

“Transporte de microorganismos indicadores de contaminación fecal en una cuenca de la Pampa Ondulada. El rol de las propiedades físicas y químicas de los suelos y de los sedimentos”

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias del Suelo

Filipe Behrends Kraemer

Ing. Agr. Facultad de Agronomía – UBA- (2007)

Lugar de trabajo: Cátedra de Manejo y Conservación de Suelos (FAUBA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Celio I., Chagas

Ing. Agrónomo (Facultad de Agronomía – UBA)
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios

Oscar J., Santanatoglia

Ing. Agr. (Facultad de Agronomía – UBA)

Juan A., Moretton

Farmacéutico y Bioquímico (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA)
Dr. Farmacia y Bioquímica (Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Celio Ignacio Chagas

Ing. Agrónomo (Facultad de Agronomía – UBA)
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

JURADO

Roberto O. Michelena

Ing. Agrónomo (Facultad de Agronomía – UBA)
Magister Scientiae en Manejo de Cuencas Hidrográficas. (Universidad de Los Andes, Venezuela)

Alicia E. Rendina

Lic. Química (Facultad de Ciencias Exáctas – UBA)
Magister en Ciencias del Suelo de la Universidad de Buenos Aires y Master en evaluación de Impacto Ambiental de la Universidad Autónoma de Yucatán (México) y el Instituto de Investigaciones Ecológicas (España)

Fecha de defensa de la tesis: 30 de Agosto de 2011

*A mi esposa, Patricia Fernández
Mi inspiración y compañera*

Agradecimientos

Aprovecho este espacio para realizar un sincero agradecimiento a todos los que hicieron posible la realización de esta tesis. A mi entender la presente tesis es un grato ejemplo de la transdisciplinariedad de las ciencias y la posibilidad concreta de aunar esfuerzos y criterios en ámbitos tan diferentes como los que participaron en la misma. Por ello quiero agradecer:

A mi Director, Celio Ignacio Chagas,
A él le agradezco por compartir su amor por la ciencia del suelo. Gran parte de mi crecimiento profesional y humano es fruto de su constante apoyo, enseñanzas y principalmente de su amistad.

A toda la Cátedra de Manejo y Conservación de Suelo, docentes y no docentes, por proporcionarme un cálido ambiente de trabajo y ayuda en cada etapa de la tesis. En particular quisiera agradecer a Félix Fernández por su paciencia y entendimiento. También quisiera agradecer a Esteban Palacín y Mario Castiglioni por el apoyo y ayuda en diferentes metodologías.

A Lucas Garibaldi, mi consejero estadístico, a quien agradezco profundamente su paciencia y dedicación, además de su estimada amistad.

Al grupo de Física de Suelos por las valiosas discusiones y aportes. Dentro de este grupo quisiera destacar a Miguel Taboada, Carina Alvarez, Patricia Fernández, Florencia Varela y especialmente a Diego Cosentino por su constante estímulo y participación activa en varias de las metodologías aplicadas.

Agradezco también el apoyo de la Cátedra de Higiene y Seguridad de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA dirigida por Juan Agustín Morettón, especialmente a Marta Paz por sus enseñanzas microbiológicas y compañerismo.

A Gabriel Vázquez por introducirme al mundo de los modelos computacionales, por su generosidad y hospitalidad recibida en Tandil.

A mis tesisistas de grado José Luis Uriarte y Santiago Utin por su ayuda metodológica y compañía.

También quisiera nombrar aquellos que aportaron significativamente a que la tesis llegara a buen puerto, a los cuales agradezco profundamente.

Héctor Morrás (INTA Castelar)

Alicia Iorio (Cátedra de Química Analítica)

Alfonso Buján (CONEA)

Eva Pawlac (CONEA)

Fernanda Tortarolo (Cátedra de Química General e Inorgánica)

Olga Correa (Cátedra de Microbiología)

A mi familia por su incondicional apoyo y estímulo, especialmente a mi hermano Francisco por su amor y amistad.

A mis Amigos Joaquín, Mariana, Rondo, Juana, Tomás y Carolina, mis guías y descanso en este camino.

Y finalmente a Patricia Fernández por acompañarme en cada momento como profesora, correctora,

A Patricia por todo.

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Importancia de la contaminación biológica de aguas.	2
1.2. Transporte de contaminantes biológicos	5
1.3. El rol de los suelos y sedimentos en la contaminación biológica	9
1.4. Procesos adsortivos asociados al transporte bacteriano en medios líquidos.	10
1.5. El rol de las propiedades físicas y químicas de los suelos y sedimentos en los procesos adsortivos.	15
1.6. Modelos computacionales de contaminación bacteriana -SWAT-	17
1.7 Objetivo general.....	18
Capítulo II	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Escalas de estudio	20
2.2 Ubicación geográfica, características climáticas, geomorfológicas, edáficas y de uso de la tierra del área bajo estudio.	22
2.3. Suelos utilizados en los ensayos	25
2.4. Microorganismos utilizados en los ensayos.....	25
Capítulo III	27
Adsorción y Partición de E. coli en suelos contrastantes de la Pampa Ondulada.	27
3.1 INTRODUCCIÓN	28
3.2 OBJETIVOS	31
3.3 HIPÓTESIS.....	31
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.4.1 Caracterización y muestreo de los sitios	32
3.4.2 Cuantificación de la adsorción de los microorganismos al sólido	34
3.5 Análisis estadísticos	36
3.6 RESULTADOS.....	38
3.6.1 Caracterización de los suelos según sus propiedades físicas y químicas	38
3.6.2 Asociación entre la adsorción microbiana y las propiedades edáficas.....	44
3.6.3 Predicción de la adsorción microbiana.....	47
3.7 DISCUSIÓN	48
3.7.2 Adsorción bacteriana y K_d	49

3.7.3 Asociación entre la adsorción bacteriana y las propiedades edáficas	49
3.7.4 Implicaciones agronómicas; erosión y contaminación.....	55
3.7.5 Predicción de la adsorción bacteriana	55
3.8 CONCLUSIÓN.....	57
Capítulo IV	59
Adsorción y Afinidad de E. coli a diferentes tamaños de agregados edáficos	59
4. 1 INTRODUCCIÓN	60
4.2 OBJETIVOS	63
4.3 HIPÓTESIS.....	63
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	64
4.4.1 Descripción del suelo y agua bajo estudio	64
4.4.2 Ensayo de adsorción y afinidad bacteriana a los distintos tamaños de agregados.	66
4.4.2.1 Adsorción Bacteriana	66
4.4.2.2 Afinidad Bacteriana.....	68
4.5 Análisis estadísticos	70
4.7 DISCUSIÓN	76
4.7.1 Asociación bacteriana por tamaño de agregados	76
4.7.2 Medio líquido y cepa bacteriana	78
4.7.3 Afinidad Bacteriana.....	80
4.7.4 Implicancias para el control de la contaminación hídrica	81
4.8 CONCLUSIÓN.....	82
Capítulo V.....	84
Adsorción y Coeficiente de Partición de E. coli en suelos contrastantes de la Pampa Ondulada bajo lluvia simulada.....	84
5.1 INTRODUCCIÓN	85
5.2 OBJETIVOS	89
5.3 HIPOTESIS.....	89
5.4 MATERIALES Y MÉTODOS	90
5.4.1 Propiedades físicas y químicas de los sitios estudiados	90
5.4.2 Descripción de los ensayos realizados a campo	92
5.4.3 Adsorción microbiana sobre diferentes tamaños de partículas presentes en el escurrido	94
5.5 Análisis estadístico.....	95
5.6.1 Caracterización edáfica e hidrológica de los sitios evaluados.....	96

5.6.2 Caracterización del escurrido	98
5.6.3 Adsorción y Kd bacteriano en laboratorio	101
5.6.4 Retención bacteriana	101
5.7 DISCUSIÓN.....	105
5.7.1 Propiedades del sistema analizado	105
5.7.2 Retención bacteriana y su relación con propiedades biológicas, físicas y químicas de los suelos	108
5.8 CONCLUSIÓN	111
Capítulo VI	113
Aplicación del Modelo SWAT en una microcuenca agrícola – ganadera de la Pampa Ondulada, Argentina.	113
6. 1 INTRODUCCIÓN	114
6.2 OBJETIVOS	117
6.3 HIPÓTESIS.....	118
6.4 MATERIALES Y MÉTODOS	119
6.4.1 El modelo SWAT	119
6.4.2 Ubicación de la microcuenca bajo estudio.....	120
6.4.3 Datos meteorológicos.....	120
6.4.4 Modelo de elevación Digital (DEM), Suelo y Uso del Suelo	122
6.4.5 Calibración y Validación.....	123
6.4.6 Pastoreo y Producción de Heces	124
6.4.7 Escenarios de Contaminación	125
6.5 Análisis estadístico.....	125
6.6.1 Calibración y Validación.....	126
6.6.2 Escenarios de contaminación biológica	128
6.7.1 Modelo hidrológico.....	133
6.7.2 Escenarios de contaminación.....	134
6.8 CONCLUSIONES	136
Capítulo VII	138
CONCLUSIÓN GENERAL	138
Anexo. 1. Simulación de lluvias.	155
Anexo. 2. Ejemplo de caracterización mineralógica de las muestras evaluadas.....	156
Anexo. 3. Escurrimientos observados y simulados a diferentes escalas y períodos.	157
Anexo 4. Suelos Utilizados en el modelo SWAT.....	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Enfermedades de transmisión hídrica y agente etiológico.....	3
Tabla 3.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos evaluados. En esta tabla se presentan la ubicación, tipo de suelo, pH, carbono orgánico (CO), capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE), porcentaje de sodio intercambiable (PSI), fuerza iónica, relación Na y Ca de la solución del suelo –solución-, porcentaje de arcilla, limo y arena, superficie específica (SE) y humedad equivalente (HE).	40
Tabla 3.2. Autovectores correspondientes al análisis de componentes principales. La significancia corresponde al análisis de correlación efectuado entre los componentes principales y cada variable.....	43
Tabla 3.3. Análisis de varianza para los efectos de tipo de suelo y concentración de muestreo sobre el componente principal 1 (CP1), el componente principal 2 (CP2) y el porcentaje de adsorción microbiana. Se presenta el estadístico F para cada término del modelo.	44
Tabla 4.1. (a) Propiedades físicas y químicas del suelo evaluado, siendo CO (carbono orgánico), CIC (capacidad de intercambio catiónico), SE (superficie específica) y CE (conductividad eléctrica). b) Características químicas del agua de cubeta y del agua destilada utilizadas en los ensayos biológicos.	65
Tabla 4.2. Cálculo de la superficie específica por tamaño de agregados para la muestra evaluada.	69
Tabla 4.3. Análisis de devianza para los efectos de tamaño de agregado, medio líquido y tipo de bacteria sobre la Distribución, la Adsorción y la Afinidad bacterianas.....	71
Tabla 5.1. Propiedades físicas y químicas de tres sitios en la Pampa Ondulada (valores promedio). DAP (densidad aparente), CC (capacidad de campo), SE (superficie específica), CIC (capacidad de intercambio catiónico), PSI (porcentaje de sodio intercambiable), CE (conductividad eléctrica) y CO (carbono orgánico).....	97
Tabla 5.2. Resultados obtenidos tras aplicar 1 h de lluvia simulada (intensidad 60 mm h ⁻¹) sobre tres sitios en la Pampa Ondulada.	98
Tabla 5.3. Variables biológicas y propiedades físicas y químicas al principio (15 minutos iniciales) y al final del escurrimiento (5 minutos finales) para tres sitios en la Pampa Ondulada. Kd (Coeficiente de distribución) y CE (Conductividad eléctrica), Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.....	99
Tabla 5.4. Regresiones lineales entre la Retención Bacteriana (%) en 1 h de simulación con una intensidad de 60 mm h ⁻¹ y variables biológicas, edáficas e hidrológicas en tres sitios de la Pampa Ondulada (n = 9 parcelas) y la Adsorción y Kd obtenida en laboratorio.....	103
Tabla 6.1. Valores de entrada del SWAT modificados en el proceso de calibración.	126

Tabla 6.2. Eficiencia de Nash-Sutcliffe y R^2 para la predicción de escurrimientos diarios y mensuales para el período de calibración (2000-2002) y el período de validación (2003-2005).
..... 127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Transporte bacteriano. Características de los procesos adsorptivos y no adsorptivos. Adaptado de Marshall (1980)	11
Figura 1.2 a) Energía de atracción y repulsión según separación de la partícula. Adaptado de Marshall (1979)	13
Figura 1.2 b) Energía de atracción y repulsión de una partícula según la concentración electrolítica. Adaptado de Marshall (1979)	14
Figura 2.2 a) Localización de la Cuenca del Tala, Prov. Buenos Aires y del Establecimiento “Los Patricios”. b) Uso de la tierra en la cuenca del arroyo del Tala. c) Mapa de elevación digital de la cuenca del arroyo del Tala.	24
Figura 2.3. Promedio histórico (1965-2006) mensual de precipitaciones en la estación INTA San Pedro. Prov. de Buenos Aires.	24
Figura 2.5. Fotomicroscópica de a) E. coli de laboratorio (ATCC 8739) y b) E. coli autóctona, aislada de heces bovinas recolectadas en suelos del establecimiento “Los Patricios”. San Pedro, Provincia de Buenos Aires.	26
Figura 3.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.	34
Foto 3.1. Morfología de agregados evaluados. Las fotografías a,b,c corresponden a suelos agrícolas (Los Patricios 13, 14, 15 respectivamente) y las fotografías d, e, f corresponden a suelos ganaderos (Colonia Velaz 3, Los Patricios 3 y 1 respectivamente).....	39
Figura 3.2. Resultados del análisis de componentes principales.	42
Figura 3.3. Regresión Lineal entre la Adsorción bacteriana (%) y el CP1.	45
Figura 3.4. Regresiones de las variables utilizadas con tendencia positiva, contenido de arcillas (%), CIC ($C \text{ mol Kg}^{-1}$) y superficie específica ($g \text{ m}^{-2}$) -panel izquierdo- y con tendencia negativa, PSI (%), contenido de arenas (%) y pH -panel derecho-.....	46
Figura 3.5. Regresiones de las variables utilizadas con tendencias diferentes según tipo de suelo, a) carbono orgánico (%) y b) Rel. Ca-sol (%).	47
Figura 4.1. Etapas del ensayo de adsorción bacteriana por tamaño de agregados edáficos.....	66
Figura 4.2. Distribución bacteriana, adsorción bacteriana relativa y afinidad bacteriana para diferentes tamaños de agregados y medios líquidos.	72
Figura 4.3. Distribución de tamaño de agregados en porcentaje (barras grises) y adsorción bacteriana en concentración de E. coli ($UFC \text{ ml}^{-1}$) promedio para ambos medios líquidos (rombos blancos).	75
Figura 5.1. Ubicación de los sitios de los ensayos de simulación de lluvia.....	91
Fotos 5.1. Imágenes de los ambientes donde se realizaron las simulaciones de lluvia a) Sitio Agrícola , b) Sitio Ganadero, c) Sitio Ganadero Sódico.....	96

Fotos 5.2. Imágenes en donde se aprecia el grado de cobertura y rugosidad de las parcelas de cada tratamiento. a) Sitio Agrícola, b) Sitio Ganadero, c) Sitio Ganadero Sódico.....	96
Figura 5.2. Distribución de tamaño de agregados (%) (barras negras) y Concentración bacteriana (UFC ml ⁻¹) correspondiente a cada fracción edáfica (cuadrados) para los tres sitios evaluados.	100
Figura 5.3. a. Adsorción bacteriana obtenida a campo (columna negra) y en laboratorio (columna blanca). b. Coeficiente de Distribución obtenido a campo (columna negra) y en laboratorio (columna blanca).....	101
Figura 5.4. Retención bacteriana en función de la Adsorción bacteriana (a) y Kd bacteriano (b) medidos en laboratorio (círculos llenos) y a campo (círculos vacíos).....	104
Figura 6.1. Ubicación de la microcuenca “Los Patricios”.....	120
Figura 6.2. Precipitaciones utilizadas en las simulaciones para los períodos analizados (2000-2005). Los datos fueron provistos por la Estación “Los Patricios” y por la Experimental San Pedro – INTA.	121
Figura 6.3. Elevación digital (m) (a) y Suelos (b) de la microcuenca “Los Patricios”.....	122
Figura 6.4. Distribución de los pares de escurrimiento (mm) observado y simulado para la calibración (círculos vacíos) y validación (círculos llenos) en la escala diaria (a) y mensual (b) en relación a la recta 1:1.	127
Figura 6.5. Promedio de UFC 100 ml ⁻¹ para el año 2000 para los escenarios de contaminación evaluados (C=carga animal en EV; Kd=Coeficiente de partición bacteriana (ml g ⁻¹)).....	129
Figura 6.6. Concentración de coliformes fecales (UFC.100 ml ⁻¹) y sedimentos (mg.l ⁻¹) diarios para el año 2000, para las comparaciones entre cargas animales y entre Kd bacterianos. a) C 0,5 Kd 10 vs C1 Kd 10; b) C 0,5 Kd 175 vs C1 Kd 175; c) C 0,5 Kd 10 vs C0,5 Kd 175; d) C 1 Kd 10 vs C1 Kd 175.	131
Figura 6.7. Regresiones lineales entre los caudales simulados (m ³ s ⁻¹) y la concentración de coliformes fecales simulados (UFC 100 ml ⁻¹) para los cuatro escenarios evaluados.	132
Figura 9.1. Descripción del microsimulador de lluvias.	155
Figura 9.2. a) Microsimulador instalado. b) Microsimulador en funcionamiento y c) aplicación de inóculo bacteriano sobre la parcela.....	155
Figura 9.3. Mineralogía de arcillas (homiónicas orientadas, glicoladas y calcinadas) a) Los Patricios 1. b) Ríos.....	156
Figura 9.5. Escurrimiento observado y simulado a escala mensual para el período de calibración (2000-2002).....	157
Figura 9.6. Escurrimiento observado y simulado a escala mensual para el período de validación (2003-2005).	157
Figura 9.7. Escurrimiento observado y simulado a escala diaria para el período de calibración (2000-2002).	158

Figura 9.8. Esgurrimento observado y simulado a escala diaria para el período de validación (2003-2005).	158
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ABREVIATURAS

CC: capacidad de campo

CE: conductividad eléctrica

CO: carbono orgánico

CP: componente principal

CV: coeficiente de variación

EV: equivalente vaca

FI: fuerza iónica

HE: humedad equivalente

PSI: porcentaje de sodio intercambiable

SE: superficie específica

SWAT: Soil and Water Assessment Tool

UFC: unidades formadoras de colonias

Resumen

Dentro de las actividades agropecuarias, es la ganadería sobre pastizales una de las principales producciones que favorece la contaminación biológica de las aguas superficiales. Uno de los principales factores que afecta este proceso es la adsorción bacteriana. Por ello se analizó la interrelación entre el suelo y los fenómenos adsorptivos en tres escalas de percepción en una cuenca agropecuaria de la Pampa Ondulada. En la *escala de laboratorio* se pudo demostrar el importante rol de las propiedades físicas y químicas de los suelos en la adsorción y coeficiente de partición bacteriana. Entre estas se destacaron la CIC, contenido de arcillas y PSI como predictores de estos parámetros biológicos. Además, los suelos evaluados mostraron una alta heterogeneidad en la capacidad de adsorción bacteriana (25% a 73,3%) lo cual permitió separar ambientes con capacidades de adsorción diferentes, encontrándose en los Arguidoles una adsorción significativamente mayor que en los Natracualfes. En esta misma escala fue probada la importancia del tamaño de agregados y la calidad del medio líquido circundante en la regulación de los procesos adsorptivos. El tamaño de agregado clave en estos procesos fue el de 20 a 50 μm mientras que un medio líquido con alta fuerza iónica intensificaba estos procesos. A *escala de parche*, en parcelas inoculadas con *E. coli* bajo lluvia simulada, se corroboró la importancia de la adsorción y coeficiente de partición en la retención bacteriana por parte del suelo y se comprobó el rol de las propiedades del suelo sobre estos parámetros a semejanza de lo encontrado en laboratorio. Por último a escala de cuenca se puso de manifiesto la incidencia de la adsorción y K_d bacteriano en el transporte de contaminantes biológicos a través del escurrido superficial. Esta escala permitió la consideración de parámetros claves en el transporte bacteriano como la supervivencia bacteriana, la temporalidad de ocurrencia

de las lluvias así como su intensidad. Los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, parche y cuenca constituyen un avance en el estudio de la dinámica de la contaminación biológica de los suelos y los cursos de agua en ambientes frágiles destinados a la producción animal.

Palabras Claves

Contaminación biológica de aguas superficiales, Adsorción bacteriana, Coeficiente de distribución, *Escherichia coli*, SWAT.

Abstract

Among agricultural activities, cattle production on grasslands is pointed out as an activity that enhances biological contamination of surface waters. Bacterial adsorption on soils and sediments is one of the main factors that work as control when dealing with bacterial transport to water bodies, as well as bacterial survival. Therefore, relations between soil and adsorptive processes were addressed at three perception scales in an agricultural watershed in the Rolling Pampa. At *laboratory* scale the role of soil physical and chemical properties proved to be relevant in the bacterial partition and adsorption. Among them, properties that better explained bacterial adsorption were CEC (R^2 : 0.67) and clay content (R^2 : 0.55), denoting electrostatic processes characteristic of reversible adsorption. The bacterial adsorption presented large range values (25-73.3%), being those for Argiudolls significantly higher than those for Natraqualfs. At the same scale, soil aggregate size and surrounding liquid media proved to be important in the regulation of adsorptive processes. The key aggregate size involved in these processes was 20 to 50 μm , while a high ionic strength media increased these processes. At *patch* scale, in inoculated plots with *E. coli* under simulated rain, bacterial partition and adsorption proved to be important on soil bacterial retention and the importance of soil properties over bacterial adsorption and partition was corroborated as founded at laboratory scale. To conclude, at *basin* scale, the incidence of bacterial partition and adsorption on the biological transport through surface runoff was proved. This scale permitted the consideration of key parameters such as bacterial survival and time of precipitation occurrence, as well as its intensity. Results obtained at laboratory, patch and basin scales constitute an advance in the biological contamination dynamics study on soils and surface waters on fragile environments devoted to animal production.

Keywords

Biological contamination of surface waters, Bacterial adsorption, Distribution coefficient, *Escherichia coli*, SWAT.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la contaminación biológica de aguas.

La contaminación de las aguas constituye uno de los problemas más serios que afronta el desarrollo de la actividad humana. El deterioro de los cuerpos de aguas superficiales y subterráneos por contaminación, sumado al incremento de la demanda por el crecimiento de la población, agrava progresivamente dicho problema (Calcagno 2000). Este deterioro está principalmente relacionado con las actividades agrícolas. Dentro de las innumerables razones de dicha afirmación se puede mencionar que la producción agropecuaria es la actividad que más cantidad de agua dulce consume en la tierra, pues utiliza el 70% de los suministros hídricos superficiales (Ongley 1997). Por otro lado las aguas superficiales pueden funcionar como vectores de transmisión de enfermedades y así la salud humana puede verse comprometida como resultado del uso de aguas contaminadas como fuente de agua potable, aguas recreacionales, riego, bebida animal entre otras. Las actividades agrícolas continúan siendo reconocidas como la principal causa para la falta de cumplimiento de los estándares de calidad de agua basado en organismos indicadores de contaminación biológica. En este sentido, el inventario nacional de calidad de agua de los Estados Unidos en su reporte al Congreso en 1996 consideró a las bacterias como la tercera causa principal de contaminación de ríos y cuerpos de agua (USEPA 1996). En cuanto a la incidencia de esta problemática, los patógenos transmitidos por el agua son responsables de aproximadamente el 25% de las consultas médicas en el mundo (Gerba *et al.* 1996). Informes de la OMS indican que de los 51 millones de muertes en el mundo en 1993, aproximadamente un tercio (16,4 millones) fueron causadas por parasitosis y por enfermedades infecciosas. En países en vías de desarrollo, las parasitosis y las enfermedades infecciosas son responsables del

44% de todas las muertes y hasta del 71% de las muertes en niños (World Development Report 1993). No existen suficientes datos como para atribuir un porcentaje exacto de las enfermedades infecciosas globales al agua, aunque se han estimado cifras de hasta 80%, cuando se toman en consideración todas las enfermedades relacionadas al agua (Clarke 1993).

En la Tabla 1.1 se mencionan algunas de las enfermedades de transmisión hídrica más frecuentes. Algunos de los microorganismos citados pueden afectar de forma más o menos grave la salud humana teniendo una incidencia elevada especialmente en países en vías de desarrollo.

Tabla 1.1 Enfermedades de transmisión hídrica y agente etiológico (adaptado de WHO. 2008)

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua ^a	Infectibilidad relativa ^b	Fuente animal importante
Bacterias				
<i>Campylobacter jejuni, C. coli</i>	Alta	Puede proliferar	Moderada	Si
<i>Escherichia coli patógena</i>	Alta	Moderada	Baja	Si
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	Alta	Moderada	Alta	Si
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Puede proliferar	Baja	No
Otras salmonellas	Alta	Puede proliferar	Baja	Si
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Corta	Baja	Si
Virus				
<i>Adenovirus</i>	Alta	Larga	Moderada	No
<i>Enterovirus</i>	Alta	Larga	Moderada	No
<i>Virus de la Hepatitis A</i>	Alta	Larga	Moderada	No
<i>Virus de la Hepatitis E</i>	Alta	Larga	Moderada	Potencialmente
<i>Rotavirus</i>	Alta	Larga	Moderada	No
Protozoos				
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Si
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Si

^aPeríodo de detección del estado infeccioso en agua a 20 °C: persistencia corta: hasta 1 semana; moderada: de 1 semana a 1 mes; larga: más de 1 mes. ^bDeterminada en experimentos con voluntarios o basándose en información epidemiológica.

En relación a la salud animal, Dupchak (1999) destaca que el agua es el nutriente individual más importante para el ganado. Según Chagas (2007) muy pocos trabajos mencionan estándares cuantitativos concretos desde el punto de vista de la calidad microbiológica del agua para bebida animal (Alejandra Herrero, comunicación personal) y existe una gran disparidad de criterios al respecto. Por ejemplo, Dupchak (1999) señala que el agua de bebida para terneros de ganado bovino no debería contener más de 1 UFC de coliformes 100 ml⁻¹ de agua y no más de 20 UFC 100 ml⁻¹ para el caso de las vacas.

A su vez, dentro de las actividades agropecuarias, es la ganadería sobre pastizales una de las principales actividades que favorece la diseminación de patógenos entre animales y hacia el medio (Nicholson *et al.* 2000). Las pasturas y pastizales se contaminan con heces de los animales los cuáles son contaminados a su vez por los patógenos presentes en el mismo pastizal (Judge *et al.* 2005). La actividad ganadera incide en la contaminación hídrica entre otras acciones, a través del aporte directo e indirecto a las aguas superficiales y subterráneas de heces y orina, las cuales pueden contener patógenos (Chagas 2007). Este potencial de contaminación biológica de las aguas superficiales es exacerbado en cuencas tradicionalmente ganaderas (Kay *et al.* 2007). Tanto el ganado para carnes como el lechero y el ganado ovino son considerados importantes reservorios de variedades patógenas de *E. coli*. La incidencia de *E. coli* 0157 entre estos biotipos según Hutchinson *et al.* (2004) fue medida en 13% y 20 % respectivamente. Además del biotipo, la condición general de salud del ganado puede impactar en la composición microbiana de las heces (Oliver *et al.* 2007), así como la edad, especie, dieta y el manejo del ganado los cuales pueden afectar los niveles de patógenos encontrados en las deposiciones (Burton y Turner 2003). Es un hecho reconocido que los animales expuestos a situaciones de stress poseen concentraciones

de patógenos elevadas en sus excrementos y resultan particularmente sensibles a la presencia de los mismo en aguas y pastos. También resultan sensibles, aquellos rumiantes que por su juventud no han desarrollado plenamente la actividad ruminal.

1.2. Transporte de contaminantes biológicos

Si bien se ha dedicado mucho esfuerzo para estudiar la relación entre la cadena alimenticia y el movimiento de patógenos y su epidemiología, mucha menos atención han recibido los factores hidrológicos y edáficos que controlan la transferencia de patógenos en sistemas agrícolas, los cuales conforman rutas alternativas de transmisión de enfermedades hídricas (Jamieson 2004).

El conocimiento de los mecanismos de transporte de contaminantes en los cuerpos de agua y su interacción con lo procesos y ciclos biológicos que se desarrollan en ellos, son fundamentales para analizar los efectos de las actividades humanas sobre los ecosistemas y la calidad de las aguas, determinar los impactos y establecer el marco regulatorio que determine las condiciones de uso y protección de los recursos hídricos (Calcagno 2000). El conocimiento del transporte de contaminantes, más específicamente el transporte de patógenos resulta imprescindible para el desarrollo de modelos de contaminación y por consiguiente prácticas de mitigación de este fenómeno. Diversos autores han desarrollado modelos de transporte microbiano de base mecánica o empírica (Moore *et al.* 1989; Walker *et al.* 1990; Tian *et al.* 2002) a fin de poder predecir el movimiento de patógenos en lagos, ríos o cuencas. Aún así, existen numerosos vacíos de información en cuanto a los factores que afectan al transporte microbiano. Nagels *et al.* (2002) exponen la necesidad de comprender y cuantificar la eficiencia del escurrimiento para facilitar la transferencia de los patógenos de la materia

fecal hacia los cuerpos de agua. Dentro de este marco, la influencia de la asociación de sedimentos y microorganismos no se comprende ni se representa completamente en el marco de modelos de simulación (Jamieson 2004). La mayoría de estos modelos analiza el transporte como un fenómeno convectivo, regulado por los flujos de agua. Este sería el caso si los microorganismos se comportasen como partículas hidrofílicas y libres sin interacción con las partículas de su entorno. Sin embargo en la última década se concluyó que las bacterias en el escurrimiento pueden ser transportadas como células libres o adheridas a partículas del suelo, fragmentos de vegetación o residuos. Por ejemplo, Oliver *et al.* (2005), encontraron que el transporte microbiano no respondía de forma idéntica al movimiento de los flujos de agua, aún teniendo las bacterias densidades muy parecidas al agua. Todavía se sabe relativamente poco acerca de las tasa de transporte de las bacterias libres en relación a las bacterias asociadas a partículas. En este sentido, el conocimiento de la condición libre o asociada, y la composición de los sedimentos respectivos son importantes en el momento de elegir prácticas de manejo que reduzcan los peligros potenciales de la contaminación hídrica (Vinten *et al.* 2004). Dai y Boll (2003) argumentan que la condición libre o asociada de los microorganismos, tiene relevancia en las prácticas de manejo. La estrategia de lidiar con las bacterias libres sería la de minimizar el flujo superficial. Los contaminantes microbianos transportados de esta forma, es decir superficialmente pueden, de esta forma, escapar del filtrado realizado por el suelo pudiendo recorrer grandes distancias (Oliver *et al.* 2005). En cambio, si estas bacterias estuvieran asociadas a partículas, el énfasis estaría puesto en el control de la generación y transporte de sedimentos.

Debe tomarse en cuenta que las bacterias como individuos son pequeñas y tienen una flotabilidad neutra en el agua. Esto puede limitar el potencial de sedimentación o

filtrado por la vegetación como forma de remoción (Fiener y Auerswald 2003) a menos que dichos microorganismos se encuentren asociadas a partículas o grandes flóculos durante el transporte. Brookes *et al.* (2004) expone que las diferentes tasas de sedimentación exhibidas por varios microorganismos reflejan su diferente carga superficial y afinidad para asociarse a partículas, así como el tamaño y la densidad de la partícula agregada. Por lo tanto, ante eventos de escurrimiento superficial sobre suelos expuestos, la adsorción es la causa conocida predominante de retención de bacterias. Esta adsorción de los microorganismos a los sedimentos facilita la supervivencia bacteriana contribuyendo a aumentar los niveles de especies entéricas, indicadoras y de virus en las capas más superficiales de los sedimentos, las cuales pueden ser resuspendidas por turbulencia (Marshall 1980). En estudios utilizando cepas de *E. coli* 0157:H7 se ha encontrado una persistencia en agua, a través de sedimentos de por los menos cuatro meses (Hancock *et al.* 1997). Algunos autores postulan que esta supervivencia aumentada se debe a que los sedimentos brindan protección de los depredadores (Enzinger y Cooper 1976) y a que las bacterias fecales son capaces de obtener nutrientes asociados a los sedimentos (Davies *et al.* 1995). Debido a que los patógenos pueden permanecer viables por un período importante en dichas partículas, se debe considerar la importancia relativa de su resuspensión y subsecuente redistribución. Esta resuspensión puede ocurrir cuando la fluctuación turbulenta de la velocidad llega a un nivel crítico (Brookes *et al.* 2005).

En este sentido Defra (2002) señala que el ciclo hidrológico juega un papel fundamental en la dinámica de la contaminación no puntual asociada a las actividades agrícolas. En general los contaminantes que alcanzan los cursos hídricos o las capas subterráneas, lo hacen a través del transporte del agua en movimiento tanto superficial como

subsuperficial. Este movimiento está gobernado por los procesos de lluvia-escorrentía, pero todos los otros elementos del ciclo hidrológico tienen efectos directos o indirectos sobre el transporte y la transformación de las sustancias contenidas en el agua y el suelo (Calcagno 2000). Estudios previos han demostrado que cuando la lluvia genera escurrimiento de áreas ganaderas y avícolas, se pueden transferir altas concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación fecal a las aguas superficiales (Signor *et al.* 2005). En cuanto a la intensidad de los eventos hidrológicos, estos pueden afectar en gran medida la calidad de aguas, habida cuenta que las lluvias de gran intensidad son capaces de aumentar en 100 veces la concentración bacteriana en los ríos (Rodgers *et al.* 2003).

Por otro lado, los procesos hidrológicos son factores decisivos que afectan el destino de contaminantes ya que son los generadores, a través de la erosión, de sedimentos los cuales son capaces de adsorber y diseminar patógenos en el ambiente. En este sentido, numerosos investigadores encontraron altos números de bacterias en sedimentos (Sherer *et al.* 1992; Burton *et al.* 1987; Gary y Adams 1985). Por ejemplo, las concentraciones de los protozoarios, *Giardia* y *Cryptosporidium*, fueron superiores en los sedimentos en uno a tres órdenes de magnitud comparadas con la concentración en la columna de agua. Chagas (2007) durante el período 2004 al 2006 analizó la contaminación de aguas de escurrimiento acumuladas en ambientes bajos representativos de la cuenca del Arroyo del Tala (Prov. Buenos Aires). Este investigador halló asociaciones estrechas entre los coliformes totales y la presencia de sedimentos en dichas aguas, indicando la potenciabilidad de estos sólidos para transportar patógenos.

Como síntesis de lo expuesto, se puede afirmar que los eventos hidrológicos y los procesos de erosión hídrica/sedimentación asociados a los mismos regularán la diseminación de patógenos y la persistencia de éstos en las cuencas bajo uso agropecuario.

1.3. El rol de los suelos y sedimentos en la contaminación biológica

Los sedimentos naturales y aquellos generados por procesos de degradación de las tierras juegan un papel fundamental en la contaminación tanto de los cuerpos de agua lénticos como de los lóticos (Chagas 2007). Las partículas de tamaño pequeño (limo) y coloidal (arcillas y materia orgánica) poseen el potencial de adsorber y transportar elementos y sustancias químicas y biológicas tales como plaguicidas, cationes varios entre ellos metales pesados, e incluso patógenos de gran incidencia en la producción animal y la salud humana. La cantidad y calidad de los sedimentos generados por una cuenca, y por ende su poder contaminante, dependen entre otros factores, de la magnitud y tipo de proceso erosivo y de la morfología, génesis e historia de uso de la cuenca de origen. Por lo tanto no resulta sencillo predecir las propiedades de dichos sedimentos y su poder contaminante. Aquellas cuencas que poseen pendientes de longitud moderada y escaso gradiente, como la del presente estudio sufren principalmente procesos de erosión de tipo laminar. Este es un rasgo común en la Pampa Ondulada. Dicho proceso se caracteriza por generar sedimentos “finos” enriquecidos en materia orgánica y arcillas de elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC). Los sedimentos generados por erosión laminar en Pampa Ondulada tendrían un elevado poder de adsorber y transportar pendiente abajo, diversos contaminantes químicos y/o biológicos tales como pesticidas, bacterias y virus, que están asociados a la actividad humana (Chagas *et al.* 2007). Por otro lado Santanatoglia

et al. (2006), encontraron valores bajos de concentración de sedimentos en el agua del arroyo del Tala. Sin embargo es probable que el escaso transporte anual de partículas registrado en dicho trabajo se deba principalmente a la importante sedimentación que se produciría en numerosos sitios de la cuenca debido a la baja pendiente general del área. Cabe destacar que a pesar de la escasa cantidad de sedimentos transportados por el arroyo del Tala, su potencialidad de acarrear contaminantes, como se mencionó con anterioridad sería muy marcada, habida cuenta de que se trata de material fino menor a 0,45 μm y por ende con gran superficie específica (Santanatoglia *et al.* 2006). También se deduce que los sedimentos “finos” (principalmente del tamaños de limos y arcillas) movilizados por erosión hídrica, no se verán tan afectados por el tamaño y las características de la cuenca como los sedimentos “gruesos” (del tamaño de arenas o mayores), teniendo los primeros mayor probabilidad de alcanzar los cursos de agua. En tal sentido Chagas (2007) encontró una importante acumulación y posterior salida de microorganismos de cubetas, hoyadas y demás sitios bajos que se producía a través de escurrimientos superficiales de diversa magnitud y postuló que los sólidos sedimentables en 10 minutos, es decir sedimentos relativamente grandes, eran responsables en este proceso. Coincidentemente, Schillinger y Gannon (1985) reportaron que alrededor de 15-20% de las células de coliformes fecales presentes en agua de tormenta estaban adsorbidas a partículas grandes, la mayoría mayor a 30 μm de diámetro.

1.4. Procesos adsortivos asociados al transporte bacteriano en medios líquidos.

Según Marshall (1980), el transporte microbiano está dividido en dos tipos de procesos bien diferenciados, los adsortivos y los no adsortivos. En relación a los no adsortivos los procesos de difusión y convección son los más importantes, siendo estos los principales

en sistemas acuáticos. Por su parte los procesos adsortivos dependen de las características del medio ambiente, los microorganismos y el adsorbente. En la Figura 1.1 se presentan los factores que juegan un rol preponderante en el transporte microbiano.

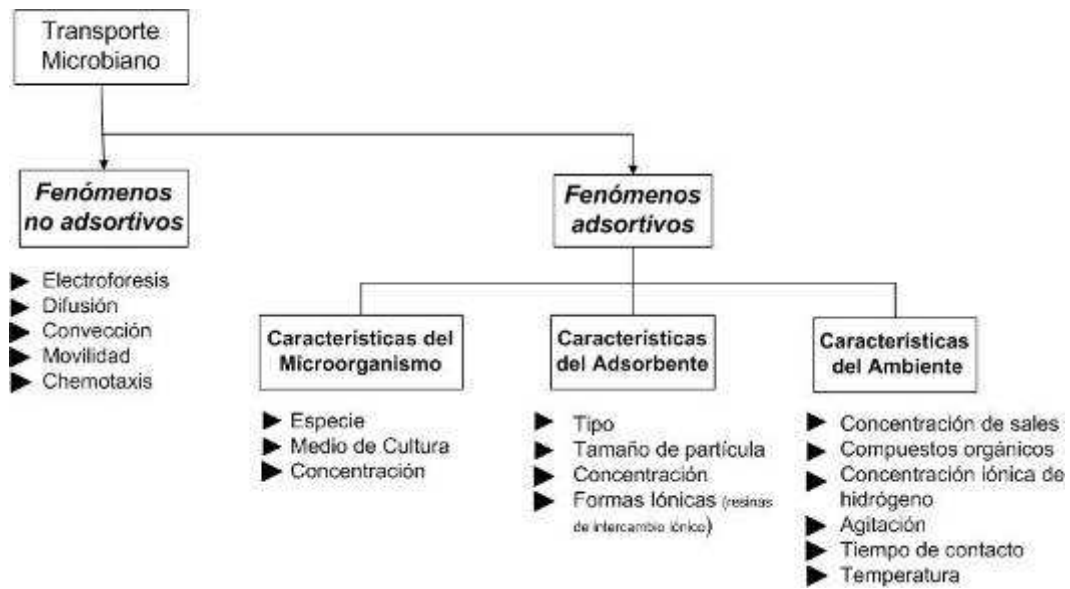


Figura 1.1. Transporte bacteriano. Características de los procesos adsortivos y no adsortivos. Adaptado de Marshall (1980)

La adsorción microbiana a superficies sólidas es un proceso complejo el cual depende del microorganismo, la superficie sólida y de la fase líquida. En cualquier suelo natural, los microorganismos pueden ser encontrados en algunas de las siguientes formas: en la solución del suelo (con o sin material coloidal asociado), físicamente atrapados entre los agregados, adsorbidos reversiblemente a partículas de diferente tamaño y composición o permanentemente pegados a estas partículas. Esta adsorción microbiana a las superficies sólidas puede ocurrir tanto en aguas calmas como turbulentas (Marshall 1980).

La adsorción de células microbianas específicas no puede ser simplemente explicada haciendo referencia a una sola fuerza o un sólo factor. Nielsen *et al* (2001) concluyeron que la adsorción bacteriana es función de fuerzas electrostáticas, interacciones Van der

Waals, presencia de polisacáridos extracelulares e hidrofobicidad celular. Uno de los mecanismos más importantes de adsorción es el puente de hidrógeno. Aunque estos enlaces son relativamente débiles en contraste con las fuerzas de Coulomb o las uniones covalentes, la interacción resultante de innumerables enlaces de H funcionando juntos a distancias cercanas producen interacciones muy fuertes (Marshall 1980).

Una de las teorías más utilizadas para explicar la adsorción microbiana es la descrita por Deryaguin-Landau (1941) y Verwey-Overbeek (1948). Esta teoría propone que la interacción entre dos partículas es el resultado de dos componentes aditivos: a) un componente atractivo debido a las fuerzas de van de Waals y b) un componente repulsivo para el caso de partículas del mismo signo, que se produce debido al solapamiento entre la doble capa eléctrica asociado a grupos con carga entre las dos partículas. Existen dos tipos de distancias de separaciones de las partículas en donde la atracción puede ocurrir. Estas son llamadas “mínimo primario” que corresponde a pequeñas distancias entre partículas, donde las fuerzas de atracción son grandes y el “mínimo secundario” que corresponde a distancias relativamente grandes, donde las fuerzas de atracción son menores. En distancias intermedias las partículas están separadas por una barrera de repulsión (Figura 1.2a). Como se observa en esta figura, a distancias intermedias de la superficie sólida la atracción resultante es netamente negativa, mientras que en el mínimo secundario el balance (atracción/repulsión) puede ser positivo, creándose así un ambiente propicio para el acercamiento de microorganismos hacia la superficie sólida. En este rango la bacteria continúa expresando movimiento browniano y está sujeta a fluctuaciones de adsorción-desorción. Esto es lo que se conoce como “adsorción reversible”.

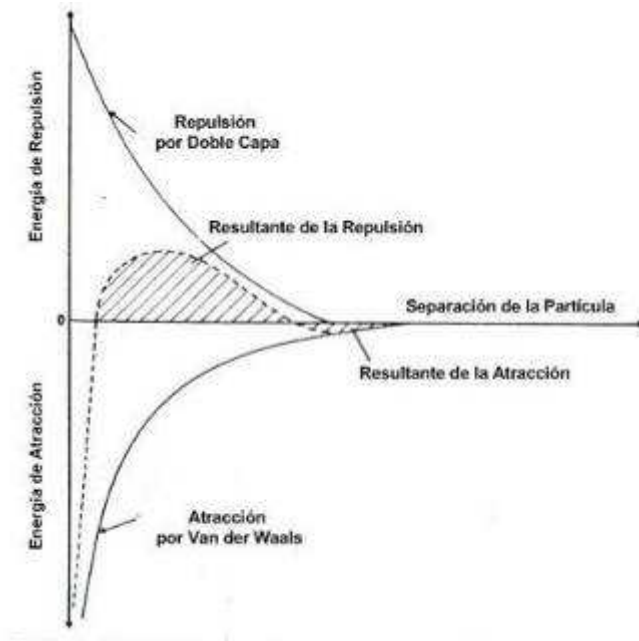


Figura 1.2 a) Energía de atracción y repulsión según separación de la partícula. Adaptado de Marshall (1980)

La interacción total en cada posición depende del radio de las partículas, los potenciales superficiales, constantes como la de Hamaker y de las concentraciones electrolíticas (Marshall 1980). Cuando la concentración electrolítica aumenta, la barrera de repulsión disminuye y tiende a desaparecer ante concentraciones muy elevadas. Por ende el grosor de la doble capa estaría afectado tanto por la valencia como por la concentración de los electrolitos. La adsorción puede ser aumentada por la adición de cationes multivalentes a la suspensión (Figura 1.2b). En soluciones que contienen altas concentraciones de electrolitos, las fuerzas repulsivas son suprimidas mientras que las fuerzas atractivas London-Van der Waals generarían una adsorción reversible de la bacteria a las superficies sólidas (Marshall 1980).

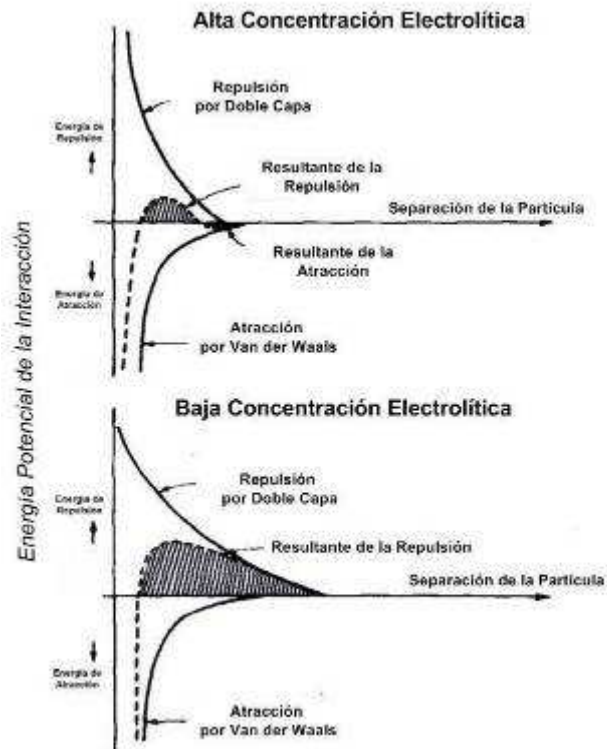


Figura 1.2 b) Energía de atracción y repulsión de una partícula según la concentración electrolítica. Adaptado de Marshall (1980).

La presencia de electrolitos como el calcio y el magnesio puede influenciar la asociación entre las células microbianas y las partículas del adsorbente (Marshall 1980). A su vez, la adición de varias sales inorgánicas a la suspensión después que la adsorción ha ocurrido promovería la desorción. Por ejemplo la desorción promovida por sales como el cloruro de sodio demuestra que la adsorción no se había producido en forma irreversible. Por su parte, la desorción de estos microorganismos después de un importante descenso de la salinidad como la que ocurre en inundaciones puede constituir una seria amenaza a la salud pública (Roper y Marshall, 1974, 1978 en Marshall, 1980)

1.5. El rol de las propiedades físicas y químicas de los suelos y sedimentos en los procesos adsortivos.

Tanto los suelos como los sedimentos, al estar condicionados por sus propiedades emergentes, configuran ambientes con dinámicas poblacionales de microorganismos diferentes entre si. De acuerdo con Marshall (1985), la distribución de microorganismos en los suelos no es homogénea. Esto se debería a que las superficies edáficas están revestidas con arcillas minerales, óxidos y materia orgánica, cuya carga superficial es dependiente del pH y de las fluctuaciones de la concentración de electrolitos. Según Marshall (1980), la cantidad relativa de arena, limo, arcilla y materia orgánica y la manera en que están espacialmente distribuidas determinará la forma del hábitat microbiano. Esta heterogeneidad restringe la aplicación directa de muchos conceptos mecanísticos de adsorción como la teoría DVLO recién abordada y también la teoría de tensión superficial crítica, ya que estas asumen que se trata de superficies homogéneas y limpias (Tadros 1980 en Stotzky 1985). A pesar de ello las teorías mencionadas mantienen vigencia debido a que explican de manera adecuada muchos de los fenómenos de adsorción registrados.

Un caso extremo lo constituyen los suelos arenosos donde la mayoría de las bacterias están asociadas a la materia orgánica. Esto se debe a que las partículas que poseen un tamaño mayor que las arcillas, no retienen por mucho tiempo las películas de agua, dada su escasa superficie específica y su relativamente alta superficie inerte. Por consiguiente dichas partículas no lograrían asociar una importante población microbiana a lo largo del tiempo (Stotzky 1974).

En este contexto, para cuantificar la asociación entre los microorganismos y las partículas edáficas de diverso origen, la comunidad científica ha comenzado a emplear índices biológicos. Los índices más comúnmente utilizados son “el

porcentaje de adsorción” y “el coeficiente de partición o distribución (K_d)”. Este último relaciona la concentración de microorganismos en forma simultánea en la fase sólida (UFC g^{-1}) y en la fase líquida (UFC ml^{-1}). Aunque en la década pasada se realizaron numerosos estudios acerca de la adsorción y partición bacteriana, la información de estas propiedades biológicas para bacterias fecales en suelos todavía es muy limitada. Estas variables son afectadas por diversas propiedades edáficas. Por ejemplo Drozd y Scharzbrod (1996) relacionaron la adsorción con el tamaño del coloide y condiciones de la partícula como la hidrofobicidad y la textura superficial. Jamison *et al.* (2004), Ling *et al.* (2002) y Stotzky (1985) entre otros investigadores resaltaron la importancia del componente arcilla en los mecanismos de adsorción bacteriana. Otros autores como Aislabie *et al.* (2001) incluyeron en este análisis a la materia orgánica en sus varias fracciones. Además, el ambiente de adsorción es afectado mayormente por el pH y la presencia de varios compuestos orgánicos e inorgánicos que alteran las cargas superficiales tal como señalan Stotzky *et al.* (1963, en Marshall 1980) y Reddy (1981).

Entonces, para comprender los procesos de adsorción y transporte a través de suelos y aguas por parte de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, se debe conocer el perfil físico y químico de los suelos y la naturaleza y magnitud de las fuerzas que actúan en este proceso.

1.6. Modelos computacionales de contaminación bacteriana -SWAT-

Tanto la erosión y el escurrimiento, como la dinámica de los contaminantes químicos y biológicos pueden ser cuantificados mediante modelos hidrológicos de base física. Un modelo matemático para simulación de variables hidráulicas e hidrológicas, brinda la posibilidad de analizar escenarios que se producirían en una cuenca hidrográfica, que afectarían a uno o varios de los procesos físicos, químicos y biológicos de forma integrada. El modelado hidrológico es a menudo el primer paso en el desarrollo de sistemas de decisión espacial para identificar áreas vulnerables a la contaminación por nutrientes, pesticidas (Lim *et al.* 2001) así como también contaminantes biológicos. En este sentido, el modelo SWAT (Soil and Water Assessment Tool) fue desarrollado para predecir impactos de las prácticas de manejo de las tierras en las aguas, sedimentos y agroquímicos en cuencas hidrográficas con diferentes suelos, usos y prácticas en largos períodos de tiempo. En el año 2000 una subrutina microbiológica fue añadida al SWAT para evaluar el destino y transporte de bacterias persistentes (ej. *E. coli* 0157) y no persistentes (ej. Coliformes fecales). Actualmente, una cantidad considerable de estudios de simulaciones hidrológicas están siendo realizados mediante el modelo SWAT principalmente por ser el modelo más inclusivo de las innumerables variables necesarias para realizar predicciones hidrológicas precisas. Aunque esta herramienta está siendo aplicada en todo el mundo, son escasos los trabajos que han utilizado la subrutina microbiológica de dicho modelo. Particularmente en el caso de Argentina no se tienen conocimientos de trabajos realizados hasta el presente, que incluyan siquiera alguna rutina del modelo SWAT.

1.7 Objetivo general

Por todo lo expuesto el objetivo general de la Tesis fue estudiar el transporte bacteriano a través de la adsorción y K_d bacteriana de algunos suelos de diverso origen representativos de una cuenca perteneciente a la Pampa Ondulada. La dinámica de este transporte bacteriano se evaluó en diferentes escalas y ambientes edáficos de dicha cuenca.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Escalas de estudio

Un aspecto a considerar en el estudio de los contaminantes agropecuarios en los cursos de agua, lo constituye la elección adecuada de la escala de análisis. Cada escala o nivel de percepción revela propiedades emergentes del sistema a estudiar a dicha escala, que pueden modificarse si se cambia el nivel de detalle del análisis.

Las cuencas hídricas son el ámbito natural para estudiar la contaminación, puesto que constituyen unidades estructurales y funcionales del paisaje asociadas al ciclo hidrológico, el escurrimiento superficial y la dinámica de los acuíferos subterráneos (USEPA 1997; Rodda *et al.* 1999; Defra 2002). El agua de los arroyos integra efectos de microcuencas y mesocuencas de diferente jerarquía, que están anidadas entre sí, constituyendo un sistema complejo, entrelazado por las vías de escurrimiento comunes. Sin embargo, cuando además de estudios hidrológicos se evalúa la interacción agua–suelo–microorganismos, debe establecerse escalas graduales de aproximación. Es difícil predecir realmente el comportamiento de los tres factores mencionados excepto en condiciones controladas de laboratorio. Por lo tanto, en el estudio de esta problemática tres escalas de percepción fueron abordadas. En primer lugar se estudiaron los fenómenos de adsorción de los microorganismos a las partículas sólidas y afinidad de dichos microorganismos a adsorberse a diferentes tamaños de agregados edáficos a nivel de laboratorio, luego a nivel de parche y por último se esbozaron algunos escenarios de contaminación a nivel de cuenca (Figura 2.1).

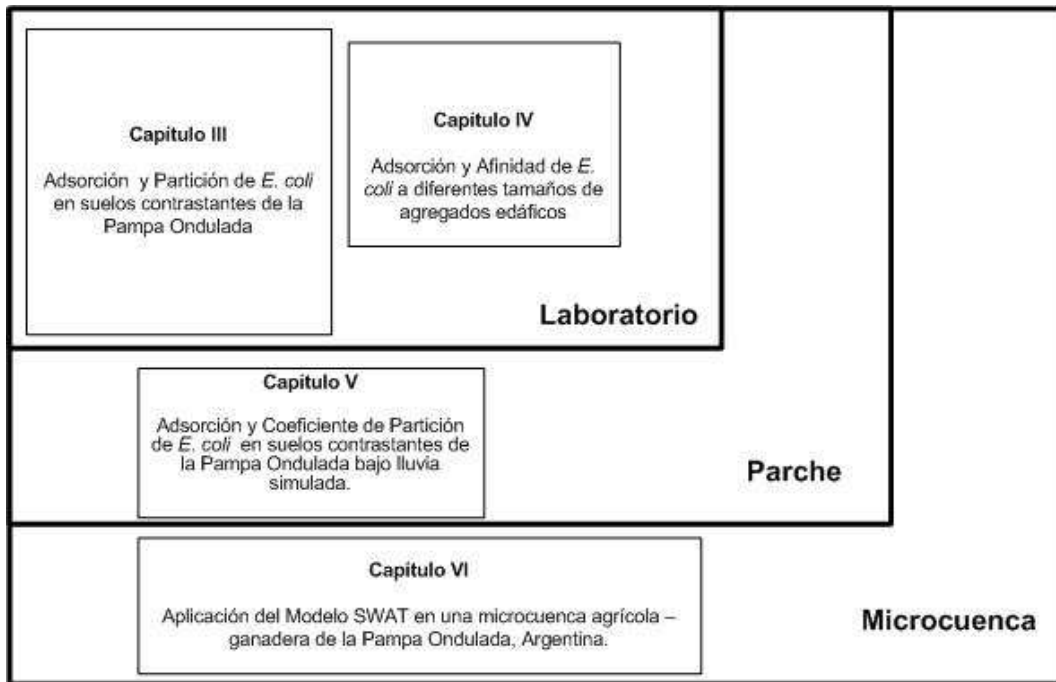


Figura 2.1. Escala de análisis de cada capítulo.

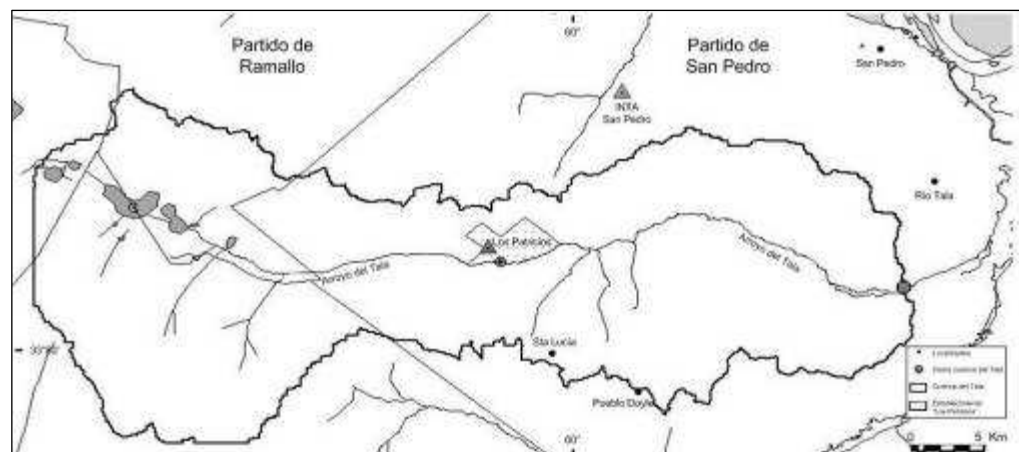
2.2 Ubicación geográfica, características climáticas, geomorfológicas, edáficas y de uso de la tierra del área bajo estudio.

La cuenca del Arroyo del Tala (Figura 2.2) se encuentra ubicada en el centro-este de la República Argentina, en el sector NE de la provincia de Buenos Aires, a 160 km de la Capital Federal en la región de la Pampa Ondulada (INTA 1973). Posee una superficie aproximada de 865 km² y ocupa parcialmente los partidos de San Pedro, Ramallo, Bartolomé Mitre y Pergamino. Sus aguas desaguan en el Río Baradero, afluente del Paraná. La forma de la cuenca es rectangular, con ensanchamiento en sus extremos (Figura 2.2a). El cauce principal posee una longitud de 71 km. Algunos parámetros morfométricos de la misma se citan a continuación (CFI, 1972): factor de forma: 1,41; pendiente media (m/km): 2,47; coeficiente de compacidad 1.46; pendiente del cauce principal (m/km) 0.93; frecuencia de cauces (cauces/km²): 0.018; densidad de drenaje (km/km²):0.189; extensión del flujo superficial (km²/km): 2,63.

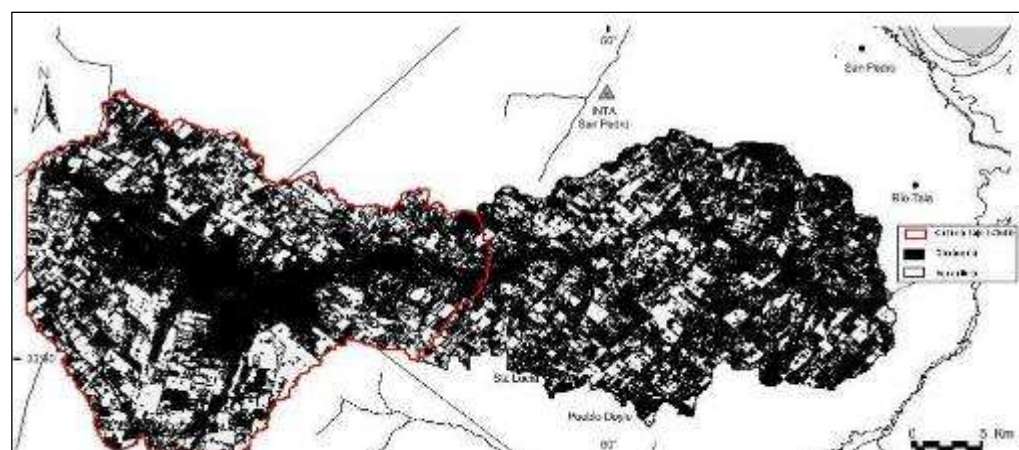
La región en la que se encuentra está dedicada principalmente a la producción de cultivos anuales en rotación, de acuerdo con SAGPYA (1995). La Pampa Ondulada es una región severamente erosionada en la que se realiza ganadería extensiva en áreas bajas e intensivas en algunas tierras altas. La actividad ganadera en la Cuenca del Arroyo del Tala y en otras cuencas de la Pampa Ondulada en la Provincia de Buenos Aires, está dada básicamente por la cría y recria de bovinos en zonas bajas próximas al arroyo, con pendientes menores al 1 % (Figura 2.2b) con suelos Natracualfes, de textura franco limosos a franco arcillo limosos, afectados por hidromorfismo y erosión hídrica (INTA 1973). Las cargas medias de estos lotes rondan los 0,4 a 0,8 EV/ha. (SAGPyA 2001). La Figura 2.2 c) presenta el uso de la cuenca del Tala dividida en dos grandes categorías: agrícola y ganadero. Esta clasificación fue realizada mediante

imágenes Landsat TM del año 2000. Otros usos presentes en la cuenca como feed-lots, producción hortícola, frutal o forestal se desestimaron debido a su relativa escasa representación en el área bajo estudio. La clasificación de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa Multispec (Biehl y Landgrebe 2002) y la separabilidad de clases fue analizada utilizando el algoritmo Bhattacharyya Minimum Distance (Bhattacharyya 1943). Tanto los coeficientes de ajuste de la calibración como la validación de este parámetro presentaron coeficientes de determinación superiores al 0,8

a)



b)



c)

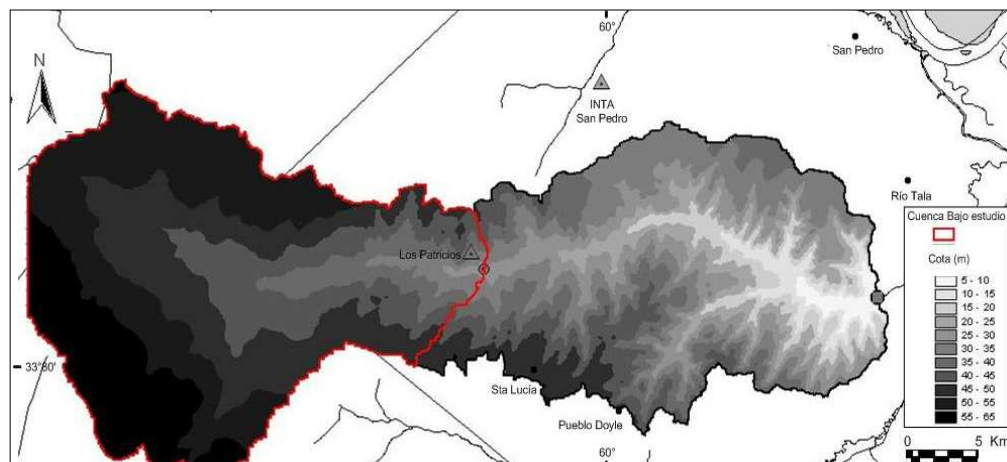


Figura 2.2 a) Localización de la Cuenca del Tala, Prov. Buenos Aires y del Establecimiento “Los Patricios”. b) Uso de la tierra en la cuenca del arroyo del Tala. c) Mapa de elevación digital de la cuenca del arroyo del Tala¹.

De acuerdo con la clasificación de Köpen, el clima del área es templado húmedo. La precipitación anual media, registrada por INTA San Pedro durante el período 1965-2006, fue de 1074 mm, concentrada principalmente en primavera, verano y otoño (Figura 2.3).

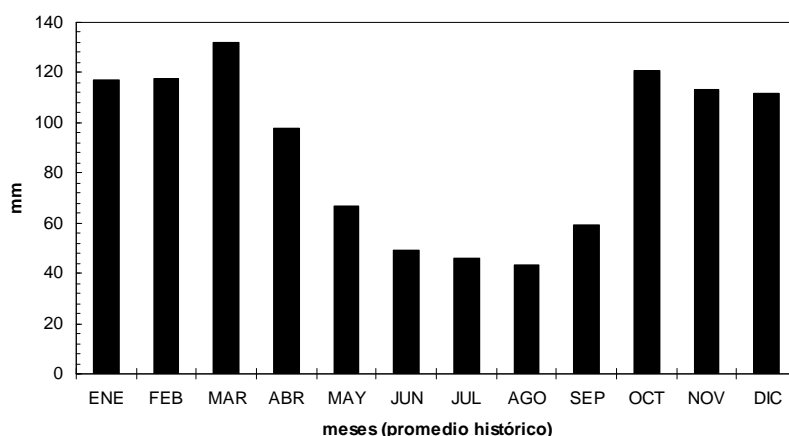


Figura 2.3. Promedio histórico (1965-2006) mensual de precipitaciones en la estación INTA San Pedro. Prov. de Buenos Aires.

¹ Mapa elaborado a partir de información suministrada por el Proyecto “Geointa”, el cual resulta coincidente con el trabajo de Ackerman et al. (2000).

2.3. Suelos utilizados en los ensayos

Los suelos analizados fueron recolectados en la cuenca del arroyo Tala, Provincia de Buenos Aires y excepcionalmente en áreas aledañas a dicha cuenca. La localización específica, las propiedades, así como la metodología empleada en cada determinación de los suelos evaluados son abordadas en cada capítulo en particular.

2.4. Microorganismos utilizados en los ensayos

En los ensayos en donde existió algún tipo de inoculación bacteriana como parte de la metodología, las cepas bacterias utilizadas fueron las siguientes:

- *Escherichia coli*, ATCC 8739 suministrada por la Cátedra de Higiene y Sanidad de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, a partir de ahora denominada *E. coli* de laboratorio (Figura 2.4a).
- *Escherichia. coli* autóctona, aislada a partir de heces bovinas encontradas en la cuenca del Tala. La misma fue separada de las heces mediante agitación manual en medio líquido para luego ser aislada e identificada con la utilización de medios selectivos diferenciales (CHROMAGAR[®]) (Figura 2.4 b). La utilización de una cepa autóctona de *E. coli* se debe a que existen diferencias morfológicas entre las cepas que podrían llegar a modificar las relaciones entre las mismas con el medio sólido.

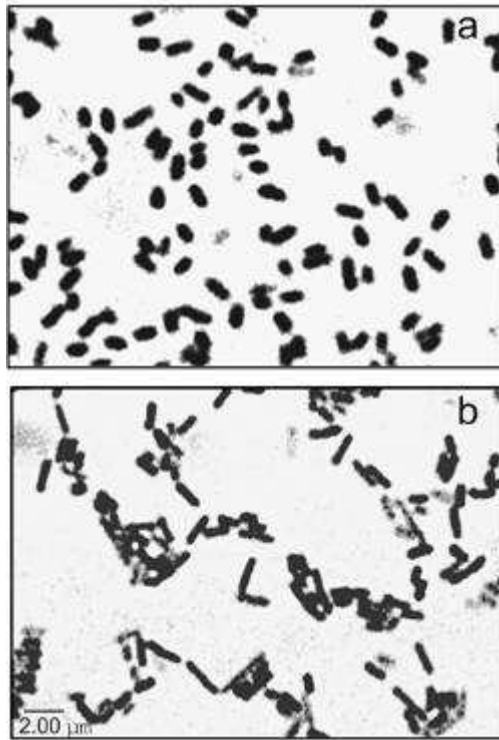


Figura 2.4. Fotomicroscópica de a) *E. coli* de laboratorio (ATCC 8739) y b) *E. coli* autóctona, aislada de heces bovinas recolectadas en suelos del establecimiento “Los Patricios”. San Pedro, Provincia de Buenos Aires.

Capítulo III

Adsorción y Partición de *E. coli* en suelos contrastantes de la Pampa Ondulada.

3.1 INTRODUCCIÓN

El estudio del transporte de microorganismos resulta imprescindible para la elaboración de modelos de contaminación biológica de suelos y aguas. Diversos autores han desarrollado modelos de transporte microbiano, de base mecanística y también de base empírica (Moore *et al.* 1989; Walker *et al.* 1990; Tian *et al.* 2002) a fin de poder predecir el movimiento de patógenos en sistemas lénticos y lóticos. Aún así, existen numerosos vacíos de información en cuanto a los factores que afectan al transporte microbiano. En este sentido, la asociación entre suelos, sedimentos y microorganismos no ha sido suficientemente estudiada (Jamieson 2004). El conocimiento de los factores que afectan esta asociación, tendría aplicaciones directas, como por ejemplo, en el manejo de desechos, en tratamiento de suelos contaminados (Ling *et al.* 2002) y en la generación de sistemas de alertas tempranas de contaminación biológica.

Estos contaminantes pueden ser transportados a través del escurrimiento en forma de células libres o estar asociados a partículas (Jamieson *et al.* 2004; Tyrrel *et al.* 2003). Drozd y Schwartzbrod (1996) mencionan que la adsorción de los patógenos al suelo no puede ser atribuida a un único factor ya que existen distintas fuerzas que interactúan en ese proceso. Los mecanismos propuestos incluyen las uniones Van der Waals, fenómenos de protonación, puentes catiónicos, etc. Dichos mecanismos están sujetos a las propiedades físicas y químicas edáficas. En tal sentido es importante considerar el tipo de material coloidal que posee cada suelo (Schijven *et al.* 2002). Algunos componentes y propiedades edáficas fueron relativamente más estudiados que otros. Entre estos se puede mencionar, el contenido de arcillas (Ling *et al.* 2002; Weaver *et al.* 1978), el pH (Reddy *et al.* 1981), la fuerza iónica (Stevik *et al.* 1999; Fontes *et al.*

1991), la CIC (Stotzky 1985) y el contenido de cationes multivalentes (Marshall 1980). Los índices más comúnmente utilizados para caracterizar esta asociación son el porcentaje de adsorción y el coeficiente de partición o distribución (K_d). Aunque en la última década fueron numerosos los estudios sobre dichos índices, la información referida a bacterias fecales en suelos todavía es muy limitada.

Los suelos constituyen microhábitats complejos que presentan componentes y una organización estructural altamente variable (Marshall 1985). Las superficies edáficas presentan ambientes con distintos comportamientos como resultado de estar revestidas con minerales de arcilla, óxidos, materia orgánica, poseer cargas variables dependientes del pH y estar sujeta a fluctuaciones de la concentración de electrolitos. La agregación de las partículas con la materia orgánica o minerales de arcilla modifican este microhábitat afectando tanto el transporte como la sedimentación y la supervivencia microbianas (Labelle y Gerba 1979). En igual sentido es importante considerar el tipo de arcillas, ya que este factor puede modificar el status físico-químico del microhábitat y por ende el balance microbiológico del sitio considerado (Marshall 1975; Stotzky 1985).

La heterogeneidad de estos microambientes restringe la aplicación directa de muchos conceptos mecanísticos de adhesión como la teoría DVLO o tensión superficial crítica, ya que dichas teorías asumen superficies homogéneas y limpias (Tadros 1980 en Stotzky 1985). Esta complejidad explicaría la escasa información que existe acerca de la forma y lugar donde ocurren los fenómenos de adsorción microbiana (Stotzky 1985). Por ello, la mayoría de los trabajos publicados se han centrado en pocos suelos fuertemente modificados en el proceso analítico. Incluso dichos estudios han utilizado metodologías sofisticadas que no se emplean rutinariamente en laboratorios de suelos.

Todo esto dificultó la caracterización de las variables mencionadas en muestras de suelo inalteradas y que presentaban rangos amplios de variabilidad edáfica. Por ende, la transferencia de la información obtenida hacia actividades de monitoreo o modelización de la contaminación no ha sido demasiado fluida hasta el presente.

En los últimos diez años diversos estudios de contaminación biológica han sido llevados a cabo en la cuenca del arroyo del Tala, Pampa Ondulada de Argentina. En esta cuenca la erosión hídrica y la contaminación han demostrado estar íntimamente asociadas (Chagas 2007). La erosión hídrica se produce principalmente por las actividades agrícolas de largo plazo desarrolladas en las posiciones altas (suelos Argiudoles) y además, por las explotaciones ganaderas extensivas realizadas en las áreas bajas (suelos Natracualfes). Estas situaciones se repiten en toda la región estudiada, por lo que resulta importante contar con información científicamente probada de esta temática.

En el presente capítulo se ha considerado que los materiales de suelo erosionados provenientes de esta cuenca pampeana poseen una importante capacidad de adsorción de contaminantes tanto químicos como biológicos (Chagas *et al.* 2007) los cuales se cargarían de microorganismos de origen fecal ganadero en las zonas bajas, antes de llegar a los cursos de agua.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es evaluar el comportamiento de la adsorción bacteriana en suelos pertenecientes a una cuenca representativa de la Pampa Ondulada (Argentina). Para ello los objetivos específicos son: a) Describir algunas propiedades edáficas importantes y de fácil medición, su variabilidad espacial y su interrelación en suelos de la cuenca del arroyo del Tala. b) Evaluar el comportamiento de la adsorción bacteriana en este sistema a través de las propiedades edáficas estudiadas. c) Analizar elementos para la elaboración de un modelo simple de predicción de la adsorción microbiana y a la vez disponer de valores locales de adsorción y coeficientes de distribución o partición que permitan compararlos con resultados obtenidos en otros lugares del mundo.

3.3 HIPÓTESIS

- **1.1.** Los suelos de la Cuenca del Tala poseen una alta heterogeneidad en relación a los porcentajes de adsorción, lo que permitiría separar ambientes con potencialidades distintas en cuanto al transporte bacteriano.
- **1.2.** La relación entre las propiedades edáficas y la adsorción bacteriana resulta independiente del suelo considerado (Argiudol o Natracualf).
- **1.3.** Existe una alta correlación lineal entre la capacidad de adsorción de los microorganismos a los suelos y sedimentos y los parámetros relacionados a la textura del suelo (contenido de arcilla y arena).

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Caracterización y muestreo de los sitios

Se muestrearon 32 sitios distribuidos a lo largo del sector medio y alto de la cuenca del arroyo del Tala, perteneciente a la Pampa Ondulada, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura 3.1). Los sitios muestreados se eligieron por su ubicación en la cuenca (alta medio o baja), diversidad edáfica (tipo de suelos), fisiográfica (loma, media loma, bajo), por las actividades predominantes en la zona de influencia (agricultura, ganadería) y presencia de cubetas o vaguadas permanentes o transitorias, a fin de obtener una importante variabilidad en la calidad de suelos de estos sectores de la cuenca. Existió una concentración de toma de muestras en un establecimiento agrícola-ganadero (“Los Patricios”) por hallarse en la cuenca media reflejando en el mismo, gran parte de la variabilidad de ambientes presentes en la cuenca estudiada (INTA, 1973). Para poder evaluar la variación espacial de las propiedades edáficas se realizó una separación de aquellas muestras recolectadas por *Tipo de suelo* (TS) en suelos **Argiudoles** (agrícolas) por un lado y suelos **Natracualfes** (ganaderos) por otro, y también por la ubicación de los muestreos, es decir, si se encontraban dentro o fuera del establecimiento “Los Patricios” (*Establecimiento - ES*). De esta forma se evaluó si el estudio de los parámetros biológicos en relación a las propiedades edáficas, debía realizarse discriminando por estas dos variables.

En cada sitio se tomó una muestra de suelo, compuesta por 3 submuestras de 0-50 mm de profundidad. Luego de tamizarse por 2 mm, se determinó en laboratorio el pH (1:2,5 sólido: agua) mediante potenciómetro, el carbono orgánico (CO) por el método de Walkley y Black (1934), conductividad eléctrica (conductímetro en extracto de saturación o doble saturación según correspondiera). Se midió también la humedad

equivalente (HE) (Mizuno *et al.* 1978). El Na y K en la solución del suelo (extracto acuoso 1/10) y en el complejo de intercambio del suelo (extracción con acetato de amonio 1 N) fueron medidos mediante fotometría de llama, mientras que el magnesio y el calcio fueron medidos por absorción atómica. Los aniones de la solución del suelo fueron medidos por titulaciones con metodología estándar (Klute 1986). Mediante el Na y Ca en la solución (sol) se confeccionaron dos índices, llamados relación Na (Rel Na-sol) y relación Ca (Rel Ca-sol), los que representan la proporción de estos cationes dentro de los cationes totales. Además, a partir de la medición de estos iones se calculó la fuerza iónica (FI) de la solución de cada suelo. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue medida mediante extracción con cloruro de potasio (Klute 1986), la superficie específica (SE) según metodología de Lombardi *et al.* (2001) y la distribución de tamaño de partículas por el método de la pipeta de Robinson (Soil Conservation Service 1972). La mineralogía de la fracción arcilla en muestras homioónicas orientadas, glicoladas y calcinadas a 520°C fue determinada mediante difracción de rayos X con un equipo Philips XPro. Los agregados de suelo (>2 mm) fueron descriptos y fotografiados mediante un fotomicroscopio Wild MZ8 Leica.

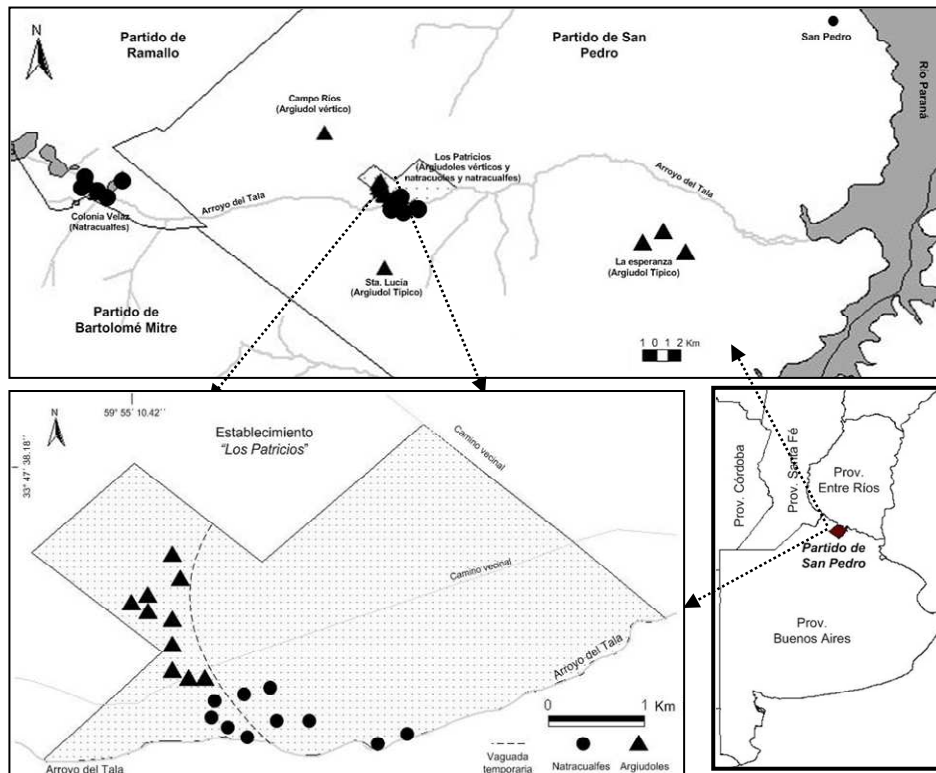


Figura 3.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo. (▲ Argiudoles ● Natracuafes ---- vaguada intermitente)

3.4.2 Cuantificación de la adsorción de los microorganismos al sólido

Previo al ensayo biológico, las muestras de suelo fueron esterilizadas en el reactor de CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica) mediante la aplicación de una dosis mínima y altamente uniforme de radiación ionizante equivalente a 25 kGy, con el fin de no provocar cambios en la estructura de las partículas. De esta forma se evitó emplear altas temperaturas que podrían desnaturalizar la materia orgánica. Además, no se usaron biocidas químicos para evitar la residualidad para los microorganismos que se inocularan *a posteriori*. La efectividad de esta técnica de esterilización fue comprobada por trabajos anteriores (Chagas 2007; Kraemer *et al.* 2008)

Para la realización de los ensayos biológicos se utilizó la cepa de laboratorio *Escherichia. coli* ATCC 8739. La concentración de inóculo fue de 1.10^7 UFC ml⁻¹, equivalente a la utilizada por numerosos investigadores para representar un valor máximo de microorganismos en escurrimientos sobre materia fecal (Guber *et al*, 2005; Oliver *et al*. 2007). Para conseguir dicho valor se utilizó una curva de absorbancia vs. concentraciones conocidas de microorganismos (UFC ml⁻¹) previamente confeccionada.

La metodología utilizada para la medición de la adsorción microbiana, fue la propuesta por Ling *et al*. (2002) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de 6 ml de solución bacteriana en 6 g de suelo. Luego de inocularse el suelo, se agitó manualmente la suspensión durante 1 min y se la dejó en reposo por 5 min. Este período de reposo fue suficiente para que exista una asociación -reversible-, entre la bacteria y el suelo. Dada la similitud de tamaños entre las bacterias (0,2-1,3 μm) y las partículas de arcilla (<2 μm) y su gran diferencia de densidades de partículas, se decidió separarlas por centrifugación poniendo como límite entre ambas un diámetro de 1 μm. La energía calculada para dicha separación con los materiales utilizados fue de 50 G durante seis minutos. Este valor se ajustó experimentalmente para las condiciones particulares del presente ensayo.

Esta energía se modificó en dos de las 32 muestras cuya comprobación de densidad real se alejaba significativamente del valor utilizado para los cálculos de la energía a emplear (2,65 g cm³) debiéndose aumentar el tiempo de centrifugación. La pureza de las fracciones separadas fue corroborada por microscopía óptica. El sobrenadante de cada muestra fue incubado a 36 °C durante 24 h en el medio VRB (Agar Rojo Bilis) para el posterior recuento de colonias. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

La proporción de bacterias adherida al suelo (porcentaje de adsorción) se calculó como:

$Ads (\%) = (N_t - N_s) / N_t \times 100$. Siendo N_t = número total de bacterias adicionadas al suelo ($UFC\ ml^{-1}$) y N_s = número total de bacterias en el sobrenadante ($UFC\ ml^{-1}$).

También se calculó el coeficiente de distribución (K_d) de la siguiente manera:

$K_d = C_s / C_a$, donde, K_d = coeficiente de distribución ($ml\ g^{-1}$), siendo C_s y C_a las concentraciones en el sólido ($UFC\ g^{-1}$) y en el líquido ($UFC\ ml^{-1}$) respectivamente.

3.5 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para resumir las características físicas y químicas de los suelos estudiados y para interpretar la asociación entre estas variables edáficas. Este procedimiento de estadística multivariada permite analizar todas las variables en forma simultánea, determinando índices llamados componentes o factores (Aboin 2004), los cuales conforman un nuevo conjunto de variables no correlacionadas entre sí y con pérdida mínima de información.

El ACP incluyó las siguientes variables: pH, CO, PSI, HE, Arcilla, Arena, CIC, SE, FI, Rel Na –sol, Rel Ca–sol. Luego se evaluó la existencia de agrupamientos entre las propiedades físicas y químicas de los sitios evaluados de acuerdo al tipo de suelo o al sitio/establecimiento de muestreo. Para corroborar dichos agrupamientos, se realizó un análisis de varianza para los efectos de tipo de suelo y sitio/establecimiento de muestreo sobre el componente principal 1 (CP1), el componente principal 2 (CP2) y el porcentaje de adsorción microbiana.

Para analizar el comportamiento de la adsorción bacteriana en la zona bajo estudio, se evaluó la asociación entre la adsorción bacteriana y las propiedades edáficas y se verificó además si esta asociación variaba según el tipo de suelo (Argiudol o Natracualf). Para esto se realizó un análisis de regresión lineal con variables categóricas (tipo de suelo) probando las diferencias entre las pendientes y ordenadas al origen

mediante ANOVA (Snedecor y Cochran 1980). En primer lugar se evaluó como variable independiente el CP1 y luego se evaluaron por separado: pH, CO, PSI, HE, Arcilla, Arena, CIC, SE, FI, Rel Na –sol y Rel Ca-sol, siendo siempre la adsorción bacteriana la variable dependiente. En todos los casos se cumplieron los supuestos de independencia y homogeneidad de varianzas. Por último se elaboró un modelo de predicción de la adsorción microbiana mediante un análisis de regresión lineal múltiple. El criterio utilizado para seleccionar las variables en esta regresión fue la minimización del cuadrado medio del error (CME), la maximización del R^2 y por último se realizó un stepwise (P entrada y salida: 0,15). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Infostat/P v1.1, 2002.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Caracterización de los suelos según sus propiedades físicas y químicas

Como se puede observar en la Tabla 3.1 existe una variabilidad importante en cuanto a las propiedades físicas y químicas de los horizontes superficiales de los suelos. El contenido de CO varió entre 0,2 y 5,1 %. A su vez el pH presentó un rango de 5.3 a 9.3 mientras que el contenido de arcillas osciló entre 220 y 525 g kg⁻¹. La mineralogía del suelo consistió en arcillas tipo 2:1, principalmente illitas, con una pequeña proporción de caolinita e interstratificados. Con respecto a los agregados de suelo retenidos en el tamiz >2 mm, se ha podido observar una importante heterogeneidad en cuanto a su tamaño, morfología y características superficiales (Foto 3.1). Las muestras evidencian diverso grado de “recubrimiento” superficial y variada intensidad y distribución de colores, indicando inclusive la presencia de materiales diferentes. Por ejemplo en la fotografía **f**, se observa un caracol y un grano de cuarzo muy grueso evidenciando el carácter aluvial que pueden poseer algunos suelos mientras que en la fotografía **b** y **c** se observan restos vegetales en descomposición. También se observa una mayor macroporosidad en los suelos agrícolas (**a**, **b** y **c**). Los agregados presentaron formas irregulares en todos los sitios con excepción del sitio Los Patricios 1 (foto **f**). Los agregados de sitios agrícolas presentaron formas de bloques angulares y subangulares mientras que los agregados de los sitios ganaderos presentaron una forma más esferoidal con caras más redondeadas. Por tratarse de agregados superficiales todos ellos presentaron rasgos de melanización aunque con distinto grado y distribución en el mismo.

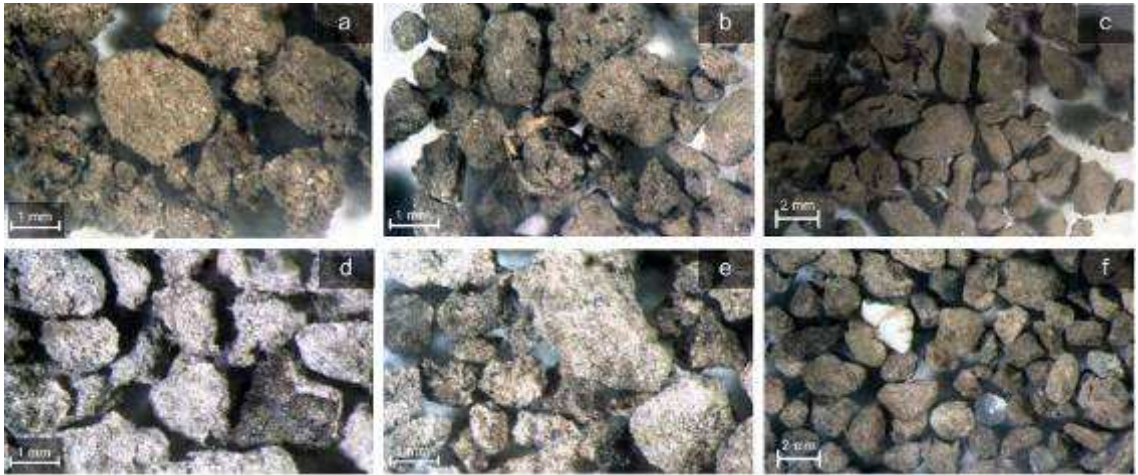


Foto 3.1. Morfología de agregados evaluados. Las fotografías a,b,c corresponden a suelos agrícolas (Los Patricios 13, 14, 15 respectivamente) y las fotografías d, e, f corresponden a suelos ganaderos (Colonia Velaz 3, Los Patricios 3 y 1 respectivamente).

Tabla 3.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos evaluados. En esta tabla se presentan la ubicación, tipo de suelo, pH, carbono orgánico (CO), capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE), porcentaje de sodio intercambiable (PSI), fuerza iónica, relación Na y Ca de la solución del suelo – solución-, porcentaje de arcilla, limo y arena, superficie específica (SE) y humedad equivalente (HE).

Ubicación	Suelo	pH	CO (%)	CIC cmol _c Kg ⁻¹	CE dS m ⁻¹	PSI (%)	Fuerza iónica (M)	Relación Na -solución- (%)	Relación Ca -solución- (%)	Arcilla (<2 µm)	Limo (2 - 50 µm) g Kg ⁻¹	Arena (> 50 µm)	SE m ² gr ⁻¹	HE (%)
Los Patricios_1	Natracualf	7,7	0,2	26,7	0,89	2,8	0,00634	54,8	28,2	220	480	300	211	19,0
Los Patricios_2	Natracualf	8,5	0,6	13,8	0,91	10,4	0,00589	42,5	5,8	240	575	185	107	18,3
Los Patricios_3	Natracualf	6,3	3,7	23,8	0,73	3,5	0,00673	35,4	5,9	390	530	80	262	26,6
Los Patricios_4	Natracualf	6,1	3,7	17,9	1,48	3,2	0,00960	17,4	25,4	300	610	90	149	25,1
Los Patricios_5	Natracualf	5,6	3,1	16,8	0,65	4,5	0,00457	11,2	18,7	320	595	85	146	25,3
Los Patricios_6	Natracualf	8,5	1,8	18,4	1,00	13,0	0,01042	65,3	11,9	255	565	180	170	23,8
Los Patricios_7	Natracualf	9,3	0,8	16,5	1,35	23,2	0,01337	66,0	17,4	285	555	160	181	22,7
Los Patricios_8	Natracualf	8,5	1,5	18,1	1,63	13,9	0,00993	53,4	21,9	340	520	140	146	19,2
Los Patricios_9	Natracualf	7,3	0,9	24,2	1,29	2,5	0,00972	33,8	28,2	430	450	120	314	21,5
Los Patricios_10	Natracualf	7,9	2,0	16,5	1,60	16,9	0,01157	38,7	25,2	290	565	145	132	17,8
Los Patricios_11	Natracualf	6,0	3,1	16,6	0,60	2,4	0,00360	28,3	6,3	355	565	80	153	22,4
Colonia Velaz_1	Natracualf	6,7	3,6	19,5	3,46	4,5	0,02044	15,5	12,1	230	590	180	136	25,4
Colonia Velaz_2	Natracualf	7,2	3,4	18,7	2,20	4,9	0,01263	47,7	17,6	280	570	150	191	25,2
Colonia Velaz_3	Natracualf	7,3	1,0	14,2	3,84	11,3	0,02429	51,6	7,9	245	585	170	163	18,3
Colonia Velaz_4	Natracualf	7,2	2,4	17,5	2,28	7,7	0,01396	25,5	24,0	310	560	130	183	19,5
Colonia Velaz_5	Natracualf	8,8	1,8	30	2,20	10,7	0,01421	29,2	26,6	360	570	70	201	29,7
Los Patricios_12	Argiudol	6,5	1,0	26	0,42	1,8	0,00272	45,1	21,7	510	440	50	271	22,9
Los Patricios_13	Argiudol	6,4	0,9	24,5	0,56	0,5	0,00357	4,7	6,2	525	390	85	264	23,6
Los Patricios_14	Argiudol	6,2	0,9	22,3	0,80	0,6	0,00455	28,0	28,0	435	445	120	224	22,0
Los Patricios_15	Argiudol	5,7	3,8	27,6	0,89	1,6	0,00558	30,6	44,2	440	525	35	224	26,5
Los Patricios_16	Argiudol	6,2	2,8	26,1	0,96	0,5	0,00454	6,3	19,8	375	570	55	236	24,5
Los Patricios_17	Argiudol	5,3	3,1	24,7	0,63	0,7	0,00397	31,2	39,0	385	595	20	200	25,5
Los Patricios_18	Argiudol	5,5	2,4	26,7	0,40	1,7	0,00262	41,2	39,8	440	530	30	194	25,9
Los Patricios_19	Argiudol	5,6	2,8	20,8	0,78	2,1	0,00558	10,1	25,1	380	540	80	186	24,3
Los Patricios_20	Argiudol	8,1	5,1	22,6	0,87	6,7	0,00715	38,3	27,3	330	455	215	206	19,6
Los Patricios_21	Argiudol	5,4	3,7	29,4	0,96	1,8	0,00698	10,7	33,1	400	580	20	223	29,3
Los Patricio_22	Argiudol	5,4	3,4	18,2	1,94	0,7	0,00715	8,1	28,8	310	590	100	182	21,0
La Esperanza_1	Argiudol	5,8	3,6	27,7	0,30	1,8	0,00304	45,9	23,9	425	485	90	287	26,7
La Esperanza_2	Argiudol	5,8	3,7	18,6	1,21	2,6	0,00744	25,6	38,2	290	570	140	150	24,7
La Esperanza_3	Argiudol	6,2	1,6	27,8	0,54	1,3	0,00523	10,4	22,0	490	450	60	326	25,9
Rios	Argiudol	5,6	4,2	22,1	1,49	2,0	0,00763	20,1	40,0	362	595	43	193	27,4
Sta Lucia	Argiudol	5,8	3,1	20,5	0,61	2,8	0,00422	9,3	17,7	340	610	50	194	19,8

Coincidiendo con la importante heterogeneidad edáfica mencionada, los valores de adsorción bacteriana hallados oscilaron entre 25,3 y 73,3 % mientras que el coeficiente de partición (K_d) varió entre 0,5 y 93 ml g⁻¹.

A partir de las propiedades edáficas de cada sitio se procedió al análisis de componentes principales a fin de describir y resumir las propiedades del sistema evaluado. Los dos primeros ejes fueron responsables de 62% de la variabilidad de las muestras evaluadas. El primer eje (CP1) explicó el 45% de la variabilidad y estuvo compuesto principalmente por el contenido de arcilla, el PSI, contenido de arena y en menor medida por el pH (Tabla 3.2). El segundo eje (CP2), el cual representó el 16% de la variabilidad, estaba compuesto por el CO, SE y la rel Na –sol. En la Figura 3.2 se puede observar un importante agrupamiento de propiedades edáficas como el PSI, pH y relación Na –sol indicando ambientes típicamente de suelos sódicos y salinos. En la misma figura se advierte también el agrupamiento de otras propiedades edáficas como el contenido de arcillas, CIC y superficie específica, variables asociadas a la presencia de partículas finas. Este agrupamiento está representado por los sitios evaluados sobre suelos Argiudoles. Se lograron observar otras relaciones esperables tales como la posición diametralmente opuesta que ocupan el contenido de arena y la HE por un lado y la relación Ca –sol con el PSI por otro lado.

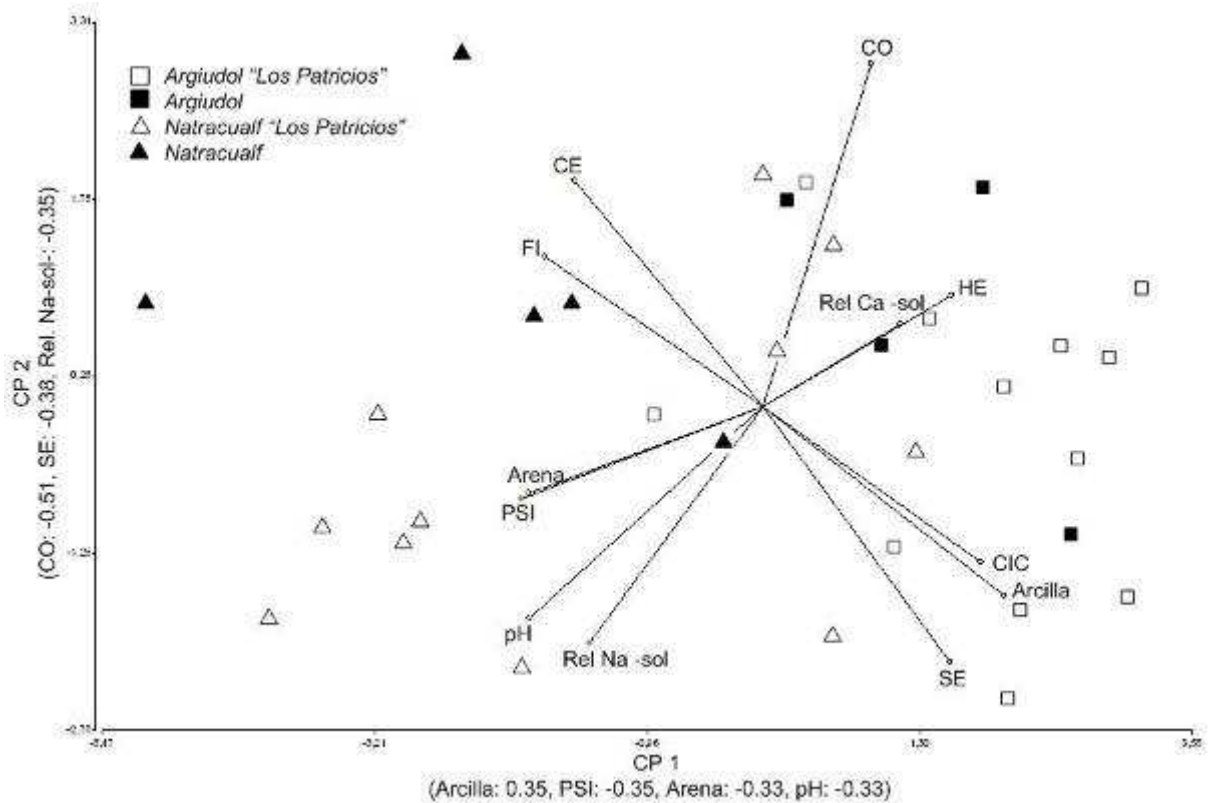


Figura 3.2. Resultados del análisis de componentes principales. Los diferentes símbolos indican el origen de la muestra. Los cuadrados indican suelos Argiudoles y los triángulos suelos Natracualfes (signo vacío Establecimiento "Los Patricios", signos llenos son muestras recolectadas fuera de "Los Patricios"). La longitud de los vectores muestra la magnitud de representación de cada variable para cada componente y los ángulos entre las variables indican la correlación existente entre estas. Ángulos de 90° entre dos variables indican que las mismas no se encuentran correlacionadas.

Tabla 3.2. Autovectores correspondientes al análisis de componentes principales. La significancia corresponde al análisis de correlación efectuado entre los componentes principales y cada variable.

Autovectores

<i>Variables</i>	<i>Eje 1</i>	<i>Eje 2</i>
pH	-0,33***	-0,31***
CO	0,16*	0,51***
CIC	0,31***	-0,23
CE	-0,27***	0,34**
PSI	-0,35***	-0,14
FI	-0,31***	0,22
Rel. Na-sol	-0,25***	-0,35***
Rel. Ca-sol	0,20**	0,12
Arcilla	0,35***	-0,28*
Arena	-0,33***	-0,13
SE	0,27***	-0,38***
HE	0,27***	-0,17

$P < 0,05^*$

$P < 0,01^{**}$

$P < 0,001^{***}$

Como se observa en la Tabla 3.3 el efecto del *Tipo de Suelo* resultó significativo en relación al CP1 mientras que no se encontraron efectos en el CP2. En la Figura 3.2 también se puede advertir dicho efecto al observarse un gradiente de propiedades físicas y químicas en relación al tipo de suelo (Natracualf o Argiudol) según lo indica el CP1. A medida que disminuye el CP1, más altos son los valores de pH, PSI y la Rel Na-sol y más pequeña resultaba la relación Ca-sol, representando a suelos de los sectores bajos (Natracualfes). De la misma forma, a medida que aumenta el CP1, menores valores presentan las tres variables antes mencionadas y mayores valores de la Rel Ca-sol son encontrados, delineando ambientes altos (Argiudoles). El establecimiento de muestreo fue importante en el CP2, aunque las diferencias entre establecimientos fueron menores que entre tipos de suelo (Fig. 3.2, Tabla 3.3), mientras que no existió interacción entre el *Tipo de Suelo* y *Establecimiento*. Finalmente, la adsorción microbiana se asoció

significativamente con el tipo de suelo, encontrándose los valores más altos de adsorción microbiana para los suelos Argiudoles y los más bajos para los suelos Natracualfes.

Tabla 3.3. Análisis de varianza para los efectos de tipo de suelo y concentración de muestreo sobre el componente principal 1 (CP1), el componente principal 2 (CP2) y el porcentaje de adsorción microbiana. Se presenta el estadístico F para cada término del modelo.

	<i>CP1</i>	<i>CP2</i>	<i>Adsorción microbiana (%)</i>
Tipo de Suelo (TS)	37,7***	0,01	12,31**
Establecimiento (ES)	1,05	6,36*	0,06
TS × ES	0,07	0,3	0,95

Los efectos significativos están resaltados: ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05

3.6.2 Asociación entre la adsorción microbiana y las propiedades edáficas

Las propiedades edáficas evaluadas, caracterizadas por el CP1, explicaron el comportamiento de la adsorción microbiana con un grado adecuado de ajuste del modelo de regresión lineal $R^2=0,67$ ($P<0,0001$) (Figura 3.3). Analizando esta regresión mediante variables categóricas no se encontraron efectos de TS o ES, tanto para la ordenada al origen como para la pendiente ($P>0,05$). Por eso el análisis del comportamiento de la adsorción bacteriana a través del CP1 resultó válido para ambos tipos de suelo sin diferenciar también por el establecimiento de muestreo.

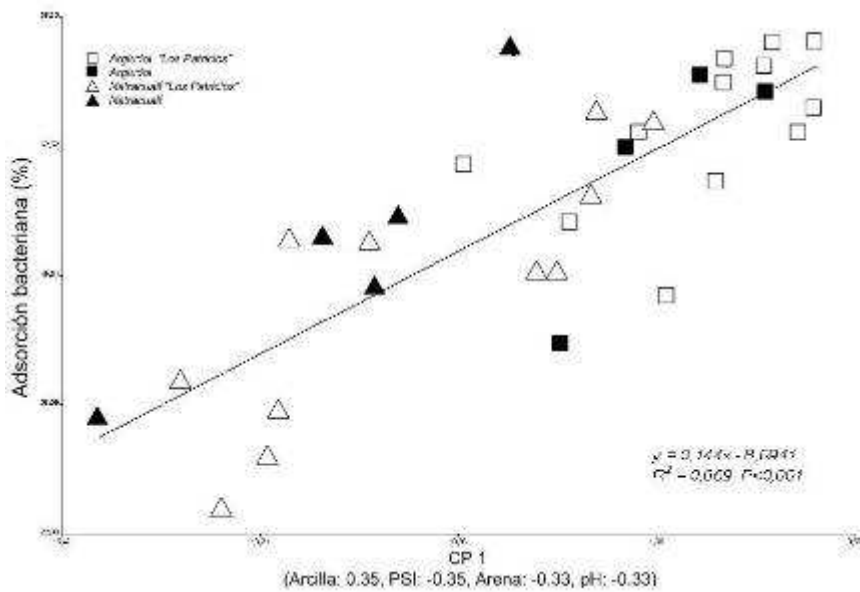


Figura 3.3. Regresión Lineal entre la Adsorción bacteriana (%) y el CP1. Los símbolos cuadrados vacíos corresponden a suelos Argiudoles, correspondiendo los cuadrados oscuros a la toma de muestra fuera de “Los Patricios”. Los triángulos vacíos corresponden a suelos Natracualf y los rellenos a los Natracualf recolectados fuera de “Los Patricios”.

Mediante el análisis de forma unitaria de las variables edáficas tampoco presentaron diferencias significativas debido al TS o ES ($P < 0,05$) (Figura 4). Estas variables lograron explicar hasta el 67% de la variación de la adsorción bacteriana. Los valores más altos de coeficiente de determinación lo constituyeron aquellos parámetros con una tendencia positiva en relación a la adsorción microbiana como la CIC ($R^2 = 0,67$), el contenido de arcilla ($R^2 = 0,55$) y la superficie específica ($R^2 = 0,45$), por otro lado, el PSI ($R^2 = 0,42$), el contenido de arenas ($R^2 = 0,38$) y el pH ($R^2 = 0,25$) fueron las variables que mejor explicaron la tendencia negativa a la adsorción (Figura 3.4). Sin embargo otras propiedades edáficas de importancia en el CP2 presentaron diferencias en el comportamiento en la adsorción bacteriana debido al tipo de suelo, aunque dichas propiedades no presentaron ni coeficientes de determinación ni significancias importantes. Como se observa en la Figura 3.5a, el CO presentó un comportamiento de

tendencia levemente negativa en los Argiudoles y por otro lado positiva para los Natracualfes. En la Figura 3.5b, la Rel. Ca-sol no presenta ninguna tendencia marcada en los suelos Argiudoles mientras que en los Natracualfes se observa una tendencia positiva. Por otro lado, la FI presentó un R^2 de 0,2 ($P < 0,05$) y la CE y Na –sol un R^2 de 0,14 ($P < 0,05$) y 0.15 ($P < 0,05$) respectivamente todas evidenciando diferentes pendientes entre suelos ($P < 0,05$) con tendencias negativas.

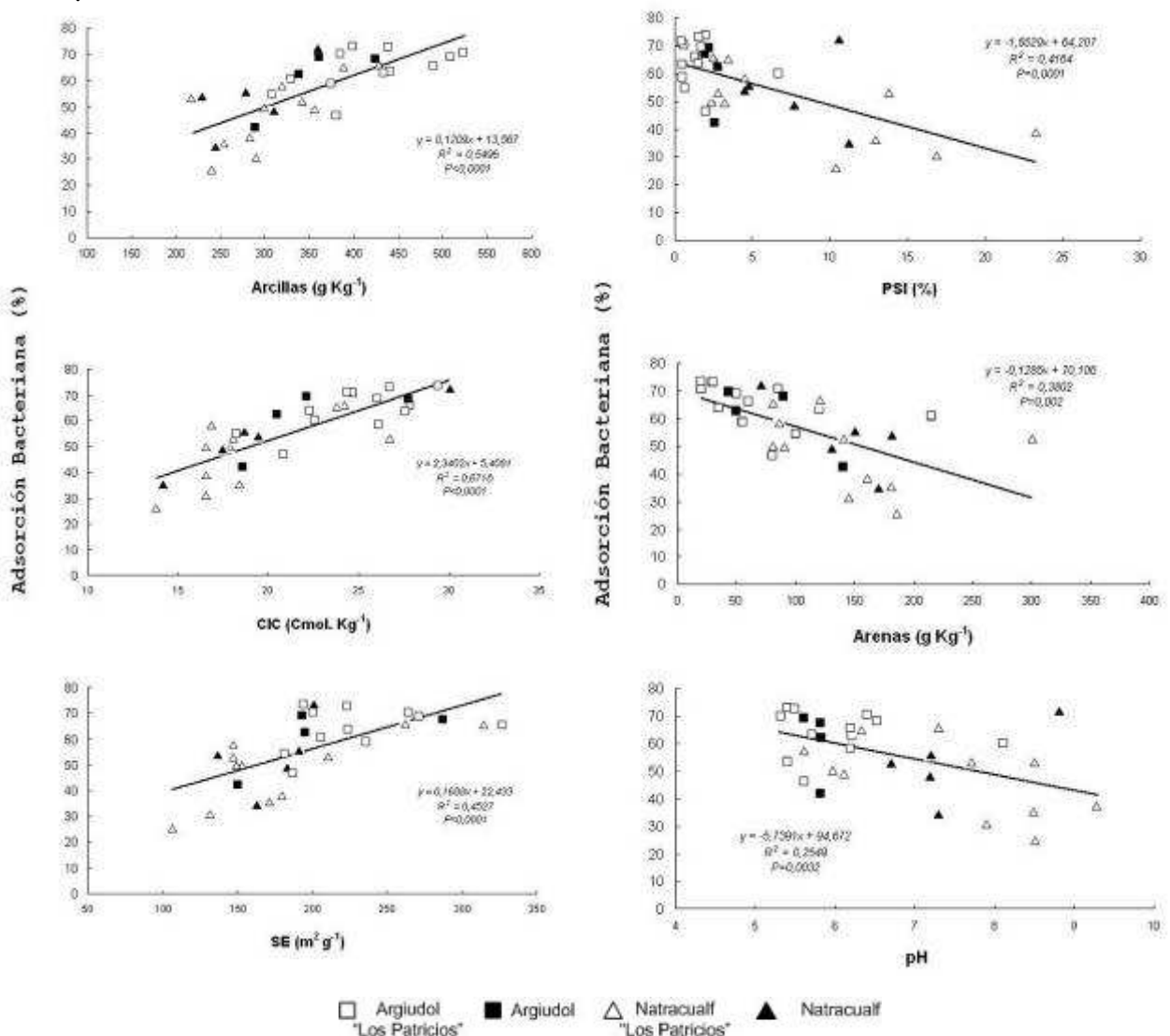


Figura 3.4. Regresiones de las variables utilizadas con tendencia positiva, contenido de arcillas (%), CIC ($C\ mol\ Kg^{-1}$) y superficie específica ($g\ m^{-2}$) -panel izquierdo- y con tendencia negativa, PSI (%), contenido de arenas (%) y pH -panel derecho-. Los cuadrados corresponden a suelos Argiudoles, mientras que los triángulos corresponden a suelos Natracualfes. Los suelos muestreados en “Los Patricios” se presentan vacíos y los llenos corresponden a muestreos fuera de este establecimiento.

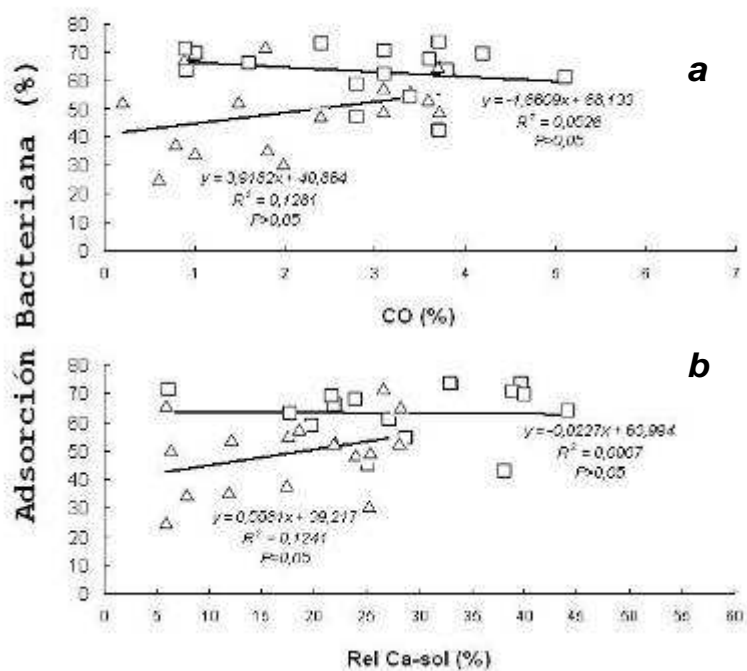


Figura 3.5. Regresiones de las variables utilizadas con tendencias diferentes según tipo de suelo, a) carbono orgánico (%) y b) Rel. Ca-sol (%). Los cuadrados corresponden a suelos Argiudoles, mientras que los triángulos corresponden a suelos Natracualfes.

3.6.3 Predicción de la adsorción microbiana

Las propiedades edáficas que integraron el modelo de predicción de la adsorción bacteriana, minimizando el CME, fueron el contenido de arcilla, CO, CIC, CE y FI. El mismo contó con un R^2 de 0,79 ($R^2_{ajus}:0,77$). Las mismas propiedades y ajustes fueron encontradas al operar maximizando el R^2 . Luego se realizó un stepwise para evaluar el comportamiento del modelo evaluado por la selección de propiedades significativas (P entrada y salida= 0,15). El modelo ajustado con esta metodología fue el siguiente: $y = 1.7 (CIC) - 0.05 (Arena) - 0.54 (PSI)$ el cual presentó un coeficiente de determinación también de 0.79 con un R^2 ajustado de 0,77. Este modelo simple pudo explicar un porcentaje muy alto de la variabilidad de la adsorción bacteriana en la cuenca estudiada.

3.7 DISCUSIÓN

La amplitud de los rangos de valores que presentaron las propiedades físicas y químicas (Tabla 3.1) conforman un marco adecuado para estudiar la variabilidad edáfica presente en la cuenca y su influencia sobre la adsorción microbiana. Esta amplitud incluso excede los rangos de aplicación de las fórmulas de predicción de la adsorción microbiana como la propuesta por Ling *et al.* (2002). En este sentido cabe destacar la variabilidad morfológica que evidenciaron los agregados retenidos por el tamiz de 2 mm (Foto 3.1) lo que refleja la diversidad composicional de los materiales de suelo estudiados. Los revestimientos de arcillas, la interacción con los compuestos orgánicos, conjuntamente con las variaciones del pH y la presencia de cationes son factores importantes en la determinación del grado de adsorción bacteriana. Este concepto reafirma la importancia de realizar ensayos empleando suelos en su estado natural en lugar de usar sus constituyentes primarios. A campo las arcillas no están dispersadas sino que forman agregados, dominios, cutanes y pueden estar asociadas en parte con MO u óxidos (Stotzky 1985). Por ejemplo, la adsorción bacteriana es dramáticamente aumentada por la presencia de recubrimientos de óxidos en los granos de cuarzo relativos a los granos puros (Mills *et al.* 1994). Por otro lado Hoek y Agarwal (2006) encontraron que la rugosidad superficial causa una importante modificación de las fuerzas repulsivas o atractivas. La heterogeneidad superficial crea una mayor distancia de separación de partícula-sustrato causando una reducción de la energía de la interacción (Jacobs *et al.* 2007). Por todo lo mencionado, los amplios rangos de valores medidos de adsorción y K_d en el presente ensayo deben entenderse como una conjunción de toda esta complejidad edáfica.

3.7.2 Adsorción bacteriana y Kd

Los rangos de adsorción (25,3-73,3%) y Kd (0,5-93 ml g⁻¹) bacteriano obtenidos en laboratorio, si bien evidenciaron una gran amplitud, resultaron relativamente bajos comparados con los que se citan habitualmente. Por ejemplo, para suelos limosos Ling *et al.* (2002) encontraron valores de adsorción microbiana de hasta 99%, A su vez Oliver *et al.* (2007) midieron 35% de asociación mientras que Characklis *et al.* (2005) encontraron que 20 a 35% de *E. coli* estuvo asociado con agregados sedimentables medidos mediante técnicas de centrifugación. En cuanto al KD, esta propiedad puede variar ampliamente entre diferentes suelos. Weaver (1978) informó valores de 33 a 9 900 ml g⁻¹ para suelos Serozem en el Asia central y entre 0,7 y 9790 para suelos de diferentes texturas en EEUU. Guber *et al.* (2005) encontraron valores de Kd de 9,4; 46,3; 513,2 ml g⁻¹ para dos suelos limosos y suelos franco arcillo limosos, respectivamente. Resulta destacable que en Argentina se hayan obtenido valores similares a los citados por Ling *et al.* (2002) (0,33 ml g⁻¹ para suelos limosos y de 127 ml g⁻¹ para suelos arcillo limosos) al emplear una metodología similar a la de dichos autores.

3.7.3 Asociación entre la adsorción bacteriana y las propiedades edáficas

Al analizar la relación entre el CP1 y la adsorción bacteriana (Figura 3) no se encontraron efectos atribuibles al tipo de suelo. Es decir que el comportamiento general del ambiente expresado por el CP1 en relación a la adsorción bacteriana, puede representarse mediante una única ecuación con un importante grado de ajuste ($R^2=0,67$), la cual incluye a las propiedades de los dos suelos dominantes. Estas variables edáficas incluidas en el primer componente principal tuvieron una alta significancia en describir el sistema bajo estudio. Dichas propiedades, mediante las regresiones lineales, fueron

las que mejor describieron el comportamiento de la adsorción bacteriana. Las mismas son citadas en la literatura como propiedades que pueden afectar de forma positiva y negativa la adsorción bacteriana.

Tendencias positivas

Dentro de este grupo, el contenido de arcilla, se suele citar como el factor principal en la regulación de la adsorción y el K_d (Hagedorn *et al.* 1978; Bengtsson 1978). Por ejemplo Weaver *et al.* (1978) estudiaron esta variable en una solución de agua y suelo y observaron que la adsorción de *E. coli* variaba entre 7% en suelos franco arenosos (10% arcilla) a 90% y más en suelos arcillosos. Mediante técnicas de centrifugación Ling *et al.* (2002) encontraron para dos suelos de 14% y 35% de contenido de arcilla, valores de 24,5% y 99,2 de adsorción de *E. coli*, respectivamente. Para los suelos evaluados, el ajuste del modelo de regresión para dicha relación (Figura 3.4) alcanzó un coeficiente de determinación de 0,55. Este valor, aunque relativamente alto en relación a las restantes propiedades evaluadas, no evidenció todo el potencial predictivo esperado del contenido de arcillas como estimador de la adsorción. Una posible explicación a este hecho se basa en el alto grado de agregación (y de recubrimiento orgánico) que presentaban las muestras analizadas (Foto 3.1).

Con respecto a la superficie específica, propiedad estrechamente asociada a las arcillas, se esperaba un grado de ajuste elevado respecto de la adsorción bacteriana. Sin embargo este ajuste resultó muy similar al contenido de arcillas. Al tratarse de muestras que en su mayoría eran similares en la proporción de tipo de arcillas (illita y caolinita) (Figura 9.3 Anexo 2), esta variable no mejoró la explicación de la adsorción bacteriana.

Por otro lado la CIC, propiedad íntimamente ligada al contenido y tipo de arcillas y a la materia orgánica, permitió ajustar un modelo de regresión con el máximo coeficiente de determinación de todo el ensayo (Figura 3.4), indicando la importancia de los balances electrostáticos, y de los cationes presentes en el ambiente de adsorción. Lipson y Stozky (1983) en estudios con reovirus también concluyeron que la CIC era una de las propiedades involucradas en la adsorción. En los minerales 2:1 un 80% de la carga negativa depende de las sustituciones isomórficas (Stozky 1985), siendo presumiblemente ésta la razón por la cual la CIC fue la variable que mejor explicó el comportamiento de la adsorción microbiana. Para comprender con más detalle dicho fenómeno, se estimó la distribución de la densidad de cargas negativas presentes en la muestra calculando el cociente entre la CIC y la superficie específica (Stozky 1985). Sin embargo este índice presentó valores muy erráticos no aportando elementos para esclarecer los mecanismos de adsorción (datos no mostrados).

Las interacciones superficiales entre las entidades biológicas y las arcillas son usualmente mayores cuando la valencia y concentración de los cationes intercambiables es mayor. Este hecho, según la teoría de DVLO (Derjaguin y Landau 1941; Verwey y Overbeek 1948) es en parte el resultado de la reducción de la extensión de la doble capa difusa de las arcillas, lo cual permite a éstas últimas y a las entidades biológicas aproximarse entre sí. La tendencia encontrada con la relación Ca^{+2} en la solución podría afirmar el rol de los cationes en la importancia del la CIC en el aumento de la adsorción bacteriana, principalmente en los Natracualfes donde la concentración de este catión es baja (Figura 3.5.b). Esto sería debido a la reducción de la doble capa difusa, tal como se mencionó anteriormente, lo que conllevaría además una floculación parcial o total de las arcillas y agregados, lo cual alteraría el balance de cargas electrostáticas. Además,

los cationes divalentes como el Ca^{+2} reducen la expansibilidad y la dispersibilidad de estas arcillas 2:1. Entonces, de forma indirecta la floculación de las arcillas disminuiría la expresión de las cargas negativas en las 2:1 aumentando el efecto de adsorción sobre los microorganismos. Por ejemplo en estudios con *Pseudomonas sp.* se observaron importantes cambios de adsorción principalmente en arcillas 2:1 principalmente debido a las cargas negativas que presentan estas arcillas a partir de pH 3 (Jiang *et al.* 2007). En este mismo sentido, con la adsorción de cationes inorgánicos (polielectrolitos cationicos) las cargas superficiales quedarían neutralizadas y si la adsorción continuara, la carga neta se revertiría y se volvería positiva. Marshall (1980) expone que la aparición de este tipo de floculación podría ser un mecanismo de acercamiento de las células bacterianas a las partículas del suelo para que luego funcionen fuerzas como la de Van der Waals.

Tendencias negativas

De acuerdo a los mecanismos antes mencionados, el elevado coeficiente de determinación en el ajuste de regresión entre el PSI y la adsorción microbiana (Figura 3.4), estaría reflejando el ambiente de dispersión de agregados que se genera al incrementarse la expresión de las cargas negativas. Este hecho tendría como efecto el incremento de la repulsión de las bacterias. De la misma forma la tendencia negativa encontrada con la Rel Na –sol confirman este fenómeno.

En relación al pH, Jiang *et al.* (2006) encontraron un aumento de la adsorción de *Pseudomonas putida* en minerales cuando el pH aumentaba de 2 a 3 para luego decrecer cuando el pH pasaba de 3 a 10. Scholl y Harvey (1992) encontraron que un gran número de colonias de *Arthrobacter sp.* se asociaron al cuarzo a pH 5,04 para luego decrecer a

7,52. En resumen, habría una estrecha relación entre la adsorción bacteriana y el pH del medio. Este hecho confirma el rol de las fuerzas electrostáticas en la adsorción bacteriana a minerales. El aumento del pH tiene también como consecuencia el aumento de la electronegatividad de las superficies de las membranas bacterianas, fenómeno que potenciaría la repulsión bacteriana a las superficies minerales.

Se puede observar que la variable pH que en el análisis de PCA discriminaba en gran medida la variabilidad de los suelos evaluados, no tuvo la misma preponderancia como variable predictiva individual de la adsorción bacteriana. Aunque a esta relación le correspondió una alta significancia ($P < 0,003$) su R^2 no superó 0,25. Esto podría deberse en parte, a la preponderancia de los minerales 2:1 en las muestras analizadas, ya que en ellos la carga negativa, responsable por la adsorción bacteriana, es escasamente dependiente del pH. En este sentido, la variación de cargas negativas dependientes del pH estará dada por la caolinita, la cual si bien está presente en prácticamente todas las muestras, su proporción en ellas es muy baja.

La materia orgánica por su parte, puede afectar los fenómenos de adsorción al modificar la superficie de las fracciones inorgánicas alterando así todas las propiedades de las mismas. Aislabie *et al.* (2001) y Marshall (1971) exponen que la materia orgánica es uno de los principales componentes del suelo que afectan la adsorción bacteriana. Sin embargo, en este trabajo se encontraron relaciones divergentes según el tipo de suelo (Figura 3.5a). La MO puede aumentar o disminuir la adsorción bacteriana dependiendo de la calidad de la misma, su solubilidad y el tamaño de fracción afectada. Gray *et al.* (1968) y Guber *et al.* (2005) encontraron que el CO tuvo una importancia mayor en aquellos suelos de textura arenosa. Si se analiza el comportamiento de la adsorción

bacteriana en relación al CO por su textura se evidencia un comportamiento positivo entre esta fracción orgánica y la adsorción en los sitios con mayor contenido de arenas (Natracualfes) y por el contrario la adsorción bacteriana disminuye al aumentar el CO en los sitios con menor contenido de arenas (Argiudoles) (datos no mostrados). En este último caso los compuestos orgánicos en la solución del suelo podrían afectar la asociación bacteriana a los minerales. Scholl y Harvey (1992) observaron un aumento en la adsorción bacteriana después de remover la materia orgánica disuelta del suelo. Los autores explicaron sus resultados a raíz de la competencia entre la MO disuelta y las bacterias. Por otro lado en los suelos con mayor contenido de arenas, dicha fracción orgánica podría actuar aumentando los sitios de adsorción.

Otra variable muy citada en los ensayos microbiológicos y que representa al ambiente de adsorción es la fuerza iónica (FI). Numerosos autores han reconocido que un aumento de la concentración de electrolitos incrementó la asociación bacteriana a los sólidos. (Fontes *et al.* 1991; Marshall 1980; Mills *et al.* 1994, Sharma *et al.* 1985). En este sentido, Huub *et al.* (1995) utilizaron en sus trabajos ocho cepas bacterianas en varios medios líquidos con fuerzas iónicas que variaron entre 0,0001 y 1 M. mientras que en otro estudio de adsorción en columnas Stevik *et al.* (1999) aplicaron como medio líquido agua destilada y dos soluciones de molaridad 0,00725 y 0.097. En ambos trabajos la adsorción bacteriana fue mejorada con el incremento de la fuerza iónica. Esta mejoría está alineada con la teoría DVLO similar a lo discutido con anterioridad. En el presente trabajo se encontraron tendencias negativas de esta propiedad relacionada a la adsorción. No obstante debe considerarse que esta variable tiene en cuenta al Na, catión presente en numerosas muestras, el cual aumenta la fuerza iónica pero a su vez dispersa los agregados.

3.7.4 Implicaciones agronómicas; erosión y contaminación.

La cantidad y calidad de los sedimentos generados por una cuenca, y por ende su poder contaminante, dependen entre otros de la magnitud y tipo de proceso erosivo, de la geomorfología, génesis e historia de uso de los suelos de la cuenca de origen. Por lo tanto no resulta sencillo predecir las propiedades de dichos sedimentos y su poder contaminante. Aquellas cuencas que poseen pendientes de longitud moderada y escaso gradiente, como la del presente estudio, sufren principalmente procesos de erosión de tipo laminar. Este es un rasgo común en la Pampa Ondulada. Dicho proceso se caracteriza por generar sedimentos “finos” enriquecidos en materia orgánica y arcillas de considerable capacidad de intercambio catiónico. Entonces, los sedimentos generados por erosión laminar en la Pampa Ondulada tendrían un elevado poder de adsorber y transportar pendiente abajo, diversos contaminantes químicos y/o biológicos tales como pesticidas y bacterias y virus, que están asociados a la actividad humana. (Chagas 2007). Es por ello que resulta destacable que haya sido la CIC la propiedad que mejor explicó la adsorción microbiana tanto en Argiudoles como en Natracualfes.

3.7.5 Predicción de la adsorción bacteriana

El modelo de predicción de la adsorción bacteriana confeccionada a partir de la regresión múltiple resultó consistente e integra los principales componentes y comportamientos descritos por el análisis de componentes principales. Tanto el contenido de arenas, el PSI como la CIC fueron variables importantes en el componente principal y también en la regresión múltiple, por ende, es factible que estas variables sean robustas para los dos tipos de suelo, es decir Argiudoles y Natracualfes. Dichos estimadores, además del contenido de arcillas, parámetro que presentó una alta

correlación con la adsorción bacteriana, son parámetros de relativa fácil medición, integran la mayoría de las descripciones de suelos y son relativamente estables en el tiempo. Modelos de simulación de procesos hidrológicos como el SWAT (Soil and Water Assessment Tool; Arnold *et al*, 1998) requieren la incorporación de valores de adsorción y $K_{bacterianos}$ en la modelización del transporte bacteriano. Al ser un modelo altamente exigente en cuanto a la cantidad de parámetros a utilizar, fácilmente se podría estimar la adsorción bacteriana mediante estas variables de regresión.

3.8 CONCLUSIÓN

De acuerdo a lo evaluado, existió una diferencia sensible en la potencialidad de adsorción y por ende su capacidad de contaminación entre los suelos Argiudoles y Natracualfes. En los Argiudoles, debido a su mayor posibilidad de adsorber bacterias tanto en suelos como sedimentos, podría producirse un aumento en la supervivencia bacteriana transformándose así en sitios reservorios de contaminantes biológicos. Por otro lado, en los suelos Natracualfes, la baja capacidad de adsorción de los suelos se traduciría en rápidos desplazamientos bacterianos en conjunto con el escurrimiento generando elevadas cargas instantáneas en los cursos de agua aledaños. Además los sedimentos generados en ambos suelos se enriquecen en arcillas las cuales potencian la adsorción bacteriana.

En relación a la *hipótesis 1.1* se corroboró que los suelos de la cuenca del arroyo del Tala poseen una alta heterogeneidad en la capacidad de adsorción bacteriana (25% a 73.3%) lo cual permitió separar ambientes con capacidades de adsorción diferentes, encontrándose en los Argiudoles una adsorción bacteriana significativamente mayor que en los Natracualfes. La *hipótesis 1.2* fue rechazada parcialmente. El Sistema estudiado, representado por el CPI demostró que las principales propiedades que explicaron la variación de la adsorción en ambos suelos son las mismas, aunque algunas propiedades como el CO o la Rel. Ca-sol presentaron comportamientos diferentes según el tipo de suelo evaluado. La *hipótesis 1.3* enunciaba que existe una alta correlación entre la textura (contenido de arcillas y arenas) y la adsorción bacteriana. Si bien se encontró dicha correlación la principal propiedad individual fue la CIC.

Por lo tanto para la cuenca evaluada se corrobora la importancia de aquellas propiedades como la textura, CIC y PSI como instrumentos para diferenciar ambientes de adsorción, aún en ambientes muy heterogéneos como los evaluados. Para poder ratificar el valor predictivo de estas propiedades sería de gran utilidad evaluar dichas variables en ambientes con diferentes texturas y mineralogía, ya que los suelos arenosos no integraron el conjunto de datos y la mineralogía resultó relativamente homogénea en los horizontes superficiales de los suelos evaluados.

Capítulo IV

Adsorción y Afinidad de *E. coli* a diferentes tamaños de agregados edáficos

4.1 INTRODUCCIÓN

Los sedimentos producidos por la erosión hídrica constituyen la principal fuente de contaminación de origen agropecuario de los cuerpos de agua superficiales, siendo el escurrimiento su vehículo de transporte. Dependiendo del grado de contaminación química y biológica que ellos posean, la calidad de las aguas puede disminuir considerablemente (Chagas 2007). La concentración de microorganismos en los sedimentos está regulada por el grado de asociación y la supervivencia de los mismos en las partículas sólidas (Guan *et al.* 2003; Chagas 2007; Ling *et al.* 2002) y las características intrínsecas del propio sedimento (Burton *et al.* 1987). La cuantificación de estos factores es clave para la modelización del proceso de contaminación biológica.

Cuando se producen lluvias intensas sobre suelos con alta concentración de microorganismos en su horizonte superficial, se pueden generar escurrimientos desde las tierras más altas hacia las más bajas aportando una elevada cantidad de microorganismos a los cursos de agua (Oliver *et al.* 2005b; Signor *et al.* 2005). Las partículas de arcillas, limos y arenas también llegan a los cursos de agua, disminuyendo su calidad (Chagas 2007). Sin embargo, es poco claro si los microorganismos y las partículas del suelo son movilizados independientemente, o si estas últimas actúan como vehículo de transporte para los microorganismos (Kay *et al.* 2007; Jamieson *et al.* 2005; Tyrrel y Quinton 2003). Si las partículas están asociadas, por ejemplo, a las bacterias, éstas pueden sufrir procesos de sedimentación que dependen de las propiedades del sólido al que están vinculadas, tales como densidad y tamaño de partícula (Schillinger y Gannon 1985). Así, para comprender la dinámica de transporte bacteriano, no solamente es importante conocer la cantidad de sedimento producido,

sino también su distribución de tamaño de partículas (Sutherland 1991). La importancia de la asociación entre bacterias y partículas del suelo está dada también por el impacto sobre la supervivencia de dichos microorganismos en el medio líquido. Algunos trabajos destacan que ciertos patógenos pueden sobrevivir más tiempo en el agua superficial cuando los mismos se encuentran asociados a sedimentos suspendidos o depositados en el fondo de los cursos de agua (Sherer *et al.* 1992; Edwards *et al.* 1997).

Algunos estudios han encontrado cantidades importantes de patógenos asociados a los sedimentos (Chagas 2010), pero es incierto aún el conocimiento de la distribución de los microorganismos según los tamaños de partículas. Schillinger y Gannon (1985) reportaron que alrededor de 15-20% de las bacterias coliformes fecales presentes en agua de tormenta estaban adsorbidas a agregados grandes, la mayoría con diámetros $> 30 \mu\text{m}$. Por el contrario, Muirhead *et al.* (2005) destacan que, en ensayos a campo, las bacterias estaban predominantemente asociadas a partículas pequeñas, sin embargo, es posible que aquellas asociadas a partículas grandes hayan sido rápidamente removidas dejando en la corriente de agua las libres o asociadas a pequeñas partículas. Oliver *et al.* (2007), reportaron la existencia de una asociación preferencial de bacterias proveniente de la materia fecal (e.g. *Escherichia coli*) a diferentes tamaños de agregados edáficos. En el mismo trabajo, en suelos franco arcillosos, encontraron que el 35 % de las células de *E. coli* estaba asociado a agregados $>2 \mu\text{m}$. De este 35 %, la mayoría estaban vinculada a fracciones de diámetro entre 4 y 15 μm . Conocer la capacidad de adsorción y afinidad bacteriana es de gran valor para el desarrollo e implementación de estrategias de mitigación de la contaminación tales como, el control de la generación de sedimentos o su posterior captura en franjas de filtrado.

La adsorción y afinidad microbiana a las partículas del suelo está influenciada por un amplio número de factores, incluyendo la atracción electrostática (Marshall 1975), la hidrofobicidad célula-superficie (Strenstrom 1989), el tipo de arcilla presente (Stotzky *et al.* 1985), el ambiente iónico de la mezcla agua-suelo y su interfase (Gannon *et al.* 1991). Este último en particular, puede modificarse en el transcurso de un evento de precipitación. Las características del medio líquido presente en precipitaciones directas sobre los suelos y bacterias en agua de escurrimiento, agua de cubetas o ríos, son heterogéneas estableciendo ambientes diversos en donde ocurrirá la asociación bacteriana. Fontes *et al.* (1991) estudiaron el movimiento bacteriano en columnas con suelos de textura y medios iónicos contrastantes. La retención bacteriana fue casi total en el suelo de textura fina con una alta fuerza iónica, mientras con suelo de textura gruesa y baja fuerza iónica la retención fue solamente del 10%. Sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan estos factores discriminados por tamaño de partículas o agregados edáficos. El estudio de la asociación bacteria-sedimento en situaciones más naturales permitirá avanzar en el conocimiento de la dinámica de transporte bacteriano.

Por otro lado, el tipo de célula biológica presente (e.g., tamaño, forma, presencia de polisacáridos) puede modificar el balance de las fuerzas electrostáticas y la fuerza de colisión, entre otros mecanismos, variando las resultantes de adsorción y afinidad. En este aspecto, existe muy poca información cuantitativa en cuanto al uso de distintas cepas asociadas al suelo y aún menos información de esta asociación por tamaños de agregados.

4.2 OBJETIVOS

El objetivo general del capítulo fue evaluar el efecto del medio líquido del ambiente de adsorción y el tipo de bacteria sobre la adsorción y afinidad bacteriana en distintos tamaños de agregados. Para ello, los objetivos específicos fueron cuantificar la adsorción y afinidad bacteriana en distintos tamaños de agregados de un suelo limoso en un medio de baja fuerza iónica (agua destilada) y otro de alta fuerza iónica (agua de cubetas), con dos cepas bacterianas (una de laboratorio y otra autóctona).

4.3 HIPÓTESIS

- **2.1.** Las variables distribución, adsorción y afinidad bacteriana resultan independientes del tamaño de agregados considerado.
- **2.2.** Los agregados de tamaño de limos finos (2-3 μm) poseen la mayor adsorción y afinidad bacteriana con respecto a las otras fracciones consideradas.
- **2.3.** Los medios líquidos y las diferentes cepas utilizadas afectan de forma significativa la distribución, adsorción y afinidad bacteriana en los distintos tamaños de agregados.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Descripción del suelo y agua bajo estudio

Para la realización del experimento en el laboratorio se recolectó suelo del tercio medio de la cuenca del arroyo del Tala en el departamento de San Pedro, provincia de Buenos Aires, Argentina (33°48'36,62''S, 59°54'54,28''O). Las muestras fueron recolectadas de un ambiente alto e inclinado, cuya pendiente oscila entre 1 y 2 %. Los suelos de estas áreas altas consisten en fases por erosión de Argiudoles vérticos y típicos (INTA 1973). El uso de la tierra corresponde principalmente a cultivos anuales extensivos y en menor medida a invernada de bovinos.

Para la caracterización del suelo se tomaron muestras compuestas de 0 – 50 mm de profundidad. El suelo presentó las características propias de una fase erosionada y luego sedimentada, enriquecida con carbono orgánico y arcillas (Tabla 4.1a). La mineralogía consistió en arcillas tipo 2:1, principalmente illitas, con una pequeña proporción de caolinita e interstratificados. Las muestras compuestas fueron tamizadas por 2 mm y secadas al aire para su posterior análisis. Se determinaron: pH (1:2,5 sólido:agua); carbono orgánico (CO) (Walkley y Black 1934); conductividad eléctrica en pasta de saturación (CE); cationes intercambiables (acetato de amonio 1N, pH 7); capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Klute 1986) y superficie específica (SE) (Lombardi *et al.* 2001). Se realizó un análisis de la distribución de tamaño de partículas por el método de la pipeta de Robinson (Soil Conservation Service 1972) (Tabla 4.1a).

Para los ensayos bacterianos de laboratorio se utilizaron diferentes medios líquidos. Se empleó agua destilada y de cubetas naturales para simular las diferentes concentraciones

iónicas que suceden durante las precipitaciones y escurrimiento respectivamente. El agua de las cubetas fue recolectada en un área aledaña a la del suelo utilizado. Tanto al agua destilada como a las de cubetas se les determinó el pH, cationes y aniones (en solución), conductividad eléctrica y fuerza iónica con las metodologías presentadas anteriormente (Tabla 4.1b).

Previo al inicio de los ensayos se esterilizó el suelo y agua en el Centro Atómico Ezeiza (CNEA). La esterilización se realizó aplicando el equivalente a 25 kGy de radiación ionizante, nivel que no provoca cambios en las estructuras de las partículas del suelo. De esta forma se evitó el uso de biocidas químicos, que podrían haber dejado restos nocivos para los microorganismos que se inocularon *a posteriori*. (Chagas 2007). La efectividad de esta técnica fue confirmada por trabajos anteriores (Kraemer *et al.* 2008).

Tabla 4.1. a) Propiedades físicas y químicas del suelo evaluado, siendo CO (carbono orgánico), CIC (capacidad de intercambio catiónico), SE (superficie específica) y CE (conductividad eléctrica). b) Características químicas del agua de cubeta y del agua destilada utilizadas en los ensayos biológicos.

a)

pH	CO (%)	CIC (cmol/Kg)	SE (m ² /g)	CE (dS m ⁻¹)	Cationes				Arcilla <2 μm	Limo 2- 50 μm (g kg ⁻¹)	Arena > 50 μm
					Na	K	Ca	Mg			
5,7	3,8	27,6	224	0,89	6	14	233	128	440	525	35

b)

Medio Líquido	Cationes					Aniones				Fuerza Iónica M
	pH	Na	K	Ca	Mg	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	
	(mg l ⁻¹)					(mg l ⁻¹)				
Agua cubetas	7,4	33,8	2,7	186	111,6	0	122	72,8	trazas	0,021
Agua destilada	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4.2 Ensayo de adsorción y afinidad bacteriana a los distintos tamaños de agregados.

4.4.2.1 Adsorción Bacteriana

El ensayo de adsorción bacteriana se basó en el protocolo propuesto por Oliver y Clegg (2007) (Figura 4.1) que consta de cuatro etapas a saber:

Preparación de las suspensiones

Se prepararon suspensiones de 1 g suelo y 10 ml de *agua destilada* estéril o 10 ml de *agua de la cubeta* también estéril. Las suspensiones se agitaron durante 15 h con un agitador *end-to-end* a 500 rpm. Dicha energía permitió obtener una distribución de agregados similar a la encontrada *in situ* luego del efecto de una lluvia representativa sobre la cuenca bajo estudio. Los valores de DTA (distribución de tamaño de agregados) obtenidos con este procedimiento fueron similares a aquellos encontrados en el capítulo V mediante simulaciones de lluvia con intensidades intermedias (60 mm h^{-1}).

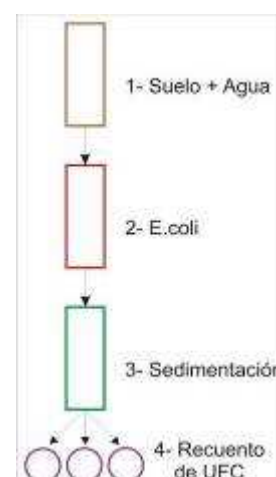


Figura 4.1. Etapas del ensayo de adsorción bacteriana por tamaño de agregados edáficos.

Inoculación

Luego de la agitación de las suspensiones de suelo se procedió a la inoculación de las mismas para lograr una concentración final de $1 \times 10^7 \text{ UFC ml}^{-1}$. Tanto a las suspensiones con agua destilada como con agua de cubetas se las inoculó con dos cepas de *E. coli*, una de laboratorio (ATCC 8739) y otra autóctona. La cepa autóctona fue aislada a partir de heces bovinas recogidas en el establecimiento donde se recolectaron

la muestra de suelo y agua. La cepa fue aislada e identificada con la utilización de medios selectivos diferenciales (CHROMAGARtm). La concentración de inóculo elegida fue utilizada por numerosos investigadores para representar una concentración máxima de microorganismos en escurrimientos sobre materia fecal (Guber *et al.* 2005; Oliver *et al.* 2007). Luego de la inoculación la solución fue llevada nuevamente al agitador por 2 h a 500 rpm con el propósito de lograr una óptima interrelación entre los microorganismos y el suelo. Se ha determinado que 2 h son suficientes para alcanzar el equilibrio entre los microorganismos en la suspensión y asociados a las fracciones de suelo (Ling *et al.* 2002; Gannon *et al.* 1991).

Sedimentación

Las suspensiones inoculadas se transfirieron a una probeta de 100 ml y se diluyeron con 50 ml de agua destilada estéril o agua de las cubetas estéril según correspondiera. La dilución facilita la separación de los distintos tamaños de agregados durante la sedimentación (Oliver *et al.*, 2007). Luego se procedió a separar las distintas fracciones de tamaño tomando alícuotas de 0,1 ml a 10 mm de profundidad en los tiempos establecidos de acuerdo a la ley de Stokes para los tamaños de 50, 20, 3 y 2 μm .

Recuento de UFC

Las alícuotas de los diferentes tamaños de agregados obtenidas por sedimentación fueron sembradas por triplicado en Agar VBR e incubadas en estufa a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 h. Finalmente, se procedió a hacer un recuento de las UFC ml^{-1} en todos los tratamientos. El experimento se condujo bajo condiciones de esterilidad y a una temperatura constante de 20 °C.

Los valores de UFC ml⁻¹ de cada tamaño de agregados, es decir la **distribución bacteriana** fueron obtenidos mediante la diferencia entre las UFC ml⁻¹ de la fracción considerada y la fracción siguiente de menor tamaño. Esta diferencia es atribuida a la sedimentación de la *E. coli* conjuntamente con los agregados de suelo. Los cambios en tamaño de las poblaciones de *E. coli* por el recrecimiento y muerte celular en las suspensiones durante la sedimentación fueron considerados insignificantes debido al muy breve tiempo de sedimentación (40 minutos).

La **adsorción bacteriana relativa** para cada tratamiento fue calculada a partir de la sumatoria de la proporción bacteriana de todas las fracciones en relación a la proporción bacteriana encontrada en la fracción <2 μm, en la que se considera que no existen bacterias adsorbidas. En esta fracción no se puede afirmar que las bacterias halladas estén adheridas ya que las mismas pueden encontrarse tanto adsorbidas como en forma de “células libres e independientes”. Por ello la adsorción bacteriana obtenida será relativa y no real ya que no se computa la adsorción que pudiera ocurrir en las partículas menores de 2 μm.

4.4.2.2 Afinidad Bacteriana

La afinidad bacteriana a los distintos tamaños de agregados se calculó como el cociente entre las UFC ml⁻¹ de cada fracción de tamaño y la superficie específica respectiva. Para estimar esta propiedad se consideró una densidad de partícula de 2,65 g cm³ y el radio de cada fracción se calculó a partir del punto medio del rango correspondiente.

Para simular la distribución del tamaño de agregados (DTA) y poder calcular la superficie específica a utilizarse en los cálculos de afinidad bacteriana, se llevaron las muestra de suelo (20 g) a un agitador (end-to-end) durante 15 h (por triplicado). La

energía utilizada en este procedimiento fue similar a la utilizada en la preparación de las suspensiones de suelo a inocular, siendo de esta forma comparables ambas metodologías. Este análisis fue efectuado por el método de la pipeta de Robinson con agua destilada. La DTA se agrupó en los mismos rangos de tamaño utilizados para el ensayo bacteriano (>50 μm , 50-20 μm , 20-3 μm , 3-2 μm y <2 μm)

Tabla 4.2. Cálculo de la superficie específica por tamaño de agregados para la muestra evaluada.

Diámetro partícula (μm)	Radio equivalente usado en cálculos (μm)	Masa total (g ml^{-1})	% de suelo	Volumen esférico de la partícula (cm^3)	Número de partículas en 1ml	Superficie esférica de una partícula (mm^2)	Superficie por tamaño de partícula en 1 ml (mm^2)
>50	37,5	0,198	19,8	$1,24 \times 10^{-7}$	$4,14 \times 10^3$	$1,77 \times 10^{-2}$	$7,32 \times 10^1$
50-20	17	0,128	12,85	$1,15 \times 10^{-8}$	$2,89 \times 10^4$	$3,63 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^2$
20 - 3	6	0,474	47,4	$5,08 \times 10^{-10}$	$2,42 \times 10^6$	$4,52 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^3$
3 -2	1,3	0,050	5	$5,17 \times 10^{-12}$	$2,51 \times 10^7$	$2,12 \times 10^{-5}$	$5,33 \times 10^2$
<2	-	-	14,95	-	-	-	-

4.5 Análisis estadísticos

Se evaluaron los efectos de los tratamientos sobre la Distribución bacteriana, la Adsorción y la Afinidad bacteriana utilizando modelos lineales generalizados en el programa *R* (<http://www.r-project.org/>). Estos modelos incluyeron tres factores: medio líquido (agua destilada vs. cubeta), tamaño del agregado (>50, 50-20, 20-3, 3-2 μm y sólo en el caso de distribución de bacterias, también la categoría <2 μm), tipo de bacteria (laboratorio vs. autóctona) y sus interacciones.

Los datos fueron modelados utilizando la función identidad como enlace, pero con diferentes distribuciones de error de acuerdo a la variable respuesta. La significancia fue evaluada a través del análisis de devianza (Crawley 2007). La distribución de bacterias y la adsorción bacteriana fueron modeladas utilizando una distribución normal, la afinidad bacteriana fue modelada utilizando una distribución de error gama.

4.6 RESULTADOS

El tamaño de agregado fue el tratamiento que más impacto tuvo sobre todas las variables biológicas medidas, teniendo el medio líquido o la cepa utilizada muy poca influencia sobre las mismas (Tabla 4.3). Se encontraron interacciones significativas entre el tamaño de agregados y el medio líquido sobre todas las variables.

Tabla 4.3. Análisis de devianza para los efectos de tamaño de agregado, medio líquido y tipo de bacteria sobre la Distribución, la Adsorción y la Afinidad bacterianas. Se presenta el estadístico F para cada término del modelo.

	Distribución de bacterias (%)	Adsorción bacteriana relativa (%)	Afinidad bacteriana (UFC mm ⁻²)
Tamaño de Agregado	46,7***	6,9**	53,4***
Medio Líquido	<0,1	<0,1	4,0*
Cepa Bacteriana	<0,1	<0,1	0,1
Tamaño de Agregado × Medio líquido	4,5**	3,9*	3,7*
Tamaño de Agregado × Cepa Bacteriana	1,4	2,4	2,4
Medio líquido × Cepa Bacteriana	<0,1	<0,1	<0,1
Tamaño de Agregado × Medio líquido x Cepa Bacteriana	2,0	3,1*	1,2

Los asteriscos ***; ** y * denotan efectos significativos al $P < 0,001$; $P < 0,01$ y al $P < 0,05$ respectivamente.

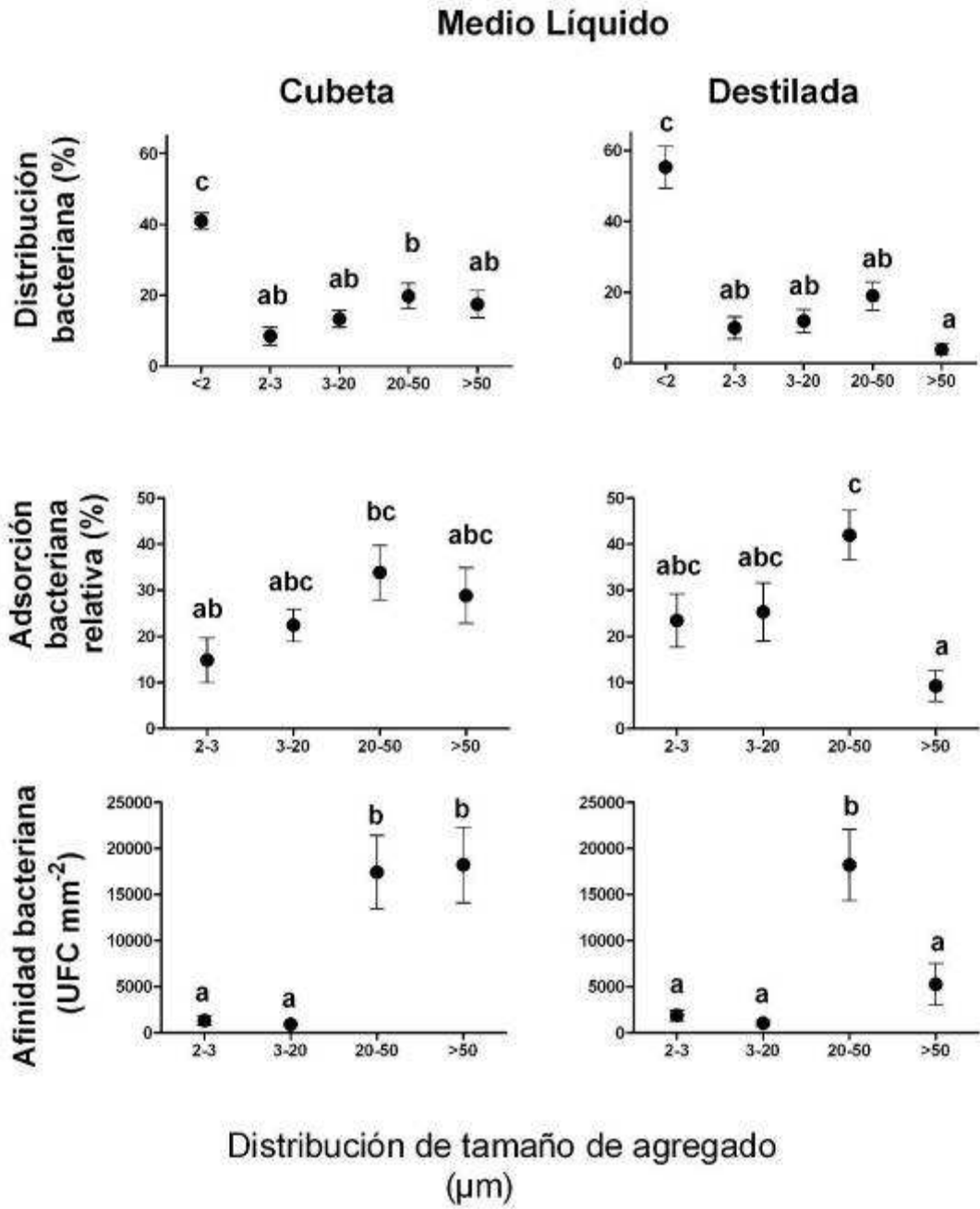


Figura 4.2. Distribución bacteriana, adsorción bacteriana relativa y afinidad bacteriana para diferentes tamaños de agregados y medios líquidos. Letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0,05$.

Distribución Bacteriana

La distribución bacteriana presentó diferencias de acuerdo a los diferentes tamaños de agregados pero no existió efecto marcado del medio líquido utilizado ni de las diferentes cepas utilizadas. Así, la fracción $<2 \mu\text{m}$ mostró mucha mayor proporción de bacterias que el resto de los tamaños de agregados, encontrándose un promedio de 48 % (ambas cepas y medio líquidos). En las fracciones de $20-3 \mu\text{m}$ y $3-2 \mu\text{m}$ se encontró una baja proporción de bacterias, no encontrándose diferencias significativas entre ambos medios líquidos ($P < 0,05$), con promedios de 12,62% y 9,23% respectivamente. La fracción $50 - 20 \mu\text{m}$ presentó una proporción bacteriana de 19.36 % promedio de todos los tratamientos. La única fracción de tamaño cuya distribución de bacterias se diferenció significativamente entre los líquidos utilizados, fue la mayor de $50 \mu\text{m}$, correspondiéndoles 3,8% para el tratamiento con agua destilada y 13,3 % para el agua de la cubeta

Adsorción bacteriana relativa

En las fracciones de tamaños de agregados $>2 \mu\text{m}$, (donde no hay bacterias libres), la fracción $50-20 \mu\text{m}$ fue la que presentó la mayor adsorción bacteriana promedio para ambos medios líquidos de 37,9% (Figura 4.2). El resto de las fracciones presentaron valores de adsorción más bajos con porcentajes promedio para ambos medios líquidos de 19,2 y 23,9% para las fracciones $3-2 \mu\text{m}$ y $20-3 \mu\text{m}$ respectivamente. La fracción $>50 \mu\text{m}$ mostró un promedio de 19% de adsorción microbiana. En esta fracción se observó un valor de adsorción de 28,8% para el tratamiento con agua de la cubeta mientras que la fracción $>50 \mu\text{m}$ con agua destilada presentó el menor valor de adsorción para todas las fracciones y medios líquidos (9,24%).

Como tendencia general, a partir de la adsorción total de cada tratamiento (sumatoria del porcentaje de todas las fracciones de bacterias asociadas a partículas $>2 \mu\text{m}$) se encontraron valores de adsorción bacteriana relativa para la bacteria de laboratorio de 40,5% y 41,0% para los tratamientos agua destilada y agua de cubeta respectivamente, mientras que para la bacteria autóctona la adsorción microbiana fue de 49,3 % para el tratamiento agua destilada y 56.6% para el tratamiento agua de cubeta. Aunque como se mencionó con anterioridad, no fue significativo el efecto de las cepas bacterianas, dichas cepas mostraron una tendencia de adsorción bacteriana con una diferencia promedio a favor de la cepa autóctona de 23%, presentando diferencias en relación al medio líquido de 17,7 y 27,5% para los tratamientos agua destilada y cubeta respectivamente. Es decir que los mayores valores de adsorción bacteriana se encontraron en los tratamientos con agua de la cubeta y bacteria autóctona y los menores en los tratamientos con agua destilada y bacteria de laboratorio.

Afinidad Bacteriana

Como se observa en la Figura 4.3, la adsorción bacteriana no muestra igual tendencia que la distribución del tamaño de agregados. Mientras que el mayor porcentaje de agregados se presenta en la fracción 20 a $3 \mu\text{m}$, para las fracciones $> 2 \mu\text{m}$, la mayor cantidad de bacterias adsorbidas se encuentra en la fracción 50 a $20 \mu\text{m}$ (limos gruesos).

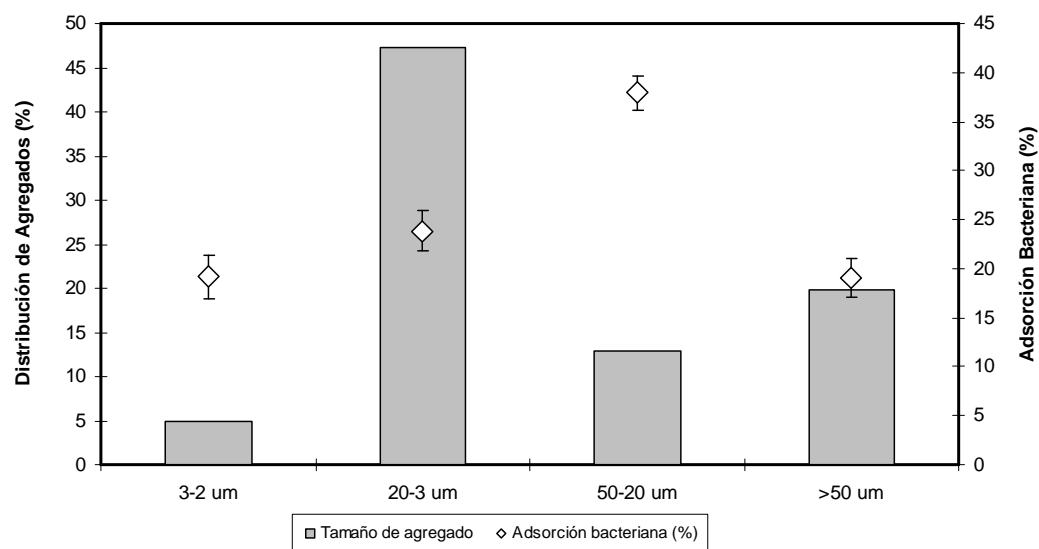


Figura 4.3. Distribución de tamaño de agregados en porcentaje (barras grises) y adsorción bacteriana en concentración de *E. coli* (UFC ml⁻¹) promedio para ambos medios líquidos (rombos blancos).

Al normalizar las concentraciones de microorganismos por la superficie específica de cada tamaño de agregados (afinidad microbiana), se observaron diferencias significativas de esta variable en relación al tamaño de agregados (Tabla 4.3). A su vez se observó una interacción significativa entre el tamaño de agregados y el medio líquido pero no así con las cepas utilizadas. Como se observa en la Figura 4.2, los mayores valores de afinidad bacteriana se encontraron en el tamaño 50 a 20 μm , independientemente del medio líquido considerado. Las fracciones 20-3 y 3-2 μm presentaron una afinidad muy baja, también sin evidenciar diferencias entre los dos tratamientos de agua destilada y de cubeta. Por último, la fracción >50 μm presentó una afinidad diferente entre tratamientos. La misma resultó alta para el tratamiento con agua de cubeta pero se redujo significativamente en el tratamiento con agua destilada.

4.7 DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que el tamaño de agregados y el medio líquido utilizado tuvieron un importante impacto en la distribución de la proporción, adsorción y afinidad bacteriana al medio sólido. Esto resalta la importancia de incluir ambos factores en el estudio del transporte de contaminantes biológicos en medios líquidos.

4.7.1 Asociación bacteriana por tamaño de agregados

Considerando todos los tratamientos, se obtuvo una adsorción bacteriana promedio del 52%, asociada a agregados $>2 \mu\text{m}$. Estos valores son altos comparados con los hallados por otros autores. Oliver *et al.*, (2007) observaron un 35% de asociación bacteriana en suelos similares, mientras que Characklis *et al.* (2005) utilizando técnicas de centrifugación, encontraron una adsorción entre el 20 al 35% de *E. coli* que estuvo asociada con partículas sedimentables. Ling *et al.* (2002) encontraron, en suelos limosos, adsorciones de hasta 99%, utilizando suspensiones agua/suelo significativamente menos diluídas. En el capítulo III utilizando la metodología de Ling *et al.* (2002) y las mismas muestras de suelo que en el presente trabajo, se midió 63,8% de adsorción bacteriana. Por ello, es posible que la adsorción real haya sido subestimada debido a aquellas asociaciones bacterianas a agregados $<2 \mu\text{m}$, no tenidas en cuenta en por la metodología empleada en el presente capítulo. Con respecto a esta fracción de tamaño de arcillas y su influencia sobre la contaminación hídrica caben dos reflexiones: Por un lado no habría diferencias en el comportamiento hidrológico entre aquellos microorganismos libres y los que están absorbidos a partículas tan pequeñas. Sin embargo estas últimas presentarían mayor supervivencia en el agua que las primeras.

Por lo expuesto no debería subestimarse la incidencia de esta fracción de sólidos en la el proceso de contaminación biológica del agua.

En las fracciones $> 2 \mu\text{m}$ el rango de tamaños que contó con la mayor proporción bacteriana fue el tamaño de limo grueso (50-20 μm). Esto no coincide con Oliver *et al.* (2007) quienes empleando la misma metodología, observaron la mayor proporción en el rango de 15–4 μm (seguido por la de 30–16 μm) ni con Auer y Niehaus (1993) que encontraron una asociación de más del 90% entre coliformes fecales y partículas en el rango de 0,4 a 10 μm . Borst y Selvakumer (2003) por su parte, no encontraron ninguna relación entre coliformes y estreptococos fecales y el tamaño de partículas.

Considerando el rango de tamaño de agregados de 2-50 μm (limo total), el suelo tuvo una adsorción relativa de 79,5% y de 11,2% para la fracción arena mientras que como se mencionó con anterioridad no se tomó en cuenta el cálculo de la fracción asociada al tamaño de arcillas. Valores muy similares fueron encontrados por Jeng *et al.* (2005) donde en ensayos con *E. coli* en escurridos de tormenta encontraron que aproximadamente 80%, 18% y 2% estuvieron asociados con los agregados de tamaño de limos, arcillas y arenas respectivamente. Cabe destacar que en el capítulo V se mencionan resultados provenientes de un ensayo de simulación de lluvias empleando la misma cepa y el mismo suelo del presente capítulo. Allí se vio que el 98% de los microorganismos estaban asociados a agregados del tamaño de limos y tan solo 2% a las arenas.

4.7.2 Medio líquido y cepa bacteriana

Se ha demostrado que la utilización del agua de las cubetas indujo mayor adsorción que el agua destilada. Esta tendencia podría explicarse por la mayor fuerza iónica del agua de la cubeta, principalmente dada por la mayor concentración de cationes divalentes como el Ca^{+2} (Tabla 4.1b). Numerosos autores han reconocido que un aumento de la concentración de electrolitos provoca incrementos de la asociación bacteriana a los sólidos. (Huub *et al.* (1996) utilizando ocho cepas bacterianas en medios líquidos con fuerzas iónicas entre 0.0001 y 1 M y Stevik *et al.* (1999) con agua destilada y dos soluciones de 0.00725 y 0.097 M concluyeron que la adsorción bacteriana aumentaba con el incremento de la fuerza iónica. En relación al catión presente, Kraemer *et al.* (2008), encontraron que la concentración de calcio fue el parámetro químico del agua que mejor explicó la adsorción de la *E. coli* en medios acuosos. Powelson *et al.* (2001), en estudios de transporte bacteriano, encontraron resultados similares, donde la inclusión de una solución dominada por el Ca^{+2} produjo un menor transporte de microorganismos en el agua indicando un aumento en la adsorción a la fracción sólida. Tanto la fuerza iónica de la solución como el tipo de catión dominante influyen en el balance de cargas electrostáticas que explicaría la adsorción de tipo reversible del microorganismo al sólido. De acuerdo con la teoría DVLO (Derjaguin y Landau 1941; Verwey y Overbeek 1948), la fuerza iónica del líquido afectará el grosor de la doble capa y por consiguiente el balance de cargas y la capacidad de adsorción de los microorganismos a las partículas. La fuerza iónica del líquido afecta más al balance de cargas en agregados pequeños donde hay mayor proporción de coloides. Pese a ello, fue en el tamaño $>50 \mu\text{m}$ en el que observamos un mayor impacto del agua de la cubeta, en el aumento de la proporción bacteriana. Inversamente, encontramos una mayor proporción de bacterias en la fracción $< 2 \mu\text{m}$ para el tratamiento de agua destilada con

respecto al agua de la cubeta. Esta diferencia podría ser consecuencia de la mayor fuerza iónica y de la presencia del Ca^{+2} en el agua de la cubeta aumentando la adsorción a los agregados $>2 \mu\text{m}$ mientras que el aumento de la proporción bacteriana en la fracción $<2 \mu\text{m}$ del tratamiento con agua destilada podría deberse a un aumento de microorganismos no asociados a los agregados.

También, es posible que el agua destilada provoque una mayor dispersión del suelo que el agua de las cubetas y por ello existiría una menor concentración de agregados en la fracción $>50 \mu\text{m}$ que la calculada, y por ende una menor cantidad de bacterias. Para contrastar esa hipótesis se analizaron los iones presentes en el líquido del agua de la cubeta. Así, se encontró una concentración importante de calcio pero también de bicarbonatos que harían precipitar este catión (Tabla 4.1b). Teniendo en cuenta que la concentración sodio y el RAS (Relación de Adsorción de Sodio) no son despreciables, el mantenimiento de la agregación del suelo por parte del agua de la cubeta también es limitada comportándose de forma similar al agua destilada.

En relación al comportamiento entre las dos cepas utilizadas no existieron efectos significativos de la cepa utilizada sobre ninguna variable. Sin embargo, la cepa autóctona tendió a presentar valores más altos de adsorción bacteriana (aumento de 23% como promedio de los tratamientos). Kraemer *et al.* (2009) sobre 5 suelos limosos y arcillo-limosos, utilizando la misma cepa autóctona, encontraron también una adsorción a los sólidos superior respecto de la bacteria de laboratorio en todos los casos con un aumento promedio del 27,6 % prácticamente igual al porcentaje encontrado con el uso del agua de cubeta. Diferencias más marcadas han sido reportados por Muirhead *et al.*

(2004) donde en estudios de laboratorio la cepa autóctona presentó una adsorción del 81%, mientras que la cepa de laboratorio mostró una adsorción de tan sólo 24%.

4.7.3 Afinidad Bacteriana

Las diferencias químicas, físicas y estructurales de cada fracción podrían ser la causa de las distintas afinidades bacterianas en cada uno de los rangos de tamaño de agregados. La alta afinidad bacteriana encontrada en el tamaño de agregados de 50 a 20 μm están en concordancia con los resultados de Oliver *et al.* (2007) que utilizando la misma metodología, encontraron que su máximo valor correspondía a la fracción de 30-16 μm (prácticamente incluida entre 50 y 20 μm). Esta afinidad explicaría la mayor concentración bacteriana encontrada en esta fracción aún cuando no fuera la de mayor proporción relativa en peso. Palmateer *et al.* (1993) citado por Oliver *et al.* (2007) que también normalizó sus datos mediante la superficie específica, encontraron en sedimentos suspendidos provenientes de drenajes agrícolas una alta colonización de bacterias fecales con una concentración de 6.5×10^5 UFC mm^{-2} . Dicho valor se situó apenas por encima del promedio general correspondiente al presente trabajo: 1.78×10^4 UFC mm^{-2} .

La gran afinidad bacteriana correspondiente a los limos gruesos podría explicarse por el importante porcentaje de minerales porosos y poco densos que existe en la región en la que se tomaron las muestras (Cosentino & Pecorari 2002). Dichos minerales de tamaño de limos podrían poseer propiedades físicas químicas y estructurales que favorecerían la asociación microbiana. Además, Morrás *et al.* (1995) trabajando con suelos de la misma región, mostraron que las partículas del tamaño del limo poseen fenómenos electrostáticos evidenciados por la existencia de sitios de intercambio iónico.

Para avanzar en el conocimiento de las causas de la existencia de diferentes afinidades debería realizarse el análisis químico y físico de cada fracción de tamaño por separado para así aislar los factores intervinientes y mejorar el entendimiento de los procesos que controlan la afinidad bacteriana.

4.7.4 Implicancias para el control de la contaminación hídrica

La distribución de tamaño de partículas presentada por el suelo analizado en conjunto con la alta afinidad bacteriana encontrada en el tamaño de limos, preferencialmente limos gruesos, configura un riesgo potencial de este tipo de partículas en la dinámica de transporte bacteriana. Esto corrobora la hipótesis expuesta por Chagas (2007) que enunciaba que los sedimentos generados por erosión laminar en la Pampa Ondulada tendrían un elevado poder de adsorber y transportar pendiente abajo, diversos contaminantes químicos y/o biológicos tales como pesticidas y bacterias y virus.

Ha sido calculado que las bacterias necesitan estar asociadas a partículas de suelo >63 μm de diámetro para poder sedimentar en el escurrimiento y deberían estar asociados a agregados >500 μm para poder ser filtrado por la pastura. (Muirhead *et al.* 2006). Los datos aquí presentados sugieren una baja efectividad de las franjas de filtrado. Por otro lado, el área bajo estudio posee gradientes muy bajos del orden de 0.5% y longitudes de pendientes muy largas (alrededor de 1000 m) donde existe una mayor posibilidad de producirse sedimentaciones selectivas y donde la vegetación pueda actuar como filtro. Así Coyne *et al.* (1995) encontraron que las franjas de filtrado redujeron el 99% de los sedimentos con una tasa de remoción bacteriana de 74 y 34% en distintas pendientes indicando que cada situación debería ser analizada específicamente, separando el efecto de las franjas de filtrado en la relación infiltración/escurrimiento y las características particulares de cada situación como pendiente, tipo de suelo, tipo de vegetación

utilizada entre otros. Por otro lado se ha verificado que existe una importante asociación bacteriana a partículas mayores a $2\ \mu\text{m}$ que pueden no ser controlada mediante franjas de filtrado aunque si pueden promover un aumento en la supervivencia bacteriana (Sherer *et al.* 1999; Jamieson *et al.* 2004). Diversos programas computacionales como el SWAT (Soil and Water Assesment Tool) simulan el transporte bacteriano de acuerdo a la adsorción microbiana (en relación al coeficiente de partición suelo/agua) y a la supervivencia (modificando la tasa de mortalidad). Una masa crítica de ensayos orientados a la adsorción bacteriana a distintos tamaños edáficos podría producir un importante ajuste en dichos modelos, mejorando la dinámica bacteriana en el ambiente. El uso de diferentes relaciones agua/suelo y calidades de suelos es necesario para la corroboración de los resultados presentados, En trabajos realizados a campo por el mismo grupo de investigación se ha encontrado diferencias en la concentración y afinidad bacteriana según el tipo de suelo (datos no presentados). El estudio de la adsorción preferencial a los distintos tamaños de partículas debería tener en cuenta las interacciones que podría producir el medio líquido en suelos contrastantes.

4.8 CONCLUSIÓN

A través del desarrollo del capítulo se observó que suelo evaluado presentó una distribución, adsorción y afinidad diferente para cada tamaño de agregado rechazando de esta forma la **hipótesis 2.1**. El tamaño de agregados $<2\ \mu\text{m}$ mostró una proporción de bacterias superior que el resto de los tamaños de agregados, encontrándose un promedio de 48 %. En las fracciones de tamaños de agregados $>2\ \mu\text{m}$, (donde no hay bacterias libres), la fracción $50\text{--}20\ \mu\text{m}$ (limo grueso) fue la que presentó mayor adsorción de bacterias promedio para ambos medios líquidos de 37,9%. Por otro lado,

los mayores valores de afinidad bacteriana se encontraron en el tamaño 50 a 20 μm (limo grueso), independientemente del medio líquido considerado. Por ello, la **hipótesis 2.2** que el tamaño limo fino poseería la mayor adsorción y afinidad bacteriana se rechaza. De la misma forma los medios líquidos evaluados modificaron de forma significativa en menor o mayor grado las tres variables estudiadas (distribución, adsorción y afinidad bacteriana). Sin embargo las cepas bacterianas utilizadas sólo evidenciaron algunas tendencias en la modificación de estas variables (**hipótesis 2.3**).

Capítulo V

Adsorción y Coeficiente de Partición de *E. coli* en suelos contrastantes de la Pampa Ondulada bajo lluvia simulada.

5.1 INTRODUCCIÓN

La actividad agropecuaria constituye una importante fuente de contaminación de las aguas ya que aporta cantidades importantes de sedimentos a través de erosión hídrica, además de nutrientes, plaguicidas y agentes patógenos (Ongley 1997; Coote y Gregorich 2000). En este sentido las aguas superficiales pueden funcionar como factores de transmisión de enfermedades y así la salud humana puede verse comprometida como resultado del uso de aguas contaminadas como fuente de agua potable, recreacional, riego, entre otras. Para la USEPA (1996), la actividad agrícola continúa siendo reconocida como la principal responsable de la falta de cumplimiento de los estándares de calidad de agua basado en microorganismos indicadores de contaminación biológica.

La contaminación del agua superficial por la actividad agropecuaria depende en gran parte de las características climáticas, geomorfológicas, edáficas y de uso de la tierra de las cuencas en las que se realizan dichas actividades, siendo el escurrimiento superficial el eje que permite articular entre sí todas estas variables (Santanatoglia *et al.* 2006). En este sentido Stainer *et al.* (1979) demostraron que el escurrimiento superficial es la ruta principal por la cual los contaminantes fecales de origen agropecuario llegan a los cursos de agua. Algunos estudios han demostrado que los escurrimientos generados por lluvias en áreas ganaderas y de otras explotaciones animales, pueden producir importantes transferencias de microorganismos indicadores de contaminación fecal a las aguas superficiales (Rodgers *et al.* 2003; Signor *et al.* 2005; Chagas *et al.* 2007; Piazza 2006). Por ejemplo, resulta necesario cuantificar la eficiencia del escurrimiento en

relación al lavado o retención bacteriana de los pasturas manejadas bajo pastoreo directo (Nagels *et al.* 2002) y los suelos correspondientes hacia los cuerpos de agua. Es importante conocer los factores que afectan dicha eficiencia de retención bacteriana, habida cuenta que existen a la fecha escasos estudios que abordan esta temática (Jamieson *et al.* 2004). No obstante se suelen señalar como tales al escurrimiento superficial, la duración e intensidad de las lluvias, el origen del contaminante y el grado de adsorción de los contaminantes a las partículas del suelo, entre otros (Walker *et al.* 1990).

Jamieson *et al.* (2004) resaltan la necesidad de investigar la relación entre las tasas y volúmenes de escurrimiento e infiltración y el transporte de sedimentos y bacterias. Según dichos autores, la cantidad de bacterias que ingresa al suelo durante un evento de escurrimiento estaría controlada por la velocidad de infiltración del suelo y el estatus de la vegetación. La partición bacteriana agua/suelo depende las tasas de infiltración las cuales tienden a ser muy variables y por ello difíciles de modelizar (Gómez *et al.* 2001). Una vez que las bacterias alcanzan los horizontes subsuperficiales se consideran fuera del sistema de análisis (Moore *et al.* 1983). No obstante, en ambientes kársticos, en suelos drenados artificialmente y en otras situaciones, el transporte subsuperficial adquiere una marcada relevancia (Gerba y Bitton 1984; Corapcioglu y Haridas 1984). Estudios realizados en la Pampa Ondulada (Argentina) demuestran que el escurrimiento superficial es una de las variables más importantes en la regulación de la dinámica hídrica y erosiva regional asociada a lluvias intensas, pendientes suaves y suelos de lenta permeabilidad (Chagas 2007). En esta región es de esperar que la dinámica del transporte superficial de sedimentos y de contaminantes biológicos esté controlada tanto

por los parámetros de escurrimiento e infiltración como por las propiedades físicas y químicas de los suelos.

Todavía no está claro si las bacterias y los sedimentos son transportados de forma interdependiente en los cursos de agua en general aunque cada vez más trabajos así lo confirman (Oliver *et al.* 2007; Vinten *et al.* 2004). Esta asociación dificulta la predicción de la supervivencia y transporte bacterianos en el escurrimiento al establecerse numerosas y complejas interacciones entre las partículas abióticas y las entidades biológicas movilizadas (Jamieson *et al.* 2004). De la misma forma Ling *et al.* (2002) resaltan la complejidad de la dinámica de adsorción bacteriana a los suelos. Tanto el tipo de suelo como las características del sedimento pueden afectar la transferencia microbiana debido a las diferencias en las propiedades de adsorción relacionadas con el material coloidal edáfico (Schijven *et al.* 2002). Esta adsorción está regulada por numerosos factores tales como: la atracción electrostática (Marshall 1975) donde el pH, contenido y tipo de arcillas juegan un importante rol; el ambiente iónico de la mezcla suelo/agua y de la interfase (Gannon *et al.*, 1991), regulado también por el pH y la concentración relativa de cationes y aniones entre otros. Las variables que comúnmente describen esta adsorción son el porcentaje de adsorción y el coeficiente de distribución (K_d) (Ling *et al.* 2002).

Las bacterias asociadas a partículas, una vez que son movilizadas por el escurrimiento, pueden sufrir sucesivos procesos de sedimentación y retransporte que dependen, además de las propiedades mencionadas, de la densidad y tamaño de las partículas transportadas (Schillinger y Gannon 1985). Por ello para predecir la dinámica del movimiento superficial bacteriano no solamente es importante el estudio de las variables

hidrológicas y biológicas sino que también deberían conocerse la cantidad, calidad y tamaño de los sedimentos movilizados. Esto es importante al momento de implementar prácticas de manejo que reduzcan la erosión hídrica y la contaminación biológica tales como franjas de filtrado u otras (Sutherland 1991; Vinten *et al.* 2004).

La aplicabilidad de los valores de adsorción y K_d microbianos obtenidos en ensayos realizados en laboratorio para ser empleados en trabajos de campo todavía es incierta (Oliver *et al.* 2007). Esto es consecuencia de la escasa información que existe sobre el transporte de microorganismos en condiciones naturales. En ensayos a campo, Abu-Ashour y Lee (2000) distribuyeron sobre pequeñas parcelas, una cepa de *E. coli* resistente al ácido nalidíxico para monitorear su movimiento. Los autores no pudieron identificar si el trazador se movía como un coloide libre o si era transportado asociado a partículas erosionadas. También se reportaron resultados de simulación de lluvias con estiércol aplicado en la parte superficial de parcelas con y sin vegetación con 20 % de gradiente. Alrededor de 20% de las bacterias movilizadas en las parcelas descubiertas, fueron encontradas en sólidos suspendidos mientras que en las parcelas vegetadas dichos valores fueron despreciables (Roodsari *et al.* 2005). En Argentina se evaluaron la dinámica de infiltración y producción de sedimentos en dos suelos Natracualfes cubiertos parcialmente con heces frescas y en un suelo de feedlot, y se corroboraron relaciones estrechas entre la concentración de microorganismos y la producción de sedimentos (Piazza 2006; Chagas *et al.* 2007).

5.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo fue evaluar la dinámica del transporte bacteriano en situaciones edáficas y de manejo contrastantes de la Pampa Ondulada a través del análisis del escurrimiento superficial. Para ello, los objetivos específicos fueron a) Evaluar dicha la retención bacteriana relacionada a las propiedades edáficas, biológicas e hidrológicas de los sitios bajo estudio, b) Comparar los valores de adsorción y K_d evaluados tanto a campo como en laboratorio y c) Analizar la salida de microorganismos del sistema según el tamaño de agregado resultante de las simulaciones de lluvia.

5.3 HIPOTESIS

- **3.1.** Existen diferencias en la retención bacteriana de los tres suelos estudiados, las cuales se explican principalmente a través de las variables biológicas (adsorción y K_d bacteriana).
- **3.2.** La adsorción y el coeficiente de distribución bacteriana de los tres suelos bajo estudio son análogos a los encontrados en el laboratorio.
- **3.3.** La afinidad de los microorganismos hacia los distintos tamaños de partículas obtenidos en las simulaciones de lluvias resultan equivalentes a las encontradas en la escala de laboratorio.

5.4 MATERIALES Y MÉTODOS

La retención bacteriana fue evaluada a través de ensayos de lluvia simulada aplicada sobre parcelas de escurrimiento en suelos previamente inoculados con *Escherichia coli*. Esta variable se calculó como la diferencia entre el inóculo aplicado y la salida total de bacterias medidas en el escurrido. Los resultados fueron analizados a través de tres grupos de variables correspondientes a cada uno de los sitios estudiados: a) variables edáficas, b) variables hidrológicas comprendidas por la relación infiltración/escurrimiento y la tasa de infiltración final y por último, c) variables biológicas integradas por la adsorción y el Kd bacterianos. Estas últimas fueron medidas tanto en el escurrido de las simulaciones de lluvia (a campo) como en laboratorio. Para caracterizar más detalladamente el propio escurrido, se midieron algunas propiedades físicas y químicas del mismo; entre ellas se cuantificó la distribución de bacterias asociadas a los distintos tamaños de agregados de los sedimentos.

5.4.1 Propiedades físicas y químicas de los sitios estudiados

La etapa de campo se realizó en el establecimiento “Los Patricios” perteneciente a la Universidad de Buenos Aires que se encuentra ubicado en la cuenca media del Arroyo del Tala. Esta etapa comprendió la aplicación de lluvia simulada sobre tres situaciones con características diferenciales: un suelo correspondiente un sector agrícola cercano a una vaguada, dedicado a cultivos anuales (sitio “Agrícola”), y dos suelos propios del ambiente bajo también cercanos a una vaguada, pero dedicados a ganadería extensiva y con distinto contenido de carbono orgánico, pH, nivel de erosión y sodicidad (sitios

“Ganadero” y “Ganadero Sódico”, Figura 5.1). De una zona contigua a cada ensayo de simulación se extrajeron muestras superficiales de suelo (0-5 cm) para determinar densidad aparente por el método del cilindro (Blake y Hartge 1986). Además, fueron tomadas muestras compuestas de tres submuestras de los primeros 2 cm que se emplearon para la caracterización física y química de los suelos bajo estudio. Estas últimas fueron secadas al aire y tamizadas por una malla de 2 mm. Se midió el pH con una relación 1:2,5 -sólido: agua- y el carbono orgánico (CO) por el método de Walkley y Black. Además se determinaron la conductividad eléctrica (pasta de saturación), la capacidad de intercambio catiónico (extracción con cloruro de potasio, Klute 1986) y la superficie específica según metodología de Lombardi *et al.* (2001). La capacidad de campo (CC) fue medida a 0,33 atm mediante olla de presión (Richards 1965). Se realizó el análisis de la distribución de tamaño de partículas por el método de la pipeta de Robinson (Soil Conservation Service 1972). En las fracciones de escurrimientos fueron medidos el pH y conductividad con la misma metodología antes mencionada, además de la concentración de sedimentos (mg l^{-1}).

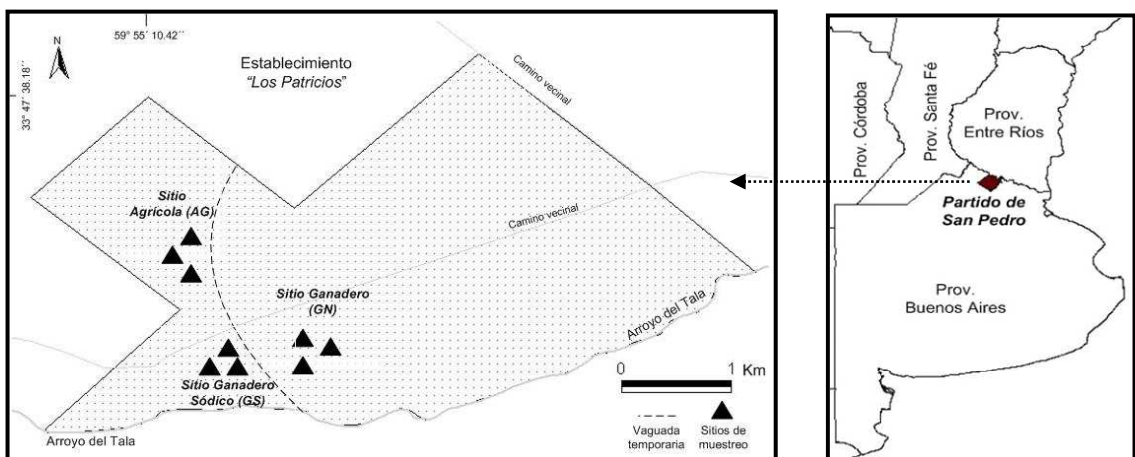


Figura 5.1. Ubicación de los sitios de los ensayos de simulación de lluvia.

5.4.2 Descripción de los ensayos realizados a campo

Para evaluar la dinámica bacteriana se empleó un microsimulador de lluvia que aplicaba agua destilada en forma de gotas de 4,7 mm cayendo desde 150 cm de altura, sobre parcelas enmarcadas por un bastidor metálico cuadrado de 25 cm de lado. Los goteros totalizaban 49 unidades estando dispuestos en forma de cuadrícula sobre una placa de acrílico (Kamphorst 1987; Irurtia y Mon 2004) (Anexo 1). Previo a la aplicación de las lluvias, cada parcela fue acondicionada de la siguiente forma: a) la parte aérea de la vegetación viva y los residuos vegetales superficiales fueron quitados a mano cuidadosamente, con el fin aislar los efectos de la vegetación, la cual podría interceptar el inóculo; b) el primer centímetro de suelo fue punteado suavemente con un cuchillo y posteriormente alisado para uniformizar la superficie y eliminar así las microdepresiones; c) por último se aplicaron uniformemente 100 ml de un inóculo de *E. coli* mediante un aspersor manual y se esperaron 5 minutos antes de comenzar las lluvias, para permitir que se produzca la asociación entre las bacterias y el suelo (Anexo 1). Se empleó una cepa de *Escherichia coli* la cual fue previamente aislada del propio establecimiento y posteriormente identificada mediante la utilización de medios selectivos diferenciales (CHROMAGARtm). La concentración de inóculo fresco de 24 h fue de $1,10^7$ UFC ml⁻¹, similar al valor utilizado por numerosos investigadores para representar una concentración máxima estándar de microorganismos en escurrimientos sobre materia fecal (Guber *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2007).

Luego de cumplidos estos tres pasos se aplicó lluvia simulada durante 1 h con una intensidad promedio de 60 mm h⁻¹ equivalente a la precipitación máxima esperable en la región con un período de retorno de 10 años. La energía aplicada fue de 15 kJ m² m⁻¹. Dicha intensidad fue equivalente a la utilizada por Roodsari *et al.* (2005) en ensayos similares. Para calcular la tasa de infiltración del agua en el suelo, se recogieron y

midieron los escurrimientos obtenidos a intervalos de 5 minutos a lo largo de todo el ensayo. La tasa de infiltración final (TIF) se asimiló al promedio de las últimas dos lecturas del ensayo.

Para obtener los valores de adsorción y partición bacteriana se tomaron dos momentos de medición del escurrido, los primeros 15 minutos y los últimos 5 minutos del ensayo. El escurrido se recolectó en recipientes estériles los cuales se mantuvieron a 8°C hasta su procesamiento en el laboratorio efectuado al día siguiente de la toma de las muestras. Una vez allí, el líquido obtenido se dejó sedimentar durante 12 hs a 8°C tras lo cual se realizó el recuento bacteriano del sobrenadante. Posteriormente el líquido se sometió a una agitación manual intensa (3 minutos) tras lo cual, se midió la concentración total de microorganismos en la totalidad de la muestra. El porcentaje de adsorción y el coeficiente de partición se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Ads (\%)} = 100 \cdot (\text{Nt} - \text{Ns}) / \text{Nt}$$

Donde Nt = número total de bacterias en el escurrido (UFC ml⁻¹) y Ns = número total de bacterias en el sobrenadante del escurrido (UFC ml⁻¹).

$K_d = C_s / C_a$, K_d = coeficiente de distribución (ml g⁻¹) y C_s y C_a , las concentraciones en el sólido (UFC g⁻¹) y en el líquido (UFC ml⁻¹) respectivamente.

Paralelamente se realizaron simulaciones de lluvia a campo sin inoculación previa, las cuales permitieron obtener la concentración bacteriana base de los suelos bajo estudio. Al encontrarse en dichas simulaciones, recuentos menores al 2% con respecto a la concentración del inóculo utilizado, se consideró despreciable el aporte debido a la población microbiana autóctona.

Además se compararon los valores de adsorción y K_d bacteriano de los suelos de los tres sitios obtenidos a campo con aquellos obtenidos en laboratorio que se menciona en el capítulo III.

5.4.3 Adsorción microbiana sobre diferentes tamaños de partículas presentes en el escurrido

El escurrido obtenido fue analizado para conocer la proporción de bacterias asociadas a los diferentes tamaños de sedimentos presentes en dicho líquido. Mediante el método de la pipeta, se extrajeron alícuotas correspondientes a los siguientes tamaños de agregados edáficos: $>50 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$ y $2 \mu\text{m}$ estimados a través de la Ley de Stokes. Una subalícuota correspondiente a cada fracción fue llevada a estufa a 105 C° para obtener los valores de la distribución de tamaño de agregado. Cabe aclarar que en esta determinación no se utilizó ningún dispersante que pudiese afectar la asociación microbiana a los agregados. Otra subalícuota (0,1 ml) fue diluida y sembrada para realizar el recuento bacteriano. Este último valor fue obtenido mediante la diferencia entre las UFC de la fracción considerada y la fracción inmediatamente posterior debido a la sedimentación de la *E. coli* conjuntamente con las partículas de suelo. Los cambios en tamaño en la población de *E. coli* en la solución agua-suelo por el recrecimiento y muerte celular fueron consideradas despreciables debido al corto período de sedimentación utilizado. Al combinar la información de ambas subalícuotas, se pudo determinar la concentración de UFC correspondiente a cada tamaño de sedimento/agregado considerado.

5.5 Análisis estadístico

Para describir los sitios evaluados se realizó un ANOVA sobre las propiedades químicas, físicas y biológicas previa verificación de supuestos. Para describir el comportamiento de las propiedades biológicas durante la simulación de lluvias, se evaluó la variación de la adsorción y el Kd bacterianos a principios y al final de las simulaciones mediante una t de Student (bilateral 0,95). Para evaluar la retención bacteriana se ajustaron modelos de regresión lineal entre esta variable dependiente y las siguientes variables independientes: propiedades edáficas, biológicas e hidrológicas. Por último para comparar la adsorción y Kd bacteriano obtenidos en laboratorio y a campo, se ajustaron modelos de regresión lineal con variables categóricas (tipo de ensayo) para todos los sitios evaluados. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa Infostat/P v1.1, 2002.

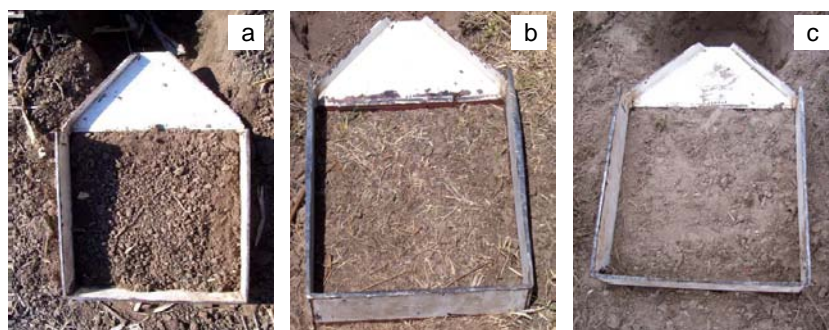
5.6 RESULTADOS

5.6.1 Caracterización edáfica e hidrológica de los sitios evaluados

En la Foto 5.1 se observan los ambientes en donde se realizaron los ensayos de simulación de lluvias, mientras que en la Foto 5.2 se puede apreciar las parcelas de escurrimiento. Las parcelas correspondientes al tratamiento Agrícola presentaron un grado de microrugosidad superficial relativamente importante, asociado a la adecuada agregación que caracterizaba a dicho suelo. Igual rasgo presentó el sitio Ganadero, aunque el origen de esta rugosidad podría estar dado por los abundantes restos de vegetación hallados a nivel subsuperficial, especialmente raíces y estolones. El sitio restante, Ganadero sódico presentó una superficie escasamente rugosa y bastante pulverulenta.



Fotos 5.1. Imágenes de los ambientes donde se realizaron las simulaciones de lluvia a) Sitio Agrícola , b) Sitio Ganadero, c) Sitio Ganadero Sódico.



Fotos 5.2. Imágenes en donde se aprecia el grado de cobertura y rugosidad de las parcelas de cada tratamiento. a) Sitio Agrícola, b) Sitio Ganadero, c) Sitio Ganadero Sódico.

Las tres situaciones estudiadas presentaron una misma clase textural, franco arcillo limosa y por ende la CIC y la SE mostraron un rango estrecho de variación encontrándose una tendencia hacia valores más altos de esas propiedades en el sitio Agrícola (Tabla 5.1). En cuanto al pH, CO y PSI los sitios Agrícola y Ganadero presentaron valores similares entre sí. A su vez el sitio Ganadero Sódico presentó mayores valores de alcalinidad y PSI y menor contenido de carbono orgánico que los dos anteriores, asociado a su condición de suelo degradado por erosión hídrica. Si bien la densidad aparente no varió entre tratamientos, las propiedades químicas y físicas evidenciaron un gradiente importante para poder analizar los cambios en los fenómenos de adsorción (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Propiedades físicas y químicas de tres sitios en la Pampa Ondulada (valores promedio). DAP (densidad aparente), CC (capacidad de campo), SE (superficie específica), CIC (capacidad de intercambio catiónico), PSI (porcentaje de sodio intercambiable), CE (conductividad eléctrica) y CO (carbono orgánico).

<i>Sitios</i>	<i>Arcilla</i>	<i>Limo</i>	<i>Arena</i>	<i>DAP</i>	<i>Poros. Total</i>	<i>CC</i>	<i>SE</i>	<i>CIC</i>	<i>PSI</i>	<i>pH</i>	<i>CE</i>	<i>CO</i>
	(<2 μm)	(2-50 μm)	(>50 μm)									
	g kg ⁻¹			g cm ⁻³	(%)	(%)	m ² g ⁻¹	cmolc kg ⁻¹	(%)		dS m ⁻¹	(%)
Agrícola	310	590	100	1,0	58	32,5	182,5	18,2	0,7	5,4	1,90	3,4
Ganadero	355	565	80	1,1	51	35,4	153,0	16,6	2,4	6	0,60	3,1
G. Sódico	290	565	145	1,1	50	33,7	132,4	16,5	16,9	7,9	1,60	2,0

Las situaciones evaluadas presentaron comportamientos hidrológicos diferentes ante las simulaciones de lluvias (Tabla 5.2). Los valores de producción de sedimentos y escurrimiento variaron entre los tratamientos ($P < 0,01$) indicando diferentes potencialidades de transporte bacteriano. El tratamiento Ganadero Sódico escurrió y generó sedimentos en forma significativamente mayor que los restantes tratamientos estudiados. Por el contrario, los valores de concentración de sedimentos no se diferenciaron significativamente ($P > 0,05$) entre los tres sitios estudiados.

Tabla 5.2. Resultados obtenidos tras aplicar 1 h de lluvia simulada (intensidad 60 mm h^{-1}) sobre tres sitios en la Pampa Ondulada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). TIF (tasa de infiltración final)

<i>Sitio</i>	Escurrecimiento	TIF	Producción de sedimentos	Conc. de sedimentos
	(%)	(mm h^{-1})	(g)	(g L^{-1})
Agrícola	45,6 a	25,4 a	6,7 a	4,9 a
Ganadero	33,8 b	26,2 a	4,0 a	3,3 a
Ganadero Sódico	84,2 c	0,96 b	21,8 b	7,4 a

5.6.2 Caracterización del escurrido

En la Tabla 3 se presentan los valores de adsorción y K_d bacterianos obtenidos al comienzo y al final de la simulación de lluvias. Ambas variables presentaron una leve disminución de su valor, sin embargo tanto la caída de la adsorción como la del K_d no resultaron significativas ($P > 0,05$). Por lo tanto, se tomaron valores promedio de adsorción y K_d para describir la Retención Bacteriana (RB). Los sitios Agrícola y Ganadero presentaron valores de adsorción calculados a campo similares entre sí y cuyas medias (contabilizando las mediciones intermedias) fueron de 73,4% y 70,2

respectivamente. En tanto, el sitio Ganadero Sódico presentó valores muy inferiores con una adsorción media (contabilizando también las mediciones intermedias) de 35,9%.

En relación al Kd, se encontraron valores de 4,82, 12,4 y 1,66 ml g⁻¹ para los sitios Agrícola, Ganadero y Ganadero Sódico respectivamente.

También en el escurrido se observó que tanto la CE como la concentración de sedimentos disminuyeron al final del ensayo (P<0,05). El pH no varió en el escurrido del sitio Agrícola, mientras que el pH aumentó levemente en los sitios ganaderos encontrándose en el sitio Ganadero Sódico valores similares a los del suelo superficial (P<0,1).

Tabla 5.3. Variables biológicas y propiedades físicas y químicas al principio (15 minutos iniciales) y al final del escurrimiento (5 minutos finales) para tres sitios en la Pampa Ondulada. Kd (Coeficiente de distribución) y CE (Conductividad eléctrica). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

Sitio		<i>Variables biológicas</i>		<i>Propiedades físicas y químicas</i>		
		Adsorción (%)	Kd (ml g ⁻¹)	pH	CE (dS m ⁻¹)	Conc. Sedimentos (mg l ⁻¹)
<i>Agrícola</i>	Principio	73,9 (4,4)	4,96 (0,83)	6,6 (0,03)	0,110 (0,025)	5,9 (0,9)
	Final	72,8 (6,2)	4,62 (1,00)	6,6 (0,02)	0,024 (0,006)	5,3 (1,3)
<i>Ganadero</i>	Principio	80,4 (8,1)	20,08 (4,50)	6,4 (0,04)	0,068 (0,008)	5,0 (1,1)
	Final	77,7 (8,4)	14,71 (3,90)	6,6 (0,02)	0,026 (0,001)	1,3 (2,6)
<i>Ganadero Sódico</i>	Principio	36,5 (3,9)	1,61 (0,08)	7,6 (0,04)	0,035 (0,004)	9,4 (1,9)
	Final	29,3 (5,9)	1,51 (0,15)	7,9 (0,02)	0,019 (0,002)	5,9 (1,8)

Como se observa en la Figura 5.2, la distribución de tamaño de agregados siguió la misma tendencia en los tres sitios analizados. La fracción mayoritaria para todas las simulaciones fueron los limos finos (20-3 µm) acorde con la textura franco arcillo

limosa de los suelos. Esta fracción podría estar integrada tanto por partículas elementales como por microagregados habida cuenta que no se emplearon dispersantes químicos en el presente estudio. En contraposición se observó relativamente pocas partículas o agregados mayores a 50 μm . Con respecto a las entidades biológicas, la concentración bacteriana asociada a la fracción edáfica menor a 2 μm resultó máxima para las tres situaciones analizadas. Dentro de las categorías mayores a 2 μm , la máxima concentración bacteriana estuvo asociada al tamaño de partículas de 20-3 y 3-2 μm para el sitio Agrícola y la misma fracción 3-2 μm para el Ganadero Sódico, mientras que para el sitio Ganadero, el máximo valor correspondió a la fracción >50 μm (Figura 5.2).

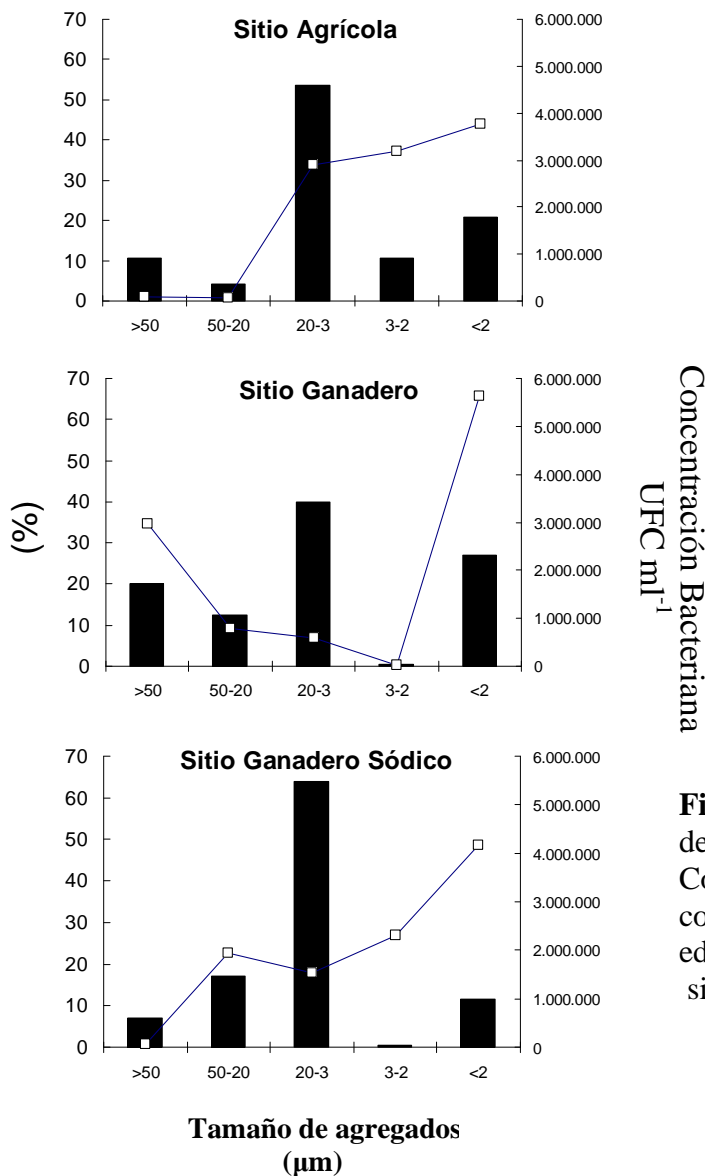


Figura 5.2. Distribución de tamaño de agregados (%) (barras negras) y Concentración bacteriana (UFC ml⁻¹) correspondiente a cada fracción edáfica (cuadrados) para los tres sitios evaluados.

5.6.3 Adsorción y Kd bacteriano en laboratorio

Los ensayos en laboratorio arrojaron valores muy similares a los obtenidos a campo ($P=0,9$), con promedios de 70,8; 64,5 y 39,7 % de adsorción bacteriana para las muestras de suelo de los sitios Agrícola, Ganadero y Ganadero sódico respectivamente (Figura 5.3a). En coincidencia con lo que muestra dicha Figura, no se hallaron diferencias significativas ($P=0,19$) entre el Kd obtenido en laboratorio y a campo (Figura 5.3b). El Kd por su parte mostró una mayor dispersión de los resultados entre sitios respecto a la Adsorción encontrándose valores de Kd de 2,9; 5,3 y 1,2 ml g^{-1} para los suelos Agrícola, Ganadero y Ganadero Sódico respectivamente.

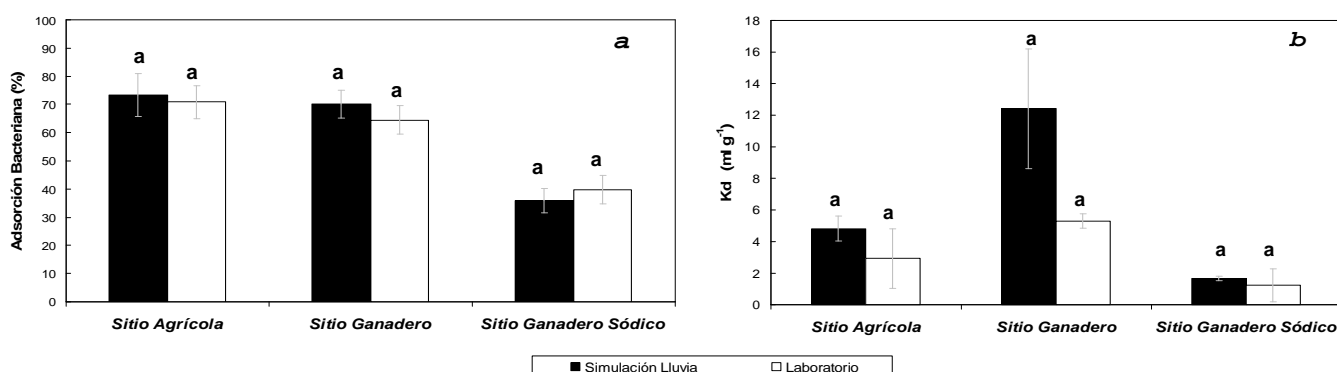


Figura 5.3. a. Adsorción bacteriana obtenida a campo (columna negra) y en laboratorio (columna blanca). b. Coeficiente de Distribución obtenido a campo (columna negra) y en laboratorio (columna blanca). Las barras de dispersión representan ± 1 error estándar.

5.6.4 Retención bacteriana

La Retención bacteriana (RB) calculada a partir de los ensayos de simulación de lluvia a campo, resultó en promedio de 81% y 75% para los sitios agrícola y ganadero respectivamente, observándose una tendencia a la diferenciación con el tratamiento Ganadero Sódico ($F 3,75$, $P < 0,10$) cuyo valor alcanzó el 52%.

La adsorción y K_d medidas en laboratorio explicaron, cada una, cerca del 50 % de la variabilidad observada en RB (Tabla 5.4). En cambio, las mismas propiedades obtenidas en los ensayos a campo presentaron coeficientes de determinación menores (Tabla 5.4). Sin embargo, no se hallaron diferencias en los parámetros de la ecuación lineal (ordenada al origen y pendiente) estimados a partir de observaciones de campo o de laboratorio (Adsorción: $F_{ord}=1.07$ $P=0.31$, $F_{pend}=1.23$, $P=0.28$; K_d : $F_{ord}=0.93$ $P=0.35$, $F_{pend}=2.9$ $P=0.11$ (Figura 5.4). Por este motivo en la Figura 5.4 se muestran las regresiones obtenidas a partir de los datos de campo y laboratorio agrupados entre sí. En cuanto a las propiedades edáficas (Tabla 5.4) se encontró que el pH, PSI y contenido de CO, y en menor grado la superficie específica y el contenido de arenas, fueron las variables que mejor explicaron RB ($P<0,05$). Por último la relación entre las variables hidrológicas y RB fue pobre, no encontrándose efectos significativos.

Tabla 5.4. Regresiones lineales entre la Retención Bacteriana (%) en 1 h de simulación con una intensidad de 60 mm h⁻¹ y variables biológicas, edáficas e hidrológicas en tres sitios de la Pampa Ondulada (n = 9 parcelas) y la Adsorción y Kd obtenida en laboratorio.

<i>Retención Bacteriana</i>		<i>R²</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	<i>Valor P</i>
<i>Variables biológicas</i>	Adsorción (Campo)	0,43	0,87	-7,48	0,019
	Adsorción (Lab.)	0,56	0,60	16,90	0,013
	kd (Campo)	0,27	0,20	-7,41	0,200
	Kd (Lab.)	0,44	0,07	-1,44	0,037
<i>Propiedades edáficas</i>	Arena	0,43	-1,11	182,90	0,041
	Limo	0,20	0,32	550,10	0,195
	Arcilla	0,20	0,79	266,90	0,192
	Porosidad	0,27	0,11	45,00	0,126
	CC	<0,01	-0,002	34,12	0,957
	SE	0,44	0,81	99,00	0,036
	CIC	0,23	0,02	15,50	0,160
	PSI	0,55	-0,33	29,03	0,013
	pH	0,56	-0,05	9,71	0,013
	CE	0,01	-3,83	1569,00	0,770
	CO	0,56	0,03	0,91	0,013
<i>Variables hidrológicas</i>	Escurrimiento	0,16	-0,57	81,80	0,248
	TIF	0,27	0,75	57,70	0,120

Valores resaltados en negrita corresponden a P<0,05. CC = capacidad de campo, SE = superficie específica, CIC = capacidad de Intercambio catiónico

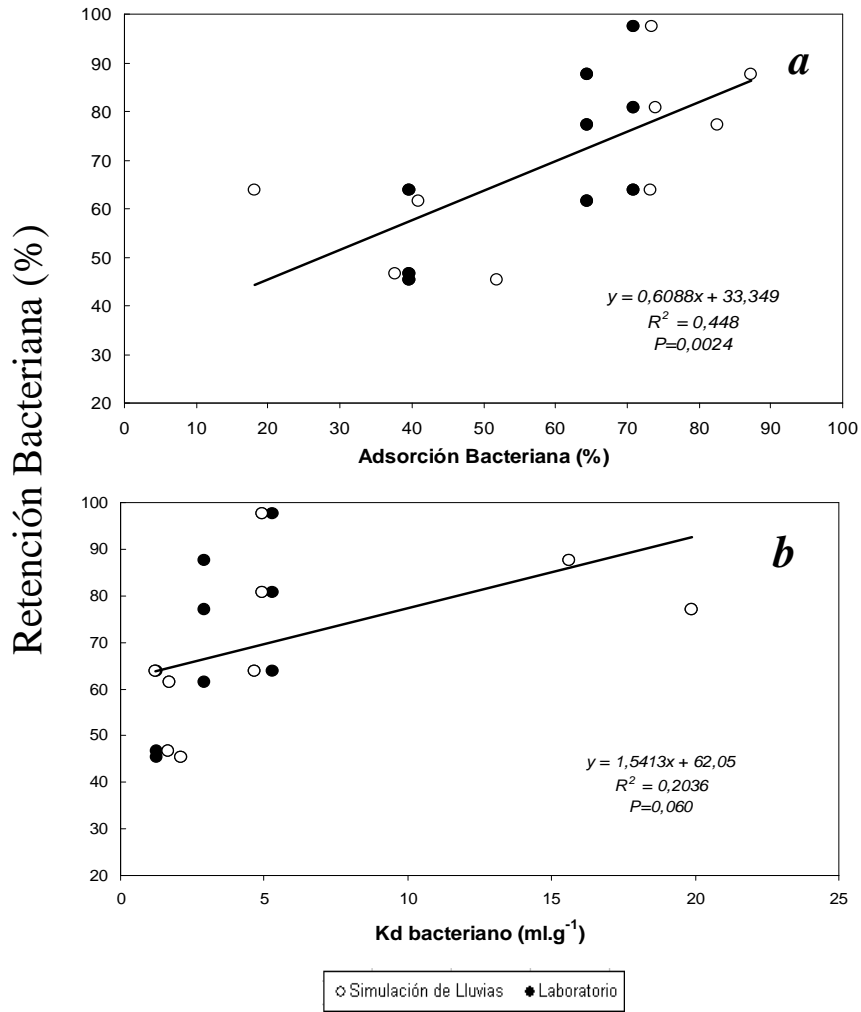


Figura 5.4. Retención bacteriana en función de la Adsorción bacteriana (a) y Kd bacteriano (b) medidos en laboratorio (círculos llenos) y a campo (círculos vacíos).

5.7 DISCUSIÓN

5.7.1 Propiedades del sistema analizado

Según los resultados obtenidos, el sitio Ganadero Sódico poseería la mayor capacidad de contaminación física, química y biológica de los cuerpos de agua cercanos. Esto es debido a su baja capacidad de infiltración, su fragilidad ante la erosión hídrica y la ubicación de este tipo de suelos aledaña a los principales curso de agua de la región.

A su vez resulta destacable el comportamiento del sitio Ganadero habida cuenta que se trata como en el caso anterior, de un suelo hidromórfico de origen nátrico aunque con adecuadas propiedades edáficas en el horizonte superficial. La TIF como la producción de sedimentos respondió en forma equivalente al sitio Agrícola (correspondiente a un suelo Molisol bien drenado). Estos resultados se asociaron al adecuado contenido de materia orgánica humificada que poseían ambos suelos desde superficie, pero sobre todo, a la presencia de restos de tallos y raíces en el tratamiento Ganadero. Resulta destacable que no se hayan encontrado diferencias en la concentración de sedimentos entre los tres tratamientos analizados. El porcentaje de adsorción y el K_d son variables sensibles a la concentración de sólido en el líquido. Por ende, la escasa diferencia encontrada entre dichos tratamientos permitiría una correcta lectura de estas variables biológicas en función de las características intrínsecas del suelo.

La adsorción y el K_d bacteriano medidas tanto a campo como en laboratorio presentaron en general valores muy semejantes entre si. Además ninguna de dichas variables medidas a campo presentó variaciones significativas entre el principio y el final del ensayo de simulación. Esto último evidencia que ambas propiedades resultarían relativamente estables durante el desarrollo de lluvias de intensidad elevada. Tomando en cuenta las importantes diferencias involucradas en las dos metodologías

empleadas (campo y laboratorio), estos resultados pueden considerarse destacables. Una posible explicación a este hecho es que el tiempo de adsorción de 5 minutos utilizado tanto a campo como en laboratorio habría sido suficiente para lograr la adsorción microbiana y que el gran volumen de escurrido en conjunto con el posterior periodo de reposo en frío (12 h) empleadas en la metodología de campo no habrían alterado dicha asociación en forma significativa.

Los valores de Adsorción y K_d obtenidos a campo y en laboratorio resultaron comparables a los encontrados por diversos autores. Por ejemplo Guber *et al.* (2005) hallaron valores de K_d de 9,4; 46,3 y 513,2 ml g^{-1} para dos suelos limosos y suelos franco arcillo limosos, respectivamente. Por su parte Ling *et al.* (2002) obtuvieron valores de 0,33 ml g^{-1} en suelos limosos y de 127 ml g^{-1} en suelos arcillo limosos. Por lo tanto, los valores de la Figura 5.3 resultaron intermedios a los citados por los mencionados autores. En los capítulos previos se hallaron valores muy similares a los aquí obtenidos, lo cual confirma la repetibilidad de la información obtenida para estos suelos. En cuanto a la adsorción, Ling *et al.* (2002) midieron más del 90% de esta propiedad en todos sus tratamientos analizados. Por su parte Oliver *et al.* (2007) en suelos limosos encontraron valores de 35% de adsorción mientras que Characklis *et al.* (2005) observaron entre 20 y 35% de asociación de *E. coli* con partículas sedimentables estimados mediante técnicas de centrifugación. Estos datos muestran la disparidad que se observa en la bibliografía respecto de la propiedad analizada. Nuevamente los datos locales resultaron intermedios a los que citan los mencionados autores.

Con respecto al tamaño de sedimento que dominó el escurrido, el mismo corresponde a los limos y arcillas (< 50 μm). Este hecho era esperable teniendo en cuenta el impacto

de las gotas con alta energía cinética y la escasa capacidad de transporte que caracteriza a la erosión laminar (Nearing *et al.* 1990). En tal sentido, es muy posible que la baja proporción de agregados $> 50 \mu\text{m}$ observados, se deba a que fueron desagregados a tamaños menores y/o fueron retenidos por su peso no llegando a la salida de la parcela.

Dado que la mayor parte de los microorganismos analizados se encontraban libres (en la fracción $< 2 \mu\text{m}$) o asociados a partículas pequeñas ($50\text{-}2 \mu\text{m}$) (Figura 5.3) los mismos tendrían un movimiento análogo al escurrimiento. Muirhead *et al.* (2006) mencionan que las practicas para el control de polución hídrica denominadas franjas de filtrado, resultaban efectivas en la retención de sedimentos mayores a $500 \mu\text{m}$ y que la sedimentación durante el escurrimiento comenzaba a ser afectado en partículas mayores a $63 \mu\text{m}$. Por tales motivos la implementación de dichas franjas sería de escasa utilidad en aquellos sectores de la Pampa Ondulada que posean pendientes cortas de escaso gradiente en las que existiría dominancia de erosión laminar por encima de otros tipos de procesos erosivos.

Resultan destacables las diferencias encontradas en la concentración bacteriana correspondientes a los distintos tamaños de agregados mayores a $2 \mu\text{m}$ para las tres situaciones analizadas. A semejanza de lo hallado en el sitio Agrícola, Oliver *et al.* (2007), encontraron una alta concentración microbiana en la fracción 20-3, mientras que se observó en el capítulo II, una mayor concentración bacteriana correspondiente a la fracción 50-20 μm siendo la fracción 20-3 μm la segunda en importancia. En contraposición Borst y Selvakumer (2003) no encontraron ninguna relación entre coliformes fecales, estreptococos fecales y tamaño de partículas. Estos resultados destacan la conveniencia de estudiar la heterogeneidad en la composición y propiedades

de los diferentes sedimentos para poder interpretar su asociación con la fracción biológica.

5.7.2 Retención bacteriana y su relación con propiedades biológicas, físicas y químicas de los suelos

Las importantes diferencias de RB halladas en los tres suelos evaluados, estarían mostrando una posible regulación diferencial por parte de dichos sitios, respecto de la dinámica de transporte bacteriano. Entre las propiedades consideradas, las biológicas y algunas propiedades edáficas, explicaron en gran parte de esta dinámica.

Con respecto a las primeras y tal como mencionaron Jamieson *et al.* (2004) y Marshall (1980) la adsorción bacteriana resultó de fundamental importancia en la dinámica del transporte de estos microorganismos. Si bien se encontró una destacable concordancia entre los resultados de laboratorio y campo, los menores coeficientes de determinación y significancia en las propiedades medidas a campo (Tabla 5.4) podrían estar reflejando un menor control de las condiciones experimentales en esta clase de ensayos. Debe tenerse en cuenta que aplicando la metodología de laboratorio (Ling *et al.* 2002), la relación agua sedimento era 1/1, mientras que a campo esta relación resultaba menor y además, relativamente variable como ya fuera mencionado en un punto anterior. Es posible que bajo las condiciones de laboratorio se haya logrado reproducir más ajustadamente el ambiente de adsorción y por ello se puedan considerar a estos parámetros como más sensibles para describir el movimiento bacteriano.

Con relación a las propiedades edáficas físicas y químicas, su efecto sobre la retención bacteriana se debió a la configuración y modificación de los mecanismos de adsorción como así también a su influencia sobre la dinámica hidrológica. En este sentido el pH, CO, PSI y el contenido de arenas actuarían como variables claves en la modificación de

los ambientes de adsorción bacteriana por un lado y como determinantes en el resultado hidrológico de las simulaciones por otro. Esto coincide con lo señalado por Marshall (1980), quien mencionaba que el ambiente de absorción bacteriana estaba afectado mayormente por el pH y la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos los cuales alteraban las cargas superficiales. Diversos autores señalaron al pH como una variable importante que modifica el balance de cargas de las arcillas incrementando o disminuyendo la adsorción (Stotzky 1985). En el presente estudio, la relación de la retención bacteriana con el pH mostró una pendiente de signo negativo. Coincidentemente Scholl y Harvey (1992) encontraron que un gran número de colonias de *Arthrobacter sp.* se asociaron al cuarzo a pH 5,04 para luego decrecer a 7,52. A su vez Kinoshita *et al.* (1993) observaron un decrecimiento de la adsorción de *P. fluorescens* a bolitas de silicio como resultado del aumento del pH de la solución de 5,5 a 7. El comportamiento del pH está en parte asociado al PSI, propiedad que determina la dispersión de los agregados aumentando las cargas negativas de los mismos y en consecuencia disminuyendo los fenómenos de adsorción. Además, la dispersión del suelo produce efectos negativos en la infiltración al disminuir la estabilidad estructural de los agregados ya que esto favorece el colapso y la posterior oclusión de los macroporos.

Por otro lado la regresión lineal ajustada entre la retención bacteriana y el CO presentó una pendiente positiva. A pesar que los compuestos orgánicos son a menudo señalados como importantes en los fenómenos de adsorción, resulta escasa la información que avale en forma contundente dicha aseveración. Según Labelle y Gerba (1979) la agregación de las partículas con la materia orgánica o con los minerales de arcillas juega un importante rol tanto en el transporte como en la sedimentación y supervivencia microbianas. En el presente experimento no todo el efecto del CO estaría explicado por

esta variable en si misma, sino también por los efectos indirectos que este componente pueda tener en la dinámica hidrológica de las simulaciones.

Con respecto a las propiedades físicas analizadas, el contenido de arena mostró una pendiente negativa explicada por la baja interacción de esta fracción con el agua (vehículo de transporte de los microorganismos) y con los propios microorganismos. En contrapartida la superficie específica pudo explicar el 44% de la variación de la retención microbiana, seguramente por su efecto en la adsorción bacteriana. Esto puede ser atribuido a una diferencia en las superficies disponibles para la adsorción (Oliver *et al.* 2007; Stotzky 1985)

Las variables hidrológicas no se asociaron significativamente con la retención bacteriana, contrariamente a lo esperado. La aplicación del inóculo distribuido uniformemente en todas las parcelas sobre el suelo seco, removido y carente de cobertura, pudo haber influido para que sean las propiedades edáficas las que regularan la dinámica microbiológica en detrimento de los parámetros hidrológicos. En este escenario, las propiedades intrínsecas de los suelos conjuntamente con la humedad y estructura de los mismos tuvieron una gran incidencia en la determinación de la adsorción microbiana y de esta forma regularon el posterior movimiento microbiano, principalmente en el comienzo del evento de lluvia. En ensayos con una liberación microbiana gradual, asociados a suelos previamente húmedos, las bacterias tendrían probablemente menor tiempo de contacto con el suelo y a su vez esa interacción se daría en un medio más acuoso, disminuyendo la posibilidad de actuar a los mecanismos de adsorción en la forma significativa con que lo hicieron en el presente ensayo.

5.8 CONCLUSIÓN

Si bien es sabido que las propiedades edáficas e hidrológicas en su conjunto pueden incidir sobre el movimiento superficial de contaminantes, las propiedades biológicas medidas en el presente trabajo, Absorción y K_d bacteriano, resultaron clave para explicar la dinámica del transporte bacteriano observado.

Con relación a la **Hipótesis 3.1**, dichas variables biológicas evaluadas a través de lluvia simulada a campo, se asociaron significativamente con la retención bacteriana en las tres situaciones de suelo y manejo contrastantes estudiadas. Por otro lado debe destacarse la similitud de respuesta obtenida a campo y en laboratorio, lo cual permitiría estimar procesos de contaminación in situ a través de ensayos de laboratorio, corroborándose así la **Hipótesis 3.2**.

Por otra parte, a los efectos perjudiciales de la degradación edáfica sobre la producción agropecuaria, debería sumarse también sus consecuencias sobre la contaminación biológica hídrica. Los elevados valores de escurrimiento y producción de sedimentos observados en el sitio ganadero sódico, sumado a su baja capacidad de absorción bacteriana, delinean un importante riesgo de contaminación a los cursos de agua aledaños, tal como surge del escaso valor de retención bacteriana hallado para este tratamiento. El panorama se ve agravado debido a la cercanía de este tipo de suelos a los principales cursos de agua de la región.

En contraposición, la adecuada tasa de infiltración encontrada en los sitios Agrícola y Ganadero sumado a su alto valor de absorción microbiana y su lejanía a los cursos de agua, permitirían concluir que, ante lluvias de moderada intensidad, los contaminantes biológicos asociados a estos suelos presentarían importantes retardos para alcanzar los

cursos de agua antes mencionados siendo además su cantidad total, sensiblemente menor que para el caso anterior.

Al analizar la distribución de microorganismos en los escurridos provocados por la lluvia simulada se observó que la mayor concentración bacteriana correspondía a la fracción de sedimentos con tamaños de 20-3 micrones. Sin embargo los ensayos de laboratorio (ver capítulo IV) mostraron que la fracción que presentaba mayor concentración bacteriana era la de 50-20 micrones. Estos resultados permiten rechazar la **Hipótesis 3.3**. De todas formas ambos resultados (campo y laboratorio) muestran que los microorganismos estuvieron asociados a partículas finas del tamaño de arcillas y limos. Esto hace suponer que las practicas de manejo que se utilizan en otras partes del mundo para controlar la contaminación biológica de los cursos de agua, tales como franjas de filtrado, deberían considerarse con reservas a la hora de ser implementadas a nivel local.

Capítulo VI

**Aplicación del Modelo SWAT en una microcuenca
agrícola – ganadera de la Pampa Ondulada, Argentina.**

6. 1 INTRODUCCIÓN

Ongley (1997) destaca la necesidad de estudiar la contaminación agrícola del agua a escala de cuenca ya que a partir de su comportamiento hidrológico es posible predecir su capacidad de generación y exportación de contaminantes. Esto permitiría diseñar estrategias de atenuación de dicha fuente de contaminación (Santanatoglia *et al.* 2006).

En relación a la contaminación biológica, existe un importante riesgo referido al agua superficial asociado a la actividad ganadera. En las últimas décadas, los suelos de la Región Pampeana (Argentina) que poseen una aptitud marginal para el desarrollo de cultivos anuales han sufrido una continua concentración de ganado bovino. Ello ha provocado un incremento de la degradación de estas frágiles tierras y un aumento de la contaminación química y biológica del sistema hídrico. Esta situación se vio agravada por el hecho que los animales presentes en dichas tierras tienen acceso directo a los cursos de agua y a sus cárcavas asociadas. Los patógenos eliminados a través de las deyecciones y orinas animales pueden ser transportadas por el escurrimiento o vertidas en forma directa a las vías de agua. Entre los patógenos más importantes asociados a la actividad ganadera, merecen destacarse el protozooario *Cryptosporidium*, microorganismos tales como *Salmonella spp*, *Leptospyra spp*, *Campylobacter spp*, virus y otros patógenos como *Giardia spp* (protozooario) y *Fasciola hepática* (metazoario) (Dutra *et al.* 2001; LeJeune *et al.* 2001; Wing *et al.* 2002), los cuales pueden ocasionar enfermedades también en humanos.

Estudios previos han demostrado que cuando la lluvia genera escurrimiento en estas áreas ganaderas, se pueden transferir altas concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación fecal a las aguas superficiales (Signor *et al.* 2005). En

cuanto a la intensidad de los eventos hidrológicos, estos pueden afectar en gran medida la calidad de aguas, habida cuenta que las lluvias de gran intensidad son capaces de aumentar en 100 veces la concentración bacteriana en los ríos (Rodgers *et al.* 2003). Curriero *et al.* (2001) encontraron que más de la mitad de las enfermedades producidas por organismos relacionados al agua en los Estados Unidos en los últimos 50 años estaban asociadas a lluvias intensas. En este sentido se ha estudiado que un incremento en la frecuencia y severidad de precipitaciones extremas, aumentaría el riesgo de los eventos de contaminación, acrecentando de esta forma la probabilidad de aparición de enfermedades relacionadas al agua (Rose *et al.* 2001).

Por otro lado, numerosos autores concluyeron que la dinámica del transporte bacteriano depende de la asociación microbiana al suelo y sedimento. Este aspecto resulta destacable debido a que la interacción con el medio sólido incrementaría la supervivencia bacteriana (Sherer *et al.* 1992). Estudios realizados en la cuenca del arroyo del Tala (Prov. Buenos Aires) mostraron que existe una estrecha afinidad entre la concentración de algunos microorganismos indicadores de contaminación fecal presentes en el escurrimiento y la fase sólida de dicho flujo hídrico (Chagas, 2007; Kraemer *et al.* 2008). Esta interrelación depende de las características del contaminante biológico y de las propiedades físicas y químicas de los suelos y sedimentos cuya resultante es el coeficiente de partición o distribución bacteriana (K_d). Por ello, la dinámica de transporte biológico debe analizarse contemplando la variabilidad física, química y biológica de cada ambiente.

Tanto la erosión y el escurrimiento, como la dinámica de los contaminantes químicos y biológicos pueden ser cuantificados mediante modelos hidrológicos de base física. Un modelo matemático para simulación de variables hidráulicas e hidrológicas, brinda la

posibilidad de analizar escenarios en una cuenca hidrográfica, que afectarían a uno o varios de los procesos físicos, químicos y biológicos de forma integrada. El modelado hidrológico es a menudo el primer paso en el desarrollo de sistemas de decisión que permiten identificar áreas vulnerables a la contaminación por nutrientes, pesticidas (Lim *et al.* 2001) como así también contaminantes biológicos. En este sentido, el modelo SWAT (Soil and Water Assessment Tool) fue desarrollado para predecir impactos de las prácticas de manejo de las tierras en las aguas, sedimentos y agroquímicos en cuencas hidrográficas con diferentes suelos, usos y prácticas en largos períodos de tiempo. Cabe destacar que este modelo no ha sido empleado aun en nuestro país. En el año 2000 una subrutina microbiológica fue añadida al SWAT para evaluar el destino y transporte de bacterias persistentes y no persistentes. Actualmente, una cantidad considerable de estudios de simulación hidrológica están siendo realizados mediante dicho modelo principalmente porque permite incluir las numerosas variables necesarias para realizar predicciones hidrológicas precisas. Por ejemplo, la subrutina de calidad de agua, fue aplicada y validada para escurrimientos, producción de sedimentos y pérdidas de nutrientes en cuencas de diversas regiones del mundo y con diferentes manejos y condiciones (Saleh *et al.* 1999; Santhi *et al.*, 2001; White *et al.*, 2004; White y Chaubey, 2005; Wang *et al.* 2006; Jha *et al.* 2007).

Sin embargo existen pocos trabajos que hayan utilizado hasta el presente la subrutina microbiológica antes mencionada. En tal sentido, Baffaut y Benson (2003) calibraron este modelo a partir de rendimientos agrícolas, caudales e información de calidad de aguas. Dichos autores efectuaron predicciones de coliformes fecales empleando esta subrutina microbiológica, las cuales resultaron acordes al rango y frecuencia valores medidos en el curso de agua. Ello les permitió efectuar recomendaciones de manejo razonables para la cuenca estudiada.

6.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo consistió en esbozar escenarios de contaminación biológica en una microcuenca agrícola-ganadera de Pampa Ondulada empleando el modelo SWAT. Los objetivos específicos fueron: a) calibrar y luego validar dicho modelo a partir de la información proveniente del monitoreo hidrológico continuo de la microcuenca bajo estudio; b) evaluar la incidencia de la propiedad “coeficiente de distribución bacteriana” (K_d) y del cambio en la carga animal, en la dinámica del transporte y retención de contaminantes biológicos del agua de escorrentía.

6.3 HIPÓTESIS

- **4.1.** Existe una relación lineal entre la magnitud de transporte de contaminantes (expresado a través de la concentración de bacterias en el escurrimiento) y el caudal superficial en la cuenca bajo estudio.
- **4.2.** Las propiedades físicas y químicas y el grado de asociación bacteriana a partículas edáficas (representado en el SWAT por el K_d) afectan de forma significativa la dinámica de transporte bacteriano.
- **4.3.** Tanto la carga animal real como el escenario de aumento de carga en la microcuenca, inciden negativamente en la calidad de agua para bebida animal y humana evaluada a través de los estándares respectivos.

6.4 MATERIALES Y MÉTODOS

6.4.1 El modelo SWAT

El Soil and Water Assessment Tool (SWAT) es un programa de modelamiento hidrológico diseñado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en conjunto con la Universidad de Texas (Arnold *et al.* 1990). Este modelo permite simular la producción de agua y sedimentos en cuencas hidrográficas, así como el efecto que tienen las prácticas agronómicas, incluyendo el uso de pesticidas, fertilizantes y derivados biológicos, sobre la calidad del agua de dichas cuencas.

El ciclo hidrológico simulado por el SWAT está basado en la ecuación del balance hídrico: $SW_t = SW + \sum (R_i - Q_i - ET_i - ET_i - P_i - QR_i)$ Donde, SW_t es la cantidad final de contenido de agua en el suelo (mm), SW es la cantidad inicial de contenido de agua en el suelo (mm), t es el tiempo en días, R_i es la cantidad de lluvia caída en el período de análisis (mm), Q_i es la cantidad de escorrentía (mm), ET_i evapotranspiración (mm), P_i percolación (mm), QR_i flujo de retorno (mm). Una vez que el AVSWAT determina las cargas de sedimentos, nutrientes y pesticidas en el agua del cauce principal, las mismas son ruteadas a través de la red de canales de la cuenca.

6.4.2 Ubicación de la microcuenca bajo estudio.

La microcuenca bajo estudio posee una superficie de 300 ha y está ubicada en la vertiente norte de la cuenca media del Arroyo del Tala (33° 50' Latitud Sur, 60° Longitud Oeste), en la localidad de San Pedro, provincia de Buenos Aires (Chagas *et al.* 1993)(Figura 6.1).

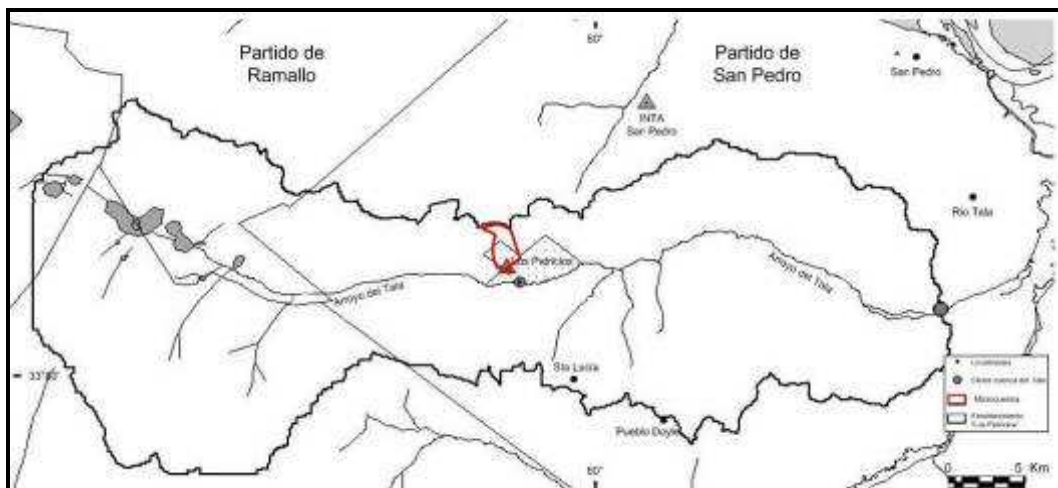


Figura 6.1. Ubicación de la microcuenca “Los Patricios”.

6.4.3 Datos meteorológicos

Las precipitaciones, temperatura máxima y mínima, humedad media e intensidad de vientos se midieron en forma automática mediante una estación meteorológica provista de un pluviógrafo de lectura a intervalos de 30 minutos y de otros sensores específicos. Esta estación meteorológica está ubicada en el Establecimiento “Los Patricios” (UBA) en el tercio medio de la cuenca del Tala, próxima al punto de cierre de la microcuenca analizada (Figura 6.1). Para completar algunos vacíos de información, se utilizaron datos provistos por la estación meteorológica del INTA - San Pedro la cual se encuentra a 15 km al norte de microcuenca (Figura 6.1). Para ser empleadas en el modelo SWAT, todas las variables meteorológicas fueron expresadas tanto en forma de valores diarios como mensuales. En la Figura 6.2 se muestran los valores de precipitación mensual

correspondientes al período de análisis (enero de 2000 – diciembre de 2005). En dicha figura se aprecia la variabilidad de lluvias del período bajo estudio, la cual resulta representativa del régimen pluviométrico de la región.

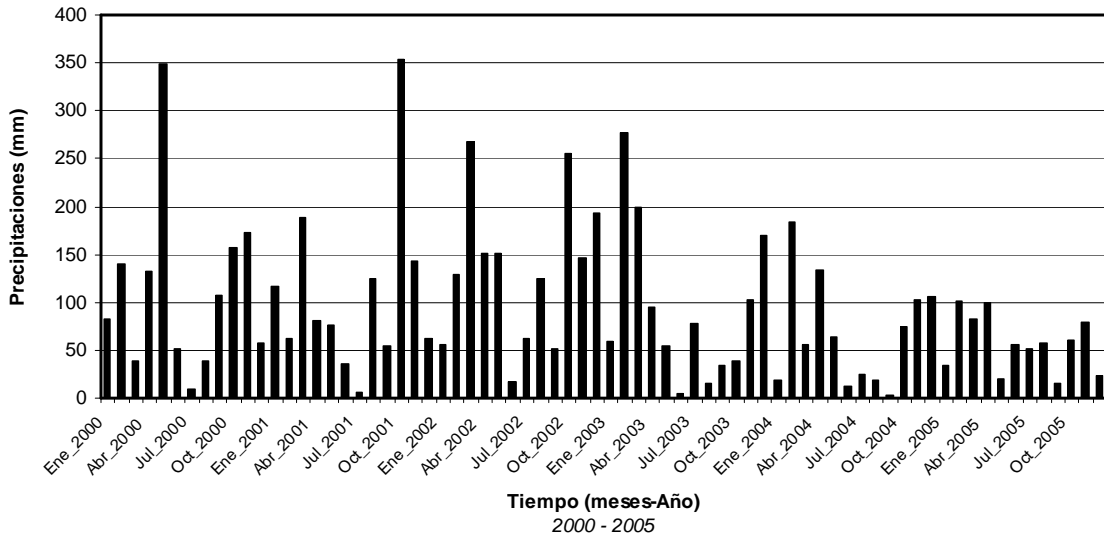


Figura 6.2. Precipitaciones utilizadas en las simulaciones para los períodos analizados (2000-2005). Los datos fueron provistos por la Estación “Los Patricios” y por la Experimental San Pedro – INTA.

6.4.4 Modelo de elevación Digital (DEM), Suelo y Uso del Suelo

El relieve de la microcuenca se caracterizó a través de la digitalización de las cartas topográficas IGM 1:50.000 y posterior interpolación de las curvas de nivel obtenidas, para poder generar el DEM (TIN, ArcView 3.3) (Figura 6.3a.)

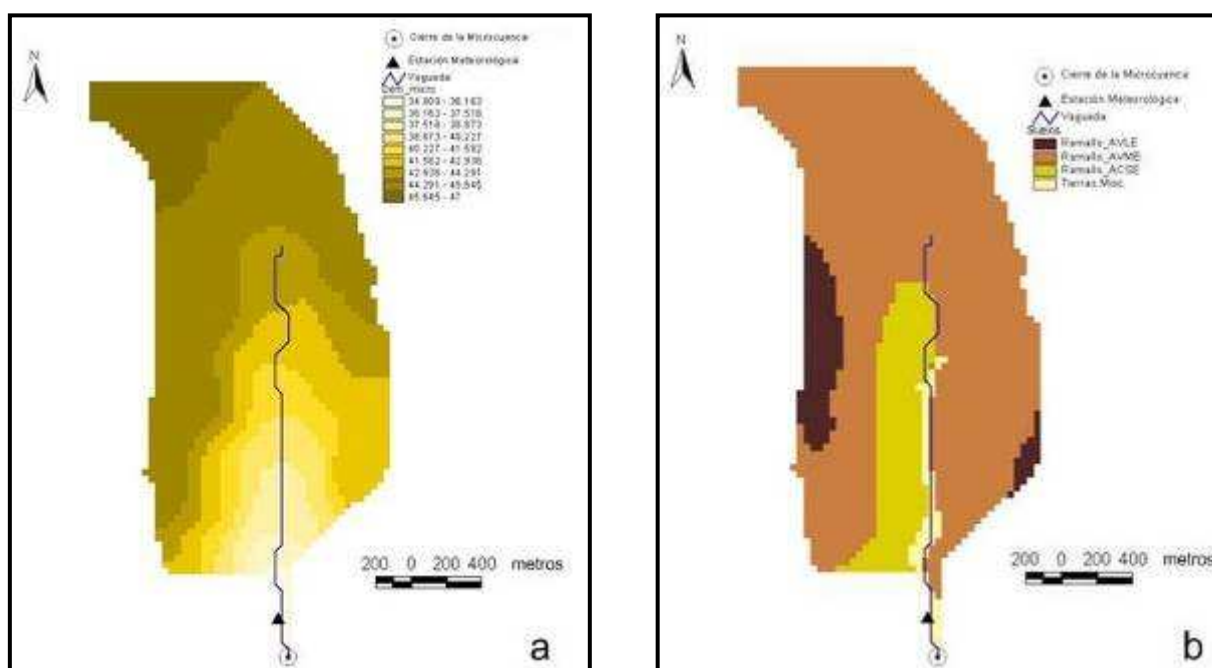


Figura 6.3. Elevación digital (m) (a) y Suelos (b) de la microcuenca “Los Patricios”.

Los suelos dominantes en la microcuenca corresponden a fases por erosión y sedimentación de la serie Ramallo (Argiudol vértico) (Figura 6.3b). El horizonte superficial del mismo es de textura franco arcillo limosa con un promedio de 15% de arena, 60% de limo y 25% de arcilla. En las áreas con pendiente los gradientes de: 0-0,5%; 0,5-1%; 1-2% ocupan una superficie del 22%; 35% y 34% respectivamente, mientras que los sectores de vaguada abarcan el 9% de la superficie total de esta microcuenca. Este último sector esta ocupado por las fases ligeramente erosionada y

engrosada de la serie Ramallo (INTA, 1973). Los parámetros edáficos no descritos por el INTA fueron estimados a través del programa Soil Water Characteristics v.1.0.103 introduciendo como variable de entrada la textura, pedregosidad y salinidad. Las propiedades edáficas utilizadas se muestran en el Anexo 3.

El uso de la tierra durante el período de análisis (2000-2005) fue predominantemente agrícola con alta presencia de cultivos de verano. Previo al año 1999 dichos cultivos se implantaban mayormente en forma convencional (arado de reja y vertedera, rastra de discos y rastra de dientes), mientras que a partir del 1999 el sistema de labranza empleado fue la siembra directa. Como input para ajustar los parámetros hidrológicos de la microcuenca durante el período indicado, se simularon cinco años continuos con cultivos de grano grueso bajo siembra directa. Para estudiar los eventos de contaminación biológica se simuló el pastoreo de cultivos de verano durante todo el año 2000. Si bien esta última situación no es habitual en la zona, se la eligió por su similitud con los efectos del pastoreo de verdeos de verano y de residuos de cosecha gruesa (rastros).

6.4.5 Calibración y Validación

La calibración y validación del modelo fueron efectuadas a través de los escurrimientos medidos *in situ*. Dichos escurrimientos se registraron en forma automática mediante un limnógrafo piezo-resistivo a intervalos de 30 minutos (Chagas *et al.*, 2008). La expresión de los valores de escurrimiento empleados para los períodos de calibración y validación fue realizada en base diaria y mensual.

6.4.6 Pastoreo y Producción de Heces

Para contemplar la carga de contaminantes de la cuenca bajo estudio se evaluó el pastoreo del ganado bovino y su producción de heces. En dicha cuenca, las cargas medias de los lotes rondan los 0,4 a 0,8 EV/ha (SAGPyA 2004).

La producción de heces por el ganado fue estimado a partir del consumo de materia seca por día para un EV (7-8 kg MS día⁻¹) y de la digestibilidad del pastizal (alrededor de 60%)(Paladino, Comunicación personal). Así calculada, la producción de heces frescas por día fue de 3 kg día⁻¹ EV⁻¹. La producción real de cada unidad animal varía dependiendo el hábito dietario del animal, reflejada en un desvío estándar de 64,4% de la media (ASAE 2000). La concentración de bacterias en las heces fue estimada en base a ASAE (2000), el cual reportó un valor en base húmeda por unidad animal para el ganado bovino de $13 \cdot 10^{10}$ UFC con un desvío estándar de $12 \cdot 10^{10}$ UFC día⁻¹. La concentración bacteriana fue convertida a las unidades requeridas por el modelo (UFC por gramo de heces en base seca) usando la media estándar de humedad de heces (86% humedad; ASAE 2000). Se asumió que existió un pisoteo de materia seca de aproximadamente 20% cada día y que el consumo de materia seca para un EV durante 30 días fue de 240 Kg. A partir de estos datos, se estimó un aporte de $1,5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ de heces secas a los pastizales durante el pastoreo con carga animal intermedia (por ej. 0,5 EV) y $3 \text{ kg ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ con alta carga (por ej. 1 EV). El factor de mortalidad para la bacteria en solución elegida para este trabajo fue de $0,40 \text{ día}^{-1}$, basado en la vida media de 3 días y el factor de mortalidad para la bacteria adsorbida por las partículas del suelo fue de $0,040 \text{ día}^{-1}$, basado en 1/10 del factor estimado para la mortalidad en solución (Baffaut y Benson 2003). El coeficiente de partición en las heces fue de 0,90, asumiendo que el 90% de las bacterias se encontraba en solución (Soupir *et al.* 2006)

6.4.7 Escenarios de Contaminación

De acuerdo a lo mencionado en el punto anterior, fueron evaluados los siguientes escenarios de carga animal vacuna: a) carga intermedia ($C= 0,5$ EV); b) carga alta ($C= 1$ EV). La carga animal se consideró uniformemente distribuida y constante durante todo el año.

Con respecto al coeficiente de partición bacteriana (K_d , denominado BACTKDQ en el modelo SWAT, con un rango entre $0-500 \text{ m}^3 \text{ Mg}^{-1}$) se evaluaron los siguientes escenarios: a) valor que propone el modelo SWAT por *default* ($K_d= 175 \text{ m}^3 \text{ Mg}^{-1}$) y b) valor promedio para los suelos de cuenca bajo estudio ($K_d= 10 \text{ m}^3 \text{ Mg}^{-1}$).

Bajo estos cuatro escenarios se evaluó la concentración de *E. coli* (UFC.100 ml⁻¹) de forma diaria para el año 2000.

6.5 Análisis estadístico

Para evaluar la eficiencia del modelo se utilizó el coeficiente de determinación (R^2) y la medida de eficiencia de Nash–Sutcliffe (ENS) (Nash y Sutcliffe 1970). El indicador de eficiencia ENS indica cuán bien el set de datos observados vs. simulados ajusta la relación 1:1. Donde,

$$R^2_N = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (Sim_i - obs_i)^2}{\sum_{i=1}^n (obs_i - Obs_{media})^2} \right]$$

Los valores de R^2 y ENS pueden variar entre 0 y 1. Ramanarayanan *et al.* (1997) sugiere que el modelo de predicción se considera aceptable o satisfactorio si el $R^2 > 0,6$ y ENS $> 0,5$. Moriasi *et al.* (2007) clasificó la eficiencia de los modelos como excelente (ENS $> 0,9$), muy buena (ENS = 0,75 a 0,89), buena (ENS = 0,50 a 0,74) aceptable (ENS = 0,25 a 0,49), pobre (0 a 0,24) y no satisfactorio (ENS < 0).

6.6 RESULTADOS

6.6.1 Calibración y Validación

Para el período de calibración (2000-2002), (Tabla 6.1), se incluyeron tres variables, la curva número, la intercepción del canopeo y el tiempo “retardo” de escurrimiento superficial.

Tabla 6.1. Valores de entrada del SWAT modificados en el proceso de calibración.

<i>Parámetro</i>	<i>Descripción</i>	<i>Input File</i>	<i>Valor de calibración</i>
CN2	Curva Número	.Mgt- subbasin (Calibration tool)	Se disminuyó 5 unidades para todas las HRUs
CNMAX	Intercepción canopeo	.HRU	Se ajustó a 10 mm
SURLAG	Tiempo de “retardo” de escurrimiento superficial	Basin Input File	Se ajustó a 1 día

En la Tabla 6.2 se observa el R^2 y el R^2 ENS diarios y mensuales para el período de calibración. A su vez, la Figura 6.4 muestra de forma gráfica la eficiencia del modelo para ambas escalas de tiempo. La Eficiencia resultó adecuada en base a los criterios de Ramanarayanan *et al.* (1997) y de Moriasi *et al.* (2007). Por su parte los valores de R^2 indican que el modelo explicó entre el 50% y el 80% de la variabilidad analizada. El máximo ajuste se logró en el período de calibración con la Escala Mensual. A su vez, durante el período de validación el máximo ajuste le correspondió a la Escala Diaria. En valores absolutos, la simulación sobreestimó los valores de escurrimiento en ambos períodos para las dos escalas temporales. En la calibración los escurrimientos fueron sobreestimados en un 36,4% y 40,2% para la escala mensual y diaria respectivamente, mientras que en la validación los mismos fueron sobreestimados en 10,2% para los valores mensuales y 56,7% para los diarios.

Tabla 6.2. Eficiencia de Nash-Sutcliffe y R^2 para la predicción de escurrimientos diarios y mensuales para el período de calibración (2000-2002) y el período de validación (2003-2005).

<i>Microcuenca “Los Patricios” (300 ha)</i>	<i>Diarios</i>		<i>Mensual</i>	
	R^2	R^2_{ENS}	R^2	R^2_{ENS}
Calibración (2000 - 2002)	0,58	0,34 (aceptable)	0,87	0,68 (buena)
Validación (2003 - 2005)	0,76	0,2 (buena)	0,6	0,33 (aceptable)

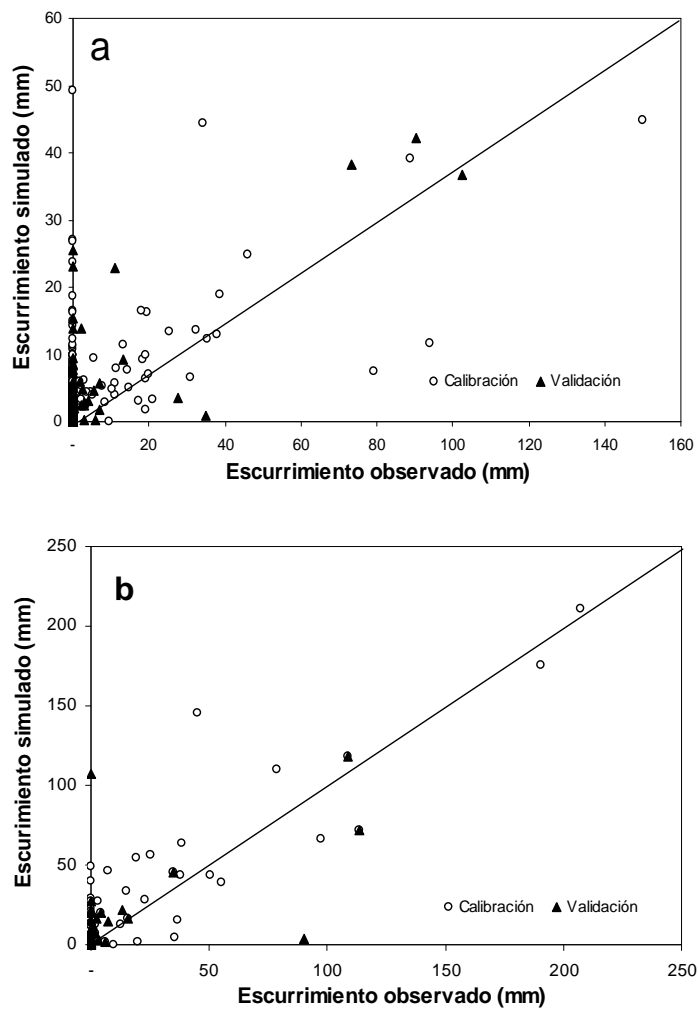


Figura 6.4. Distribución de los pares de escurrimiento (mm) observado y simulado para la calibración (círculos vacíos) y validación (círculos llenos) en la escala diaria (a) y mensual (b) en relación a la recta 1:1.

6.6.2 Escenarios de contaminación biológica

Los escenarios de contaminación evaluados mostraron importantes diferencias entre sí. En el escenario **C 1 Kd 175** la carga bacteriana llegó a valores cercanos a 218,8 UFC.100 ml⁻¹ mientras que en el escenario **C 0,5 Kd 10** los valores fueron muy inferiores llegando a 94,9 UFC.100 ml⁻¹ (Figura 6.5). El aumento de la carga animal de 0,5 EV a 1 EV elevó la concentración bacteriana en 99,9 % para el Kd 10 y 98,4% para el Kd 175 mientras que para el escenario de aumento del Kd, de 10 a 175 mL g⁻¹ se encontró un aumento de la concentración bacteriana de 16,8% para la carga de 0,5 EV y 15,3 % para la carga de 1 EV. Las Figuras 6.6 a),b),c),d) muestran las comparaciones entre tratamientos de forma gráfica para el período simulado. Como se observa en todas las figuras, el tratamiento que presentó concentraciones bacterianas más elevadas fue el tratamiento C1 Kd 175 mientras que el tratamiento C0,5 Kd 10 presentó las concentraciones más bajas. Sin embargo, la dinámica en el tiempo de dicha concentración fue similar para todos los tratamientos.

Por otro lado, como se observa en la Figura 6.7, existió una elevada correlación entre la concentración bacteriana del agua de escurrimiento y el caudal de la microcuenca para el escenario Kd=10 pero no así para Kd=175. Por su parte, tanto la concentración como producción de sedimentos no se correlacionaron con la concentración bacteriana simulada (datos no presentados).

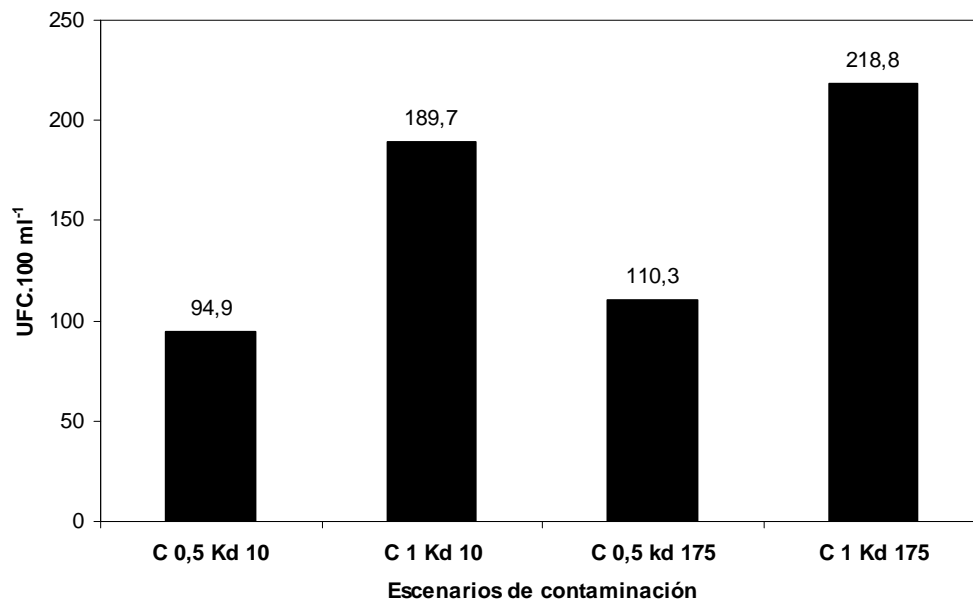
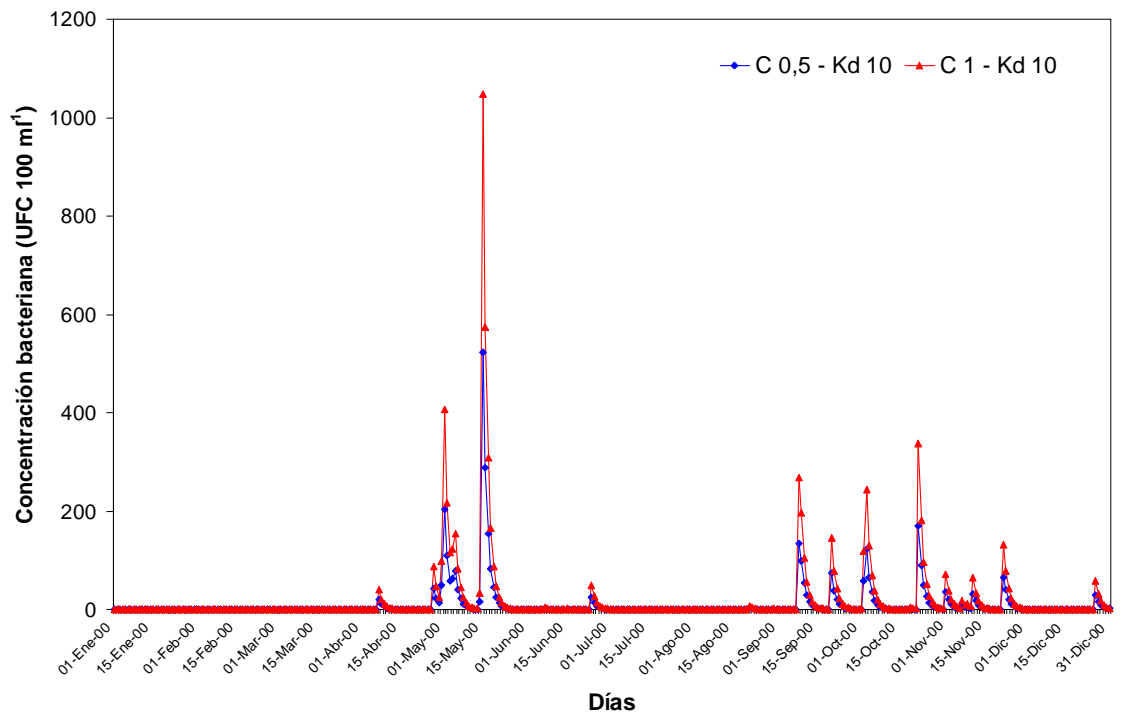
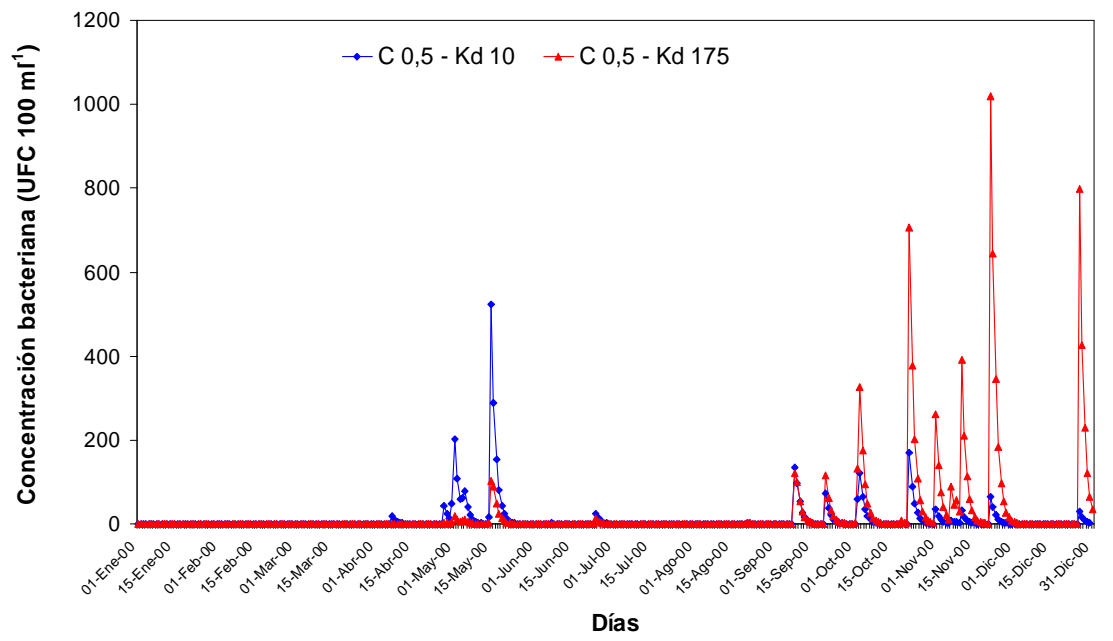


Figura 6.5. Promedio de UFC 100 ml⁻¹ para el año 2000 para los escenarios de contaminación evaluados (C=carga animal en EV; Kd=Coeficiente de partición bacteriana (ml g⁻¹)).

a)



b)



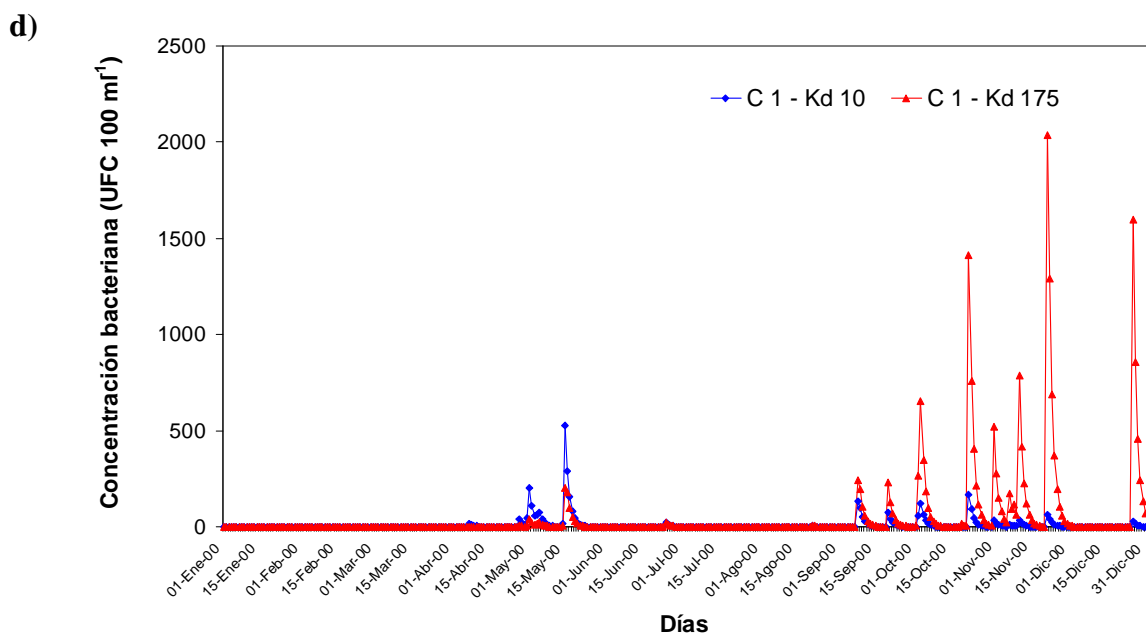
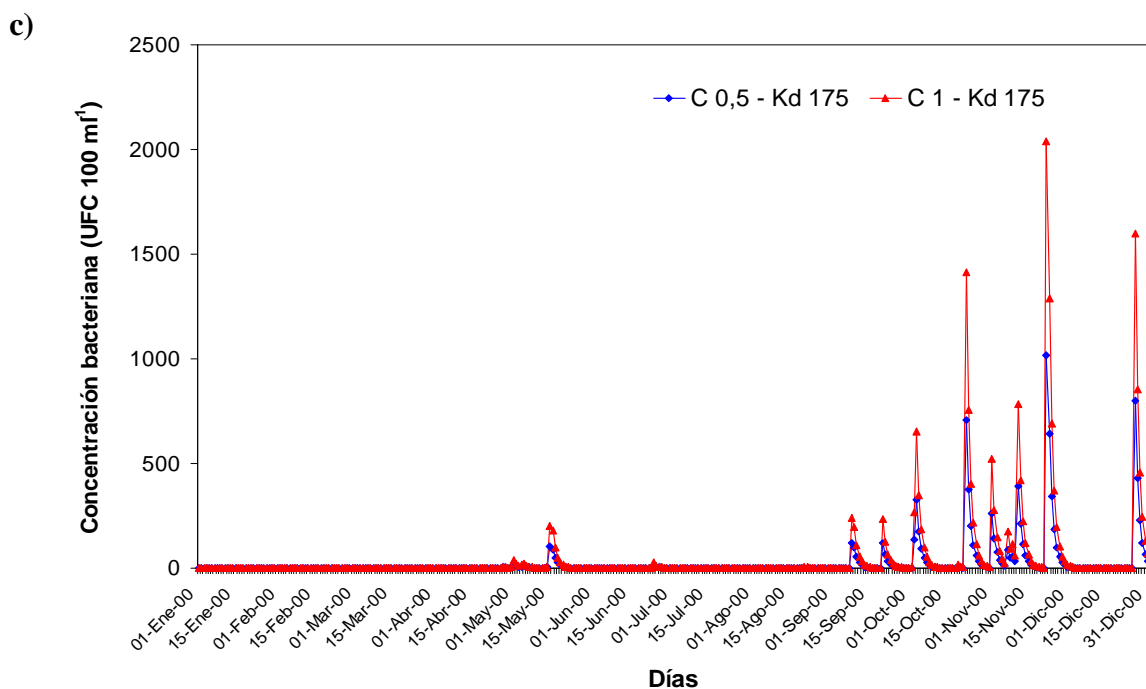


Figura 6.6. Concentración de coliformes fecales (UFC.100 ml⁻¹) y sedimentos (mg.l⁻¹) diarios para el año 2000, para las comparaciones entre cargas animales y entre Kd bacterianos. a) C 0,5 Kd 10 vs C1 Kd 10; b) C 0,5 Kd 175 vs C1 Kd 175; c) C 0,5 Kd 10 vs C0,5 Kd 175; d) C 1 Kd 10 vs C1 Kd 175.

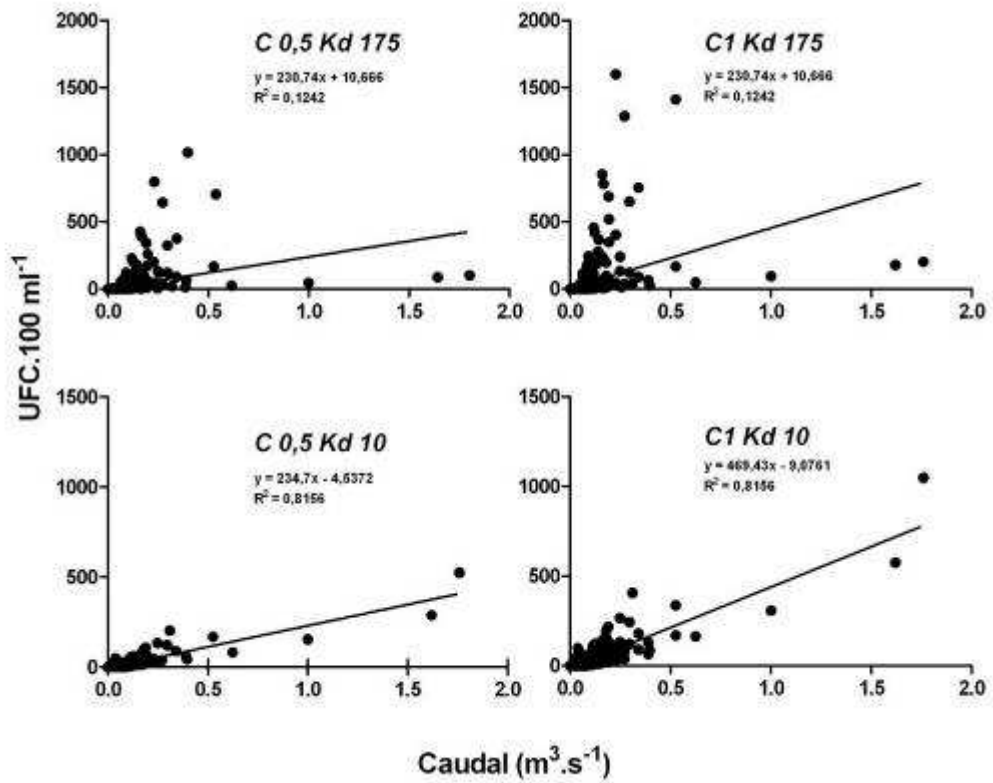


Figura 6.7. Regresiones lineales entre los caudales simulados ($m^3 s^{-1}$) y la concentración de coliformes fecales simulados (UFC 100 ml^{-1}) para los cuatro escenarios evaluados.

6.7 DISCUSIÓN

6.7.1 Modelo hidrológico

La media anual de precipitaciones de los años analizados (enero-2000 a diciembre-2005) fue de 1103 mm, prácticamente igual a la media histórica (1074 mm). A su vez la variabilidad inter e intraanual de las lluvias resultó semejante al informado por INTA San Pedro (2010). Por ende las simulaciones fueron realizadas bajo un período representativo de lluvias.

En general se observó una adecuada eficiencia del modelo SWAT y un buen ajuste de los valores simulados respecto de los observados. Un resultado llamativo fue la superioridad de eficiencia del modelo a escala diaria en la validación en relación a los datos diarios obtenidos en la calibración y los datos mensuales de la validación. En ambos casos era esperable que la eficiencia diaria de la validación fuera menor a la encontrada en la calibración y menor a la escala mensual. Una posible explicación puede encontrarse en el hecho que existió una importante diferencia en los eventos de lluvia entre ambos períodos. En el período de validación existieron una gran cantidad de días sin lluvias resultando en escurrimientos muy bajos o nulos aumentando de esta forma la eficiencia del modelo. Algunos autores como Vázquez Amábile *et al.* (2005) también encontraron períodos de validación con eficiencias superiores al de calibración. Uno de los factores determinantes en la exactitud del AVSWAT son los datos meteorológicos, así, la cercanía de las estaciones meteorológicas del cierre de la microcuenca fue un factor que presumiblemente haya influido en las importantes eficiencias que muestra la Tabla 6.2. Debe destacarse que este ajuste se logró aún en una microcuenca de tan bajas dimensiones, lo que no permitiría la compensación de errores. De la misma forma Arnold y Allen (1996) usando mediciones de tres cuencas

en Illinois con tamaños de 122 a 246 km², pudieron validar el escurrimiento superficial, el flujo de agua subterránea y la evapotranspiración entre otros parámetros. En el otro extremo Santhi *et al.* (2001) realizaron validaciones extensivas de caudales para dos cuencas de Texas con un tamaño de 4,000 km². Arnold *et al.* (1999b) por su parte evaluaron caudales y producción de sedimentos en la cuenca del Golfo de Texas con áreas de drenaje de 2,253 a 304,260 km².

6.7.2 Escenarios de contaminación

Lo señalado en el punto anterior sugiere que el modelo hidrológico ajustado resultaba robusto, otorgando confiabilidad al análisis de la producción de sedimentos y el transporte biológico derivado de estos procesos hidrológicos.

Para el año evaluado (2000) se registraron más de 10 episodios de alto transporte bacteriano hacia la vaguada, donde la concentración de coliformes fecales en todos los escenarios planteados resultó elevada. Según USEPA (1986), a partir de 1968 se estableció como estándar de calidad de aguas una concentración de coliformes fecales de 200 UFC 100 ml⁻¹. A su vez Dupchak (1999) señala que el agua de bebida para terneros de ganado bovino no debería contener más de 1 UFC de coliformes 100 ml⁻¹ de agua y no más de 20 UFC 100 ml⁻¹ para el caso de las vacas. Específicamente para la bebida humana la mayoría de las regulaciones en diversos países no permite la presencia de coliformes fecales, o si lo permite, está en el orden de 1 a 2,2 UFC 100 ml⁻¹. Como se puede observar en las Figuras 6.6 a),b),c),d) prácticamente en cada evento de precipitación y escurrimiento se han superado estos estándares de calidad.

Como quedó evidenciado en la Figura 6.5, tanto la carga animal como el Kd fueron importantes en la estimación de la concentración total de los coliformes fecales. Cuando

la carga se duplicó la concentración bacteriana aumento de forma lineal con un aumento promedio de 99% mientras que el aumento de 17.5 veces en el Kd aumentó la concentración de coliformes fecales en promedio un 16%. Es decir esta última variable fue significativamente menos sensible.

Para los escenarios Kd 175 se esperaba que el transporte de contaminantes fecales estuviese acompañado por una mayor concentración de sedimentos en la vaguada. Sin embargo no existieron relaciones significativas entre los coliformes fecales y la cantidad o concentración de sedimentos en la vaguada. Por eso se puede inferir que la mayor concentración bacteriana encontrada en estos escenarios se deben exclusivamente al efecto de supervivencia de las bacterias en el suelo (la supervivencia en el sólido fue 10 veces mayor a la supervivencia en la solución). En contraposición, en los escenarios de Kd 10 debido a la baja adsorción de las bacterias al suelo, se encontraron correlaciones muy altas entre el escurrimiento y la concentración bacteriana. Esta dinámica puede apreciarse en los primeros episodios de escurrimiento en donde los escenarios Kd 10 presentaron las mayores concentraciones bacterianas, mientras que hacia fines del período evaluado la tendencia se revierte seguramente explicada por una acumulación creciente de bacterias asociadas al suelo.

6.8 CONCLUSIONES

La dinámica de transporte bacteriano simulada en la microcuenca corrobora la íntima relación entre los eventos de precipitaciones y escurrimientos y la contaminación biológica de los cursos de agua en escenarios caracterizados por suelos con bajo KD como los de San Pedro. Sin embargo esta relación no fue corroborada para el caso de suelos con Kd 175 (*hipótesis 4.1*).

Los valores de Kd bacteriano hallados en la cuenca del arroyo del Tala que se mencionan en los capítulos anteriores indicarían que, aunque bajos, incidirían de forma significativa en la dinámica de transporte de coliformes fecales. Por ende es de interés la inclusión de parámetros como el Kd medido en los modelos de predicción de la contaminación biológica (*hipótesis 4.2*)

Por otro lado, la falta de estaciones de monitoreo de la calidad de aguas conjuntamente con la creciente intensificación productiva principalmente en la zona bajo estudio, propicia un ambiente de riesgo para la salud humana y animal. En este sentido se pudo observar una importante concentración de coliformes fecales en la microcuenca constituyendo así ambientes de alto riesgo de contaminación biológica (*hipótesis 4.3*).

Si bien los estándares de calidad de agua para la Argentina son incipientes, existen niveles guías para calidad de agua para bebida humana y animal, para recreación y para la conservación de la biota en los cuales descansar para realizar una mejor gestión del territorio. En este sentido en esta aplicación del modelo SWAT todos los niveles guías fueron sobrepasados. En este marco, la utilización de modelos computacionales será trascendental como soporte de decisiones tanto productivas como ambientales. La utilización de este modelo permitió, además de conocer la dinámica de contaminación de la cuenca bajo estudio, estudiar la potencialidad de dicho modelo para utilizarse a

gran escala en cuencas agropecuarias y continuar evaluado la factibilidad de uso en cuencas de la Pampa Ondulada.

Capítulo VII

CONCLUSIÓN GENERAL

7. CONCLUSIÓN GENERAL

En el desarrollo de los capítulos precedentes se pudo corroborar la importancia del factor edáfico en la dinámica de transporte de contaminantes biológicos en el área estudiada y bajo diferentes escalas de percepción. A *escala de laboratorio*, tanto las propiedades físicas, químicas como fisicoquímicas han probado el importante rol que desempeñan en la configuración de los ambientes de adsorción evaluados. Principalmente se destacaron aquellas propiedades asociadas a las partículas elementales finas, tales como el contenido de arcillas, la CIC y la superficie específica. El PSI y el pH, resultaron importantes para describir las tendencias negativas de adsorción bacteriana. Por su parte, tanto la CIC y el pH como la presencia de cationes mono y divalentes, pusieron de relieve el carácter electrostático del fenómeno adsorptivo. A su vez, se encontró que el tamaño de los agregados edáficos así como la calidad del medio líquido, pueden afectar los procesos de adsorción y son importantes en la caracterización del transporte bacteriano. En especial los agregados entre 50-20 μm , cuya presencia resultaba significativa en el escurrimiento de los suelos evaluados, fueron los que presentaron una mayor concentración bacteriana. Se comprobó también la existencia de incrementos en el grado de los procesos adsorptivos debido a la utilización de medios líquidos con mayor fuerza iónica. Además se comprobó que las situaciones edáficas estudiadas presentaban diferencias importantes en la distribución, adsorción y afinidad bacteriana de sus agregados y sedimentos respectivos. Por ello, el estudio de la adsorción sobre distintos tamaños de agregados y en medio líquidos contrastantes puede proporcionar pautas para la elaboración de propuestas de mitigación de la contaminación biológica de los suelos y cursos de agua representativos de una región determinada. En este sentido surge la importancia de la evaluación de la

estabilidad estructural de los suelos ya que dicha propiedad indicaría la propensión de los suelos a generar agregados de tamaños compatibles con los procesos de transporte bacteriano.

A *escala de parche*, las simulaciones de lluvia sobre suelo contaminado corroboraron lo hallado en laboratorio ya que se observaron relaciones muy estrechas entre las mediciones realizadas *in vitro* y a campo. Este hecho avalaría la posibilidad de extrapolación de las determinaciones de laboratorio hacia escalas de menor detalle. En esta última escala, la adsorción y K_d bacteriana lograron explicar en gran medida el transporte bacteriano observado, aunque sin desmedro de las variables edáficas antes mencionadas. Cuando aumentaban la adsorción bacteriana y el K_d , mayor era la retención bacteriana y por ende, menor resultaba la salida total de microorganismos del sistema.

A *escala de cuenca* aplicando el modelo SWAT, se puso nuevamente de manifiesto la incidencia de la adsorción y K_d bacteriano en el transporte de contaminantes biológicos a través del escurrido superficial. Además, es evidente que el antecedente de humedad de los suelos es un aspecto clave a tener en cuenta ya que modifica la posibilidad de adsorción y la dinámica de la infiltración/escurrimiento de una cuenca. En este sentido se corroboró una estrecha relación lineal y positiva entre las lluvias y la concentración bacteriana en el escurrido, principalmente en la simulación de los escenarios reales, es decir, con carga animal de 0,5 EV y K_d medido *in situ* de 10 ml g^{-1} . Es de destacar que esta linealidad no se verificó al emplear los valores por default que incluye el modelo (175 ml g^{-1}). El empleo del mismo puso además de relieve la importancia de considerar la escala temporal del análisis. Esto se debe a que la simulación de largo plazo con valores de K_d por default arrojaron concentraciones de microorganismos en el escurrimiento, 20% superiores a las predichas con K_d medido *in situ* (10 ml g^{-1}). Esta

aparente contradicción con los resultados del ensayo de lluvia simulada antes mencionado se debería a que los sistemas con mayor K_d ofrecen una mayor protección determinando un incremento de la supervivencia de los microorganismos en el suelo y por ende eleva la posibilidad de su transporte hacia los cursos de agua en lluvias posteriores. Estos resultados muestran que los programas de simulación de reciente desarrollo como el mencionado SWAT permitirían modelizar complejos procesos de contaminación biológica y química, perfilándose como un importante instrumento soporte en la toma de decisiones de las problemáticas planteadas. También se puede advertir la importancia de evaluar los procesos estudiados bajo diferentes niveles de percepción ya que existen propiedades emergentes y específicas para cada escala de trabajo utilizada.

En síntesis, se puede destacar que para las cuencas hídricas de Pampa Ondulada se determinó que los Argiudoles poseen un potencial significativamente mayor de adsorción y retención bacteriana que los Natracualfes. Teniendo en cuenta que las zonas altas de las cuencas regionales son dominadas por los Argiudoles se configurarían éstos como ambientes de reserva bacteriana donde los contaminantes biológicos volcados en su superficie, permanecerían un tiempo prolongado siendo movilizados hacia sectores más bajos recién ante eventos de precipitación de cierta magnitud. Por el contrario, los ambientes bajos dominados por Natracualfes, volcarían rápidamente a los cursos de agua circundantes los contaminantes biológicos aportados a su superficie, debido a la baja retención bacteriana asociada a sus propiedades edáficas. De esta forma la dinámica de contaminación biológica en los bajos sería rápida y lineal con la carga bacteriana presente en el momento del escurrimiento. Esta dinámica de contaminación es compleja ya que está relacionada con todos los procesos degradatorios de la cuenca.

Alteraciones en los procesos erosivos, de escurrimiento o cambios en los sistemas productivos podrían modificar la intensidad de estos procesos contaminantes.

Los diversos estudios realizados a nivel de laboratorio, parche y cuenca, indican que el uso de la tierra agrícola-ganadero realizado sin una adecuada planificación, puede afectar la calidad de agua para diversos usos en sistemas hidrológicos frágiles como la cuenca del Tala y cuencas similares. Por ello deberían implementarse acciones destinadas al aumento de la infraestructura de medición y monitoreo de los cursos de agua, especialmente de aquellos con potencialidad para bebida humana, animal y con fines recreativos como son los de la región estudiada.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aboim, M. C. R. 2004. Impacto à Diversidade Bacteriana e sua Relação com Indicadores de Qualidade do Solo em Ecossistemas Agrícolas e Naturais de Mata Atlântica, na Região Serrana do Rio de Janeiro. Tese Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde.
- Abu-Ashour, J., H. Lee, , 2000. Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff. *Environ. Toxicol.* 15,149–153.
- Ackerman, G.; D.E. Depietri y O.J. Santanatoglia. 2000. Detección de áreas con diferente vulnerabilidad a erosionarse a partir de la morfodinámica del paisaje. *Rev. Facultad de Agronomía.* 20: 235-243.
- Aislabie, J., J.J. Smith, R. Fraser, y M. McLeod. 2001. Leaching of bacterial indicators of faecal contamination through four New Zealand soils. *Aust. J. Soil Res.* 39:1397–1406.
- Arnold, J.G., y P.M. Allen. 1996. Estimating hydrologic budgets for three Illinois watersheds. *J.Hydrol.* 176: 57-77.
- Arnold, J.G., Srinivasan, R., Muttiah, R. S. y J. R. Williams. 1998. Large area hydrologic modeling and assessment part I: model development. *Journal of American Water Resources Association*, 34(1), 73-89.
- Arnold, J.G. y P.M. Allen. 1999. Automated methods for estimating baseflow and groundwater recharge from stream flow records. *J. Amer. Water Resour. Assoc.* 35(2): 411-424.
- ASAE Standards. 2000. D384.1: Manure production and characteristics (pp. 659-661). ASAE: St. Joseph, MI.
- Auer, M., S. Niehaus. 1993. Modelling fecal coliform bacteria I. Field and laboratory determination of loss kinetics. *Water Res.* 27, 693–701.
- Baffaut, C. y V. W. Benson. 2003. A bacterial TMDL for Shoal creek using SWAT modeling and DNA source tracking. Pp. 035-040 In *Total Maximum Daily Load (TMDL) environmental regulations-II proceedings of the conference.* ASAE Publication No.701P1503. ASAE: St. Joseph, MI.
- Bengtsson, G., 1989. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb. Ecol.* 8, 235–248.

- Bhattacharyya, A. 1943. On a measure of divergence between two statistical populations defined by their probability distributions. *Bulletin of the Calcutta Mathematical Society* 35: 99–109.
- Biehl, L. y D. Landgrebe. 2002. MultiSpec: a tool for multispectral--hyperspectral image data analysis, *Computers & Geosciences*, v.28 n.10, p.1153-1159, December 2002 [doi>10.1016/S0098-3004(02)00033-X]
- Blake, G.R. y K.H. Hartge. 1986. Bulk Density, in A. Klute, ed., *Methods of Soil Analysis, Part I. Physical and Mineralogical Methods: Agronomy Monograph no. 9* (2nd ed.), pp. 363-375.
- Borst, M.,A. Selvakumar. 2003. Particle-associated microorganisms in stormwater runoff. *Water Res.* 37, 215–223.
- Brookes, J.D., Antenucci, J.P., Hipsey, M.R., Burch, M.D., Ashbolt, N. y Fergusson, C.. 2004. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs, *Environment International*, 30(5): 741-759
- Burton G.A, D. J.R. Gunnison, G.R. Lanza. 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 633-638.
- Burton, C.H. y C. Turner. 2003. Health risks from pathogens in livestock manure. In *Manure management. Treatment strategies for sustainable agriculture*. Ed. Silsoe Research Institute, UK. 451 pp.
- Calcagno, A. T, 2000. Gestión integrada de los recursos hídricos. Gestión de la calidad del agua. Curso internacional de Posgrado. Gestión integrada de los recursos hídricos.
- CFI (Consejo Federal de Inversiones). 1972. Contribución al conocimiento geohidrológico de la Cuenca del Arroyo del Tala. Estudio de Aguas Subterráneas del Noreste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. 22 PP.
- Chagas, C.I., O.J. Santanatoglia, M.G. Castiglioni, M.J. Massobrio, A. Buján, C. Iurrtia. 2008. Número de curva de escurrimiento para microcuenca de Pampa Ondulada bajo labranza convencional y siembra directa. *Ciencia del Suelo.* 26:71-79
- Chagas, C.I. 2007. Calidad y contaminación del agua superficial como recurso para bebida animal en una cuenca representativa de Pampa Ondulada. Tesis Doctoral (Área Toxicología). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, 9 de agosto de 2007.
- Chagas C.I., M.V. Piazza, M. De Siervi, O.J. Santanatoglia, J. Moretton, M. Paz, M.G. Castiglioni, C. Iurrtia. 2007. Calidad de agua de escorrentía superficial en sistemas

ganaderos extensivos e intensivos de Argentina. *Revista Agrochimica (Italia)*. LI (2-3):130-136.

- Chagas, C.I., O.J. Santanatoglia, E. A. Rienzi. 1993. Análisis del escurrimiento de una microcuena utilizando distintas metodologías. *Revista Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales (España)*. 8:177-180.
- Characklis, G.W., M.J. Dilts, O.D. Simmons III, C.A. Likirdopulos, L.A.H. Krometis, y M.D. Sobsey. 2005. Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Research*, 39, 1773–1782.
- Crane, S. R., J. A. Moore, M. E. Grismer, y J. R. Miner. 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: a review. *Trans. ASAE* 26:858–866.
- Crawley, M.J. 2007. *The R book*. John Wiley and Sons, Ltd.
- Clarke, R. 1993. *Water: The International Crisis*. MIT Press. (en Timothy E. Ford y Rita R. Colwell 1995 *Disminución Global de la Calidad Microbiológica del Agua: Un Llamado a la Acción*. Copyright © 1996 American Academy of Microbiology. 1325 Massachusetts Avenue, N.W. Washington, D.C. 20005-4171
- Coote, D.R., L.J. Gregorich (Editors). 2000. *The health of our water- Toward a sustainable agriculture in Canada*. Publication 2020. Research branch. Agriculture and Agri-food, Canada. 173 PP
- Corapcioglu, M. Y., y A. Haridas. 1984. Transport and fate of microorganisms in porous media: a theoretical investigation. *J. Hydrol.* 72:149-169.
- Cosentino, D. y C. Pecorari. 2002. Limos de baja densidad: impacto sobre el comportamiento físico de los suelos de la región pampeana. *Ciencia del Suelo* 20(1):9-16
- Coyne, M.S., R.A. Gilfillen, A. Villalba, Z. Zhang, R. Rhodes, L. Dunn, R.L. Blevins. 1998. Soil and fecal-coliform trapping by grass filter strips during simulated rain. *J. Soil Water Conserv.* 50, 405–408. 27, 935–945.
- Curriero, F. C., J. A. Patz, J. B. Rose, S. Lele. 2001. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948–1994. *Am. J. Public Health.* 91(8): 1194-1199.
- Dai, X., J. Boll. 2003. Evaluation of attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to soil particles. *J. Environ. Qual.* 32, 296–304.

- Davies C.M., J.A.H. Long, M. Donald, N.J. Ashbolt. 1995. Survival of faecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol*;61(5):1888–96.
- Defra, 2002. The Government's strategic review of diffuse water pollution from agriculture in England. *Agriculture and water: a diffuse pollution review*. Department for Environment Food, and Rural Affairs, United Kingdom. PP 16-24
- Derjaguin, B., y L. D. Landau. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim. U.R.S.S.* 14:633-662.
- Drozd, C. y J. Schwartzbrod, 1996. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1227 – 1232.
- Dupchak K, 1999. Evaluating Water Quality for Livestock. Fuente=<http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/nutrition/bza01s06.html>
- Edwards, D. R., M.S. Coyne, P.F. Vendrell, T.C. Daniel, P.A. Jr. Moore, J.F. Murdoch. 1997. Fecal coliform and streptococcus concentrations in runoff from grazed pastures in northwest Arkansas. *J. Am. Water Resour. Assoc.*, 33:413-422.
- Entry, J.A., R.K. Hubbard, J.E. Theis, J.J. Fuhrmann. 2000. The influence of vegetation in riparian filterstrips on coliform bacteria: II. Survival in soils. *J. Environ. Qual.* 29, 1215–1224.
- Enzinger, R.M. y R.C. Cooper. 1976. Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Appl. and Environment. Microbiol.* 31 758-763.
- Fiener, P. y K. Auerswald. 2003. Effectiveness of grassed waterways in reducing runoff and sediment delivery from agricultural watersheds. *Journal of Environmental Quality* 32(3): 927-936.
- Fontes, D. E., E. L. Mills, G. M. Hornberger, y J. S. Herman. 1991. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Applied and Environmental Microbiology* 57(9): 2473–2481.
- Gannon, J., U. Mingelgrin, M. Alexander y R.J. Wagenet. 1991. Bacterial transport through nonhomogenous soil. *Soil Biol. Biochem.* 23:1155–1160.
- Gary, H.L. y J.C. Adams. 1985. Indicator bacteria in water and stream sediments near Snowy Range in southern Wyoming. *War. Air Soil Pollut.* 25, 133-144.

- Gerba, C. 1996. Pathogens in the environment. In I.L. Pepper, C.P. Gerba, and M.L. Brusseau (ed.) *Pollution science. for soil classification for making and interpreting soil surveys*. Academic Press, New York. p. 278–299.
- Gerba, C.P. y G. Bitton. 1984. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater, p. 65–88. In G. Bitton and C. P. Gerba (ed.), *Groundwater pollution microbiology*. Wiley, New York, N.Y.
- Gomez, J.A., M.A. Nearing, J.V. Giraldez, E.E. Alberts. 2001. Analysis of sources of variability of runoff volume in a plot experiment using a numerical model. *J. Hydrol.* 248, 183–197.
- Gray, T.R.G., P. Baxby, L. R. Hill, y M. Goodfellow. 1968. Direct observation of bacteria in soil, p. 171–197. In T. R. G. Gray and D. Parkinson (ed.). *The ecology of soil bacteria*. University of Toronto Press, Toronto, Canada.
- Guan, T.Y. y R.A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness. A review. *J. Environ. Qual.*, 32:383-392.
- Guber, A.K., D.R. Shelton, Y.A. Pachepsky. 2005. Effect of manure on *Escherichia coli* attachment to soil. *J. Environ. Qual.* 34, 2086–2090.
- Hagedorn, C., D.T. Hansen, G.H. Simonson. 1978. Survival and movement of fecal indicator bacteria in soil under conditions of saturated flow. *J. Environ. Qual.* 7, 55–59.
- Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, D. E. Herriott, y P. I. Tarr. 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol. Infect.* 118:193–195.
- Hoek, E.M.V., y G.K. Agarwal. 2006. Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 298:50–58.
- Huub H.M.R., W. Norde, J. Lyklema y A J. B. Zehnder. 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 4, Issue 4. 191-197.
- Hutchison M.L., L.D. Walters, S.M. Avery, B.A. Synge y A. Moore. 2004. Levels of zoonotic agents in British livestock manures *Letters in Applied Microbiology* 39 (2) , 207–214
- INTA, 1973. Carta de Suelos. Hoja 3360-33. Pérez Millán. E=1:50.000. 45 PP
- Irurtia C.B., R . Mon. 1994. Microsimulador de lluvia para determinar infiltración a campo. Publicación N° 76, Instituto de Suelos, CIRN, INTA, 18 PP.

- Jacobs, A., F. Lafolie, J.M. Herry, M. Debroux. 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59: 35–45.
- Jamieson, R., R. Gordon, D. Joy, y H. Lee. 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters: a review of current watershed scale modeling approaches. *Agric. Water Manag.* 70:1–17.
- Jha, M. K., P. W., Gassman, y J. G. Arnold. 2007. Water Quality Modeling for the Raccoon River Watershed using SWAT. *Transactions of the ASABE* 50(2): 479-493.
- Jiang, D., Q. Huang, P. Caib, X. Rong, W. Chena. 2007. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54, 217–221.
- Judge, J., A. Greig, I. Kyriazakis, M.R. Hutchings. 2005. Ingestion of feces by grazing herbivores—risk of inter-species disease transmission. *Agric Ecosyst Environ.* 107:267–274.
- Kamphorst, A., 1987. A small rainfall simulator for the determination of erodibility. *Nether. J. Agric. Sci.*, 35: 407-412.
- Kay, D., A. C. Edwards, R. C. Ferrier, C. Francis, C. Kay, L. Rushby et al. 2007. Catchment microbial dynamics: The emergence of a research agenda. *Progress in Physical Geography*, 31, 59–76.
- Klute, A. 1986. Water retention: Laboratory methods. In: Klute, A. (ed.). *Methods of soil analysis*. 2nd.ed. ASA and ASSA. Madison, WI, USA. V. 1, 1.188 p.
- Kraemer, F.B., C.I. Chagas, J. Moreton y M. Paz. 2008. Capacidad de resuspensión de patógenos en sedimentos de la cuenca del Tala. Efecto del medio líquido. *Actas del Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Potrero de los Funes (SL), Argentina. Pag. 492.
- LaBelle, R. B. y C. P. Gerba. 1979. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:93-101.
- Lim, K. J., B. Engel, y A. Hetzroni. 2001. Incorporation and evaluation of a river quality model to NAPRA WWW decision support system. ASAE Paper No. 012127, presented at the 2001 ASAE Annual International Meeting. St. Joseph, Mich.: ASAE.

- Ling, T. Y., E. C. Achberger, C. M. Drapcho y R. L. Bengtson. 2002. Quantifying adsorption of an indicator bacteria in a soil–water system. *Transactions of the ASAE*, 45, 669–674.
- Lipson S.M. y G. Stotzky 1983. Adsorption of Reovirus to Clay Minerals: Effects of Cation- Exchange Capacity, Cation Saturation, and Surface Area. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 46, No. 3. p. 673-682 0099-2240/83/090673-10\$02.00/0
- Lombardi, B., M. A. Dapino, P. R. Montardit y R. M. Torres Sánchez. Aproximación al valor de superficie específica por un método manual y simple. *Jornadas SAM - CONAMET - AAS 2001*, Septiembre de 2001 251-256.
- Marshall, K.C. 1971. Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. In *Soil Biochemistry*, 409–445.
- Marshall, K. C. 1975. Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13:357-373.
- Marshall, K.C., 1980. Adsorption of microorganisms to soils and sediments. In: Bitton, G., Marshall, K.C. (Eds.), *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, Wiley, New York, pp. 317–330.
- Marshall, K.C. 1985. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In: Savage, D.C., Fletcher, M. (Eds.), *Bacterial Adhesion*, Plenum Press, New York, pp. 133–161.
- Mills, A. L., J. S. Herman, G. M. Hornberger, y T. H. DeJesus. 1994. Effect of solution ionic strength and iron coating on mineral grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3300– 3306.
- Mizuno, I. M.N Arrigo, H.A. Svartz. 1978. Método rápido para la determinación de la humedad equivalente. *Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo.*, Buenos Aires (Argentina). 25-30 Set. Resúmenes de trabajos y comunicaciones p. 4.
- Moore, J., J. Smyth, E. Baker, J. Miner, D. Moffitt. 1989. Modeling bacteria movement in livestock manure systems. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 32, 1049–1053.
- Moriasi, D. N., J. G. Arnold, M. W. Van Liew, R. L. Bingner, R. D. Harmel, y T. L. Veith. 2007. Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. *Trans. ASABE* 50(3): 885-900.
- Morrás, H.J.M. 1995. Mineralogy and cation exchange capacity of the fine silt fraction in two soils from the Chaco region (Argentina). *Geoderma* 64: 281-295.

- Muirhead, R.W., R.P. Collins, P.J. Bremer. 2005. Erosion and subsequent transport state of *Escherichia coli* from cowpats. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2875–2879.
- Muirhead, R.W., R.P. Collins, P.J. Bremer. 2006. Interaction of *Escherichia coli* and soil particles in runoff. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:3406–3411
- Nagels, J.W., R.J. Davies-Colley, A.M. Donnison y R.W. Muirhead. 2002. Faecal contamination over flood events in a pastoral agricultural stream in New Zealand. *Water Science and Technology*, 45(12), 45-52.
- Nash, J. E. y J. V. Sutcliffe. 1970. River flow forecasting through conceptual models, part 1sA discussion of principles. *J. Hydrol.*, 10 (3), 282-290.
- Nearing, M.A., L.J. Lane, E.E. Alberts, J.M. Laflen. 1990. Prediction technology for soil erosion by water: status and research needs. *Soil Sci. Am. J.*, 54:1702-1711.
- Nicholson, F.A., M.L. Hutchinson, K.A. Smith, C.W. Keevil, B.J. Chambers y A. Moore, 2000. A study on faro manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain. A report to: The Ministry of Agriculture Fisheries and Food.
- Oliver, D.M., C.D. Clegg, P.M. Haygarth, A.M. Heathwaite. 2005. Assessing the potential for pathogen transfer from grassland soils to surface waters. *Adv. Agron.* 85, 125–180.
- Oliver, D.M., A.L. Heathwaite, P.M. Haygarth y C.D. Clegg. 2005. Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *Journal of Environmental Quality*, 34, 918–925.
- Oliver, D. M., C.D. Clegg, A.L. Heathwaite, P.M. Haygarth. 2007. Preferential attachment of *Escherichia coli* to different particle size fractions of an agricultural grassland soil *Water, Air & Soil Pollution* 185:1-4369-375
- Ongley, E.D. 1997. *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos*. Estudio FAO Riego y Drenaje n° 55, FAO, Roma. 116 PP.
- Palmateer, G., D. McLean, W. Kutas, S. Meissner. 1993. Suspended particulate/bacterial interaction in agricultural drains. In: Rao, S.S. (Ed.), *Particulate Matter and Aquatic Contaminants*, Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- Piazza, V. 2006. *Calidad de agua de escorrentía en sistemas intensivos y extensivos de ganado bovino en la Cuenca del Arroyo del Tala, Provincia de Buenos Aires*. Trabajo de Intensificación para acceder al título de Grado de la carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 80 PP.

- Powelson, D.K., y A.L. Mills. 2001. Transport of Escherichia coli in sand columns with constant and changing water contents. *J. Environ. Qual.* 30:238–245.
- Ramanarayanan et al., 1997. Using APEX to Identify Alternative Practices for Animal Waste Management: Part II. Model Application. ASAE, St. Joseph, MI.
- Reddy, K.R., R. Khaleel, M.R. Overcash. 1981. Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *J. Environ. Qual.* 10, 255–266.
- Rodgers, P., C. Soulsby, C. Hunter y J. Petry. 2003. Spacial and temporal bacterial quality of a lowland agricultural stream in north east Scotland. *Sci. Total Environ.* 314–316:289–302.
- Rodda, H.J, U. Shankar, S. Demuth, B. Diekkruger, (ed.), M.J. Kirkby (ed.), U. Schroder. 1999. The application of geographical information systems to water quality modelling in New Zealand. Proceedings of an International Conference held at the Technical University of Braunschweig, Germany, 10-14 March 1997, IAHS Publication no. 254, PP 243-251.
- Roodsari, R., D. R. Shelton, A.. Shirmohammadi, Y. A. Pachepsky, A. M. Sadeghi, y J. Starr. 2005. Fecal coliform transport as affected by surface conditions. *Trans. ASAE* 48:1055–1061.
- Rose, J. B., P. R. Epstein, E. K. Lipp, B. H. Sherman, S. M. Bernard, y J. A., Patz. 2001. Climate variability and change in the United States: potential impacts on water and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environ. Health Perspect.* 109 (suppl 2): 211–221.
- SAGPyA (Secretaría de Ganadería, Agricultura, Pesca y Alimentación). 1995. El deterioro de las tierras en la República Argentina.. 288 PP.
- SAGPyA (Secretaría de Ganadería, Agricultura, Pesca y Alimentación). 2001 Estadísticas ganaderas, bovinas y ovinas. http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0/index/ganaderia/index_ganaderia.htm
- Santanatoglia, O.J., A. Iorio de, C.I. Chagas, M. Massobrio, A. Rendina, M. Castiglioni, M. Bargiela. 2006. Esgurrimiento, sólidos totales y propiedades químicas del agua del arroyo del Tala (San Pedro, Buenos Aires, Argentina). *Rev. Facultad de Agronomía (Argentina)*, 26:121-131.
- Santhi, C., J. G. Arnold, J. R. Williams, L. M. Hauck y W. A. Dugas. 2001. Application of a watershed model to evaluate management effects on point and nonpoint source pollution. *Trans. ASAE* 44(6):1559-1570.

- Schijven, J.F., S.M. Hassanizadeh y H.A.M. Bruin. 2002. Column experiments to study nonlinear removal of bacteriophages by passage through saturated dune sand. *Journal of contaminant hydrology*, 58, 243-259.
- Schillinger J.E. y J.J. Gannon. 1985. Bacterial adsorption and suspended particles in urban stormwater. *J. Water Pollut Control Fed.* 57:384–9.
- Sharma, M. M., Y. I. Chang, y T. F. Yen. 1985. Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria facilitating transport through porous media. *Colloids Surf.* 16:193–206.
- Scholl, M. A., y R. W. Harvey. 1992. Laboratory investigations on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 26:1410–1417.
- Sherer, B.M., J.R. Miner, J. A. Moore, J.C. Buckhouse. 1992. Indicator bacterial survival in stream sediments. *J. Environ. Qual.*, 21: 591-595.
- Snedecor, G.W.y W.G. Cochran. 1980. *Statistical methods*, 7th Edn. Iowa University Press.
- Signor, R.S, D.J. Roser, N.J. Ashbolt, J.E. Ball. 2005. Quantifying the impact of run-off events on the microbiological contaminant concentrations entering drinking surface source waters. *J. Water Health*, 3:453-468.
- Stevik T. K., A. Geir, J.F. Hanssen y P.D. Jenssen. 1999. The Influence Of Physical And Chemical Factors On The Transport Of E. Coli Through Biological Filters For Wastewater Purification *Wat. Res.* Vol. 33, No. 18, pp. 3701±3706.
- Soil Conservation Service. 1972. *Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soils samples.* Soil Surv. Report, 1. USDA, Washington (USA).
- Soupir, M. L., y S. Mostaghimi. 2006. Partitioning of E. coli and Enterococci between planktonic & sorbed phases in surface runoff from pasturelands. ASAE Meeting Paper No. 062197. ASAE: St. Joseph, MI.
- Stainer, R.Y., E.A. Adelberg, J.L. Ingraham, y M.L. Wheelis. 1979. *Introduction to the microbial world.* Prentice–Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Stenstrom, T. A. 1989. Bacterial hydrophobicity: An overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil
- Stotzky, G. 1985. Mechanisms of adhesion to clays, with referente to soil systems. In *Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance*, 195–253. D. C. Savage and M. H. Fletcher, eds. New York, N.Y.: Plenum Publishing.

- Sutherland, I. W. 1983. Microbial exopolysaccharides-their role in microbial adhesion in aqueous systems. *Crit. Rev.Microbiol.* 10:173-201.
- Tian, Y., P. Gong, J. Radke, J. Scarborough. 2002. Spatial and temporal modeling of microbial contaminants on grazing farmland. *J. Environ. Qual.* 31, 860–869.
- Tyrrel, S.F.y J.N. Quinton. 2003. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J. Appl. Microb.* 94 (s1), 87–93.
- USEPA. 1986. Ambient water quality criteria for bacteria. EPA440/5–84–002. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, D.C.
- USEPA. 1996. The Quality of our Nation's water: 1996. Office of Water 305 (b) Report, Washington, DC.
- USEPA. 1997. The index of watershed indicators. EPA-841-R-97-010. 56 PP.
- Vazquez Amábile, G. y B. A. Engel. 2005. Use of SWAT to compute groundwater table depth and stream flow in Muscatatuck River Watershed. *Transaction of the ASAE.* Vol 48(3): 991-1003.
- Verwey E.J.W. y J.Th.G. Overbeek. 1948.Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam (1948)
- Vinten A.J.A., J.T. Douglas, D.R. Lewis, M.N. Aitken y D.R. Fenlon. 2004. *Agricultural Water Management* 70 1–17 Assessing microbial pollution of rural surface waters A review of current watershed scale modeling approaches.
- Walker, S., S. Mostaghimi, T. Dillaha, F. Woeste. 1990. Modeling animal waste management practices: Impacts on bacteria levels in runoff from agricultural lands. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 33, 807–817.
- Walkley, A., I.A. Black. 1934. An examination of the Degjareff method for determining soil organic matter and a proponed modification of the cromi acid titration method. *J. Amer. Soc. Agr.* 24, 256-275.
- Wang, X., A. M. Melesse, y W. Yang. 2006. Influences of Potential Evapotranspiration Estimation Methods on SWAT's Hydrologic Simulation in a Northwestern Minnesota Watershed. *Trans. ASABE* 49(6): 1755-1771
- Weaver, R. W., N. O. Dronen, B. G. Foster, F. C. Heck, y R. C. Fehrmann. 1978. *Sewage Disposal on Agricultural Soils: Chemical and Microbiological Implications.* Vol. II: Microbiological implications. Ada, Okla.: U.S. EPA.
- White, K. L., I. Chaubey, B. E. Haggard, y M. D. Matlock. 2004. Comparison of two methods for modeling monthly TP yield from a watershed. *ASABE Meeting Paper* No. 042162. ASABE:St. Joseph, MI.

- White, K. L. y I. Chaubey. 2005. Sensitivity Analysis, Calibration, and Validations for a Multisite and Multivariable SWAT Model. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 41(5): 1077-1089.
- WHO. 2008. Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first and second addenda, Microbial Aspects, pp122. WHO Geneva 2008.
- World Development Report. 1993. Investing in Health. Oxford University Press.

ANEXOS

Anexo. 1. Simulación de lluvias.

Microsimulador de lluvias.

En la parte superior se apoya la caja porta goteo en cuya base están los 49 picos formadores de gotas. Los picos tiene un diámetro interno de 0.5 mm y poseen una alimentación de agua desde un reservorio de acrílico, colocado en una de las aristas de la estructura. Las gotas formadas tienen entre 4.7 a 5.1 mm de diámetro. La base del reservorio puede variar de altura con la cual se modifica la intensidad de lluvia de acuerdo a la escala graduada en el soporte (desde 0 a 300 mm/h). En la parte inferior existe un marco metálico que delimita la microparcela de medición de 50 cm de lado con uno de los costados en forma de vertedero por donde se recibe el escurrimiento.

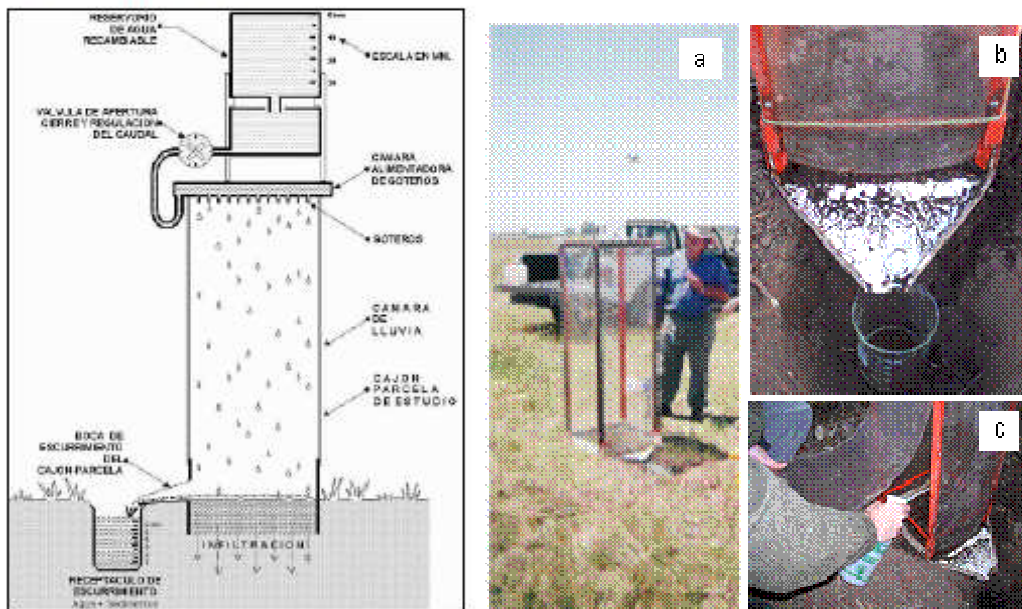
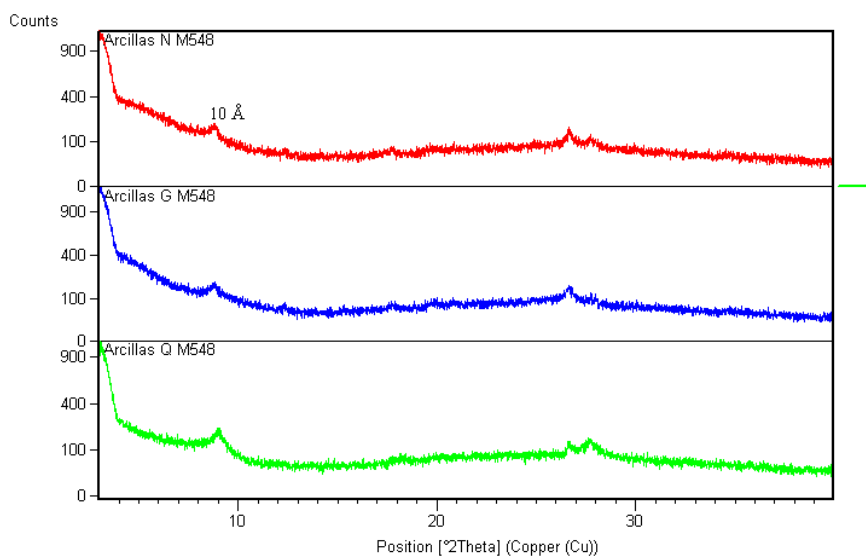


Figura 9.1. Descripción del microsimulador de lluvias.

Figura 9.2 a) Microsimulador instalado. b) Microsimulador en funcionamiento y c) aplicación de inóculo bacteriano sobre la parcela.

Anexo. 2. Ejemplo de caracterización mineralógica de las muestras evaluadas.

a)



b)

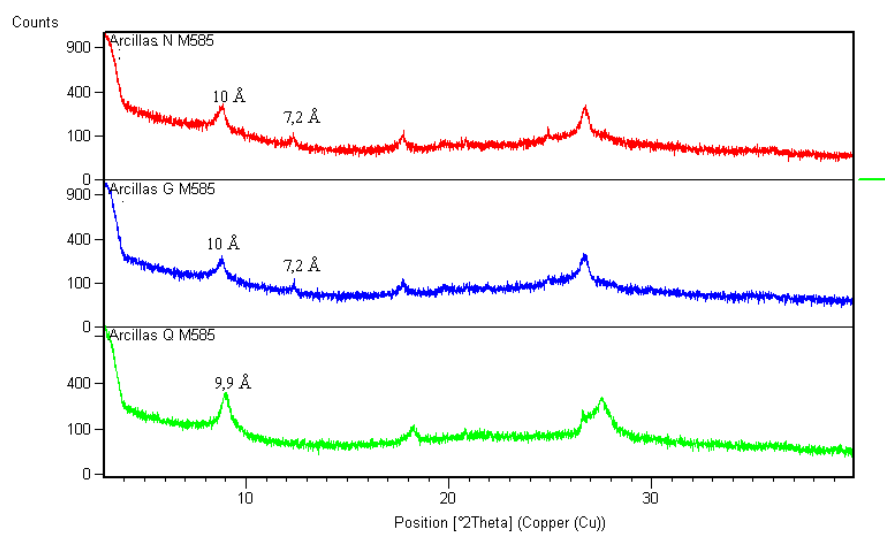


Figura 9.3. Mineralogía de arcillas (homiónicas orientadas, glicoladas y calcinadas) a) Los Patricios 1. b) Ríos.

Anexo. 3. Escurreimientos observados y simulados a diferentes escalas y períodos.

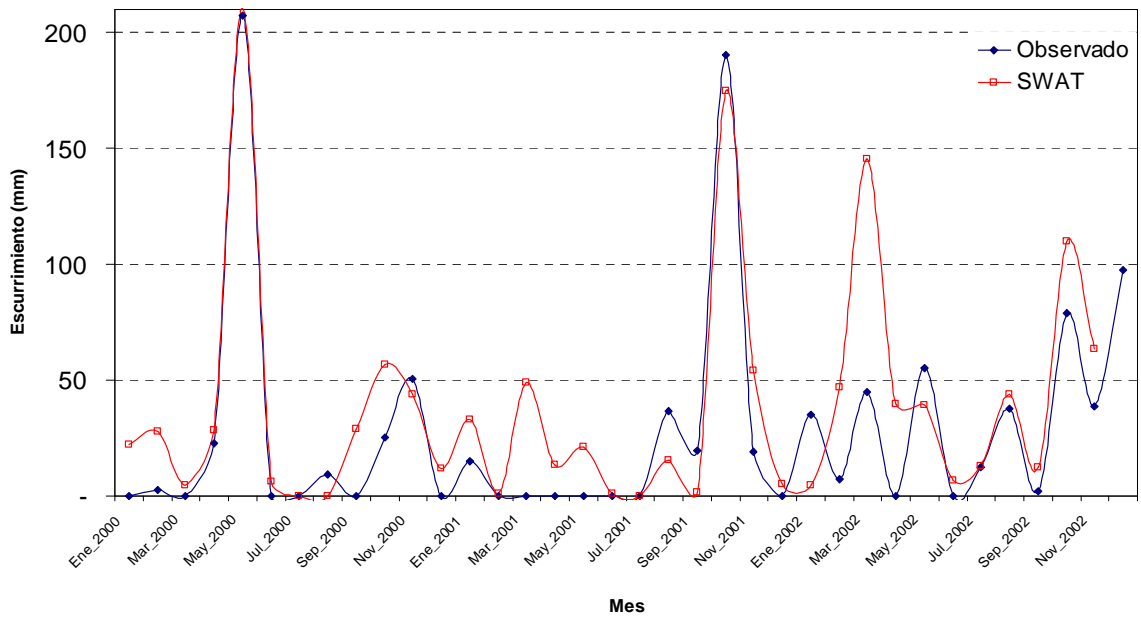


Figura 9.5. Escurreimiento observado y simulado a escala mensual para el período de calibración (2000-2002).

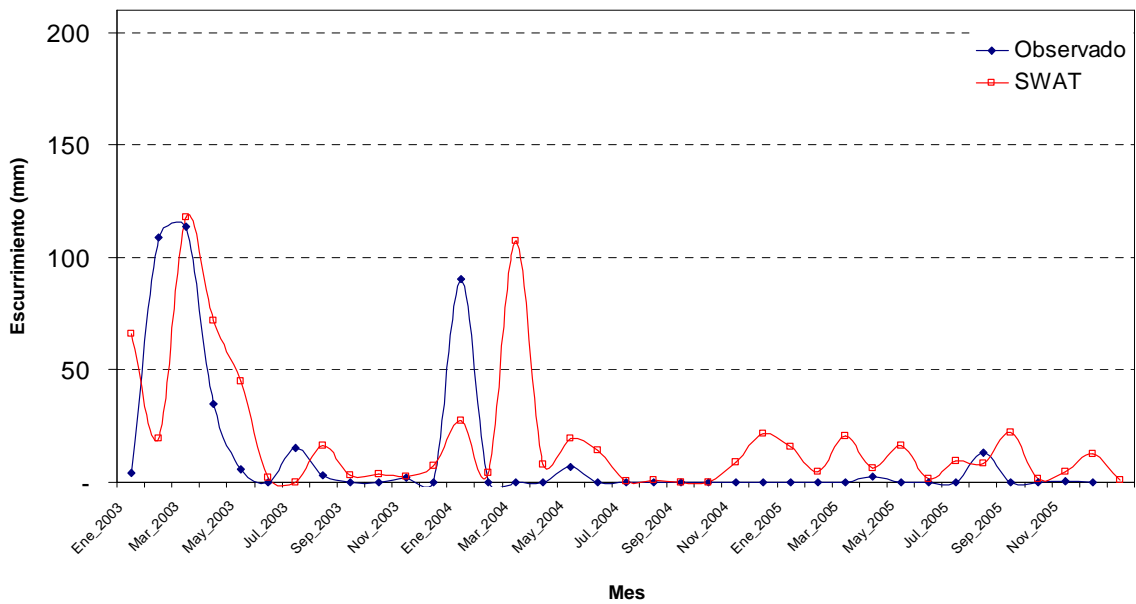


Figura 9.6. Escurreimiento observado y simulado a escala mensual para el período de validación (2003-2005).

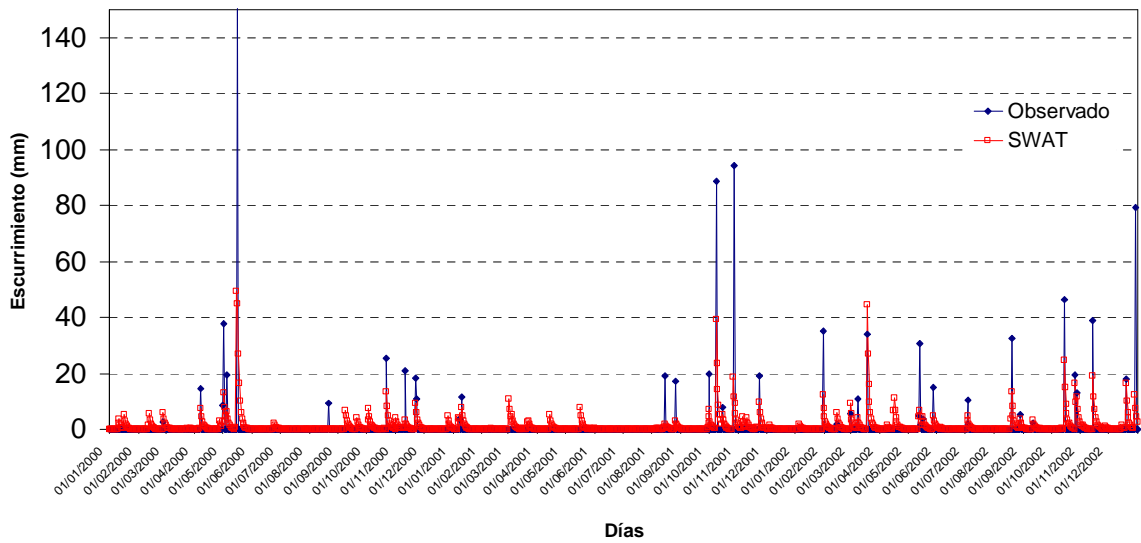


Figura 9.7. Ecurrimiento observado y simulado a escala diaria para el período de calibración (2000-2002).

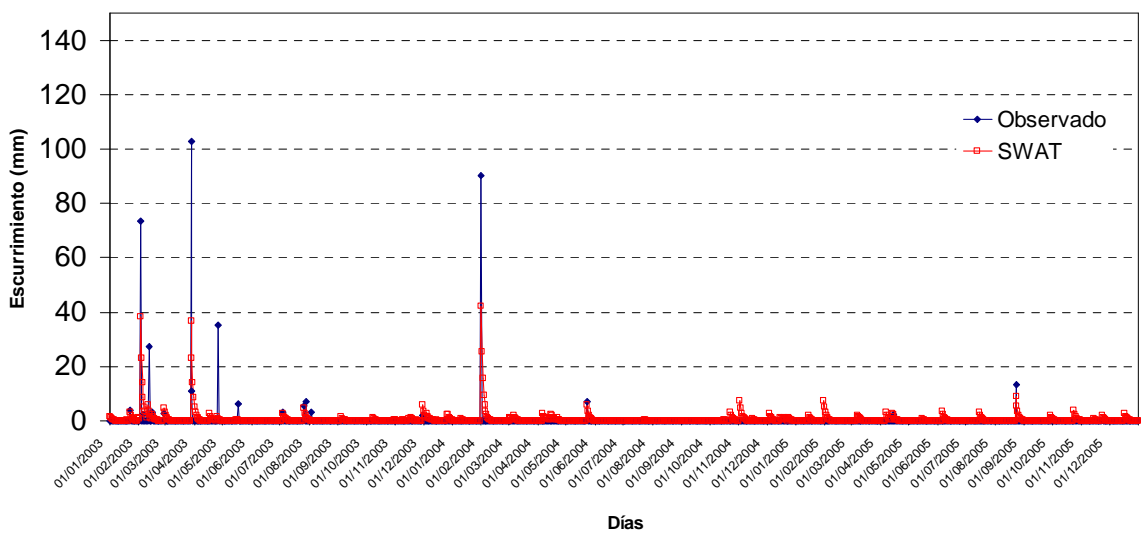


Figura 9.8. Ecurrimiento observado y simulado a escala diaria para el período de validación (2003-2005).

