueo de celulosa Kraft mediante una técnica de fraccionamiento. Tesis

presentada para optar al título de Biólogo Marino. Universidad de Concepción, Concepción. Chile. 85 pp.

- Romig, D. E., M. J. Garlynd, R. F. Harris, & K. McSweeney, 1995. How farmers assess soil health and quality. *J. Soil Water Conservation*, 50: 229-236.

- Smith, R. L., T. M. 2001. Ciclos biogeoquímicos. *In: Ecología*. 4° Edición, Editorial Addison Wesley, España. 387-406.

- Ternicer, C. 2005. Planteamiento de un modelo teórico de indicadores para la evaluación de impacto ambiental de sistemas intensivos de producción de carne porcina de exportación. Tesis de Magister en Gestión en Desarrollo Sustentable. Universidad Católica, Temuco, Chile. 97 pp.

- Van Velsen, A.F.M. 1979. Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations. *Water Research*, 13 (10): 995-999.

- van Wijk D. Kroon S and Garttner-Arends I. 1998. Toxicity of chlorite to selected species of algae, bacteria and fungi. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40:206-211.

- van Wijk D and Hutchinson T. 1995. The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: a critical review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 32:244-253

### **Citas electrónicas**

- ASPROCER (Asociación de Productores de Cerdo), Último acceso Mayo de 2009: [www.asprocer.cl](http://www.asprocer.cl).

- Bautista, A., Etcheves, J. Del Castillo, R. & C. Gutiérrez, 2004. La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas* 13 (2). Último acceso Mayo de 2009: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=149>.

- Belmonte, M., Jarpa, M., Arumi, J. & G. Vidal, , 2008. Swine wastewater treatment by a combined system: preliminary results. Ultimo acceso Mayo de 2009: <http://asae.frymulti.com/abstract.asp?aid=24339&t=2>.
- Castro, S., Espinola, J., Miguez, D. y Viana, F. 2002. Los Bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay. Ultimo acceso en Diciembre de 2009. [www.mvotma.gub.uy/dinama/index.php?option=com.docma](http://www.mvotma.gub.uy/dinama/index.php?option=com.docma).
- Comisión Nacional del Medio Ambiente de Chile (CONAMA). Ultimo acceso: Mayo, 2009. [www.conama.cl](http://www.conama.cl)
- González, S. Ingeniero Agrónomo INIA-La Platina. Caracterización de los purines de cerdo. <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR33212.pdf> . Consultado Mayo, 2009.
- Instituto Nacional de Estadísticas de Chile (INE). Ultimo acceso: Mayo de 2009: [www.ine.cl](http://www.ine.cl).
- Instituto Nacional de Estadísticas de Chile (INE). Ultimo acceso: mayo, 2009. [www.ine.cl](http://www.ine.cl)
- Milerky, C. & P. Lozada, 2004. Alimentación de cerdos. Ultimo acceso: Mayo de 2009: [www.ucla.edu](http://www.ucla.edu).
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Ultimo acceso Mayo de 2009: [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Piedras, S., Olivera, J., Moraes, P. & A. Bager, Toxicidade aguda de amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de Cichlasoma facetum. Ultimo acceso: Mayo de 2009: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v30n5/v30n5a27.pdf>.
- SAG,2009.[www.sag.gob.cl/recursosnaturales/manejo\\_purines\\_cerdo/pdf/anexo\\_3.pdf](http://www.sag.gob.cl/recursosnaturales/manejo_purines_cerdo/pdf/anexo_3.pdf). Ultimo acceso: Mayo de 2009.