

**MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN LA
ESCORRENTÍA DE UN SUELO ENMENDADO CON ESTIÉRCOL VACUNO**

Por

Angel Manuel Domenech Emmanuelli

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

de

SUELOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2013

Aprobado por:

Gustavo A. Martínez Rodríguez, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Myrna Alameda, M.Sc.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

David Sotomayor Ramírez, Ph.D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Jaime A. Acosta Martínez, Ph.D.
Representante de Estudio Graduados

Fecha

Elvin Román Paoli , Ph.D.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Dairy manure application to agricultural soils is a common disposal method of the material that will provide nutrients and organic carbon to the soils, but at the same time adds fecal indicator bacteria (FIB). The effects of vegetation, manure application levels (0, 0.7, 1.4 and 3.1 cm of manure¹), rainfall after manure application (1, 3, 7 and 14 days) and elapsed time after application manure (1, 7 and 14 days) on the concentrations of *Escherichia coli* (*E. Coli*) and *Enterococcus* spp. in runoff were measured. An undisturbed Humatas clay soil (Typic Haplohumults) in runoff trays with *Brachiaria decumbens* was used as the experimental unit. The simulated rainfall intensity was 70 mm hr⁻¹ for a 30 minute runoff event. In soils without recent dairy manure application *Enterococcus* spp. concentrations in runoff on day 1 were higher than in soil with vegetative cover but the opposite was observed for *E. coli*. In soils with manure application at 1.4 cm, *Enterococcus* spp. concentrations in runoff were not affected by vegetative cover and were persistent in successive runoff events on days 1 to 7, but on day 14 were significantly lower than on previous days.

In soils with manure application at 1.4 cm and without vegetative cover, *E. coli*. concentrations were persistent in successive runoff events on days 1 through 7, but on day 14 were significantly lower than on previous days; *Enterococcus* spp. concentrations in runoff were not affected by successive rainfall events with or without vegetative cover. Concentrations of *Enterococcus* spp. but not of *E. coli* were reduced as the number of days without rainfall increased after application. In soils with a history of manure application but without recent manure application, the recovery of *Enterococcus* spp. in runoff was 1% of that in the soil, while in soil with manure application the recovery was 25% of that applied and in soil.

¹ Dairy manure application depth (cm) is volume of manure per unit area of soil (cm³/cm²)

Manure management must consider the level of manure application, the time passed after manure application with the goal of reducing the concentrations of *E. coli* y *Enterococcus* spp. in runoff.

RESUMEN

La aplicación de estiércol vacuno a suelos agrícolas es una forma común para disponer del material y proveer nutrientes a suelos, pero a la misma vez aporta microorganismos indicadores de contaminación (MIC). Se evaluaron los efectos de cobertura vegetal, niveles de aplicación de estiércol (0, 0.7, 1.4 y 3.1 cm de estiércol²), lluvias sucesivas luego de aplicación de estiércol (1, 3, 7 y 14 días) y tiempo transcurrido después de la aplicación de estiércol (1, 7 y 14 días) sobre las concentraciones de *Escherichia coli* (*E. Coli*) y *Enterococcus* spp. en la escorrentía. Se utilizó un suelo intacto Humatas arcilloso (Typic Haplohumults) en bandejas de escorrentía con *Brachiaria decumbens*. La lluvia fue de una intensidad de 70 mm hr⁻¹ durante 30 minutos de escorrentía. En suelos sin la aplicación reciente de estiércol, las concentraciones de *Enterococcus* spp. en la escorrentía del día 1 fueron mayores en el suelo desnudo en comparación con el suelo con cobertura vegetal y lo opuesto se observó para *E. coli*. En suelos con la aplicación de estiércol de 1.4 cm las concentraciones de *Enterococcus* spp. en escorrentía no se afectaron por la cobertura y fueron persistentes en lluvias sucesivas desde el día 1 al día 7 y en el día 14 fueron significativamente menores. En suelos con la aplicación de estiércol de 1.4 cm y sin cobertura, las concentraciones de *E. coli* en escorrentía fueron persistentes en lluvias sucesivas desde el día 1 al día 7 y en el día 14 fueron significativamente menores que en los días anteriores; las concentraciones de *Enterococcus* spp. no se afectaron por lluvias sucesivas. Las concentraciones de *Enterococcus* spp. pero no las de *E. coli* se redujeron conforme transcurrieron mayor número de días (1, 7 y 14) después de la aplicación, lo cual sugiere que la viabilidad de *Enterococcus* spp. se reduce conforme pasa más tiempo después de la aplicación de estiércol. En suelos con historial de aplicación, pero sin la aplicación de estiércol reciente,

² La profundidad (cm) de aplicación de estiércol se refiere al volumen (cm³) de aplicación por unidad de área (cm²) de suelo (cm³/cm²).

solamente se recuperó menos del 1% de *Enterococcus* spp. con tres eventos consecutivos de escorrentía, mientras que en suelos con la aplicación reciente de estiércol se recuperó un 25% del potencial. El manejo del estiércol vacuno a los suelos debe considerar el nivel de aplicación de estiércol y el tiempo transcurrido después de la aplicación de estiércol con la meta de reducir las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en la escorrentía.

DEDICATORIA

A mis padres Angel M. Domenech y Laura E. Emmanuelli por su amor y perseverante lucha, esfuerzo, bendiciones y dedicación en mi formación espiritual y académica.

A mis abuelos Andrés M. Domenech, María M. Rivera y Virgenmina Santiago que desde la Gloria Divina me cuidan, protegen y me dan la fortaleza para culminar con esta etapa de mi vida.

A mi hermana Luryan Domenech, mi hermano Ricardo A. Domenech por su apoyo en todo momento y mis sobrinos Elwin A. Cardona y Angel R. Cardona y a mis familiares que de una forma u otra me han apoyado en todos mis logros.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar dar las gracias a mi Dios, por darme vida, salud, bendiciones y sobre todas las cosas, la esperanza de haber finalizado mis estudios de maestría.

Agradecer de manera sincera a mi tutor y presidente del comité graduado Dr. David Sotomayor Ramírez y los miembros el Dr. Gustavo Martínez y la Prof. Myrna Alameda por darme la oportunidad de poder realizar estudios en el Recinto Universitario de Mayagüez

A los doctores Raúl Macchiavelli y Linda Beaver por sus sugerencias y colaboración en los análisis estadísticos.

A mis compañeros(as) de maestría Gerson Ardila, Ronald Dorcinvil, Alexander Recaman, Alexis Tirado, Víctor Asencio, Jacqueline Vega, Litza López, Ixia Avilés, David Zavala, Manuel Pérez, por su amistad, ayuda en los trabajos de campo y laboratorio a lo largo de la investigación.

A Gloria Aguilar, Evelyn Roselló, Floripe Cancel, Jeannette Morales, Rocío Suárez y Héctor Pino, Rosalie Ramos por su ayuda, comprensión, amistad y dedicada labor en la logística general de la investigación y de mi vida académica

A todos los trabajadores de la Finca Alzamora, en especial a Eduardo Badillo por su disposición en los trabajos de campo, su ayuda incondicional y amistad ofrecida.

Al señor José Noriega por su apoyo a los trabajos de investigación, por darme la oportunidad de trabajar en su finca y por la confianza depositada y la disposición incondicional y a los trabajadores de las finca.

Al doctor Nelson Rolong por sus sugerencias y colaboración en mi proceso de culminar mi tesis y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de esta investigación y de mi vida en la Universidad de Puerto Rico.

En especial a Yarisel A. Lozano por estar a mi lado en todos los momentos y proceso a lo largo de mi maestría.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE ANEJOS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
1.0 REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1 Utilización de microorganismos como indicadores	4
1.2 Microorganismos indicadores de contaminación.....	5
1.3 Estatus de calidad microbiana en aguas de Puerto Rico	6
1.4 Disposición de estiércol en sistemas agrícolas	7
1.5 Sobrevivencia y transporte de microorganismos indicadores de contaminación	8
1.5.1 Tiempo de aplicación del estiércol	8
1.5.2 Forma de aplicación del estiércol	8
1.5.3 Factores ambientales que afectan la sobrevivencia de los MIC en el suelo	9
1.6 Prácticas de manejo en la aplicación del estiércol	9
1.6.1 Uso de filtros vegetativos.....	10
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Selección de las bandejas de escorrentía y colección del suelo.....	12
2.2 Simulador de lluvia.....	13
2.3 Experimento I y II: Efecto de la presencia de cobertura vegetal y niveles de aplicación de estiércol en la pérdida de MIC por escorrentía	13

2.4 Experimento III: Efecto del tiempo luego de la aplicación del estiércol vacuno en la pérdida de MIC por escorrentía	16
2.5 Experimento IV: Factores que inciden en la pérdida de MIC por escorrentía.....	17
2.6 Muestreo de escorrentía	18
2.7 Análisis de MIC mediante las pruebas de Colilert® y Enterolert®	19
2.8 Limpieza de materiales utilizados en los ensayos.....	20
2.9 Análisis estadístico.....	21
2.10 Control de calidad de metodología IDEXX.....	21
2.11 Cuantificación de MIC en charca de retención.....	21
2.12 Precisión de metodología IDEXX	22
2.13 Comparación de las metodologías de conteo de enterococos mediante filtración por Membrana y el uso de Enterolert® (IDEXX).....	22
3.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1 Control de calidad de metodología IDEXX.....	24
3.2 Concentraciones de MIC en la charca de retención.....	24
3.3 Precisión de metodología IDEXX	25
3.4 Comparación entre las metodologías de conteo de enterococos por filtración de Membrana y Enterolert® (IDEXX)	26
3.5 Experimento I.....	27
3.6 Experimento II	33
3.7 Experimento III.....	36
3.8 Experimento IV.....	38
4.0 CONCLUSIONES	41

5.0 RECOMENDACIONES.....	43
6.0 LITERATURA CITADA	44
7.0 ANEJOS.....	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el efecto de la presencia de cobertura vegetal en la pérdida de MIC por escorrentía.	14
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en el efecto de niveles de aplicación en la pérdida de MIC por escorrentía.	15
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos correspondientes al experimento III.	17
Cuadro 4. Descripción de los tratamientos utilizados para determinar los factores que inciden en la pérdida de MIC por escorrentía.	18
Cuadro 5: Promedio de las concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. aplicados a los suelos por experimento.	25
Cuadro 6: Concentraciones de <i>E. coli</i> en una muestra.....	25
Cuadro 7: Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cobertura vegetal sobre las concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en suelos sin aplicación reciente de estiércol. ..	28
Cuadro 8: Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cobertura vegetal sobre las concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en suelos con aplicación de estiércol.....	30
Cuadro 9. Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cuatro niveles aplicación sobre las concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en suelos con cobertura vegetal.	33
Cuadro 10: Concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal con cuatro niveles de aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.	35
Cuadro 11. Resumen del ANOVA para las concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en suelos que recibieron lluvia sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia.	36
Cuadro 12: Concentraciones de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en escorrentía desde la aplicación del estiércol vacuno en días sucesivos después del primer evento de lluvia.	37
Cuadro 13: Resumen de las concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. para el experimento IV.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relación entre la metodología IDEXX y filtro de membrana.....	27
Figura 2: Concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal sin aplicación reciente de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.	29
Figura 3: Concentraciones de <i>E. coli</i> colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal sin aplicación reciente de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.	29
Figura 4: Concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal con aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.	31
Figura 5: Concentraciones de <i>E. coli</i> colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal con aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.	31
Figura 6: Concentraciones de <i>E. coli</i> colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal durante diferentes días de simulación.	34
Figura 7: Concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. colectadas en la escorrentía en días transcurridos después de la aplicación de estiércol.....	38

LISTA DE ANEJOS

Anejo 1: Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos sin aplicación reciente de estiércol: <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	52
Anejo 2: Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos con aplicación de estiércol: <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	54
Anejo 3: Análisis de varianza para suelos con cobertura y cuatro niveles de aplicación de estiércol: <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	56
Anejo 4: Análisis de varianza para los suelos que recibieron lluvias sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia: <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	59
Anejo 5: Historial de aplicación de las bandejas utilizadas para este estudio.	63
Anejo 6: Bandejas utilizadas en los experimentos y los niveles de estiércol aplicado.	63
Anejo 7: Contajes comparativos de <i>Enterococcus</i> spp. mediante las pruebas con Enterolert (IDEXX) y Filtro de membrana.	64

INTRODUCCIÓN

El estiércol proveniente de vacas en ordeño y en pastoreo puede ser beneficioso para la producción agrícola, pero también puede representar un problema ambiental. La aplicación de estiércol a pasturas provee nutrientes y aumenta los niveles de materia orgánica del suelo (Rufete et al., 2006). No obstante, los aspectos negativos incluyen la presencia de organismos patógenos y cantidades inciertas de nutrientes lo cual puede crear una sobre acumulación de nutrientes en el suelo (Mishra et al., 2008). Los cultivos pueden sufrir desbalances nutricionales y se pueden generar altas concentraciones de nutrientes y de patógenos en la escorrentía (Durso et al., 2011).

En Puerto Rico existe un sistema de alta tecnología para el ordeño de vacas. Los animales pasan desde una sala de espera, a la sala de ordeño para luego ir a pastorear a los campos. En otros casos hay sistemas que los animales están en continuo confinamiento. El estiércol que es excretado por los animales es lavado de las estructuras y se transfiere por canales o cunetas a una charca de retención. Las prácticas de lagunas de tratamiento de residuos de NRCS (código 359) establecen que el material requiere un mínimo de 60 días en las charcas (USDA-NRCS, 1998). Posteriormente se aplica el estiércol en suspensión por medio de cañones de alta presión o cañones de transferencia tipo “honeywagon” a los predios (USDA-NRCS 2008; USDA-NRCS, 2012).

En Puerto Rico, la industria lechera cuenta con 330 vaquerías y 74,142 vacas de producción y horas. Las vaquerías ocupan un área de 24,319 ha (61,772 cuerdas) de terreno de las cuales 20,451 ha (51,946 cuerdas) están sembrados con pastos mejorados para corte y pastoreo (ORIL, 2010). Los terrenos de las vaquerías área reciben durante la aplicación de estiércol o mientras los animales pastorean, microorganismos indicadores de contaminación (MIC) que potencialmente pueden ser transportados por la escorrentía. Los MIC comúnmente

utilizados como indicadores de contaminación en agua son *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., coliformes fecales (Mishra et al., 2008) y *Salmonella* (Semenov et al., 2009), entre otros. Los MIC son bacterias que se encuentran mayormente en el tracto digestivo en animales de sangre caliente. Algunos a su vez pueden ser patogénicos (Mishra et al., 2008), y al tener contacto con el humano pueden ocasionar enfermedades gastrointestinales.

El estiércol producto de las actividades pecuarias es una de las principales fuentes de la contaminación de nutrientes a los cuerpos de agua en los Estados Unidos (EU) (USEPA, 2002; Soupir et al., 2006). La escorrentía transporta nutrientes que eventualmente promueven la eutroficación y aporta microorganismos a los cuerpos de agua. A pesar de las recomendaciones, existe evidencia que en Puerto Rico (Ramírez Ávila, 2005) hay sobre acumulación de nutrientes en suelos (Martínez et al., 2002) y que parte de esos nutrientes son transferidos por la escorrentía a cuerpos de agua (Sotomayor Ramírez et al., 2006; Ortega-Achury et al., 2007). Los organismos indicadores de contaminación persisten en los suelos que luego son transportados en escorrentía a cuerpos de agua (Rufete et al., 2006). La presencia de microorganismos en los cuerpos de agua representa un riesgo para la salud humana, el ganado y el buen uso del agua para la población (Meals et al., 2006).

En EU se han realizado estudios que documentan la presencia de MIC en el tejido de productos vegetales frescos debido a la aplicación de estiércol en suelos donde estos fueron cultivados (Cole et al., 1999), persistencia de MIC en el suelo (Rufete et al., 2006) y el transporte en la escorrentía (USEPA, 2002). En Puerto Rico es necesario documentar el transporte de MIC en la escorrentía para desarrollar estrategias de manejo adecuado para la aplicación del estiércol en los suelos.

Esta investigación tiene como propósito cuantificar las concentraciones de MIC en escorrentías que se generan de suelos con la aplicación de estiércol. Además, se pretende determinar los efectos de algunos factores en el momento de hacer las aplicaciones del excremento vacuno a los predios.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Cuantificar las concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación (MIC) en la escorrentía de suelos enmendados con estiércol y describir algunos factores que inciden en su transporte.

Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de nivel de aplicación, tiempo luego de la aplicación, eventos de lluvia sucesivos y cobertura, sobre la concentración de MIC en escorrentía proveniente de un suelo enmendado con estiércol vacuno.
- Cuantificar la sobrevivencia de MIC en un suelo enmendado con estiércol vacuno.
- Describir algunos de los factores que influyen sobre el transporte de los MIC.

1.0 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Utilización de microorganismos como indicadores

El riesgo de contaminación, tanto a nivel humano como ambiental, hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua. Determinar los tipos de microorganismos presentes y sus concentraciones, proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de derrames, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas. Frente a estas dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con organismos indicadores. Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero su identificación y cuantificación es rápida, económica y fácil. Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (Tallon et al., 2005; Díaz, 2008).

E. coli ha sido seleccionado como un buen indicador de contaminación fecal en las aguas ya que cumple con una serie de criterios. Por ejemplo, proviene de heces fecales de humanos y otros animales de sangre caliente, muestra un crecimiento mínimo en los ecosistemas acuáticos, es fácil de detectar mediante procedimientos sencillos y muestra resistencia a desinfectantes de otros patógenos (Redman, 2003). *E. coli* y *Enterococcus* spp. son igualmente aceptables para monitorear los cuerpos de agua dulce (Clesceri et al., 1998), siendo *Enterococcus* spp. tradicionalmente utilizado para el monitoreo de aguas costeras (Kani y Mills, 2000). Las especies de *Enterococcus* spp. que comúnmente se identifican en heces fecales del ganado vacuno son *E.*

faecium, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. cecorum* y *E. columbae* (Suárez, 2002). Se ha documentado que la alta densidad de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en cuerpos de agua recreacionales guarda relación con incidencias de enfermedades gastrointestinales en humanos (Bartram y Rees, 2000).

1.2 Microorganismos indicadores de contaminación

Las heces fecales de animales de sangre caliente contienen microorganismos siendo algunos de ellos patogénicos (Mishra et al., 2008). Los grupos de bacterias de mayor presencia en el estiércol son coliformes fecales y estreptococos. *Salmonella* spp. ha sido encontrada ocasionalmente (Soupir et al., 2006; Semenov et al., 2009). Los MIC de mayor preocupación son: *E. coli* 0157:H7, *Enterococcus* spp., coliformes fecales y estreptococcus fecales. Estos MIC han sido reportados en el estiércol de una gran variedad de especies de granja y animales salvajes, siendo los rumiantes la principal preocupación (Soupir et al., 2006). En la actualidad, *E. coli* es considerado uno de los mejores indicadores de bacterias de contaminación fecal en el agua potable debido a que es una bacteria termotolerante, prevalece en las heces de humanos y animales en comparación con otros coliformes termotolerantes y es fácil de detectar (Tallon et al., 2005). Los patógenos *E. coli*, *Enterococcus* spp. y coliformes fecales del estiércol causan problemas de contaminación en aguas superficiales y subterráneas (USEPA, 1999). Los MIC se transportan por escorrentía en aguas superficiales y por infiltración en aguas subterráneas luego de los eventos de lluvia (Gerba y Smith, 2005). En Puerto Rico, se ha reportado el cierre de las playas debido a la presencia de altas concentraciones de microorganismos (PREQB, 2011).

Las bacterias se adhieren a las partículas de suelo, provocando una reducción de su concentración en el agua de escorrentía, provocado por un evento de lluvia (Guber et al., 2005). Daniels, (1972) mencionó que la adhesión de las bacteria al suelo, puede disminuir debido a (i) cambio en las propiedades del suelo por constituyentes solubles del estiércol orgánico y por

constituyentes inorgánicos, (ii) adsorción de bacterias en las partículas del estiércol (iii) la competencia de la materia orgánica disuelta y las bacterias por los sitios de adsorción y (iv) modificación de la superficie de las bacterias por disolución de materia orgánica. Concentraciones altas de bacterias en las aguas superficiales han sido encontradas cuando llueve 24 h luego de la aplicación del estiércol a los suelos (Mishra et al., 2008). La distancia entre el área de aplicación y el área de descarga influye sobre la concentración de bacterias en las aguas superficiales (Stout et al., 2005).

1.3 Estatus de calidad microbiana en aguas de Puerto Rico

En un estudio realizado por la United States Geological Survey (USGS) entre 1991 al 2000, se determinó que las concentraciones de coliformes fecales en algunas partes del Río La Plata y sus tributarios excedían los estándares de la Junta de Calidad Ambiental (JCA) de 2,000 colonias/100mL (USEPA, 2003). Las fuentes potenciales de las bacterias incluían 27 fuentes puntuales y fuentes no puntuales que entre estas se incluyen áreas urbanas, terrenos agrícolas y áreas forestales (USEPA, 2003). El oxígeno disuelto y la presencia de coliformes fecales son las causas principales del deterioro de los lagos en Puerto Rico (PREQB, 2008 y 2010). Los niveles máximos permisibles de *Enterococcus* spp. y coliformes fecales en aguas costeras es 35 ufc/100mL y 200 ufc/100mL respectivamente (PREQB, 2010). La JCA no tiene estándares para *Enterococcus* spp., *E. coli* y coliformes fecales en agua clasificadas como SD. Sin embargo, la “United States Environmental Protection Agency” (USEPA por sus siglas en inglés) sugiere que los límites para *E. coli* en cuerpos de agua dulce debe ser 126 ufc/100mL (USEPA, 2012). Según la JCA (2010), las 2,053 millas de ríos y arroyos en PR se encuentran afectadas por coliformes fecales. Para el 2001, la Junta de Calidad Ambiental de Puerto Rico (PREQB, 2008) documentó que el 90% de 29 ríos y arroyos no cumplían con los estándares de calidad de agua en al menos

un segmento, encontrándose patógenos microbianos en la mayoría de los casos. Sotomayor-Ramírez, et al. (2006) documentaron que las actividades de áreas sub-urbanas y cría de animales cerca del canal de drenaje puede ser una fuente potencial de bacterias en el flujo de agua.

1.4 Disposición de estiércol en sistemas agrícolas

Las aplicaciones de excremento animal a los suelos son formas para disponer del material y suplir nutrientes a los cultivos (Soupir et al., 2006). El estiércol aporta material orgánico (MO) al suelo, promueve la estabilidad de agregados, mejora la retención y disponibilidad de humedad del suelo, mejora disponibilidad de nutrientes y sirve de fuente de energía para los microorganismos (UME 2002, Snapp y Grandy 2011). En EEUU se estima que el 80% de los patógenos encontrados en los cuerpos de agua provienen de la ganadería (Guber et al., 2006). En Puerto Rico, el excremento vacuno que proviene del lavado de la sala de ordeño se aplica a las pasturas. Estas aplicaciones se rigen siguiendo los planes de manejo establecido por el Servicio de Extensión Agrícola de la Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez o el Servicio de Conservación de Recursos Naturales del Departamento de Agricultura de E.E.U.U. (NRCS por sus siglas en inglés) basado en concentraciones de N en el estiércol y niveles de extracción³ en los cultivos. Para realizar las aplicaciones se utilizan aspersores de alta presión con el propósito de lograr un mayor alcance del área de los predios. Estos usualmente están situados en las áreas más altas del paisaje para que a su vez se puedan cubrir las partes más bajas. Aunque los números varían según la especie, en Estados Unidos el ganado suele arrojar 10^6 a 10^7 coliformes fecales por gramos de excremento fresco (Meals y Braun, 2006). No hay datos reportados sobre estimado de coliformes fecales presentes en el estiércol fresco del ganado en Puerto Rico.

³ El nivel de extracción de un cultivo, es la masa de nutrientes presente en el material vegetativo de un cultivo por unidad de área de suelo.

1.5 Sobrevivencia y transporte de microorganismos indicadores de contaminación

1.5.1 Tiempo de aplicación del estiércol

La cantidad de MIC transportados de un lugar de aplicación de residuos depende de muchos factores, incluyendo intensidad de precipitación, volumen de escorrentía, tiempo de la precipitación con relación al tiempo de aplicación, temperatura, infiltración, vegetación, características de suelo, pendiente, método, forma de aplicación y tiempo de contacto en el suelo (Crane et al., 1983; Moore et al., 1988). Meals y Braun (2006), reportaron que las poblaciones de *E. coli* disminuyen significativamente con el tiempo de almacenaje del estiércol vacuno. El almacenaje de excremento por 30 días en un tanque plástico causó una reducción de 97% de microorganismos y con 90 días de almacenaje la reducción fue de 99.7% comparándolo con excremento fresco (sin almacenar). La reducción en la población microbiana se debió al incremento de temperatura de 11.3°C a 18.1°C que se generó en los tanque de almacenamiento. Los autores además reportaron que si la escorrentía ocurre en el día de aplicación entre el 58% y 90% de los coliformes fecales que se aplican se pierden en la escorrentía. Si la escorrentía ocurre en el tercer día posterior a la aplicación, entonces el porcentaje de coliformes fecales en la escorrentía varía entre 10% y 20%.

1.5.2 Forma de aplicación del estiércol

La forma de aplicar el estiércol es uno de los factores que afecta las concentraciones de MIC en el estiércol aplicado al suelo (Spiehs y Goyal, 2007). La aplicación y posterior incorporación al suelo reducen las concentraciones de MIC con relación a la aplicación superficial (Meals y Braun, 2006) debido a que la concentración de los MIC se reducen en la escorrentía por la adsorción a partículas del suelo. Uno de los métodos de suplir estiércol vacuno a los predios, es aplicando el estiércol basado en las concentraciones de nitrógeno (N) en el

mismo. Uno de los posibles problemas ambientales asociados con el uso del estiércol de animales, es la aplicación de nitrógeno del estiércol a niveles muy superiores a las necesidades del cultivo (Fulhage, 2000). Además, se menciona que esto resulta en la aplicación de fósforo y potasio y otros micronutrientes por encima de las necesidades del cultivo. Por esta razón se recomienda hacer aplicaciones con los niveles más bajos y de ser necesario suplementar con fertilizantes comerciales.

1.5.3 Factores ambientales que afectan la sobrevivencia de los MIC en el suelo

Las bacterias son altamente susceptibles a la luz ultravioleta y al desecamiento. Aunque la temperatura óptima de *E. coli* y *Enterococcus* spp. es de 35°C y 41°C respectivamente. Cools et al. (2001) encontró que ambas bacterias sobrevivieron por más tiempo en el suelo a temperaturas frías (5°C) que a temperaturas calientes (25°C). Spiehs y Goyal, (2007) mencionan que las bacterias se destruyen a temperaturas mayores a 55°C. La viabilidad de patógenos en la escorrentía superficial disminuye con el aumento en la temperatura y la exposición a la luz ultravioleta (Spiehs y Goyal, 2007). *Enterococcus* spp. puede persistir en el suelo a 25°C por 80 días y *E. coli* por 68 días 9 (Cools et al., 2001). Los suelos con reacción de suelo ácidos y alcalinos tienden a desfavorecer la sobrevivencia y viabilidad de bacterias mientras que aquellos con reacción neutral generalmente ayudan en la sobrevivencia de bacterias entéricas (Estrada et al., 2004). Los MIC pueden transportarse por grietas en el suelo y fracturas en la roca caliza y eventualmente llegar a contaminar las aguas subterráneas (Spiehs y Goyal, 2007).

1.6 Prácticas de manejo en la aplicación del estiércol

Algunas maneras de reducir los patógenos del estiércol y reducir el transporte en la escorrentía son: aplicar los niveles adecuados al suelo (Gerba y Smith, 2005), almacenar el

excremento por un tiempo (Meals y Braun, 2006), usar barreras vegetativas (Stout et al., 2005; Mankin et al., 2006; Tate et al., 2006), modificar la dieta del animal, instalar bebederos para el ganado y el uso de cercas (Spiehs y Goyal, 2007). Sotomayor-Ramírez, et al. (2006) reportaron que mientras menor es la distancia entre un cuerpo de agua y el área de drenaje de la posible fuente, mayor podría ser la concentración de MIC en los ríos.

Hay información que demuestran una relación positiva entre indicadores de bacterias y nutrientes, por ejemplo, P disuelto con bacterias, enterococos con P total y coliformes totales y enterococos con nitrógeno total Kjehldahl (TKN) (Sotomayor-Ramírez et al., 2006). Amador et al. (2008) y Sotomayor-Ramírez et al. (2001) encontraron asociación entre fosforo total, nitratos y nitrógeno total con contaminación fecal en los ríos de Puerto Rico.

1.6.1 Uso de filtros vegetativos

Las franjas vegetativas filtrantes (VFS por sus siglas en inglés) consisten de bandas de vegetación colocadas en la parte baja del paisaje por donde se mueven las escorrentías. Estos tienen la capacidad de reducir sedimentos sólidos, material orgánico suspendido, nutrientes, agro-químico y bacterias de las escorrentías y aguas residuales. Esto ocurre debido a que la franja vegetativa reduce la velocidad de la escorrentía permitiendo la infiltración del agua en el suelo, reteniendo los sedimentos y promoviendo las transformaciones químicas y biológicas durante el proceso del flujo (Mankin et al., 2006). Mankin et al. (2006) reportaron que el uso de las franjas vegetativas filtrantes reduce en 77% los coliformes fecales, 83% los *E. coli* y estreptococos fecales, 67% las concentraciones de nitrógeno total y 66% las concentraciones de fósforo total. Para lograr esta reducción en la contaminación se deben colocar los VFS a una distancia entre 20 a 30 metros entre los animales y el cuerpo de agua (Tate et al., 2006; Spiehs y Goyal 2007). La franja vegetativas filtrante de mayor grosor en el área de drenaje produce una

mayor reducción en la concentración de los MIC en la escorrentía (Mankin et al., 2006). Entry et al. (2000), mencionan que las franjas filtrantes vegetativas en la ribera del río no reducen completamente las concentraciones de los MIC en la escorrentía, pero sí hay una reducción en comparación con la concentración en la fuente de origen. Mankin et al. (2006) menciona que luego de 20 mm de lluvia hay un aumento marcado en la escorrentía y en el transporte de MIC. Tate et al. (2006), menciona además que la administración adecuada de VFS como sistema de amortiguamiento garantiza obtener múltiples beneficios de salud pública y seguridad en las áreas cercanas a las fuentes de agua.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección de las bandejas de escorrentía y colección del suelo

Se utilizaron 28 cajas de metal galvanizado de 1 m de largo, 0.20 m de ancho y una profundidad de 7.5 cm ($0.20 \text{ m}^2 = 2,000 \text{ cm}^2$) que contenían muestras intactas de suelo obtenidas de la Finca del Agricultor Carlos Torres Medina localizada en el barrio Cidral de San Sebastián Carr. 450 km 7.0 (18° 19' Norte, 66° 57' Oeste). Las 28 cajas fueron seleccionadas aleatoriamente de entre 36 cajas que habían sido preparadas y utilizadas en un estudio previo realizado por Ardila (2009). Los criterios de selección de las bandejas fueron disponibilidad de las bandejas e historial de aplicación de estiércol. El suelo pertenecía a la serie Humatas arcilloso (Very-fine, parasesquic, isohyperthermic Typic Haplohumults).

Ardila, (2009) colectó secciones del suelo intacto realizando un corte rectangular a una profundidad de 7.62 cm y 30.48 cm de ancho utilizando una máquina (Ryan Jr. Sod Cutter, Honda de 18 pulgadas y 7 caballos de fuerza Professional Grade, Textron Turf Care and Specialty Products Inc. Lincoln, NE). Las muestras de suelo que presentaron cobertura vegetal consistía de *Bracharia decumbens* cuya altura fue aproximadamente de 15 cm previo a las simulaciones de lluvia (Ardila, 2009; Sotomayor-Ramírez et al., 2010). La cobertura de suelo aproximada de *B. decumbens* antes de realizar las simulaciones de este trabajo fue de 92%.

De las 36 bandejas originales que se colectaron en el estudio de Ardila, 18 muestras de suelo eran de un predio donde se aplicaba estiércol por medio de la combinación de aspersor aéreo y había pastoreo y 18 muestras de un predio donde no se aplicaba estiércol con aspersor aéreo pero había pastoreo (Anejo 5). Dieciséis de las bandejas utilizadas en este estudio eran del predio donde se aplicó el estiércol y las otras doce del predio donde no se aplicó el estiércol (Anejo 6). Estas bandejas con las muestra de suelo se colocaron en un umbráculo de la Finca

Alzamora en la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. La vegetación se mantuvo viva con riego de micro aperción (Pin Perfect Nozzle 22 psi-082 gpm color verde en PVC) HummertTM International), aplicando 0.861 mm/ día uniformemente a todas las bandejas hasta antes de comenzar del experimento.

2.2 Simulador de lluvia

Se utilizó un simulador de lluvia diseñado por Miller (1987) con dimensiones de 3.05 m (10 pies) de largo y 2.90 m (9.5 pies) de ancho (Ardila, 2009). El simulador de lluvia tenía una boquilla TeeJetTM ½HH-SS50WSQ (Spraying Systems Co., Wheaton, IL) a una altura de 3.05 m (10 pies) por encima de la superficie del suelo. La presión hidráulica del simulador de lluvia se calibro a 5 psi para obtener una intensidad de aspersion de 70 mm/hr, con un coeficiente de uniformidad de 80% (Ardila, 2009). El coeficiente de uniformidad del sistema se determinó midiendo el volumen de aspersion colectado en 48 recipientes de 0.5 litros, durante 10 minutos en dos repeticiones (Ardila, 2009). El simulador de lluvia se cubrió por los lados con toldos de plástico para evitar que el viento afectara la dirección de la aspersion. Se utilizó una bomba de presión Flotec® de 0.5 de caballos de fuerza y 3450 rpm para obtener una presión constante. La fuente de agua utilizada era de acueducto y se almacenó temporalmente en una cisterna de 200 galones, previo a cada simulación de lluvia. Ramírez Ávila (2005) utilizó un simulador de lluvia similar bajo condiciones de campo y Ardila, (2009) lo utilizó con cajas de escorrentía.

2.3 Experimento I y II: Efecto de la presencia de cobertura vegetal y niveles de aplicación de estiércol en la pérdida de MIC por escorrentía

El experimento I y II se realizaron simultáneamente, pero el análisis estadístico se realizó por separado. El experimento I se realizó para evaluar el efecto de la presencia de la cobertura vegetal con lluvias sucesivas en suelos con historial de aplicación de estiércol. El experimento

consistió en un diseño en bloques con cuatro tratamientos y tres repeticiones (Cuadro 1). A los tratamientos con aplicación se les añadió manualmente 1.4 cm de estiércol vacuno con un envase plástico de 1L mediante una sola aplicación. Las bandejas con el tratamiento control (0 cm de estiércol) no recibieron adiciones de agua para compensar por la humedad añadida a los otros tratamientos durante la aplicación del estiércol. Se reconoce que esto pudo haber sido un potencial error experimental que pudo haber influido sobre los niveles de escorrentía que se generan.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el efecto de la presencia de cobertura vegetal en la pérdida de MIC por escorrentía.

<i>Tratamiento</i>	<i>Cobertura*</i>	<i>Nivel de aplicación de estiércol (cm)**</i>	<i>Días sucesivos de precipitación</i>
1	No	0	1, 3, 7, 14
2	No	1.4	1, 3, 7, 14
3	Si	0	1, 3, 7, 14
4	Si	1.4	1, 3, 7, 14

*La cobertura es *Bracharia decumbens*

** Los niveles de aplicación corresponden a cm^3/cm^2 de estiércol fresco

El experimento II se realizó para evaluar los efectos de niveles de aplicación de estiércol y lluvias sucesivas en suelos con historial de aplicación de estiércol y con la presencia de cobertura vegetal. El experimento consistió en un diseño en bloques con cuatro tratamientos y tres repeticiones (Cuadro 2). Los tratamientos de aplicación fueron los siguientes: 0, 0.7, 1.4 y 3.05 cm de estiércol.

Los niveles de aplicación de estiércol seleccionados corresponden al nivel típicamente utilizado por el agricultor (1.4 cm) en sus aplicaciones a los predios donde las muestras de suelo

fueron colectadas (Sotomayor-Ramírez et al., 2008). Se seleccionaron tres niveles de aplicación de estiércol adicionales. Se permitió que la temperatura del estiércol almacenado volviera a la del ambiente para ser aplicado al suelo de las bandejas. Se realizaron simulaciones de lluvia sobre las bandejas en forma sucesiva en los días 1, 3, 7 y 14 después de la aplicación de estiércol. Los días para realizar los eventos de las lluvia fueron adaptados de un estudio previo donde se realizaron simulaciones de lluvia sucesivas (Ardila, 2009).

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en el efecto de niveles de aplicación en la pérdida de MIC por escorrentía.

<i>Tratamiento</i>	<i>Cobertura*</i>	<i>Nivel de aplicación de estiércol (cm)**</i>	<i>Días sucesivos de precipitación</i>
1	Si	0	1, 3, 7, 14
2	Si	0.7	1, 3, 7, 14
3	Si	1.4	1, 3, 7, 14
4	Si	3.05	1, 3, 7, 14

*La cobertura es *Bracharia decumbens*

** Los niveles de aplicación corresponden a cm^3/cm^2 de estiércol fresco

Para acomodar las bandejas dentro del simulador de lluvia y maximizar su eficiencia, las dieciocho bandejas seleccionadas para este estudio fueron divididas en tres grupos de seis bandejas cada uno. Cada grupo fue dividido en subgrupos de 3 bandejas y a cada subgrupo se le realizó una simulación de lluvia por día para un total de dos simulaciones por día. Se realizaron simulaciones de lluvia sucesivas a los días 1, 3, 7, 14 a cada grupo posterior a la aplicación de estiércol. La logística de las simulaciones se realizó de la siguiente manera. Luego de la simulación de lluvia del día 7 se seleccionaron aleatoriamente seis bandejas del segundo grupo para la simulación del día 1 y se repitió el procedimiento de aplicación de estiércol. Al día 19 se le realizó el mismo procedimiento de aplicar estiércol y de simulación de lluvia al último grupo

de seis bandejas. El procedimiento se completó en un periodo de 35 días durante los meses de abril y mayo de 2009.

2.4 Experimento III: Efecto del tiempo luego de la aplicación del estiércol vacuno en la pérdida de MIC por escorrentía

El experimento III se realizó para evaluar el efecto de días transcurrido después de la aplicación de estiércol y el efecto de días sucesivos después del evento de lluvia sobre las concentraciones de MIC en escorrentía con un nivel de aplicación de estiércol. A cada bandeja se le aplicó manualmente 0.7 cm de estiércol vacuno 7 días antes de su primer evento de lluvia y 0.7 cm de estiércol adicional un día antes de realizar la primera simulación de lluvia. Todas las bandejas recibieron un total de 1.4 cm de estiércol vacuno.

Los tratamientos consistieron en simulaciones de lluvia en los días 1, 7 y 14 que transcurrieron posteriores a la segunda aplicación de estiércol (Cuadro 3). Luego de cada simulación de lluvia se realizaron otras simulaciones de lluvia en forma sucesiva. La logística de manejo fue la siguiente. Las nueve bandejas fueron divididas en 3 grupos de tres bandejas cada uno. Estas bandejas se seleccionaron aleatoriamente y fueron diferentes al experimento I y II. El día 1 se seleccionó aleatoriamente el primer grupo de tres bandejas para realizar la primera simulación de lluvia. En el día 7 luego del primer evento de lluvia, se seleccionó aleatoriamente el segundo grupo de 3 bandejas y se realizó una simulación de lluvia a las bandejas del segundo grupo y la segunda simulación a las bandejas del primer grupo. El día 14 posterior al primer evento de lluvia, se realizó una simulación de lluvia al tercer grupo de 3 bandejas y se realizó una simulación de lluvia adicional a las bandejas del primer y segundo grupo. Al finalizar el experimento III se le realizó un total de 3 simulaciones de lluvia al primer grupo de bandejas, 2 al segundo grupo y una al tercer grupo.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos correspondientes al experimento III.

<i>Tratamiento</i>	<i>Días transcurrido después de la aplicación de estiércol</i>	<i>Días sucesivos después del evento de lluvia</i>
1	1	7, 14
2	7	14
3	14	

2.5 Experimento IV: Factores que inciden en la pérdida de MIC por escorrentía

El experimento IV consistió de dos tratamientos analizados anteriormente en el experimento II, en este caso con dos niveles de aplicación de estiércol en suelos con historial de aplicación de estiércol (Cuadro 4). Se seleccionaron aleatoriamente 12 de las bandejas que ya habían sido utilizadas en los experimentos anteriores (Anejo 6). En cada bandeja se colectó una muestra de suelo compuesta de seis submuestras tomadas a una profundidad de 5 cm para medir las concentraciones de *Enterococcus* spp. en el suelo antes de la aplicación de estiércol vacuno. Luego se dividieron aleatoriamente las 12 bandejas en dos grupos de seis bandejas cada uno. Al grupo 1 no se le realizó una aplicación de estiércol ni de ninguna otra sustancia, pero al grupo 2 se le aplicó manualmente 1.4 cm de estiércol vacuno. Se realizaron simulaciones de lluvia sucesivas en los días 1, 7 y 14 después de la aplicación del estiércol. Al finalizar la simulación del día 14 se colectó nuevamente en cada bandeja una muestra de suelo compuesta de seis submuestras tomadas a una profundidad de 5 cm para determinar las concentraciones residuales de *Enterococcus* spp. en el suelo. Se midieron las concentraciones de *Enterococcus* spp. en el estiércol antes de ser aplicada para cuantificar las pérdidas de *Enterococcus* spp. en el sistema.

Los valores de las concentraciones de *Enterococcus* spp. en el estiércol y en la escorrentía (NMP/100mL) se transformaron a NMP/bandeja según fue descrito en la sección 2.2.

La concentración de *Enterococcus* spp. en el suelo (NMP) se transformó a cantidad en cada bandeja (NMP/bandeja) mediante la siguiente formula:

$$\text{NMP/bandeja} = \text{NMP}/100\text{g} \times 20,250 \text{ g}$$

$$20,250 \text{ g} = \text{densidad aparente}^4 (\text{g}/\text{cm}^3) \times \text{volumen de la bandeja}^5 (\text{cm}^3)$$

El porcentaje de recuperación de *Enterococcus* spp. se calculó mediante:

$$(\text{b}/\text{a}) \times 100;$$

donde: a es la suma del número de *Enterococcus* spp. en el suelo y el número *Enterococcus* spp. aplicadas y b es el número de *Enterococcus* spp. en los tres eventos de escorrentía.

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos utilizados para determinar los factores que inciden en la pérdida de MIC por escorrentía.

<i>Tratamiento</i>	<i>Nivel de Aplicación de estiércol (cm)*</i>	<i>Días sucesivos de precipitación</i>
1	0	1, 7, 14
2	1.4	1, 7, 14

* Los niveles de aplicación corresponden a cm^3/cm^2 de estiércol fresco

2.6 Muestreo de escorrentía

Una vez comenzado el flujo de escorrentía se colectó la muestra en intervalos de 10 minutos hasta completar 30 minutos. Es importante señalar que todas las bandejas tuvieron el mismo tiempo de escorrentía (30 min) pero que el tiempo de precipitación en cada uno pudo haber sido distinto. Se pesó el volumen de la muestra de escorrentía colectada cada 10 minutos y se transfirió a un envase de 19L. Debido a que la escorrentía de cada bandeja no comenzaba al mismo tiempo, una vez transcurrían los 30 minutos de escorrentía en las bandejas, se cubrían con un plástico para evitar que continuaran recibiendo lluvia y generando más escorrentía. El

⁴ Densidad aparente de $1.35 \text{ g}/\text{cm}^3$

⁵ Volumen de la bandeja de $15,000 \text{ cm}^3$

simulador de lluvia se apagó una vez pasaron los 30 minutos de escorrentía para cada bandeja. Se homogenizó la muestra de escorrentía colectada para cada bandeja y se transfirió una submuestra representativa a una bolsa plástica estéril Whirlpak® de 500 mL que fue almacenada en una nevera con hielo a una temperatura aproximada de 5°C. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de Suelo de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez para ser analizadas en un periodo no mayor a 4 horas luego de haber sido colectadas.

2.7 Análisis de MIC mediante las pruebas de Colilert® y Enterolert®

Una alícuota de 200 mL fue tomada para analizar las concentraciones de coliformes totales, *E. coli* y *Enterococcus* spp. mediante las pruebas de Colilert® y Enterolert® con el método de “Quanti-Tray/2000®” (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME). Este método provee los resultados basados en número más probable (NMP/mL) basado en la presencia o ausencia de fluorescencia en las 97 fosas que contienen la muestra con el indicador correspondiente. Los coliformes y *E. coli* poseen la enzima β -D-galactosidase, que tiene la habilidad de degradar *ortho*-nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG), produciendo una coloración amarilla producto *o*-nitrophenol. *E. coli* sin embargo tiene la habilidad de degradar methylumbelliferyl- β -d-glucuronide (MUG), resultando en la formación de los productos fluorescentes producto de 4-methylumbelliferone. Para *Enterococcus* spp. el método es basado en la actividad de β -glucosidase de entorococci para producir methylumbelliferylone desde 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside cuando es incubada a 41°C por 24 horas (Eckner, 1998). La muestra fue dividida en dos porciones iguales. La primera porción (100mL) se transfirió a un frasco de cristal (110 mL) en el cual a una se le añadió el reactivo “Colilert” para identificar y cuantificar los coliformes fecales y *E. coli* y a la segunda porción se le añadió el reactivo “Enterolert” para cuantificar *Enterococcus* spp. Esta metodología IDEXX es reconocida por la

EPA como una prueba aceptada para pruebas en aguas recreacionales (IDEXX, 2004; USEPA, 2006; USEPA, 2013). Las muestras demasiado turbias por sedimentos o partículas en suspensión, fueron diluidas con agua destilada estéril y el valor de la concentración fue calculada con la debida dilución. Estas mezclas fueron agitadas manualmente para homogeneizarlas y luego fueron transferidas a la plantilla, “Quanti-Tray®/2000” de 97 “fosas”. El “Quanti-Tray®/2000” se selló mecánicamente por un equipo especializado “Quanti-Tray® Sealer”, que distribuye los 100mL de la muestra en todas las fosas y luego fueron colocadas por 24 horas en una incubadora a 35°C y a 41°C para la cuantificación de coliformes fecales, *E. coli* y de *Enterococcus* spp., respectivamente. El cambio de color en las fosas del Quanti-tray de transparente a amarillo, es indicativo de la presencia de coliformes totales. Las “fosas” que presentaron fluorescencia bajo luz ultravioleta (365nm) son consideradas positivas a *E. coli* y *Enterococcus* spp. Las “fosas” positivas de cada plantilla fueron contadas y comparadas con la tabla de referencia que provee “IDEXX” que corresponden al número más probable (NMP) de coliformes, *E. coli* y *Enterococcus* spp. por 100mL.

2.8 Limpieza de materiales utilizados en los ensayos

Los envases utilizados en las toma de esorrentía en las simulaciones de lluvias fueron lavados en el laboratorio de microbiología con agua destilada y un detergente libre de fosforo. Los materiales se esterilizaron con alcohol etílico al 70% y se enjuagaron con agua destilada estéril antes de cada evento de simulación. De igual manera se procedió con la limpieza de los embudos, conectores y canaletas a las bandejas. Los 12 envases de cristal utilizados en la medición de MIC en el laboratorio fueron previamente esterilizados en la autoclave (American Sterilizer Company) a una temperatura de 121°C y 15 psi por 15 minutos. Durante todo el procedimiento se utilizaron guantes de látex para evitar contaminación.

2.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y las descripciones estadísticas se realizaron con Infostat® versión 2010. Los valores reales fueron transformados a rangos ya que los datos no se conformaban a los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los rangos para evaluar la posibilidad de diferencias entre los tratamientos. Se aplicó la prueba de LSD Fisher y el valor de Probabilidad (P) <0.05 para determinar diferencias entre tratamientos. Los datos fueron presentados en figuras y cuadros utilizando las medias de los datos sin transformar. Con los datos que excedían el número más probable (>2,419.6 NMP), se utilizó el valor límite inferior (i.e. 2,500) como el valor cuantificable.

2.10 Control de calidad de metodología IDEXX

Antes del comienzo del estudio se seleccionaron diferentes fuentes de agua con el fin de corroborar que no hubieran falsos positivos. Las fuentes eran agua de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillado (AAA) de diferentes áreas como los baños, fuentes de tomar agua, plumas de agua para regar, agua destilada y agua destilada estéril. Todas estas pruebas pasaron por el mismo procedimiento de análisis. Las muestras tomadas del experimento IV fueron analizadas para medir las concentraciones de *Enterococcus* spp. en la escorrentía con la prueba de *Enterolert* (IDEXX).

2.11 Cuantificación de MIC en charca de retención

Mientras el ganado se encuentra en la sala de ordeño de las vaquerías, el excremento que se genera es lavado y almacenado en las charcas de retención. Se tomó una muestra de agua de la charca de retención para cuantificar las concentraciones de *E. coli* y de *Enterococcus* spp.

durante el proceso de la aplicación del estiércol a los predios. La muestra fue colectada en un envase de plástico de 19L previamente lavado y esterilizado con alcohol etílico al 70%. Antes de obtener la muestra se realizaron tres enjuagues con el agua de la charca y se descartaron en el suelo fuera del área de muestreo. El estiércol colectado fue transportado en menos de 12 horas y almacenado en un refrigerador a una temperatura promedio de 4°C en el Laboratorio de Ciencia Animal en la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Al día siguiente y en menos de 24 horas de colectada la muestra, se realizaron manualmente las aplicaciones del estiércol a las bandejas y se tomó una muestra del estiércol líquido para cuantificar las concentraciones de *E. coli* y de *Enterococcus* spp.

2.12 Precisión de metodología IDEXX

Durante el proceso de análisis de muestras se seleccionó una muestra al azar del experimento III. Esta fue analizada en cuadruplicado con las pruebas Enterolert y Colilert (IDEXX) con el fin de cuantificar la variabilidad.

2.13 Comparación de las metodologías de conteo de enterococos mediante filtración por Membrana y el uso de Enterolert® (IDEXX)

Para determinar la confiabilidad de la metodología de IDEXX, las muestras fueron analizadas por la metodología de Filtros de Membrana (Membrane Filter, MF) (Slanetz y Bartley, 1957). La metodología de filtro de membrana provee los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC). Esta unidad es un estimado basado en el número de colonias de bacterias formadas en un agar luego de ser filtradas e incubadas. Se seleccionaron aleatoriamente 5 de dieciséis muestras de tres eventos de esorrentía del experimento IV. Cada muestra se dividió en dos submuestras de 100 mL cada una para ser analizada mediante el método de IDEXX y el método de filtración por membrana. Los 100 mL de una de las submuestras fue

transferida en su totalidad a la plantilla “Quanti-Tray/2000®” de 97 fosas con el reactivo “Enterolert” y se incubó a 41°C por 24 horas. De la otra submuestra de 100 mL se filtraron 25 mL utilizando una membrana estéril de celulosa de 0.45µm (Millipore™ modelo AAWP 047 S0). La membrana se removió del sistema de filtración y colocada en un plato petri (60 x 15mm) sobre la superficie del agar m-Enterococcus (DIFCO-0746-17-0) y fueron incubados a 35°C por 48 horas. Luego del periodo de incubación se contaron las colonias con una coloración rojo oscuro o vino las cuales eran indicativas del crecimiento de enterococos.

Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/100mL) utilizando la fórmula:

$$(\# \text{ de enterococcus}/100 \text{ mL})_ = (a/b) \times 100;$$

donde: a es el número de colonias enumeradas y b es el volumen (mL) de la muestra filtrada.

3.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Control de calidad de metodología IDEXX

Antes de comenzar con los experimentos se hicieron diferentes análisis con el fin de confirmar que las pruebas de Colilert y Enterolert se estaban realizando correctamente. Para esto se tomaron muestras de agua en las cuales se podían estimar los conteos bacterianos, por ejemplo de agua de servicio de AAA de diferentes áreas, agua destilada del laboratorio, y agua destilada estéril. Todos los resultados arrojaron valores de 0 NMP/100mL. Este resultado es indicativo de que no había contaminación en el proceso de toma de muestras y de análisis en la cuantificación de *Enterococcus* spp. y *E. coli*. No obstante, no se realizó una simulación con una bandeja vacía para cuantificar los MIC en escorrentía y validar que no hubo contaminación durante la simulación de lluvia.

3.2 Concentraciones de MIC en la charca de retención

Se tomaron diferentes muestras de estiércol producto del lavado de las salas de ordeño. Las concentraciones promedio de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en el estiércol fresco colectado en la charca de retención para las aplicaciones del experimento I y II fueron de 1.33×10^6 NMP/100mL y 1.95×10^5 NMP/100mL, respectivamente (Cuadro 5). La concentración promedio de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en el estiércol fresco colectado para las aplicaciones del experimento III fueron 2.41×10^6 NMP/100ml y 4.41×10^4 NMP/100mL, respectivamente. En el experimento IV la concentración promedio de *Enterococcus* spp. en el estiércol fresco fue 2.06×10^5 NMP/100mL.

Cuadro 5: Promedio de las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. aplicados a los suelos por experimento.

<i>Experimento</i>	<i>Nivel de estiércol aplicado (cm)*</i>	<i>Concentraciones en el estiércol (NMP/100mL)</i>		<i>Cargas aplicadas (NMP/m²)</i>	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
I y II	0	0	0	0	0
I y II	0.7	1.33 x 10 ⁶	1.95 x 10 ⁵	9.3 x 10 ⁷	1.37 x 10 ⁷
I y II	1.4	1.33 x 10 ⁶	1.95 x 10 ⁵	1.9 x 10 ⁸	2.7 x 10 ⁷
I y II	3.05	1.33 x 10 ⁶	1.95 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁸	5.9 x 10 ⁷
III	0	0	0	0	0
III	1.4	2.41 x 10 ⁶	4.41 x 10 ⁴	3.4 x 10 ⁸	6.2 x 10 ⁶
IV	0		0		0
IV	1.4		2.06 x 10 ⁵		2.4 x 10 ⁷

* Los niveles de aplicación corresponden a cm³/cm² de estiércol fresco

3.3 Precisión de metodología IDEXX

Se seleccionó una muestra del experimento III y se le realizaron los análisis con las pruebas con Colilert y Enterolert (IDEXX). Los resultados obtenidos muestran que *E. coli* tuvo una media de 845 NMP/100mL (Cuadro 6), con una desviación estándar de 82.83, un error estándar de 41.41 y un coeficiente de variación de 9.80. En el caso de *Enterococcus* spp. las concentraciones sobrepasaron el límite máximo de 2,419.6 NMP del método, por lo que no se pudo determinar las concentraciones reales.

Cuadro 6: Concentraciones de *E. coli* en una muestra.

<i>Muestra</i>	<i>Replica</i>	<i>E. coli (NMP/100mL)</i>
1	1	727
1	2	866
1	3	866
1	4	921

3.4 Comparación entre las metodologías de conteo de enterococos por filtración de Membrana y Enterolert® (IDEXX)

Para comparar la prueba de Enterolert se tomaron muestras de esorrentía y de suelo del experimento IV y se analizaron con la metodología de filtro de membrana. En los valores obtenidos para ambos métodos (Anejo 7), dos datos presentaron ser valores atípicos por lo que fueron eliminados para que se cumpliera con los criterios de una distribución normal. Estos datos atípicos se debieron a errores manuales durante el procesamiento de la muestra en el laboratorio. Los datos fueron transformados a la escala \log_{10} para realizar una regresión lineal.

Al realizar una regresión lineal con los datos obtenidos en la metodología de filtración por membrana y la metodología de IDEXX se obtuvo un coeficiente de regresión lineal de 0.80 (Figura 1). Esto es indicativo de una relación positiva fuerte entre ambos métodos utilizados para el conteo de enterococos. Basado en la regresión lineal se concluyó que los valores de *Enterococcus* spp. medidos por la metodología de IDEXX sobreestima los valores de *Enterococcus* spp. por el método de filtro de membrana en 1.6 veces. Budnick et al., (1996) encontraron que Enterolert fue más efectivo y preciso recuperando enterococci en comparación con el método de filtro de membrana en cuerpos de agua recreacionales. Los autores antes citados encontraron una correlación positiva entre los métodos Enterolert y filtro de membrana con un coeficiente de regresión lineal de entre 0.76 y 0.97 para aguas costeras y agua dulce. Los autores además encontraron que con la metodología de IDEXX los falso-positivos y falso-negativos fueron 5.1% y 0.4%, respectivamente. Levin et al. 1975 encontraron que para filtro de membrana los falsos positivos fueron de 10.0% y falsos negativos de 11.7%. En mi caso en particular no pude realizar un estimado de los falsos positivos y falsos negativos.

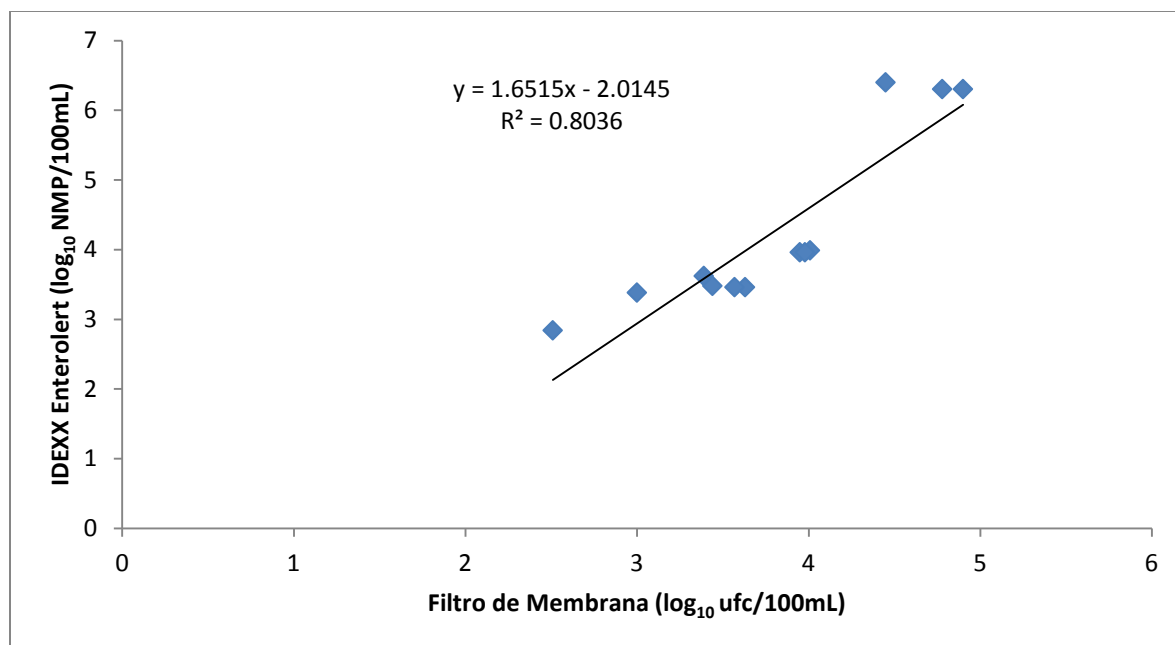


Figura 1: Relación entre la metodología IDEXX y filtro de membrana

3.5 Experimento I

En el experimento I se evaluaron los efectos de cobertura vegetal, tiempo, y nivel de aplicación (0 y 1.4 cm) sobre las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. presentes en la escorrentía. Para simplificar la interpretación se analizaron los resultados obtenidos con la aplicación de estiércol y sin la aplicación de estiércol por separado. Las bandejas sin aplicación de estiércol no recibieron agua estéril del mismo volumen que recibieron las bandejas con la aplicación de estiércol. Los resultados de la prueba de ANOVA indican que las concentraciones de *Enterococcus* spp. en los suelos sin aplicación reciente de estiércol fueron afectadas significativamente por la interacción entre cobertura y simulación ($p < 0.05$). Las concentraciones de *E. coli* en suelos sin aplicación reciente de estiércol fueron afectadas significativamente por los días de simulación y por la interacción entre cobertura y simulación ($p < 0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7: Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cobertura vegetal sobre las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en suelos sin aplicación reciente de estiércol.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
Cobertura (C)	1	0.1897	0.4026
Día de simulación (S)	3	0.0292	0.4789
C x S	3	0.0473	0.0203

En suelos sin cobertura las concentraciones de *Enterococcus* spp. no hubo diferencias significativas a través del tiempo (Figura 2). En suelos con cobertura, las concentraciones fueron mayores en el primer día de escorrentía y luego no hubo diferencias en los demás tiempos. Los resultados indican que hubo mayor concentración de *Enterococcus* spp. con cobertura vegetal en el primer evento de escorrentía solamente y que en eventos subsiguientes no hubo diferencias entre suelo cobertura y suelo sin cobertura.

En suelos con cobertura las concentraciones de *E. coli* fueron similares en todos los eventos de escorrentía con un promedio de 115 NMP/100mL. En suelos sin cobertura las concentraciones de *E. coli* fueron las más altas en el día 1 y disminuyeron progresivamente hasta estar por debajo del límite de detección en el día 14 (Figura 3). Los resultados de este experimento sugieren que en suelos sin aplicación reciente de estiércol vacuno pueden aportar MIC en escorrentía posiblemente porque los MIC pueden permanecer en el suelo por largos periodos de tiempo.

Basado en los resultados presentados en la Figura 2 y Figura 3, no es posible determinar la importancia de la cobertura vegetal en suelos sin aplicación reciente de estiércol en la reducción de *Enterococcus* spp. en escorrentía. En suelos sin la aplicación reciente de estiércol,

la cobertura aumentó las concentraciones de *Enterococcus* spp en escorrentía en el día 1, pero lo opuesto se observó para *E. coli* en el día 1.

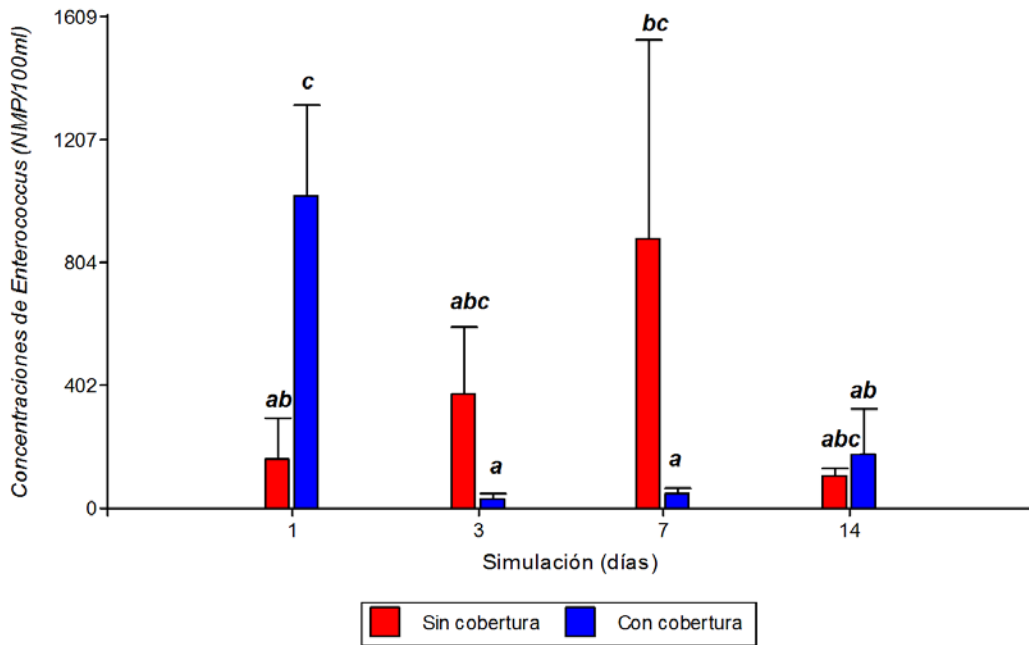


Figura 2: Concentraciones de *Enterococcus* spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal sin aplicación reciente de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.

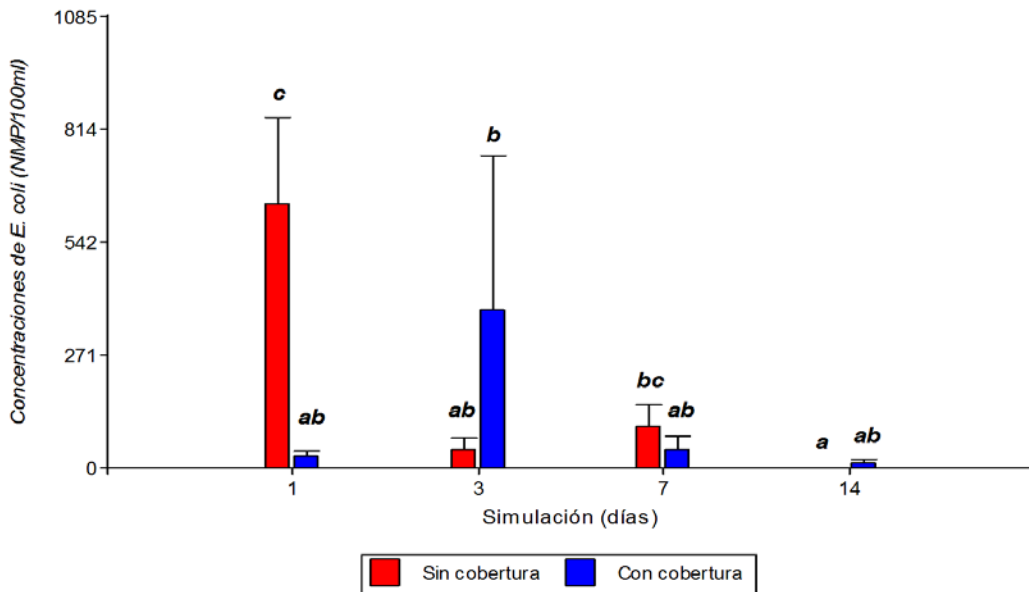


Figura 3: Concentraciones de *E. coli* colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal sin aplicación reciente de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.

En los suelos con aplicación de estiércol las concentraciones de *Enterococcus* spp. fueron afectadas significativamente por el día de simulación ($p < 0.05$) pero no por la cobertura y la interacción cobertura x día de simulación. Las concentraciones de *E. coli* en suelos con aplicación de estiércol fueron afectadas significativamente por los días de simulación y por la interacción entre cobertura y día de simulación ($p < 0.05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8: Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cobertura vegetal sobre las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en suelos con aplicación de estiércol.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>p-valor</i>	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
Cobertura (C)	1	0.4595	0.6341
Día de simulación (S)	3	0.0120	0.0085
C x S	3	0.0543	0.9932

Las concentraciones de *Enterococcus* spp. en escorrentía fueron persistentes desde el día 1 al día 7 y en el día 14 fueron significativamente menores (Figura 4). Las concentraciones de *E. coli* fueron similares entre cobertura y sin cobertura para todos los días evaluados. Pero, en suelos sin cobertura las concentraciones de *E. coli* fueron similares del día 1 al 7 y se redujeron significativamente en el día 14 (Figura 5). En suelo con cobertura las concentraciones de *E. coli* fueron similares en la escorrentía que se generó con las simulaciones del día 1 al 14. Para el día 1 las concentraciones de *E. coli* no presentaron diferencias entre suelos con y sin cobertura, esto pudo deberse a que no se pudieron detectar niveles mayores de 2,419.6 NMP.

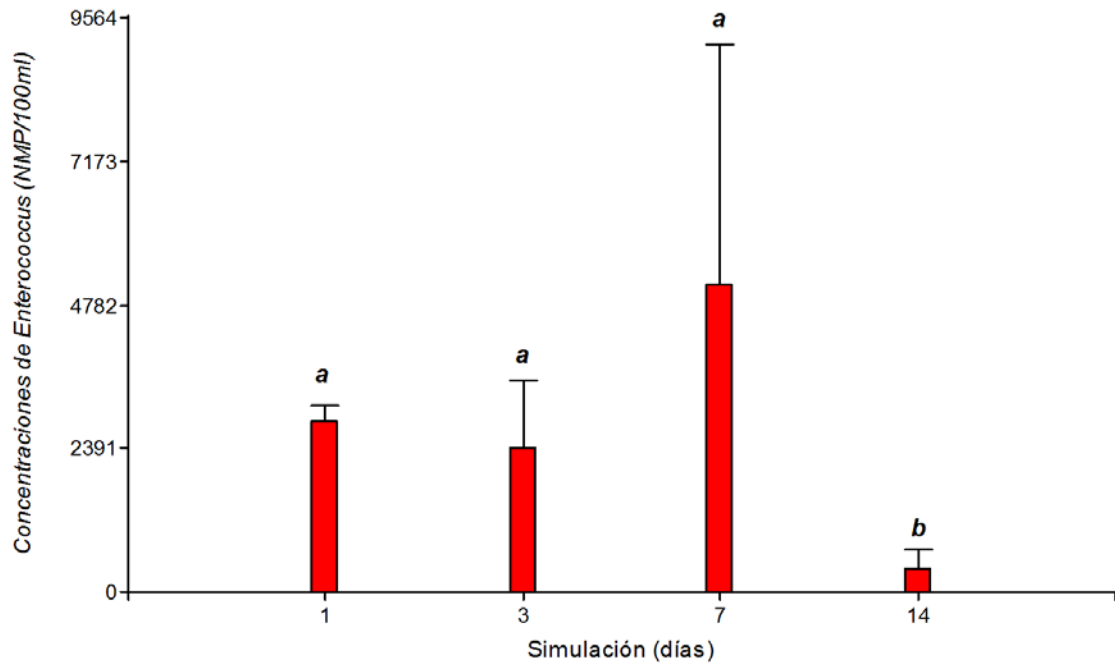


Figura 4: Concentraciones de *Enterococcus* spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal con aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.

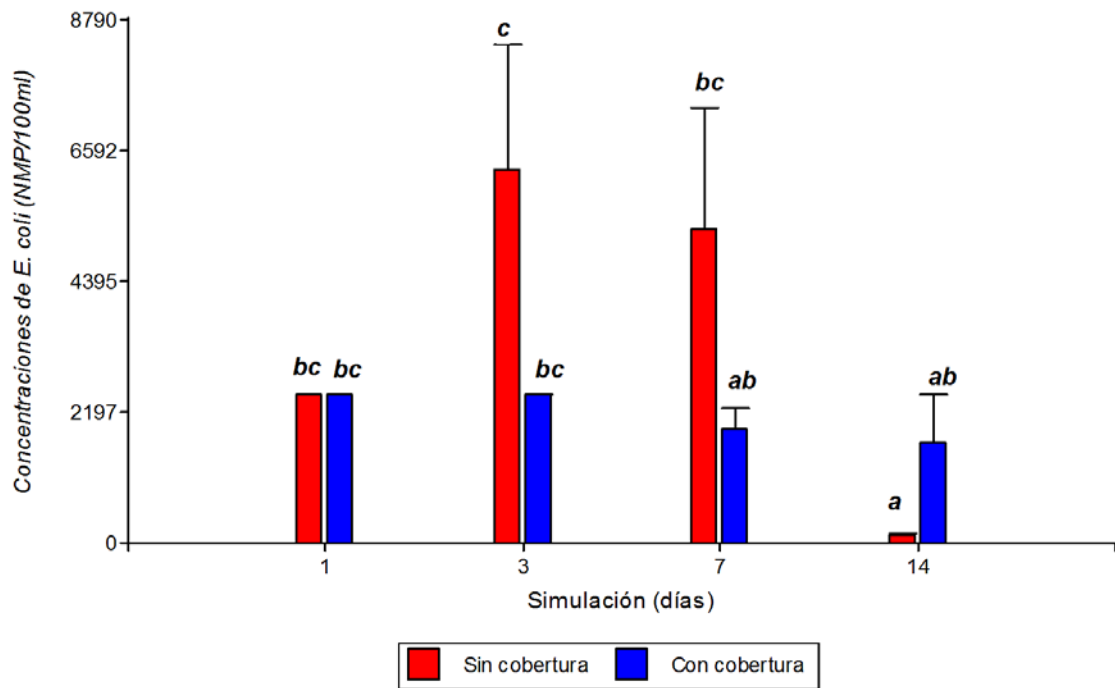


Figura 5: Concentraciones de *E. coli* colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal y suelos sin cobertura vegetal con aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.

Las concentraciones de *Enterococcus* spp. y *E. coli* fueron mayores con la aplicación de estiércol que en suelos sin aplicación reciente (Ver figuras 1, 2 y 3). Por ejemplo, las concentraciones en escorrentía de *E. coli* fueron tres veces mayor y las de *Enterococcus* spp. dos veces mayor comparándolos con los suelos sin la aplicación de estiércol. En general, en suelos con aplicación de estiércol las concentraciones de *E. coli* sin cobertura disminuyeron en el día 14, mientras que para *Enterococcus* spp. se observó también una reducción en las concentraciones en escorrentía en el día 14, pero la cobertura no fue un factor importante. Meals et al. (2006) demostró que las concentraciones de MIC en la escorrentía en suelos con vegetación permanente se reducen en comparación con suelos desnudos. Mis resultados en suelos con aplicación reciente de estiércol contradicen lo encontrado por Meals et al. ya que las concentraciones de *E. coli* se redujeron significativamente solamente en el día 14 para los suelos sin cobertura, pero no para los suelos con cobertura, y no hubo efecto de la cobertura dentro de cada día de simulación.

En el experimento I, en suelos sin aplicación reciente de estiércol (control) se obtuvieron concentraciones significativas de MIC. La detección de concentraciones de MIC en escorrentía en suelos sin enmendar se pudo deber a que esos suelos tenían un historial de aplicaciones de estiércol y además fueron utilizados anteriormente en un estudio previo en la cual recibieron aplicaciones de estiércol vacuno. Rufete et al. (2006), mencionan que la sobrevivencia de MIC en los suelos depende en parte a parámetros como temperatura, humedad, pH, composición del suelo y la presencia de otros microorganismos. Aunque las concentraciones en las bandejas con cobertura vegetal fueron menores, todavía exceden los valores sugeridos por la EPA de *E. coli* y *Enterococcus* spp. Debido a que los tratamientos controles no recibieron aplicaciones de

estiércol ni de agua se obtuvo una gran variabilidad en los datos debido a que la humedad inicial posiblemente era diferente en esos tratamientos.

3.6 Experimento II

En el experimento II se evaluó el efecto de cuatro niveles de aplicación de estiércol y días sucesivos de simulación de lluvia en suelos con cobertura vegetal. Las concentraciones de *E. coli* en escorrentía fueron significativamente afectadas ($p < 0.05$) por los efectos de niveles de aplicación y días sucesivos de simulación de lluvia (Cuadro 9). Esto puede deberse a que las concentraciones de *E. coli* en la mayoría de las muestras sobrepasaron el nivel máximo de detección del método Colilert.

Cuadro 9. Resumen del ANOVA que evalúa el efecto de cuatro niveles aplicación sobre las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en suelos con cobertura vegetal.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
Día sucesivos de precipitación luego de la aplicación (S)	3	0.0080	0.1731
Nivel de Aplicación (N)	3	<0.0001	0.0078
S x N	9	0.3747	0.0764

Las concentraciones de *E. coli* en la escorrentía luego de la aplicación de estiércol fluctuaron entre 1.5×10^3 y 1.8×10^3 NMP/100mL entre los días 1 y 7 (Figura 6). Este resultado puede deberse a que en los días 1, 3 y 7 el periodo entre simulaciones fue corto, favoreciendo las condiciones para la sobrevivencia de MIC. Los valores obtenidos concuerdan con lo encontrado por Mishra et al. (2008) quienes demostraron que la humedad en el suelo luego del primer evento

de simulación ayudó en la sobrevivencia de las bacterias, dando lugar a una mayor concentración de éstas durante el segundo evento de simulación.

El día 14 se registró una concentración de *E. coli* de 9.2×10^2 NMP/100mL lo cual fue significativamente menor a los días 1 y 3 ($p < 0.05$). La disminución de *E. coli* el día 14 pudo deberse a un proceso natural de mortandad de bacterias causado por la exposición al sol y por la reducción en la humedad del suelo debido a que habían pasado 7 días sin realizar una simulación de lluvia. Spiels y Goyal (2007) indicaron que el número de bacterias se reduce por la exposición a los rayos ultravioleta provenientes de la luz solar y al secado natural del estiércol en la superficie del suelo.

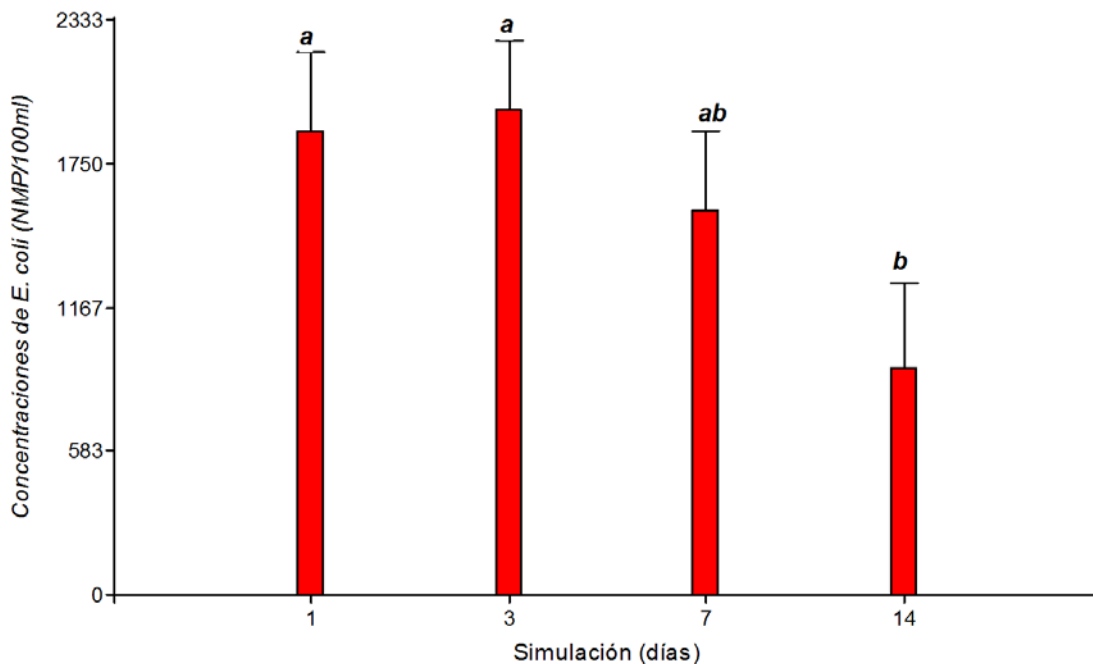


Figura 6: Concentraciones de *E. coli* colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal durante diferentes días de simulación.

Los resultados muestran que hubo una diferencia significativa en las concentraciones de *Enterococcus* spp. en la escorrentía entre los suelos que recibieron aplicación de estiércol vacuno y los que no recibieron ningún tipo de aplicación (Cuadro 9). Sin embargo, las variaciones en las

concentraciones de *Enterococcus* spp. y *E. coli* entre los niveles 0.7, 1.4, y 3.05 cm de aplicación de estiércol no fueron estadísticamente significativas (Cuadro 10). Durso et al. (2011) documentaron que el transporte de microorganismos en las aguas de escorrentía fue directamente proporcional al aumento en los niveles de aplicación de estiércol, aunque esta relación no fue estadísticamente significativa.

Cuadro 10: Concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. colectadas en escorrentía en suelos con cobertura vegetal con cuatro niveles de aplicación de estiércol vacuno durante diferentes días de simulación.

Niveles de Aplicación (cm) ^{**}	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	<i>Enterococcus</i> (NMP/100mL)
0	115 a*	319 a
0.7	1777 b	753 ab
1.4	2139 b	1640 b
3.05	2296 b	1635 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas (p<0.05).

** Los niveles de aplicación corresponden a cm³/cm² de estiércol fresco

Los datos muestran que las concentraciones de *E. coli* en la escorrentía fueron mayores en comparación con *Enterococcus* spp. (Cuadro 10), pero en los suelos que no recibieron la aplicación de estiércol vacuno los niveles de *Enterococcus* spp. fueron mayores que las de *E. coli*. Esto pudo deberse a que los *Enterococcus* spp. tienen una mayor capacidad de subsistir en el suelo en un estado de latencia en comparación con *E. coli* (Cools et al., 2001).

El no haber aplicado agua a las bandejas control pudo haber afectado la concentración de *Enterococcus* spp. obtenidos en las muestras de escorrentía. Niveles bajos de humedad en el suelo afectan significativamente la sobrevivencia de los microorganismos (Mawdsley et al., 1995). Cools et al. (2001) estudió la influencia de la humedad en el suelo en las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. y reportó que ambos MIC presentaron una mejor sobrevivencia en suelos con mayor contenido de humedad. Los autores además estudiaron la sobrevivencia de la bacterias de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en muestras de suelo con diferentes texturas, humedad y

temperatura de incubación. En ese estudio se observó que las concentraciones de *Enterococcus* spp. y *E. coli* disminuyeron gradualmente con el tiempo luego del primer día de inoculación, pero *Enterococcus* spp. mostró mayor capacidad de sobrevivencia que *E. coli* cuando fueron evaluadas a 25°C en suelos con la misma textura y humedad.

3.7 Experimento III

En el experimento III se utilizaron suelos con cobertura vegetal e historial de aplicación de estiércol para cuantificar las concentraciones de MIC en escorrentía al realizar simulaciones de lluvia sucesivas luego de la aplicación de estiércol vacuno. Las concentraciones de *E. coli* se afectaron significativamente por los eventos sucesivos de lluvia después del primer evento de lluvia, pero no por días transcurridos después de la aplicación de estiércol vacuno ($p < 0.05$) (Cuadro 11). El día 1 luego de la aplicación de estiércol, las concentraciones de *E. coli* en la escorrentía fueron mayor comparado con las concentraciones registradas en los días 7 y 14 (Cuadro 12).

Cuadro 11. Resumen del ANOVA para las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en suelos que recibieron lluvia sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Días transcurridos después de la aplicación (a)</i>	2	0.2544	0.0349
<i>Días sucesivos después del primer evento de lluvia (b)</i>	2	0.0003	0.0011
a x b	1	0.1360	0.7264

Las concentraciones de *Enterococcus* spp. en la escorrentía de los suelos fueron afectadas significativamente por los días transcurridos después de la aplicación de estiércol y por los días

sucesivos después del primer evento de lluvia ($p < 0.05$) (Cuadro 11). Las concentraciones de *Enterococcus* spp. que tuvieron lluvias en días sucesivos después del primer evento de lluvia fueron mayores en el día 1 y se redujeron en el día 7 y 14 (Cuadro 12). Al día 1 luego de la aplicación de estiércol las concentraciones de *Enterococcus* spp. tuvieron la mayor concentración y en el día 14 las concentraciones fueron menores. En los suelos que recibieron estiércol las concentraciones de *Enterococcus* spp. se redujeron luego de 7 y 14 días sin precipitación y escorrentía (Figura 7).

Cuadro 12: Concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en escorrentía desde la aplicación del estiércol vacuno en días sucesivos después del primer evento de lluvia.

<i>Lluvias Sucesivas</i> (Días)	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	<i>Enterococcus</i> (NMP/100mL)
1	6364 a*	1618 a
7	1202 b	1359 ab
14	433 b	257 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para *Enterococcus* spp. en este experimento coinciden con los resultados obtenidos por Meals et al. (2006) para *E. coli*. Meals et al. (2006) indicaron que en retrasos de al menos 3 días entre la aplicación de estiércol vacuno y el primer evento de lluvia las concentraciones de *E. coli* se redujeron significativamente en un 50%, comparándolo con los suelos que tuvieron el evento de lluvia al día siguiente luego de la aplicación de estiércol vacuno. Los autores hacen mención de que al aumentar el tiempo de permanencia del estiércol en el suelo antes de la precipitación y la escorrentía, aumentará la posibilidad de la muerte de las bacterias y la inmovilización de las bacterias a través de la adsorción y fijación a la superficie del suelo, la vegetación y la exposición a la radiación UV y la eventual desecación.

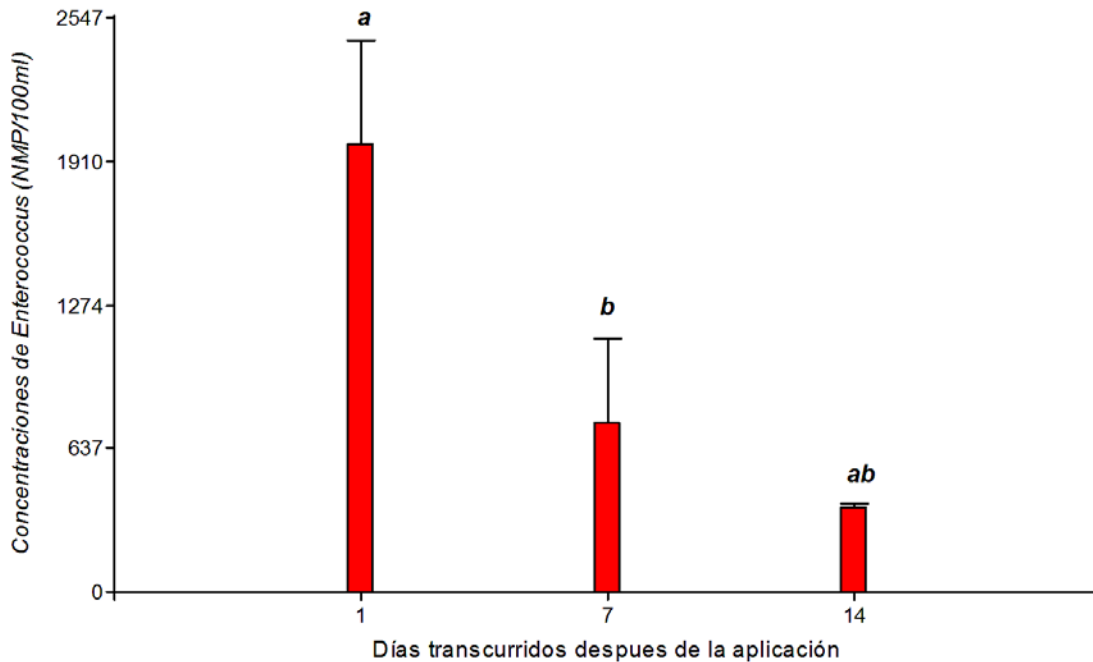


Figura 7: Concentraciones de *Enterococcus* spp. colectadas en la escorrentía en días transcurridos después de la aplicación de estiércol.

3.8 Experimento IV

En el experimento IV se evaluó la sobrevivencia de *Enterococcus* spp. luego de realizar varios eventos de lluvia sucesivos. La concentración inicial de *Enterococcus* spp. registrada en el suelo de las bandejas que no recibieron aplicación de estiércol vacuno fue $4.42 \times 10^9/\text{m}^2$ (d.e.⁶ 1.01×10^6), mientras que la concentración inicial de *Enterococcus* spp. en el suelo de las bandejas en que se aplicó estiércol fue $9.43 \times 10^9/\text{m}^2$ (d.e. 1.59×10^5). A los suelos que tuvieron aplicación de estiércol vacuno (1.4 cm) se les aplicó 2.89×10^7 células de *Enterococcus* spp. por m^2 basado en una concentración en el estiércol de 2.06×10^5 NMP/100ml.

Los valores cumulativos de *Enterococcus* spp. obtenidos en la escorrentía (tres eventos sucesivos) para los suelos utilizados como control fueron de $3.35 \times 10^7/\text{m}^2$ (d.e. 3.11×10^3), mientras que para los suelos con aplicación de estiércol vacuno los valores fueron de $24.1 \times$

⁶ d.e. es la desviación estándar

$10^7/m^2$ (d.e. 4.15×10^3) en todo los eventos. Estos valores representan un 24.8% de recuperación para los suelos con aplicación de estiércol vacuno y 0.76% de recuperación para suelos sin aplicación reciente de estiércol vacuno. Las concentraciones recolectadas en los suelos al día 14 luego de la simulación de lluvia fueron entre 1.07×10^{10} (d.e. 1.01×10^6) y 1.35×10^{10} (d.e. 1.00×10^6) por bandeja a las cuales se le hizo la aplicación de estiércol y las bandejas que se utilizaron como control respectivamente (Cuadro 13).

En ambos grupos de bandejas (con y sin aplicación) se detectaron *Enterococcus* spp, pero la cantidad cumulativa fue 6.2 veces más en bandejas con la aplicación de estiércol versus sin la aplicación de estiércol. La presencia de *Enterococcus* spp. en las bandejas que no recibieron aplicación de estiércol se debió a que los suelos tenían un historial previo de aplicación y a la capacidad de estas bacterias a subsistir en el suelo (Mawdsley et al., 1995). El porcentaje de recuperación de *Enterococcus* spp. en los suelos sin aplicación reciente de estiércol fueron menores lo que quiere decir que las bacterias se quedaron el suelo. Partiendo de lo que ocurrió en los suelos sin aplicación reciente de estiércol, se puede inferir que casi todo lo que se recuperó se debió a *Enterococcus* spp. recién aplicado. Esto datos concuerdan con lo encontrado por Durso et al. (2011) que aplicaciones periódicas de estiércol vacuno en los suelos aportarán más enterococos a las aguas de escorrentías.

Cuadro 13: Resumen de las concentraciones de *Enterococcus* spp. para el experimento IV

	<i>Bandejas</i>	
	<i>Sin Aplicación</i>	<i>Con Aplicación</i>
Células de <i>Enterococcus</i> spp. en el suelo NMP/m ² (día 0)	4.42 x 10 ⁹	9.43 x 10 ⁸
Aplicación de estiércol (litros)	0	2.8
Concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. en el estiércol (NMP/100mL)	2.06 x 10 ⁵	2.06 x 10 ⁵
Células de <i>Enterococcus</i> spp. aplicadas NMP/ m ²	0	2.89 x 10 ⁷
Concentraciones promedio de <i>Enterococcus</i> spp. en cada evento de escorrentía NMP/100ml (por evento)	5.91 x 10 ³	2.66 x 10 ⁴
Volumen promedio de escorrentía en los tres eventos (L)	566.14	906.03
Concentraciones de <i>Enterococcus</i> spp. en escorrentía NMP/m ² (tres eventos)	3.35 x 10 ⁷	2.41 x 10 ⁸
Porcentaje de recuperación en escorrentía (%)	0.76	24.8
Células de <i>Enterococcus</i> spp. en el suelo NMP/m ² (día 14)	1.35 x 10 ¹⁰	1.07 x 10 ¹⁰

4.0 CONCLUSIONES

En esta tesis se cuantificó la concentración de los microorganismos fecales *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. en la escorrentía de suelos agrícolas, por medio de lluvia simulada sobre suelos intactos en bandejas. Se evaluaron las siguientes variables sobre las concentraciones de MIC en la escorrentía: cobertura vegetal, nivel de aplicación, lluvias sucesivas luego de la aplicación de estiércol y tiempo transcurrido en que ocurre un evento de lluvia luego de la aplicación de estiércol.

En los suelos sin aplicación reciente de estiércol las concentraciones de *E. coli* en escorrentía fueron mayores en suelos sin cobertura vegetal en el día 1 luego de la aplicación de estiércol y lo opuesto se observó con las concentraciones de *Enterococcus* spp. En suelos con la aplicación de estiércol de 1.4 cm las concentraciones de *Enterococcus* spp. en escorrentía no se afectaron por la cobertura y fueron persistentes desde el día 1 al día 7 y en el día 14 fueron significativamente menores. En suelos con la aplicación de estiércol de 1.4 cm y sin cobertura, las concentraciones de *E. coli*, fueron persistentes desde el día 1 al día 7 y en el día 14 fueron significativamente menores que en los días anteriores. Las concentraciones de *E. coli* en escorrentía fueron más persistentes (manteniéndose altas) en el suelo con cobertura que en suelo sin cobertura.

En suelos con cobertura vegetal y aplicación de estiércol entre 0.7 y 3.05 cm, las concentraciones de *E. coli* se redujeron en el día 14, luego de tres eventos sucesivos de escorrentía (días 1, 3 7). Las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. fueron mayores debido a la aplicación de por lo menos 0.7 cm de estiércol; no hubo diferencias significativas entre aplicar 0.7 cm y 3.05 cm de estiércol. La ausencia de diferencias entre los niveles más altos

pudo haber sido porque el límite de detección se alcanzó en la mayoría de los casos con los niveles más altos de estiércol.

En suelos con cobertura vegetal y aplicación de estiércol a un nivel de 1.4 cm, las concentraciones de *E. coli* se redujeron consistentemente con escorrentía sucesiva pero no se afectaron por escorrentía en días transcurridos después de la aplicación. En suelos con cobertura vegetal y aplicación de estiércol a un nivel de 1.4 cm, las concentraciones de *Enterococcus* spp. se redujeron consistentemente con escorrentía sucesiva y por escorrentía en días transcurridos después de la aplicación.

Los resultados demuestran que pueden ocurrir concentraciones altas de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en escorrentía en suelos sin aplicación de estiércol pero con historial de aplicación. *E. coli* y *Enterococcus* spp. pueden persistir en suelos para luego aparecer ocurrir en la escorrentía. La presencia de cobertura vegetativa puede modificar las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. pero los resultados obtenidos en este experimento no fueron consistentes entre un experimento y otro. La aplicación de estiércol aumentó la concentración de *E. coli* y *Enterococcus* spp., pero las concentraciones de estos no aumentaron con el nivel de aplicación posiblemente porque las medidas estaban cerca del límite máximo de contaje.

5.0 RECOMENDACIONES

Se sugiere que se realicen estudios de microorganismos indicadores de contaminación en escorrentía con metodologías similares al realizado bajo condiciones de campo. Al realizar los estudios en el campo se debe tener en consideración el efecto del historial de aplicación de estiércol sobre el suelo.

Se recomienda que el agricultor almacene el estiércol por el mayor tiempo posible en la charca de retención o en tanques de gran capacidad para reducir las concentraciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. Se debe evitar hacer aplicaciones de estiércol después de un evento de lluvia y hacer la aplicación de estiércol cuando la probabilidad de incidencia de lluvia sea menor para lograr que no se pierdan grandes cantidades MIC en la escorrentía. Otra práctica que puede ayudar a reducir las pérdidas de MIC es aplicar cantidades menores de estiércol vacuno y suplementar el suelo con fertilizantes comerciales para suplir los nutrientes de los cultivos o pastos y de ser necesario realizar una incorporación de estiércol al suelo.

6.0 LITERATURA CITADA

- Amador, J.A., Sotomayor-Ramírez, D., Martínez, G., Chen, L. y Bachoon, D. 2008. Tracking human faecal contamination in tropical reservoirs in Puerto Rico. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 13:301-317.
- Ardila, G. 2009. Caracterización de los patrones de la pérdida de nutrientes y sedimentos en ultisoles y oxisoles enmendados con residuos orgánicos de vaquería. (Tesis). Departamento de Agronomía y Suelos, Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico. 146 p.
- Bartram, J., y Rees, G. 2000. Monitoring bathing waters; practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes, Routledge, New York, p. 113-167.
- Budnick, G.E., Howard, R.T. y Mayo, D.R. 1996. Evaluation of Enterolert of Enterococci in recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, p.3881-3884.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. y Eaton, A. D. 1998. Standard methods for examination of water and wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C. p. 9-32.
- Cole, D.J., Hill, V.R., Hurnenik, F.J. y Sobsey, M.D. 1999. Health, safety, and environmental concerns of farm animal waste. *Occup. Med.* 14:423-448.
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K. y Verhaegen, J. 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. Derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*. 17: 53-62.
- Crane, S.R., J.A. Moore, M.E. Grismer, y J.R. Miner. 1983. Bacterial pollution from agricultural source: A review. *Trans. ASAE*. 26: 858-866.

- Daniels, S.L. 1972. The adsorption of microorganisms onto solid surfaces, a review. *Dev. Ind. Microbiol.* 13:211-253.
- Díaz, C. 2008. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua; http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20.pdf accesado septiembre, 2010.
- Durso, L.M., Gilley, J.E., Marx, D.B. y Woodbury, B.L. 2011. Effects of animal diets, manure application rate, and tillage on transport of microorganisms from manure-amended fields. *Applied and Environmental Microbiology.* 77(18): 6715-6717.
- Eckner, K.F. 1998. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water Quality monitoring in southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(8):3079-3083.
- Entry, J.A., Hubbard, R.K., Thesi, J.E. y Fuhrmann, J.J. 2000. The influence of vegetation in riparian filterstrips on coliform bacteria: I. Movement and survival in water. *Journal Environmental Quality* 29(4):185-191.
- Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gómez, X. y Moran, A. 2004. The Survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresource Technology.* 93, 191-198.
- Fulhage C. D. 2000. Reduce Environmental Problems with Proper Land Application of Animal Manure. MU Extension, University of Missouri-Columbia. muextension.missouri.edu/xplor/
- Gerba, C.P. y Smith, J.E. 2005 Source of pathogenic microorganisms and their fate during land application of waste. *Journal Environmental Quality.* 34:42-48.

- Guber, A.K., Shelton, D.R. y Pachepsky, Y.A. 2005. Effect of manure on Escherichia coli attachment to Soil. *J. Environ. Qual.* 34:2086-2090.
- Guber, A.K., Shelton, D.R., Pachepsky, Y.A., Sadeghi, A.M. y Sikora, L.J. 2006 Rainfall-induced release of fecal coliforms and other manure constituents: comparison and modeling. *Applied and Environmental Microbiology.* 72: 7531-7539.
- IDEXX 2004. H₂O news newsletters.
http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/water/newsletter/200407.jsf accesado julio, 2013
- IDEXX 2004. <http://www.idexx.com/water/colilert/>.
- Kani, J., y Mills, D. 2000. Recommended methods for analysis of recreational marine water to comply with AB 411. California Department of Health Service, Environmental Laboratory Accreditation Program and Microbiological Disease Laboratory, Sacramento, Calif. http://www.dhs.ca.gov/ps/ddwem/beaches/ab411_methods.htm. accesado abril, 2011.
- Levin, M.A., Fischer, J.R. y Cabelli, V.J. 1975. Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine water. *Appl. Microbiol.* 30:66-71.
- Mankin, K.R., Barner, P.L., Harner, P.K., Kalita, P.K. y Boyer, J.E. 2006. Field evaluation of vegetative filter effectiveness and runoff quality from unstocked feedlots. *Journal of Soil and Water Conservation.* 61:209-217.
- Martínez, G.A., D. Sotomayor-Ramírez, and J.A. Castro. 2002. Application of the Caribbean P index to soils receiving organic amendments. *J. Agric. Univ. P.R.* 86: 145-154.

- Mawdsley, J.L., Bardgett, R.D., Merry, R.J., Pain, B.F. y Theodorou, M.K. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil Ecol.* 2:1-15.
- Meals D.W. y Braun D.C. 2006. Demonstration of method to reduce E. coli runoff from dairy manure application sites. *J. Environ. Qual.* 35:1088-1100.
- Miller, W.P. 1987. A solenoid-operated, variable intensity rainfall simulator. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51:832-834.
- Mishra, A., Benham, B.L. y Mostaghimi, S. 2008. Bacterial transport from agricultural lands fertilized with animal manure. *Water, Air and Soil Pollution.* 189: 127-134.
- Moore, J. A., Smyth, J., Baker, S. y Miller, J. R. 1988. Evaluating coliform concentration in runoff from various animal waste management system. Special Rep. 817 . Agric. Exp. Stn., Oregon State Univ., Corvallis.
- ORIL (Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera) 2010. Informe anual año fiscal 2009-2010. Departamento de Agricultura. Estado Libre Asociado de Puerto Rico.
- Ortega-Achury, S.L. G.A. Martínez-Rodríguez, D. Sotomayor-Ramírez, and M. Muñoz-Muñoz. 2007. Nutrient concentrations in runoff from different manure amended fields of the tropics under natural rainfall conditions. *J. Agric. Univ. P.R.* 91: 101-115.
- PREQB (Junta de Calidad Ambiental). 2011. Área de Evaluación y Planificación Estratégica Programa de Monitoria de Playas y Notificación Pública.
- <http://www.gobierno.pr/NR/rdonlyres/3DC83609-F8A8-4F5B-AB38-57DEA5D6A3DA/0/ResultadosMonitor%C3%ADaActualizadoal18demarzode2011.pdf>
- accesado marzo, 2011.

- PREQB (Junta de Calidad Ambiental). Puerto Rico Environmental Quality Board, 2008. 305(b) y 303(d) Integrated Report. Puerto Rico Environmental Quality Board.
- PREQB (Junta de Calidad Ambiental). Puerto Rico Environmental Quality Board, 2010. 305(b) y 303(d) Integrated Report. Puerto Rico Environmental Quality Board.
- Ramírez-Ávila, J. 2005. Transporte de sedimentos y fósforo en escorrentía bajo simulación de lluvia. (Tesis). Departamento de Agronomía y Suelos. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico. 170 p.
- Redman, C. L. 2003. E. coli method and holding time. (Memorandum) Water Quality Division Department of Environmental Quality. State of Oregon.
- Rufete, B., Perez-Murica, M.D., Perez-Espinosa, A., Moral, R., Moreno-Caselles, J. y Paredes, C. 2006. Total and faecal coliform bacteria persistence in a pig slurry amended soil. *Livestock Science*. 102:211-215.
- Semenov, A. V., Overbeek, L. y van Bruggen, A. H. C. 2009. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* entérica Serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and environmental microbiology*. 75:3206-3215.
- Slanetz, L.W. y Bartley, C.H. 1957. Numbers of Enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improve medium. *Journal of Bacteriology*. 74 (5):591-595.
- Snapp, S.S. y Grandy, A.S. 2011. Advance soil organic matter management (Bulletin E-3137). Michigan State University, Extension.

- Sotomayor-Ramírez, D., Alameda, M., Martínez, G.A., Pérez-Alegría, L. y Corvera-Gomringer, R. 2006. Microbial surface-water quality of the Rio Grande de Añasco watershed, Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*. 42 (2):151-163.
- Sotomayor-Ramírez, D., Ardila-Sierra, G., Martínez-Rodríguez, G. y Pérez-Alegría, L. 2010. Phosphorus persistence in runoff from Ultisol amended with dairy manure sludge. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World pp.105-108.
- Sotomayor-Ramírez, D., G. Martínez, L. Pérez-Alegría. J.J. Ramírez. 2006. Off-field transport of phosphorus from an Ultisol under pasture. *J. Agric. Univ. P.R.* 90: 159-172.
- Sotomayor-Ramírez, D., Martínez, G. y Oliveri L.J. 2001. Phosphorus status of stream waters in Puerto Rico: 1989-97. *J. Agric. Univ. P.R.* 85: 1-15.
- Sotomayor-Ramírez, D., T. Ruiz, Y. Quijano, G. Martínez, C. Saavedra y A. Recaman-Serna. 2008. Nutrients in Dairy Manure Sludge in Puerto Rico: Management and Implications. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society*. 44(2):347-355.
- Soupir, M.L., Mostaghimi, S., Yagow, E.R., Hagedorn, C. y Vaughan, D.H. 2006. Transport of fecal bacteria from poultry litter and cattle manure applied to pastureland. *Water, Air and Soil Pollution*. 169:125-136.
- Spiehs, M. y Goyal, S. 2007. Best management practice for pathogen control in manure management Systems. University of Minnesota, Extension www.extension.umn.edu. accesado abril, 2011.
- Stout, W.L., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R., Sadeghi, A.M., Saporito, L.S. y Sharpley, A.N. 2005. Runoff transport of faecal coliform and phosphorus released from manure in grass buffer conditions. *Applied Microbiology*. 41, 230-234.

- Suárez, M. 2002. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. Rev Cubana Hig Epidemiol 40(1):38-43.
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C. y Leung, K.T. 2005. Microbial indicator of fecal contamination in water: a current perspective. Water, Air and Soil pollution. 166: 139-166.
- Tate, K.W., Atwill, E.R., Bartolome, J.W. y Nader, G. 2006. Significant Escherichia coli attenuation by vegetation buffer on annual grassland. J. Environ. Qual. 35:795-805.
- UME (University of Minnesota/Extension) 2002. Organic Matter management-Soil Scientist. http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/components/7402_02.html accesado mayo, 2012.
- USDA-NRCS. 1998. Waste Treatment Lagoon, Code 359. Field Office Technical Guide Section IV. <ftp://ftp-fc.sc.egov.usda.gov/NHQ/practice-standards/standards/359.pdf> accesado julio, 2013.
- USDA-NRCS. 2008. Waste storage facility, Code 313. Filed Office Technical Guide Section IV. <http://efotg.sc.egov.usda.gov/references/public/CR/313.pdf> accesado julio, 2013.
- USDA-NRCS. 2012. Nutrient Management, Code 590. Filed Office Technical Guide Section IV. [http://efotg.sc.egov.usda.gov/references/public/CR/NutrientManagement\(590\)CB.pdf](http://efotg.sc.egov.usda.gov/references/public/CR/NutrientManagement(590)CB.pdf) accesado julio, 2013.
- USEPA 2002. 2000 National Water Quality Inventory. Washington, DC: USEPA Office of Water 7:54-61.
- USEPA 2003. Fecal Coliform Bacteria TMDL for the Rio La Plata Watershed Puerto Rico. USEPA Region 2 New York, NY. <http://www.epa.gov/waters/tmdl/docs/PR-2003-Fecal%20Coliform-Rio%20La%20Plata%20Watershed.pdf> accesado mayo, 2012.

USEPA 2006. Chapter 17: Bacteria Indicator of Potential Pathogens

http://water.epa.gov/type/oceb/nep/upload/2009_03_13_estuaries_monitor_chap17.pdf

accesado julio, 2013.

USEPA 2012. Recreational Water Quality Criteria. USEPA Office of Water EPA-820-F-12-061

<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/factsheet2012.pdf> accesado mayo, 2012.

USEPA 2013. EPA Region 8 Laboratory Microbiology Capabilities

<http://www2.epa.gov/region8/laboratory-microbiology-capabilities> accesado julio, 2013

USEPA. 1999. Environmental regulations and technology: Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA/625/R-92/013. USEPA, Washington, DC.

7.0 ANEJOS

Anejo 1: Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos sin aplicación reciente de estiércol: *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Anejo 1.1. Experimento 1

Anejo 1.1.1. Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos sin aplicación reciente de estiércol: *E. coli*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG_ <i>E. coli</i>	24	0.59	0.42	49.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1301.00	7	185.86	3.35	0.0215
Cobertura	104.17	1	104.17	1.88	0.1897
Simulación	646.58	3	215.53	3.88	0.0292
Cobertura*Simulación	550.25	3	183.42	3.30	0.0473
Error	888.33	16	55.52		
Total	2189.33	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.11977

Error: 55.5208 gl: 16

Simulación	Medias	n	E.E.		
14	6.67	6	3.04	A	
3	15.58	6	3.04	A	B
7	16.42	6	3.04		B
1	21.00	6	3.04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.44865

Error: 55.5208 gl: 16

Cobertura	Medias	n	E.E.	
Con cobertura	12.83	12	2.15	A
Sin cobertura	17.00	12	2.15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=12.89730

Error: 55.5208 gl: 16

Simulación	Cobertura	Medias	n	E.E.		
14	Sin cobertura	3.00	3	4.30	A	
14	Con cobertura	10.33	3	4.30	A	B
1	Con cobertura	12.00	3	4.30	A	B
7	Con cobertura	12.67	3	4.30	A	B
3	Sin cobertura	14.83	3	4.30	A	B
3	Con cobertura	16.33	3	4.30		B
7	Sin cobertura	20.17	3	4.30		B C
1	Sin cobertura	30.00	3	4.30		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anejo 1.1.2. Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos sin aplicación reciente de estiércol: *Enterococcus* spp.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG_ <i>Enterococcus</i>	24	0.51	0.29	54.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2996.83	7	428.12	2.34	0.0756
Cobertura	135.38	1	135.38	0.74	0.4026
Simulación	475.75	3	158.58	0.87	0.4789
Cobertura*Simulación	2385.71	3	795.24	4.34	0.0203
Error	2929.67	16	183.10		
Total	5926.50	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=11.71089

Error: 183.1042 gl: 16

Cobertura	Medias	n	E.E.	
Con cobertura	22.63	12	3.91	A
Sin cobertura	27.38	12	3.91	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=16.56170

Error: 183.1042 gl: 16

Simulación	Medias	n	E.E.	
3	18.92	6	5.52	A
14	23.50	6	5.52	A
7	26.42	6	5.52	A
1	31.17	6	5.52	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=23.42178

Error: 183.1042 gl: 16

Simulación	Cobertura	Medias	n	E.E.			
3	Con cobertura	10.17	3	7.81	A		
7	Con cobertura	14.33	3	7.81	A		
1	Sin cobertura	17.33	3	7.81	A	B	
14	Con cobertura	21.00	3	7.81	A	B	
14	Sin cobertura	26.00	3	7.81	A	B	C
3	Sin cobertura	27.67	3	7.81	A	B	C
7	Sin cobertura	38.50	3	7.81		B	C
1	Con cobertura	45.00	3	7.81			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anejo 2: Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos con aplicación de estiércol: *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Anejo 2.1. Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos con aplicación de estiércol: *E. coli*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG_ <i>E. coli</i>	24	0.61	0.44	24.98

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3609.74	7	515.68	3.59	0.0162
Cobertura	82.51	1	82.51	0.57	0.4595
Simulación	2173.03	3	724.34	5.04	0.0120
Cobertura*Simulación	1354.20	3	451.40	3.14	0.0543
Error	2297.50	16	143.59		
Total	5907.24	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=14.66640

Error: 143.5937 gl: 16

Simulación	Medias	n	E.E.		
14	32.00	6	4.89	A	
7	49.92	6	4.89		B
1	53.50	6	4.89		B
3	56.50	6	4.89		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=10.37071

Error: 143.5937 gl: 16

<i>Cobertura</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
Con cobertura	46.13	12	3.46	A
Sin cobertura	49.83	12	3.46	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=12.89730

Error: 55.5208 gl: 16

<i>Simulación</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	Sin cobertura	22.33	3	6.92	A	
7	Con cobertura	41.17	3	6.92	A	B
14	Con cobertura	41.67	3	6.92	A	B
3	Con cobertura	48.17	3	6.92		B C
1	Con cobertura	53.50	3	6.92		B C
1	Sin cobertura	53.50	3	6.92		B C
7	Sin cobertura	48.67	3	6.92		B C
3	Sin cobertura	64.83	3	6.92		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anejo 2.2. Análisis de varianza para suelos con y sin cobertura en suelos con aplicación de estiércol: *Enterococcus* spp.

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
RANG_ <i>Enterococcus</i>	24	0.51	0.30	39.75

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	5405.91	7	772.27	2.42	0.0683
Cobertura	75.26	1	75.26	0.24	0.6341
Simulación	5303.03	3	1767.68	5.53	0.0085
Cobertura*Simulación	27.61	3	9.20	0.03	0.9932
Error	5115.33	16	319.71		
Total	10521.24	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=21.88430

Error: 319.7083 gl: 16

<i>Simulación</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
14	21.58	6	7.30	A
7	46.67	6	7.30	B
3	48.83	6	7.30	B
1	62.83	6	7.30	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=15.47454

Error: 319.7083 gl: 16

<i>Cobertura</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
Con cobertura	43.21	12	5.16	A
Sin cobertura	46.75	12	5.16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=30.94908

Error: 319.7083 gl: 16

<i>Simulación</i>	<i>Cobertura</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	Con cobertura	21.00	3	10.32	A	
14	Sin cobertura	22.17	3	10.32	A	
7	Con cobertura	45.67	3	10.32	A	B
3	Con cobertura	46.67	3	10.32	A	B
7	Sin cobertura	47.67	3	10.32	A	B
3	Sin cobertura	51.00	3	10.32	A	B
1	Con cobertura	59.50	3	10.32		B
1	Sin cobertura	66.17	3	10.32		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anejo 3: Análisis de varianza para suelos con cobertura y cuatro niveles de aplicación de estiércol: *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Anejo 3.1. Análisis de varianza para suelos con cobertura y cuatro niveles de aplicación de estiércol: *E. coli*.

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
RANG_ <i>E. coli</i>	48	0.79	0.69	27.31

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	13010.25	15	867.35	8.04	<0.0001
Simulación	1517.96	3	505.99	4.69	0.0080
Nivel	10400.46	3	3466.82	32.13	<0.0001
Simulación*Nivel	1091.83	9	121.31	1.12	0.3747
Error	3452.67	32	107.90		
Total	16462.92	47			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=8.63781

Error: 107.8958 gl: 32

<i>Simulación</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	29.33	12	3.00	A	
7	36.83	12	3.00	A	B
3	42.88	12	3.00		B
1	43.13	12	3.00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=17.27561

Error: 107.8958 gl: 32

<i>Nivel</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
0.00	12.83	12	3.00	A	
1.40	43.50	12	3.00		B
2.80	46.13	12	3.00		B
6.10	49.71	12	3.00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=17.27561

Error: 107.8958 gl: 32

<i>Simulación</i>	<i>Nivel</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	0.00	10.33	3	6.00	A	
1	0.00	12.00	3	6.00	A	
7	0.00	12.67	3	6.00	A	
3	0.00	16.33	3	6.00	A	
14	1.40	21.67	3	6.00	A	
7	2.80	41.17	3	6.00		B
14	2.80	41.67	3	6.00		B
14	6.10	43.67	3	6.00		B
7	1.40	45.33	3	6.00		B
7	6.10	48.17	3	6.00		B
3	2.80	48.17	3	6.00		B
3	6.10	53.50	3	6.00		B
1	2.80	53.50	3	6.00		B
1	1.40	53.50	3	6.00		B
1	6.10	53.50	3	6.00		B
3	1.40	53.50	3	6.00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anejo 3.2. Análisis de varianza para suelos con cobertura y cuatro niveles de aplicación de estiércol: *Enterococcus* spp.

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
RANG_ <i>Enterococcus</i>	48	0.54	0.32	48.01

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo.	11248.12	15	749.87	2.48	0.0152
Simulación	1603.43	3	534.48	1.77	0.1731
Nivel	4276.68	3	1425.56	4.72	0.0078
Simulación*Nivel	5368.01	9	596.45	1.97	0.0764
Error	9674.33	32	302.32		
Total	20922.45	47			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=14.45895

Error: 302.3229 gl: 32

<i>Simulación</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	28.29	12	5.02	A	
7	35.96	12	5.02	A	B
3	36.00	12	5.02	A	B
1	44.63	12	5.02		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=14.45895

Error: 302.3229 gl: 32

<i>Nivel</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
0.00	22.63	12	5.02	A	
1.40	32.42	12	5.02	A	B
2.80	43.21	12	5.02		B
6.10	46.63	12	5.02		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=28.91790

Error: 302.3229 gl: 32

Simulación	Nivel	Medias	n	E.E.				
3	0.00	10.17	3	10.04	A			
7	0.00	14.33	3	10.04	A			
14	2.80	21.00	3	10.04	A	B		
14	0.00	21.00	3	10.04	A	B		
14	1.40	21.83	3	10.04	A	B		
1	1.40	25.00	3	10.04	A	B	C	
3	1.40	31.50	3	10.04	A	B	C	D
7	6.10	32.50	3	10.04	A	B	C	D
1	0.00	45.00	3	10.04		B	C	D
7	2.80	45.67	3	10.04		B	C	D
3	2.80	46.67	3	10.04		B	C	D
1	6.10	49.00	3	10.04		B	C	D
14	6.10	49.33	3	10.04		B	C	D
7	1.40	51.33	3	10.04			C	D
3	6.10	55.67	3	10.04				D
1	2.80	59.50	3	10.04				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anejo 4: Análisis de varianza para los suelos que recibieron lluvias sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia: *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Anejo 4.1. Análisis de varianza para los suelos que recibieron lluvias sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia: *E. coli*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG_ <i>E. coli</i>	18	0.76	0.67	32.33

F.V.	SC	gl	CM	F	p-value
Modelo	366.33	5	73.27	7.77	0.0018
Días transcurridos luego de aplicación (a)	29.00	2	14.50	1.54	0.2544
Lluvia sucesivas (b)	313.25	2	156.63	16.61	0.0003
a*b	24.08	1	24.08	2.55	0.1360
Error	113.17	12	9.43		
total	479.50	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.05276

Error: 9.4306 gl: 12

<i>Días transcurridos luego de aplicación</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
14	7.67	3	1.77	A
1	9.00	9	1.02	A
7	11.17	6	1.25	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.05276

Error: 9.4306 gl: 12

<i>Lluvia sucesivas</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
14	3.33	3	1.77	A
7	7.75	6	1.25	A
1	12.72	9	1.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.46315

Error: 9.4306 gl: 12

<i>Días transcurridos luego de aplicación</i>	<i>Lluvia sucesivas</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
14	7	sd	0	sd	A
7	14	sd	0	sd	B
14	14	sd	0	sd	C
1	14	3.33	3	1.77	D
1	7	6.67	3	1.77	D E
14	1	7.67	3	1.77	D E
7	7	8.83	3	1.77	E F
7	1	13.50	3	1.77	F G
1	1	17.00	3	1.77	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anejo 4.2. Análisis de varianza para los suelos que recibieron lluvias sucesivas y retrasos en el primer evento de lluvia: *Enterococcus* spp.

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R²</i>	<i>R² Aj</i>	<i>CV</i>
RANG_ <i>Enterococcus</i>	18	0.74	0.63	33.93

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Modelo	357.83	5	71.57	6.89	0.003
Días transcurridos luego de aplicación (a)	93.44	2	46.72	4.5	0.0349
Lluvia sucesivas (b)	256.06	2	128.03	12.32	0.0012
a*b	8.33	1	8.33	0.8	0.3881
Error	124.67	12	10.39		
total	482.5	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.25370

Error: 10.3889 gl: 12

<i>Días transcurridos luego de aplicación</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
7	7.17	6	1.32	A	
14	7.33	3	1.86	A	B
1	11.78	9	1.07		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.25370

Error: 10.3889 gl: 12

<i>Lluvia sucesivas</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
14	5.00	3	1.86	A	
7	9.00	6	1.32	A	B
1	11.33	9	1.07		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.73401

Error: 10.3889 gl: 12

<i>Días transcurridos luego de aplicación</i>	<i>Lluvia sucesivas</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
7	14	sd	0	sd	A
14	7	sd	0	sd	B
14	14	sd	0	sd	C
7	7	4.67	3	1.86	D
1	14	5.00	3	1.86	D
14	1	7.33	3	1.86	D
7	1	9.67	3	1.86	D E
1	7	13.33	3	1.86	E F
1	1	17.00	3	1.86	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anejo 5: Historial de aplicación de las bandejas utilizadas para este estudio.

<i>Bandejas</i>	<i>Área colectada</i>	<i>Aplicaciones en los predios (cm³/cm²)</i>	<i>Última fecha de aplicación antes de coleccionar el suelo</i>	<i>Prueba de suelo (P extraíble)</i>	<i>Aplicaciones de estiércol en estudio previo (kg P/ha)</i>	<i>Fecha de aplicación</i>	<i>Promedio de Volumen de simulación de lluvia aplicado (L)</i>
Dosis Baja							
1-3	Pastoreo	----	----	Alta	0	----	38.5
10-12	Pastoreo	----	----	Alta	5.6	04/2008	39.9
19-21	Aplicaciones	1.4	02/2008	Muy alta	0	----	44.1
28-30	Aplicaciones	1.4	02/2008	Muy alta	5.6	04/2008	34.3
Dosis Alta							
4-9	Pastoreo	----	----	Alta	0	----	38.5
13-18	Pastoreo	----	----	Alta	11.2	04/2008	42.7
22-27	Aplicaciones	1.4	02/2008	Muy alta	0	----	44.1
31-36	Aplicaciones	1.4	02/2008	Muy alta	11.2	04/2008	35.7

(Ardila, 2009)

Anejo 6: Bandejas utilizadas en los experimentos y los niveles de estiércol aplicado.

<i>Experimento</i>	<i>Fecha realizado</i>	<i>Aplicación de estiércol (cm³/cm²)</i>	<i>Bandejas de escorrentía</i>											
1 y 2	04/2009	0	3	13	14	17	21	28						
2	04/2009	0.7	31	33	36									
1 y 2	04/2009	1.4	9	11	12	19	30	34						
2	04/2009	3.05	6	16	23									
3	06/2009	1.4	1	2	5	10	15	18	22	24	27			
4	09/2010	1.4	6	7	11	13	14	15	16	17	19	30	31	34

Anejo 7: Contajes comparativos de *Enterococcus* spp. mediante las pruebas con Enterolert (IDEXX) y Filtro de membrana.

<i>Muestra</i>	<i>Replica</i>	<i>Filtro de Membrana</i> (ufc/100mL)	<i>Enterolert</i> (NMP/100mL)
1	1	10240	9804
1	2	1000	2382
1	3	8880	9208
2	1	2480	4160
2	2	18000	114
2	3	4280	2909
3	1	2760	2987
3	2	9600	9208
3	3	3680	2909
4	1	320	691
4	2	80000	1986300
4	3	No data	1986300
5	1	28000	2500000
5	2	60000	1986300
5	3	132000	118