



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Producción de metano en el tratamiento de aguas
servidas por humedales de flujo horizontal
subsuperficial utilizando *Phragmites australis* y
Schoenoplectus californicus: composición de las
comunidades microbianas**

Presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, para
optar al título de Bioingeniero

MARIO IGNACIO SEPÚLVEDA MARDONES

Tutora: Dra. Gladys Vidal

Co-tutora: Dra (c) Daniela López

Concepción, 2015

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Aguas servidas	11
1.2. Características de las aguas servidas	11
1.2.1. Características físicas	12
1.2.2. Características químicas	12
1.3. Humedales construidos	14
1.3.1. Tipos y clasificaciones de los humedales construidos	15
1.3.2. Vegetación en humedales construidos	17
1.3.3. Mecanismos de degradación en humedales de flujo horizontal subsuperficial (HFHSS)	19
1.4. Emisiones de metano	27
1.4.1. Emisiones de metano en sistemas de tratamiento convencionales	28
1.4.2. Emisiones de metano en sistemas basados en HFHSS	29
1.5. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica	33
1.6. Comunidades microbianas en humedales de flujo horizontal subsuperficial	35
1.7. Hipótesis y objetivos	37
1.7.1. Objetivo principal	37
1.7.2. Objetivos específicos	38
2. METODOLOGÍA	38
2.1. Planta piloto de HFHSS	38
2.1.1. Localización del sistema piloto de HFHSS	38
2.1.2. Obtención del influente	39
2.1.3. Características y diseño de los HFHSS	41
2.1.4. Parámetros de operación	42
2.1.5. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos e <i>in situ</i>	43
2.1.6. Balances de masa	44
2.2. Evaluación de la producción de metano	44
2.2.1. Extracción de biomasa	44
2.2.2. Determinación de la actividad metanogénica específica	45
2.2.3. Determinación de la cinética de degradación ácidos grasos volátiles	46
2.3. Análisis estadístico	47
2.4. Caracterización de las comunidades microbianas de los HFHSS	47
2.4.1. Extracción de biomasa y ADN	47
2.4.2. Cuantificación de bacterias y arqueas mediante PCR en tiempo real	48
2.4.3. Análisis de las comunidades microbianas por PCR-DGGE	49
2.4.4. Identificación de las especies microbianas presentes en los HFHSS mediante secuenciación	50
3. RESULTADOS	51

3.1. Monitoreo de parámetros <i>in situ</i>	51
3.2. Caracterización fisicoquímica del influente	55
3.3. Determinación de las eficiencias de eliminación de contaminantes	57
3.3.1. Materia orgánica y sólidos	57
3.3.2. Nutrientes	62
3.4. Evaluación de la producción de metano de los HFHSS	66
3.4.1. Determinación de la actividad metanogénica específica (AME) de la biomasa extraída de los HFHSS	66
3.4.2. Análisis de la degradación de ácidos grasos volátiles (AGV) en los ensayos de actividad metanogénica específica	71
3.5. Evaluación de las comunidades microbianas presentes en los HFHSS	72
3.5.1. Cuantificación de microorganismos mediante la técnica PCR en tiempo real (q-PCR)	72
3.5.2. Análisis de las estructuras de las comunidades microbianas por la técnica PCR-DGGE	73
3.5.3. Identificación de microorganismos presentes en los HFHSS por pirosecuenciación	75
4. DISCUSIÓN	79
4.1. Monitoreo de parámetros <i>in situ</i>	79
4.2. Caracterización fisicoquímica del influente	81
4.3. Determinación de las eficiencias de eliminación de contaminantes	82
4.4. Evaluación de la producción de metano de los HFHSS	85
4.5. Evaluación de las comunidades microbianas presentes en los HFHSS	88
5. CONCLUSIONES	92
6. AGRADECIMIENTOS	94
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8. ANEXO	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los contaminantes orgánicos en aguas servidas	13
Figura 2: Esquema de clasificación de los tipos de Humedales Construidos	15
Figura 3: Perfiles de los tipos de humedales construidos según hidrología. a) HFS (humedal de flujo superficial); b) HFHSS (humedal de flujo Horizontal subsuperficial); c) HFVSS (humedal de flujo vertical subsuperficial)	17
Figura 4: Esquema de las transformaciones involucradas en la digestión anaerobia de materia orgánica y los consorcios microbiológicos implicados en cada una de ellas	25
Figura 5: Ubicación de la planta piloto de HFHSS en la PTAS de Hualqui (36°59'26.93" de la latitud sur, y 72°56'47.23" de longitud Oeste)	38
Figura 6: Planta piloto de HFHSS ubicado en la PTAS-Hualqui. HFHSS: Humedal de flujo horizontal subsuperficial; HFHSS-Phr1 y HFHSS-Phr2: celdas plantadas con <i>Phragmites australis</i> ; HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2: celdas plantadas con <i>Schoenoplectus californicus</i> ; flechas naranjas: influente; flechas azules: efluente; TA: tanque de almacenamiento	40
Figura 7: Zonas de muestreo de los HFHSS. A: HFHSS-Phr2 (plantado con <i>P. australis</i>); B: HFHSS-Sch2 (plantado con <i>S. californicus</i>); Las flechas indican la dirección del flujo; C: Esquema del perfil de los HFHSS	41
Figura 8: Equipo para la determinación de la actividad metanogénica específica (AME). Izquierda: esquema del sistema; derecha: montaje para determinación de AME. Flechas verdes: dirección de flujo de biogás; Flecha azul: dirección del flujo de solución NaOH. Modificado de Soto et al. (1993)	46
Figura 9: Comportamiento del pH en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera verano; Zona A (□); Zona B (■); Zona C (■)	52

Figura 10: Comportamiento de la temperatura en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera verano; Zona A (□); Zona B (■); Zona C (■) 53

Figura 11: Comportamiento del potencial óxido reducción (POR) en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera verano; Zona A (□); Zona B (■); Zona C (■) 54

Figura 12: Comportamiento del oxígeno disuelto en los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera verano 55

Figura 13: Eficiencias de eliminación (barras) y concentraciones (cajas) de DBO₅ en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 58

Figura 14: Eficiencias de eliminación (barras) y concentraciones en los efluentes (cajas) de DQO. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 59

Figura 15: Eficiencias de eliminación (barras) y concentraciones (cajas) de SST en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 60

Figura 16: Eficiencias de eliminación y concentraciones de SSV en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 61

Figura 17: Eficiencias de eliminación y concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 62

Figura 18: Eficiencias de eliminación y concentraciones de nitrógeno total (NT) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (▒); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 63

Figura 19: Eficiencias de eliminación y concentraciones de fósforo total (PT) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (▒); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano 64

Figura 20: Producción específica de metano de la biomasa extraída desde los HFHSS. A) HFHSS con *P. australis* en la temporada otoño/invierno del año 2013; B) HFHSS con *S. californicus* en la temporada otoño/invierno del año 2013; C) HFHSS con *P. australis* en la temporada de otoño/invierno del año 2015; D) HFHSS con *S. californicus* en la temporada de otoño/invierno del año 2015. E) HFHSS con *P. australis* en la temporada primavera/verano del año 2015; F) HFHSS con *S. californicus* en la temporada de primavera/verano del año 2015. Zona A (●); Zona B (□); Zona C (Δ) 68

Figura 21: Curvas de degradación de ácidos grasos volátiles (AGV) en los ensayos AME de cada zona de los HFHSS. O/I: temporada otoño invierno; P/V: temporada primavera verano. Phr: *P. australis*; Sch: *S. californicus*. acetato (●); propionato (▲); butirato (■) 72

Figura 22: Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE). Los números indican las bandas extraídas para secuenciación. A) bacterias; B) arqueas 74

Figura 23: Dendrogramas de similitud entre las comunidades microbianas de los HFHSS plantados con *P. australis* (Phr) y *S. californicus* (Sch), en las temporadas de otoño/invierno (O/I) y primavera/verano (P/V). A) bacterias; B) arqueas 75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de contaminantes de origen químico en las aguas servidas	12
Tabla 2: Características y parámetros óptimos de crecimiento de las especies de macrófitas más utilizadas en HFHSS	18
Tabla 3: Eficiencias de eliminación de contaminantes mediante el uso de HFHSS	20
Tabla 4: Eficiencias de eliminación de materia orgánica de HFHSS con diferentes diseños y cargas orgánicas aplicadas	22
Tabla 5: Emisiones de metano en tratamientos de aguas servidas mediante tecnologías convencionales	29
Tabla 6: Emisiones de metano en tratamientos de aguas servidas mediante el uso de HFHSS	32
Tabla 7: Microorganismos involucrados en las reacciones bioquímicas que ocurren en los HFHSS	35
Tabla 8: Condiciones climáticas, parámetros de diseño y operación de las celdas de HFHSS	42
Tabla 9: Partidores para amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR	48
Tabla 10: Parámetros <i>in situ</i> promedio por zona	51
Tabla 11: Caracterización fisicoquímica del influente	56
Tabla 12: Concentraciones promedio del influente y los efluentes de los HFHSS	65
Tabla 13: Cargas orgánicas aplicadas, actividad metanogénica específica y emisiones de CH ₄ estimadas	70

Tabla 14: Cuantificación del gen ARNr 16S de la biomasa extraída de los HFHSS 73

Tabla 15: Secuencias de bandas extraídas del DGGE asociadas a base de datos GenBank 78

ABREVIACIONES

AGV	Ácidos grasos volátiles	mg·L ⁻¹
CH₄	Metano	
CO₂	Dióxido de Carbono	
DBO₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg·L ⁻¹
DQO	Demanda Química de Oxígeno	mg·L ⁻¹
ET	Evapotranspiración	mm·d ⁻¹
HC	Humedal Construido	
HFHSS	Humedal de Flujo Horizontal Subsuperficial	
HFS	Humedal de Flujo Superficial	
HFSS	Humedal de Flujo Subsuperficial	
HFVSS	Humedal de Flujo Vertical Subsuperficial	
MOD	Materia Orgánica Disuelta	
MOP	Materia Orgánica Particulada	
N-NH₄⁺	Nitrógeno amoniacal	mg·L ⁻¹
NT	Nitrógeno Total	mg·L ⁻¹
O/I	Temporada de otoño/invierno	
OD	Oxígeno disuelto	mg·L ⁻¹
P/V	Temporada de primavera/verano	
Phr	<i>Phragmites australis</i>	
POR	Potencial Óxido Reducción	mV
PP	Precipitaciones	mm·d ⁻¹
PT	Fósforo Total	mg·L ⁻¹
PTAS	Planta de Tratamiento de Aguas Servidas	
Sch	<i>Schoenoplectus californicus</i>	
SST	Sólidos Suspendidos Totales	mg·L ⁻¹
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles	mg·L ⁻¹
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulico	d

RESUMEN

Los humedales construidos de flujo horizontal subsuperficial (HFHSS) han sido una tecnología mundialmente utilizada para el tratamiento de aguas servidas. Sin embargo, las condiciones de operación de los HFHSS permiten el desarrollo de microorganismos productores de metano, que es un gas de efecto invernadero. De los diversos factores que inciden en las producciones de metano, el tipo de vegetación utilizada en los HFHSS puede afectar las comunidades microbianas, y por ende, estas producciones de metano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las producciones de metano y composición de las comunidades microbianas de HFHSS que tratan aguas servidas utilizando *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus*. Se utilizó una estación piloto de HFHSS plantados con *P. australis* y *S. californicus* cuyo monitoreo consideró: determinación de eficiencias de eliminación de contaminantes; determinación de actividad metanogénica específica (AME); determinación de las comunidades microbianas mediante las técnicas PCR en tiempo real, y PCR-DGGE, usando partidores contra el gen ARNr 16S, con posterior secuenciación.

Los HFHSS presentaron eficiencias de eliminación del 70, 65, 93 y 92% de DBO₅, DQO, SST y SSV, respectivamente. Las producciones de metano fueron en general mayores en la salida del efluente, con valores de AME entre 0,013 y 1,176g DQO_{CH₄}·g⁻¹SSV·d⁻¹. En promedio se cuantificaron 5,8·10⁶copias·g⁻¹SSV bacterias y 4,7·10⁴copias·g⁻¹SSV arqueas. Los microorganismos encontrados pertenecieron principalmente a los géneros *Clostridium*, *Bacteroidales*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* y a los subgrupos β y γ-proteobacteria.

El uso de *P. australis* o *S. californicus* generó diferencias no significativas en las producciones de metano entre el 20 y 43 %. La estacionalidad generó diferencias significativas desde el 70 al 97 % en las producciones de metano. Las comunidades microbianas presentaron diferentes composiciones entre el uso de *P. australis* o *S. californicus*. No obstante, la estacionalidad influyó de mayor manera en las comunidades. La metanogénesis acetoclástica fue el mecanismo principal en la producción de metano en los HFHSS.

ABSTRACT

Horizontal subsurface flow constructed wetlands (HSSF) are a technology used worldwide for wastewater treatment. However, HSSF operation conditions may generate the development of microorganisms linked to the production of methane, a strong greenhouse gas. Different plant species used in HSSF can shape microbial communities, and in consequence, affect methane production.

The aim of this work was to evaluate methane production and microbial community composition of the biomass attached to the HSSF that treat wastewater using *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus*.

To carry out this work, a pilot plant based on HSSF planted with *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus* was used. The study considered the following items: pollutant removal efficiencies determination; specific methanogenic activity (SMA) evaluation; determination of microbial communities through real-time PCR, denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) and subsequent gene sequencing. All the molecular techniques were carried out targeting bacterial and archaeal 16S rRNA genes.

HSSF presented efficiencies of 70, 65, 93 and 92 % removing BOD₅, COD, TSS and VSS, respectively. Methane productions showed to be higher in the outlet zones. SMA values were in the range 0,013 y 1,176g COD_{CH₄}·g⁻¹VSS·d⁻¹. Bacterial and archaeal quantification presented, in average, 5,8·10⁶ and 4,7·10⁴copies·g⁻¹VSS, respectively. The main microbial species founded belonged to the genera *Clostridium*, *Bacteroidales*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* and the sub-groups β-proteobacteria and γ-proteobacteria.

The use of either *P. australis* or *S. californicus* produced differences between 20 and 43 % in methane production. These differences were not significant. Seasonality did produce significant differences between 70 and 97 % in methane productions. Microbial communities from HSSF planted with *P. australis* showed different compositions to those from HSSF planted with *S. californicus*. Nevertheless, seasonality was a major factor in shaping microbial communities. Acetoclastic methanogenesis was the principal pathway for methane production.

1. INTRODUCCION

1.1. Aguas servidas

Las aguas servidas domésticas corresponden a los residuos líquidos generados por una comunidad, los cuales provienen de viviendas, residencias, edificios comerciales e institucionales cuyo contenido se basa en toda la materia añadida durante su uso (Romero, 2004). Por tanto, se compone por aguas negras portadoras de excretas humanas (provenientes del inodoro), y aguas grises, que corresponden al residuo resultante del aseo personal, ropa y cocina (Mara, 2004).

La cantidad de aguas servidas generadas en los hogares y su composición varía de acuerdo al tipo de instalaciones, implicancias familiares de los habitantes (número de individuos, edad, tipos de viviendas, movilidad, etc.), niveles socioeconómicos, entre otros. Por otro lado, las características también varían con respecto a la ubicación geográfica y la movilidad estacional o anual de los habitantes (U.S.EPA, 2000). La tasa de generación diaria de residuos líquidos urbanos está en el rango $100 - 400 \text{ L}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Zaror, 2000). La regulación Chilena vigente (DS 609/98), considera la generación de $200 \text{ L}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ que llegan como descarga a los sistemas de alcantarillado. El 94,6 % de las aguas servidas urbanas en Chile son tratadas por plantas de tratamiento de aguas servidas ya sean de tipo convencional o no convencional (SISS, 2014). Sin embargo sólo el 8 % de las aguas servidas rurales son tratadas (SISS, 2008).

1.2. Características de las aguas servidas

Los constituyentes de las aguas servidas se pueden clasificar en las categorías de contaminantes físicos, químicos o biológicos. (Ramalho, 1996). En la Tabla 1 se observan las principales características de las aguas servidas de un núcleo urbano de 20.000 habitantes en las estaciones de invierno y primavera (Rojas *et al.*, 2013). Las aguas servidas se clasifican según su carga de contaminantes. Las aguas más diluidas presentan concentraciones 71, 75 y 73 % menores de DBO_5 , nitrógeno total (NT) y sólidos suspendidos totales (SST), respectivamente, en comparación a aquellas clasificadas como aguas servidas concentradas (Henze *et al.*, 2002).

Tabla 1. Concentración de contaminantes de origen químico en aguas servidas.

Parámetro	Concentración (mg·L ⁻¹)	
	Invierno	Primavera
DBO ₅	184,0 ± 39,0	236,0 ± 44,0
DQO	287,6 ± 25,0	425,2 ± 350,6
SST	216,6 ± 87,7	449,2 ± 272,3
SSV	123,8 ± 85,9	297,5 ± 142,6
NT	54,5 ± 17,3	117,7 ± 15,4
N-NH ₄ ⁺	39,5 ± 13,2	100,3 ± 38,6
PT	14,1 ± 3,2	16,4 ± 4,3
P-PO ₄ ³⁻	8,2 ± 2,5	10,7 ± 0,8

DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno; DQO: Demanda química de oxígeno; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; NT: nitrógeno total; N-NH₄⁺: nitrógeno amoniacal; PT: fósforo total; P-PO₄³⁻: ortofosfato. Rojas *et al.* (2013).

1.2.1. Características Físicas

a) Sólidos Totales: Los sólidos totales se clasifican en sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos disueltos. Dentro de los SST se encuentran los sólidos suspendidos volátiles (SSV) que corresponden a la fracción orgánica y los sólidos sedimentables (~60% de los sólidos totales) (Metcalf y Eddy, 2003).

b) pH: Los procesos biológicos oxidativos que ocurren en las aguas servidas tienden a alcalinizar el medio (Von Sperling, 2007). El rango de pH comúnmente observado varía entre 6,5 y 8,5 (Metcalf y Eddy, 2003).

1.2.2. Características químicas

a) Materia orgánica: En las aguas servidas la materia orgánica (MO) está comprendida por diversos compuestos, cuyas estructuras y tamaños moleculares son diversos (0,001-100 μm) (Aguirre, 2004). Por tanto, esta queda condicionada por dicha cualidad, pudiéndose clasificar como se esquematiza en la Figura 1. APHA (1999), describe a la materia orgánica disuelta (MOD) como aquella que pasa a través de filtros de tamaño de poro de 0,45μm (o menor), mientras que la particulada (MOP) es la que queda retenida en el filtro. La MO se encuentra principalmente en forma disuelta y

sedimentable, tanto como en efluentes primarios como en aguas servidas crudas (Caselles-Osorio *et al.*, 2007). La MO proveniente en las aguas servidas contiene una fracción biodegradable y otra no biodegradable (recalcitrante) (Metcalf y Eddie, 2003). Henze *et al.* (2008) documenta que el 10 % de la MOD corresponde a materia recalcitrante, siendo la fracción restante (90 %) biodegradable. La MOP comprende un 33,3 % de materia orgánica inerte y el 66,7 % restante es biodegradable (Henze *et al.*, 2008).

En las aguas servidas, el índice de biodegradabilidad (DBO_5/DQO) suele ser 0,5, valor que posibilita el tratamiento con sistemas biológicos. Por el contrario, con $DBO_5/DQO < 0,3$, las aguas servidas se consideran altamente recalcitrantes, lo que dificulta el uso de tratamientos biológicos (Metcalf y Eddy, 2003).

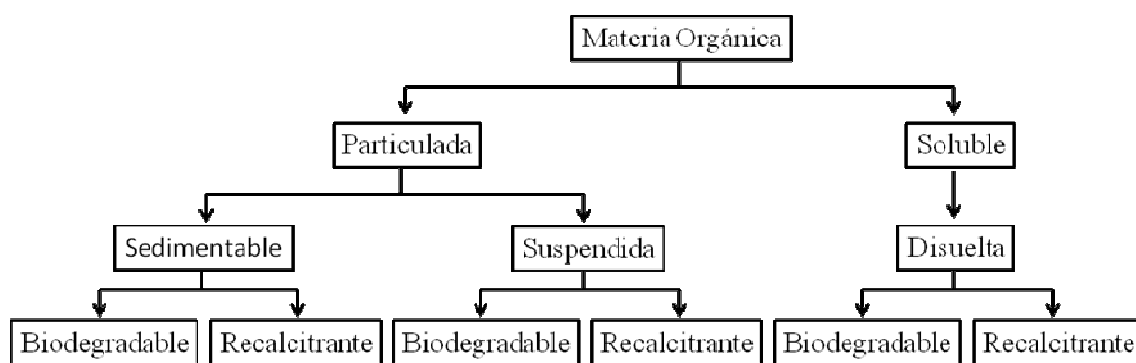


Figura 1. Clasificación de los contaminantes orgánicos en aguas servidas. Modificado de Henze *et al.* (2008).

Específicamente, los compuestos orgánicos presentes en las aguas servidas consisten principalmente en: proteína (~40%), carbohidratos (25% al 50%), aceites y grasas (~10%), y en menor cantidad, urea, detergentes, fenoles, pesticidas, entre otros. (Pessoa *et al.*, 1982). Además suele haber presencia de compuestos orgánicos individuales, como productos de desinfección (trihalometanos, triclorofenoles, ácidos haloacéticos, etc.) (Metcalf y Eddy, 2003) y compuestos orgánicos emergentes como antibióticos, cosméticos, metabolitos y hormonas esteroideas. (Reyes-Contreras *et al.*, 2012).

b) Nutrientes: los nutrientes más importantes que se consideran en las aguas servidas son el nitrógeno y el fósforo, ya que son los más indispensables para el crecimiento de los organismos acuáticos (Ramalho, 1996).

En aguas servidas, el NT generalmente se encuentra comprendido en un 50% como amonio (N-NH_4^+), (0,75 – 3 %) como nitritos y nitratos (N-NO_2^- , N-NO_3^-) y el restante como nitrógeno orgánico (R-NH_4), (Henze *et al.*, 2002).

El fósforo total (PT) se puede encontrar en diversas formas, siendo el ortofosfato (PO_4^{3-}) el utilizado por los organismos como nutriente, y por ende, el más considerado al momento de caracterizar las aguas servidas (Metcalf & Eddy, 2003). Es además, la especie más abundante en aguas servidas (~71 % del PT) (Henze, *et al.*, 2002). El fósforo también se encuentra en su forma inorgánica, cuyos valores aumentan en aproximadamente un 40 % con el alto uso de productos de limpieza y otros químicos hogareños (Von Sperling, 2007; Henze *et al.*, 2002).

1.3. Humedales construidos

Los humedales construidos (HC) son sistemas de tratamiento no convencionales que han sido utilizados a partir de mediados del siglo XX en el tratamiento de aguas servidas (Vymazal, 2011a). Estos HC han sido diseñados para que mediante procesos fisicoquímicos y biológicos propios de la vegetación, el suelo y los consorcios microbianos, puedan depurar las aguas servidas bajo determinadas condiciones operativas (Vymazal, 2007). Estos sistemas de depuración están constituidos de lagunas o canales impermeabilizados de menos de 1 m de profundidad, con sus respectivas tuberías de entrada del influente y salida del efluente (García y Corzo, 2008). Estos se encuentran vegetados con especies de plantas características de zonas húmedas, denominadas macrófitas (Kadlec y Wallace, 2009).

Los humedales construidos son una tecnología apropiada para aquellos sectores en que existe disponibilidad de terreno pero no hay mano de obra calificada para la operación de sistemas más complejos de depuración (U.S.EPA, 2000). Los requerimientos energéticos de los HC son considerablemente menores a los sistemas convencionales de lodos activados (Kadlec y Wallace, 2009). Rojas, (2012) obtuvo consumos de energía ($\text{kWh}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$) en sistemas de flujo subsuperficial con

tratamiento primario del 33 al 75 % menores que los consumos en sistemas de tratamiento con lodos activados (planta de tratamiento de aguas servidas Hualqui y Quilleco). Estas características han permitido un crecimiento exponencial de este tipo de tecnologías en los últimos años en Europa, alcanzando un número de 1012 humedales construidos sólo en el Reino Unido hasta el año 2007 (Cooper, 2009). Estos se utilizan comúnmente para la depuración de aguas residuales domésticas en zonas rurales de baja densidad poblacional (<2000 habitantes) como tratamiento secundario o terciario donde existe la superficie de suelo disponible para su instalación (Vymazal, 2007).

1.3.1. Tipos y Clasificación de los humedales construidos

Los humedales construidos pueden ser clasificados de acuerdo a diversos parámetros de diseño, siendo los más importantes la hidrología, tipo de crecimiento de la vegetación, y dirección del flujo del influente (Figura 2) (Vymazal, 2011a).

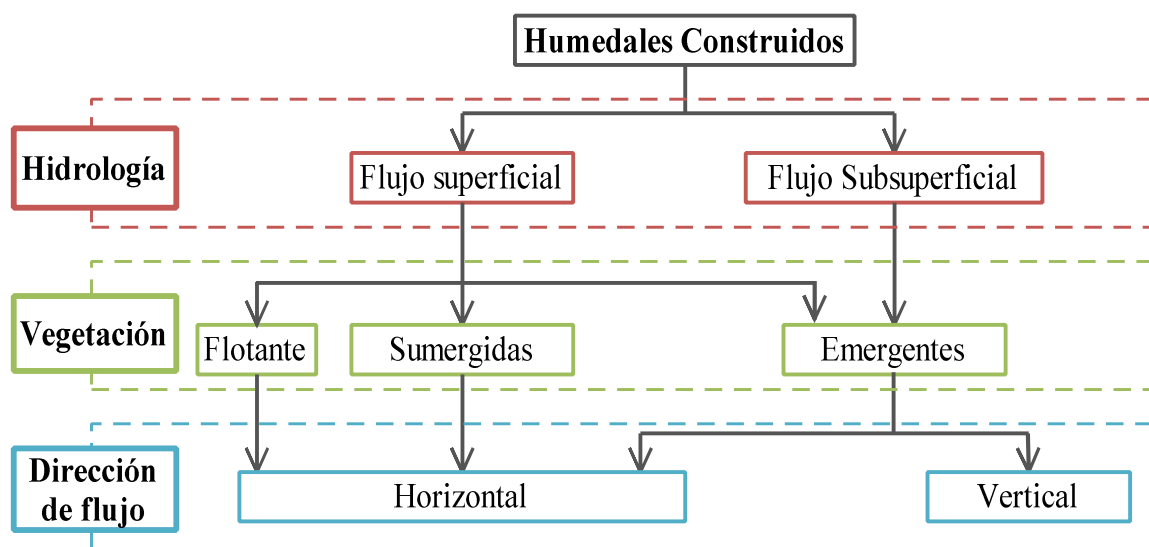


Figura 2. Esquema de clasificación de los tipos de Humedales Construidos. Modificado de Plaza de los Reyes *et al.* (2011).

a) Humedales de flujo superficial (HFS): Como se expone en la Figura 3a, el agua se encuentra expuesta directamente a la atmósfera, circulando entre los tallos y hojas de la vegetación, que puede ser flotante, sumergida o emergente. Estos humedales tienen una profundidad de lámina de agua entre 0,3 y 0,4 m (García y Corzo, 2008) y

ocupan, generalmente, grandes extensiones de terreno de hasta centenares de hectáreas, ya que el área específica por persona equivalente (PE) es entre 5 y 10 m²·PE⁻¹ (García *et al.*, 2004a; Bécares, 2004). Un inconveniente de los HFS es el directo contacto de la lamina de agua con la atmosfera, por lo que existe exposición a patógenos (Kadlec y Wallace, 2009).

b) Humedales de flujo subsuperficial (HFSS): En este caso, el agua fluye a través de un medio granular en forma subterránea (0,3 a 0,9 m de profundidad) circulando entre las raíces y rizomas de las plantas (García y Corzo, 2008). Los procesos bioquímicos de depuración son llevados a cabo por la biopelícula que coloniza el medio granular y las raíces y rizomas del sistema (Kadlec y Wallace, 2009). Este tipo de humedales requiere menor superficie específica (1 - 5 m² PE⁻¹) que los HFS (Vymazal, 2011a; Bécares, 2004). De acuerdo a la dirección del flujo del influente, los HFSS se pueden clasificar en las siguientes configuraciones:

I) Humedales de flujo horizontal subsuperficial (HFHSS): En estos sistemas el agua residual fluye desde la tubería del influente pasando horizontalmente a través del medio filtrante hasta llegar a la zona de salida (Figura 3b). La profundidad comúnmente utilizada es de 0,5 m con una superficie específica de 5 m² PE⁻¹ para tratamiento secundario (Bécares, 2004). Estos humedales funcionan permanentemente inundados con la lámina de agua entre 5 y 1 cm por debajo de la superficie (Plaza de los Reyes *et al.*, 2011; García y Corzo, 2008).

II) Humedales de flujo vertical subsuperficial (HFVSS): En estos sistemas el influente entra por la parte superior en forma de riego uniforme, percolando verticalmente a través del medio filtrante para ser recolectada mediante tuberías perforadas en el fondo (Figura 3c) (García y Corzo, 2008). La profundidad de estos sistemas varía entre 0,8 y 1 m, con superficies específicas entre 1 y 2 m²·PE⁻¹, dependiendo de las necesidades de eliminación de nitrógeno (Bécares, 2004). La circulación vertical del agua tiene lugar a pulsos, de manera que el medio granular no está siempre inundado. Estos sistemas han sido utilizados para producir efluentes nitrificados (Plaza de los Reyes *et al.*, 2011). Más aún, estos

son combinados generalmente con sistemas de HFHSS para generar en forma sucesiva los procesos de nitrificación y desnitrificación (García y Corzo, 2008).

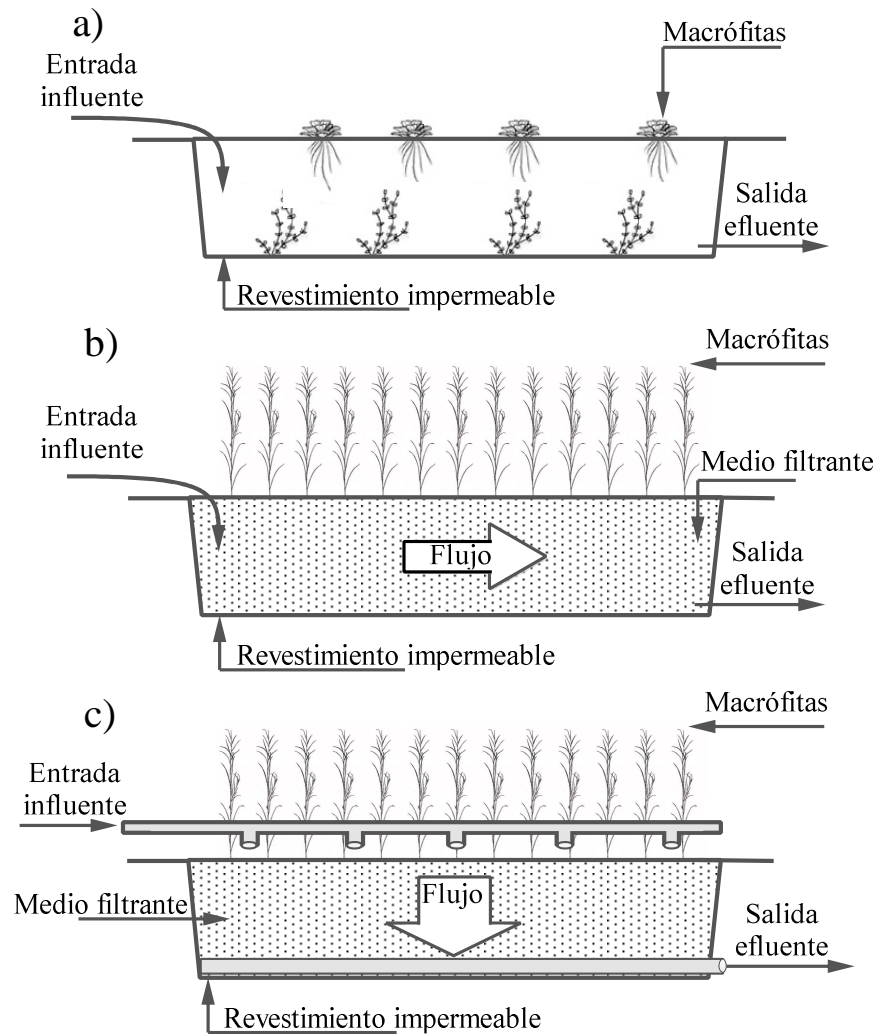


Figura 3. Perfiles de los tipos de humedales construidos según hidrología. a) HFS (humedal de flujo superficial); b) HFHSS (humedal de flujo horizontal subsuperficial); c) HFVSS (humedal de flujo vertical subsuperficial). Modificado de Kadlec y Wallace (2009).

1.3.2. Vegetación en humedales construidos

Se han realizado diversos estudios en humedales construidos con y sin vegetación, en los cuales se concluye que este componente tiene incidencia en la

eliminación de contaminantes (Brix, 1997; Tanner, 2001; Stottmeister *et al.*, 2003). La vegetación en HC otorga un ambiente propicio para los procesos fisicoquímicos y microbiológicos, mejorando de esta manera las eficiencias de eliminación (García y Corzo, 2005).

Los procesos en que participan las macrófitas emergentes de los HFHSS para aumentar las eficiencias de depuración son:

- a) Aislamiento térmico: la vegetación cumple el rol de aislante térmico, apantallando la radiación solar durante la época de verano y almacenando el calor en épocas de bajas temperaturas (Vymazal, 2011b).
- b) Superficie para crecimiento microbiano: La rizosfera de las plantas aumenta la densidad microbiana proporcionando superficie y materia orgánica (producto de la fotosíntesis) para el crecimiento de la biopelícula que da lugar a los procesos de depuración, que se mostrarán más adelante (Vymazal, 2011b).
- c) Exudación de las raíces: Las macrófitas eliminan diversos componentes a través de las raíces producto de su metabolismo. Uno de los componentes liberados es el oxígeno, el cual genera ambientes aerobios en las cercanías de las raíces, habilitando procesos de nitrificación, oxidación de metano, digestión aerobia, entre otros (Le Mer y Roger, 2001).

Las especies de macrófitas utilizadas en los HFS pueden ser del tipo flotante, como por ejemplo *Lemna minor*, *Spirodella polyrhiza* o sumergidas como *Myriophyllum spicatum* (Kadlec y Wallace, 2009). Las macrófitas emergentes se usan para todos los tipos de humedales (HFHSS, HFVSS y HFS), donde los géneros comúnmente utilizados en HFHSS son: *Phragmites* spp., *Schoenoplectus* spp., y *Typha* spp. (Plaza de los Reyes y Vidal, 2007). En la Tabla 2, se especifican las características y condiciones de crecimiento de las especies más utilizadas en sistemas de HFHSS

Tabla 2. Características y parámetros óptimos de crecimiento de las especies de macrófitas más utilizadas en HC

Especie	Tipo	T (°C)	pH	Altura (m)	Profundidad raíces (m)	Asimilación de nutrientes
----------------	-------------	-------------------	-----------	-----------------------	-----------------------------------	--------------------------------------

						(kg·ha ⁻¹ ·año ⁻¹)
<i>Phragmites australis</i>	Perenne	16-27	4,8-8,2	8	0,6-1,0	225 (35)
<i>Schoenoplectus lacustris</i>	Perenne	16-28	4,0-9,0	3	0,7-0,8	125 (18)
<i>Typha latifolia</i>		10-30	4,0-10	3	-	2630 (403)

T: temperatura; Asimilación de nutrientes: en paréntesis la asimilación de fósforo, fuera del paréntesis asimilación de nitrógeno. (Plaza de los Reyes y Vidal, 2007; Vymazal, 2011b).

1.3.3. Mecanismos de degradación de contaminantes en humedales de flujo horizontal subsuperficial (HFHSS)

Los mecanismos que predominan en los HFHSS son la separación líquido-sólido y las transformaciones químicas (Kadlec y Wallace, 2009). Las separaciones incluyen procesos de sedimentación, filtración, absorción, adsorción, intercambio iónico y lixiviación (U.S.EPA, 2000). Dentro de las transformaciones químicas, están las reacciones de óxido/reducción, floculación, precipitación, reacciones ácido/base y reacciones bioquímicas (U.S.EPA, 2000). Las reacciones bioquímicas ocurren mediante mecanismos aerobios en presencia de oxígeno disuelto. Mientras que en condiciones anóxicas o de baja concentración de oxígeno disuelto (OD) (< 2 mg·L⁻¹) los procesos son principalmente anaerobios (Vymazal *et al.*, 1998).

En los HFHSS, las reacciones bioquímicas se llevan a cabo principalmente por la biopelícula que crece en el medio granular y las raíces de las macrófitas (García y Corzo, 2008). De esta manera se alcanzan altas eficiencias (Tabla 3) de eliminación de MO orgánica (medidas como DQO y DBO₅), SST y SSV. En cuanto a nutrientes las eficiencias suelen ser menores (Tabla 3).

Tabla 3. Eficiencias de eliminación de contaminantes mediante el uso de HFHSS

Parámetro	Concentración (mg·L ⁻¹)		Eficiencia (%)
	Influyente	Efluente	
DBO ₅	19,5-373,0	-	60,7 – 97,0
DQO	260,0 – 580,0	26,1 – 98,0	70,0 -97,0
NT	53,0 – 85,0	<10,0 – 126,0	30,0 -75,0
N-NH ₄	59,0 – 61,0	47,0 – 51,0	14,0 – 25,0
PT	0,6 – 17,0	0,6 - 6,4	10,0 - 40,9

SST	113,0 – 310,0	2,0 - 22,3	68,1 – 99,0
-----	---------------	------------	-------------

DBO₅: demanda bioquímica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno; NT: nitrógeno total; N-NH₄⁺: nitrógeno amoniacal; PT: fósforo total; SST: sólidos suspendidos totales. Modificado de Rojas (2012).

La importancia relativa de las diferentes reacciones bioquímicas involucradas en la depuración es determinante para la eficiencia del sistema (Vymazal *et al.*, 1998). En el caso de los HFHSS, la permanente saturación del sistema promueve la predominancia de las vías anaerobias de eliminación de contaminantes (Aguirre, 2004). Además, las condiciones óxido reducción coartan las vías de eliminación de contaminantes en los HFHSS (García *et al.*, 2010). Debido a esto, el potencial de óxido reducción (POR) es un parámetro que sirve como indicador de los aceptores de electrones disponibles en el medio, y en consecuencia de la importancia relativa de cada proceso involucrado en la eliminación de contaminantes (Baptista *et al.*, 2003; García *et al.*, 2003; Faulwetter *et al.*, 2009; Saeed y Sun, 2012). De esta manera, las vías aerobias predominarán en un rango de potencial oxido reducción (POR) de entre +300mV y +700mV (condiciones oxidativas), mientras que con potenciales redox menores a +300mV nos indican un medio donde predomina un ambiente reductor y por ende anaerobio (Scholz, 2005; Faulwetter *et al.*, 2009). Hay que tomar en cuenta que estos umbrales pueden cambiar debido a que el potencial redox está influenciado por la temperatura y pH del medio (Kadlec y Wallace, 2009). Los mecanismos de eliminación de los distintos constituyentes de las aguas servidas se describen a continuación:

a) Sólidos suspendidos: Los sistemas de HFHSS tienen largos tiempos de residencia hidráulicos (TRH) (5 - 10 días) (Plaza de los Reyes y Vidal, 2007), por lo que gran parte de los sólidos suspendidos son removidos por sedimentación y filtración (García y Corzo, 2005). Los sólidos suspendidos coloidales no sedimentables son degradados por los microorganismos (o las enzimas sintetizadas por estos) o adsorbidos al medio granular o raíces y rizomas de las macrófitas (Vymazal *et al.*, 1998).

Como se muestra en la Tabla 3, las eficiencias de SST son altas. Más de la mitad de la eliminación se lleva a cabo en el primer cuarto de la longitud total del sistema (García *et al.*, 2004). Es por esto que los HFHSS tienden a colmatarse, sobre todo si las aguas servidas a tratar contienen un alto contenido de materia orgánica recalcitrante

(Caselles-osorio *et al.*, 2007). Por ende, es necesaria la instalación de un tratamiento primario, con el fin de evitar la colmatación prematura del sistema (Pedescoll *et al.*, 2011).

El fenómeno de colmatación (o clogging) se genera debido a factores de carga internos (crecimiento de biomasa microbiana y vegetal, residuos exudados por la biopelícula y las raíces de las macrófitas y erosión química de la grava) y externos (sólidos suspendidos provenientes en las aguas servidas y precipitados químicos) (Knowles *et al.*, 2011). No obstante, Tanner *et al.* (1998) documenta que el mayor factor que contribuye a tal fenómeno es la carga de SST provenientes en las aguas servidas y la acumulación de MO recalcitrante exudada por las raíces de las macrófitas. Los lodos acumulados están constituidos por un 80% de agua aproximadamente (Tanner y Sukias, 1995). Esto otorga la consistencia necesaria al lodo para que ácidos fúlvicos y húmicos (63-96% del carbono total acumulado en grava) exudados por las raíces de las macrófitas tapen los poros del lodo acumulado (Knowles *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2000).

Las tasas de acumulación de sólidos en HFHSS se encuentran en un rango de entre 0,7 y 8,8 kg MS·m⁻²·año⁻¹ (MS= materia seca) (con cargas aplicadas de entre 0,6 y 8,0 g SST·m⁻²·d⁻¹) (Tanner y Sukias, 1995; Tanner *et al.*, 1998; Caselles-Osorio *et al.*, 2007; Pedescoll *et al.*, 2011). Estos lodos se encuentran altamente mineralizados (10 al 20 % SSV/SST) (Caselles-Osorio *et al.*, 2007).

b) Materia orgánica: los mecanismos de eliminación de la MO están condicionados por la distribución del tamaño de partícula de esta, por lo que al evaluar las vías de eliminación, este factor es clave (Sophonsiri *et al.*, 2004). En HFHSS la MOP es eliminada por mecanismos físicos que involucran sedimentación y filtración (Vymazal y Kröpfelová, 2009). García *et al.* (2005) documenta que el conteo de partículas disminuye en un 90% en el primer cuarto del sistema, logrando eliminaciones de carbono orgánico total del 50%. El 10 % de la MOP restante es degradada por mecanismos físicos y enzimas extracelulares, transformándose en MOD (García *et al.*, 2005). En los casos de colmatación, la materia orgánica acumulada es principalmente recalcitrante (90%) y comprende menos de un 20% de la acumulación de sólidos totales

(Caselles-Osorio *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2000). Aún así, este fenómeno es directamente proporcional con la carga orgánica del influente (Tanner *et al.*, 1998).

La MOD es eliminada principalmente por la biopelícula adherida al medio filtrante y a las raíces de las macrófitas, ya que las plantas no la asimilan de forma significativa. Es más, estas aportan MOD al sistema mediante el exudado de las raíces (Tanner *et al.*, 2001).

Tabla 4: Eficiencias de eliminación de materia orgánica de HFHSS con diferentes diseños y cargas orgánicas aplicadas.

Carga orgánica ^a	Medio filtrante	Profundidad ^c	Vegetación	Eliminación (% DQO)	Ref	
5,2	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,5	<i>Phr</i>	64-65	[1]	
	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,27	<i>Phr</i>	70-79		
6,9	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,5	<i>Phr</i>	58-65		
	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,27	<i>Phr</i>	73-83		
7,7	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,5	<i>Phr</i>	53-62		
	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,27	<i>Phr</i>	76-77		
6	Grava (D ₆₀ =3,5-10mm)	0,3	<i>Phr</i>	81		[2]
20,7	Grava (40% porosidad)	0,2	<i>Phr</i>	70		[3]
18	Filtralite (45% porosidad)	0,2	<i>Phr</i>	94		
0,9-4,1	Grava (D=10-40mm)	0,4	<i>Sch</i>	76-92		[4]
1,7-5,8 ^b	Grava (D=10-30mm)	0,4	<i>S. tabernamontani</i>	74 - 88		[5]
6-10,8	Grava (D=9-12mm)	0,6	<i>Phr</i>	36-48		[6]
6-10,8	Grava (D=9-12mm)	0,6	<i>Phr, Sch, Typ</i>	21-73		
6-10,8	Zeolita natural + Grava (D=9-12mm)	0,6	<i>Phr</i>	51,4-76,7		

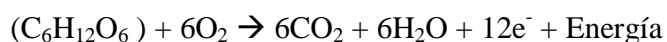
a: en (g DQO m⁻² d⁻¹); b: (gSSV·m⁻²d⁻¹); c: (m); D₆₀: tamaño del tamiz al cual un 60% de la materia queda retenido, eliminación en % DBO. *Phr*: *Phragmites australis*; *Sch*: *Schoenoplectus californicus*; *Typ*: *Typha latifolia*; *S*: *Schoenoplectus* [1]: García *et al.* (2005); [2]: Caselles-osorio *et al.* (2006); [3]:

Albuquerque *et al.* (2010); [4]: Tanner, *et al.* (1994); [5]: Nguyen *et al.* (2000); [6]: Janbo Li *et al.* (2008).

Vymazal y Kröpfelová, (2009) llevaron a cabo un análisis sobre las eficiencias de eliminación de MOD de cerca de 200 HFHSS que tratan aguas servidas domésticas. Las eliminaciones de carga orgánica fueron de 32 a 77,6 kg DBO₅·ha⁻¹·d⁻¹ y 149 kg DQO·ha⁻¹·d⁻¹ (Vymazal y Kröpfelová, 2009). Estos porcentajes de eliminación varían con respecto a diversos factores clave, entre los que se encuentran el diseño del sistema, la carga y el tipo de materia orgánica del influente (Tabla 4) (García *et al.*, 2005). García *et al.* (2005) confirmó que el parámetro de diseño más influyente es la profundidad del sistema debido a que cambia el perfil de POR, y en consecuencia, la importancia relativa de cada reacción bioquímica involucrada en la eliminación de MOD (Tabla 4).

En condiciones aerobias, la degradación de MOD se lleva a cabo por bacterias heterótrofas aerobias estrictas y facultativas, acorde a la reacción mostrada en la Ecuación 1 (Vymazal y Kröpfelová, 2009).

Ecuación 1



Sin embargo, este proceso es interrumpido en sistemas de HFHSS debido a las condiciones anóxicas en las cuales estos sistemas operan (García y Corzo, 2004). De esta manera, el bajo oxígeno disuelto (<2 mg·L⁻¹) y el ambiente altamente reductor (entre +200 y -400 mV), dan lugar a reacciones anaerobias en la eliminación de MOD (García *et al.*, 2003; Dusek *et al.*, 2008).

La Figura 4 muestra las etapas de la degradación anaerobia de MO y los consorcios microbianos anaerobios asociados a cada reacción (Seghezzi, 2004). Este proceso multi-etapas cumple el objetivo de degradar polímeros orgánicos complejos a sus unidades monoméricas solubles para que puedan finalmente ser utilizadas como fuente de energía para los microorganismos (Vymazal *et al.*, 1998). Esta asociación entre consorcios microbianos es necesaria ya que estos sólo pueden transportar materia orgánica de tamaño menor a 1 kDa (1 nm aproximadamente) a través de la membrana celular (Sophonsiri *et al.*, 2004).

La primera etapa consiste en la hidrólisis, donde los polímeros complejos son transformados, mediante enzimas hidrolíticas extracelulares, a sus unidades monoméricas (carbohidratos, proteínas y ácidos grasos) (Vymazal y Kröpfelová, 2009). Sólo la MOD y MO coloidal (<1 μm aproximadamente) puede ser degradada por las enzimas hidrolíticas, pues esta debe tener un tamaño que les permita penetrar la biopelícula y estar en contacto con las bacterias (Drury *et al.*, 1993). En la etapa siguiente, llamada fermentación primaria, o acidogénesis, los monómeros son transformados a intermediarios aún más simples denominados ácidos grasos volátiles. (AGV) como ácido acético (Ecuación 2), ácido láctico (Ecuación 3), etanol (Ecuación 4), butirato, propionato, valerato, CO_2 y H_2 , principalmente (Aguirre, 2004). Los AGV son los intermediarios más importantes en la degradación anaerobia de materia orgánica, especialmente el acetato (responsable del 75 % de la producción de metano) (Huang *et al.*, 2005). Se ha demostrado que en HFHSS el acetato presenta ser el AGV de mayor importancia, puesto mostró representar desde el 7 al 48 y del 17 al 70 % del carbono orgánico total del influente y efluente, respectivamente (García *et al.*, 2004b). La siguiente etapa, llamada acetogénesis, se centra en la generación de acetato a partir de los otros AGV y de CO_2 y H_2 (Homoacetogénesis) (Aguirre, 2004).

Ecuación 2



Ecuación 3



Ecuación 4



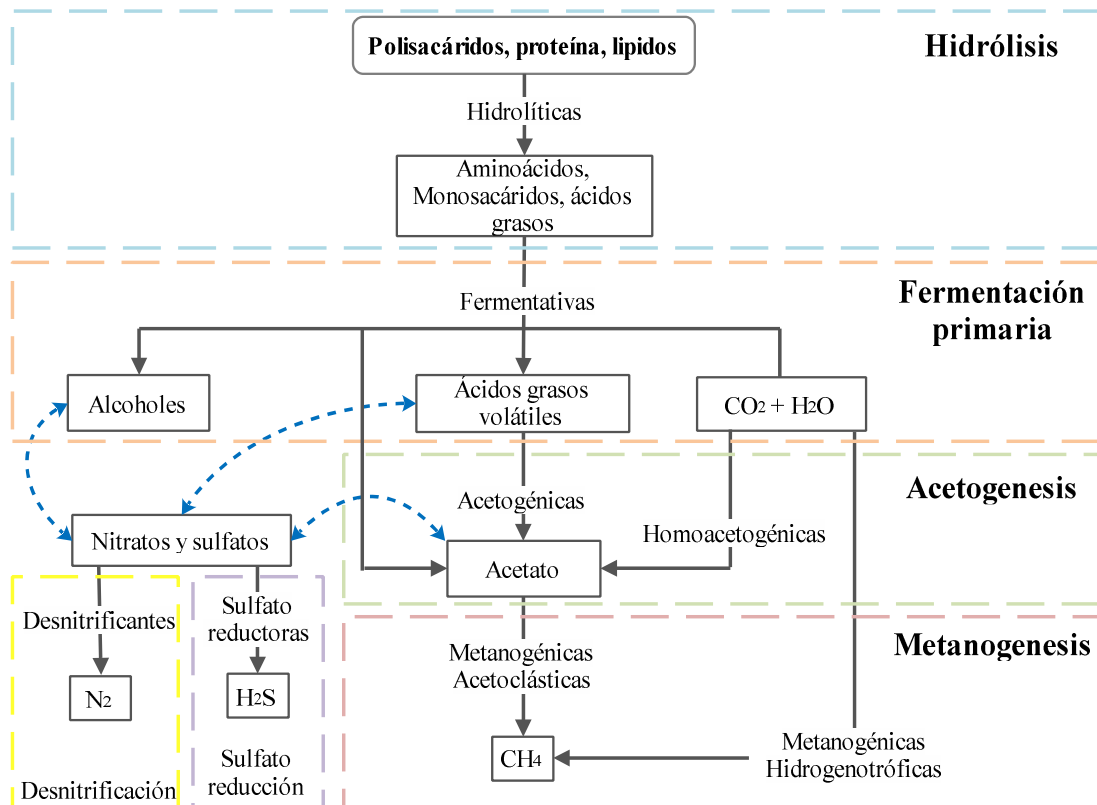
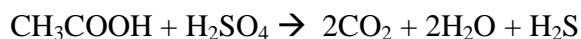


Figura 4. Esquema de las transformaciones involucradas en la digestión anaerobia de materia orgánica y los consorcios microbiológicos implicados en cada una de ellas. Kadlec y Wallace (2009); Almeida (2011).

Los productos de la fermentación son luego degradados por consorcios microbiológicos que utilizan los donadores y aceptores de electrones que se encuentran disponibles en el medio, según las reacciones de las ecuaciones 5 a la 8 (Vymazal y Kröpfelová, 2009; Saeed y Sun, 2012).

a) Sulfato reducción

Ecuación 5

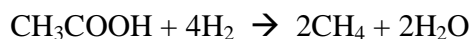


Ecuación 6

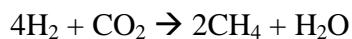


b) Metanogénesis

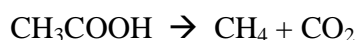
Ecuación 7



Ecuación 8

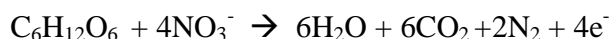


Ecuación 9



c) Desnitrificación

Ecuación 10



Los mecanismos de eliminación de MOD representados en las ecuaciones 5 a la 10 tienden a competir por el sustrato (donadores de electrones) utilizando diferentes aceptores de electrones (Vymazal *et al.*, 1998).

La desnitrificación puede ser significativa en HFHSS de bajas profundidades (Tabla 4) (0,27 m) donde el POR presenta mayores rangos (+350 a +100 mV) pudiendo representar del 50 hasta un 70% de la eliminación de MOD (García *et al.*, 2004b). Sin embargo este proceso está limitado por la tasa de nitrificación, que es despreciable en HFHSS, debido a las condiciones anaerobias ($< 2 \text{ mg OD} \cdot \text{L}^{-1}$) (Vymazal, 2007).

En aquellos sistemas de HFHSS donde el POR se encuentra entre -100 y -200 mV con presencia de sulfato (SO_4^{2+}) en el medio, predomina la sulfato-reducción (Faulwetter *et al.*, 2009). Cuando la relación DQO: SO_4^{2+} es menor a 1,5, los procesos sulfato reductores pueden desplazar por competencia al resto (Stein *et al.*, 2007). Por otro lado, Baptista *et al.* (2003) encontraron presencia de bacterias sulfato-reductoras en un HFHSS con POR menores a -200 mV, sin embargo estos sólo aportaban 11 – 12 % en la eliminación de DQO del sistema. Los mecanismos metanogénicos suelen ser los predominantes en HFHSS, con POR entre -200 y -300 mV (Faulwetter *et al.*, 2009), teniendo una importancia relativa mayor (>90%) en la eliminación de MOD (medida como DQO) (Baptista *et al.*, 2003; Aguirre, 2004).

c) Nutrientes: La eficiencia de eliminación de NT en HFHSS oscila entre el 42,3 y 44,6% (Vymazal 2007). Los mecanismos de eliminación incluyen: a) amonificación: proceso que ocurre en sistemas tanto aerobios como anaerobios (Vymazal, 2007) b) volatilización de amonio (NH_3): este proceso es relevante solo a pH >7,5 alcanzando

tasas de eliminación considerables ($2,2 \text{ g NT}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) (García *et al.*, 2010) c) nitrificación-desnitrificación: la nitrificación ocurre en ambientes estrictamente aerobios, por lo que en HFHSS sólo ocurre en los microambientes oxidados cercanos a las raíces de las macrófitas, con rendimientos bajos y fuertemente dependientes de la temperatura ambiente ($0,15 \text{ a } 0,7 \text{ g N-NH}_4^+\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) (Vymazal, 2007; García *et al.*, 2010). La desnitrificación ocurre en ambientes estrictamente anaerobios (potenciales redox $+350\text{mV}$ a $+100\text{mV}$) utilizando la MOD como donador de electrones (García *et al.*, 2010,). d) asimilación por plantas y microorganismos: Las plantas son capaces de asimilar nitrógeno en tasas mostradas en la Tabla 2. La eliminación de nitrógeno también ocurre por otros procesos como adsorción, lixiviación, oxidación anaerobia de amonio (mediado por consorcios anaerobios AnAmmOx) (Vymazal 2007).

Los mecanismos de eliminación del fósforo pueden ser de tipo biótico o abiótico, con eficiencias de hasta un 32% promedio en sistemas de HFHSS (García *et al.*, 2010). Los procesos abióticos de eliminación constan de sedimentación, adsorción, precipitación, mientras que los bióticos corresponde a la asimilación por parte de las macrófitas (U.S.EPA, 2000). Las tasas de asimilación de fósforo por parte de las plantas se muestran en la Tabla 2. Los procesos abióticos suelen ser los que más contribuyen a la eliminación de PT, puesto que las plantas solo participan de un 5 al 10 % en la eliminación de PT por asimilación (Tanner, 2001). La eliminación de fósforo es altamente dependiente de los materiales usados para su construcción, debido a la saturación de este componente en el medio (Arias y Brix, 2004). Por ejemplo, se puede emplear Zeolita como medio de soporte en HFHSS, aumentando la eficiencia de eliminación en un 20% en sistemas aireados (Vera *et al.*, 2014). En sistemas anóxicos ($\text{POR} < +250\text{mV}$) se observa lixiviación de fosforo adsorbido o precipitado (Vymazal *et al.*, 1998).

1.4. Emisiones de metano

Desde el siglo XIX, las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO_2) han aumentado en un 30 %, las de oxido nitroso (N_2O) un 15 %, y las de mayor aumento, de metano (CH_4), en un 145 % (Fadel y Massound, 2001). El metano es de principal preocupación, puesto que además de ser el de mayor aumento, posee un

potencial de efecto invernadero 23 veces al equivalente en masa de CO₂ en un horizonte de tiempo de 100 años (Wang *et al.*, 2013). Estas emisiones son generadas por fuentes tanto naturales como antropogénicas, donde las fuentes naturales principales son: humedales naturales, incendios, termitas, océanos y deposiciones animales (Czepiel *et al.*, 1993). Estas fuentes naturales y antropogénicas aportan en un 45 y 55 %, respectivamente a las emisiones totales de metano (Czepiel *et al.*, 1993).

1.4.1. Emisiones de metano en sistemas convencionales

La emisión de CH₄ es un suceso inherente al tratamiento de aguas servidas con materia orgánica, pues es el producto final de la digestión de la MO por vías anaerobias, como se desprende de la Figura 4 (IPCC, 2006). A pesar de las condiciones aerobias de la mayoría de los tratamientos convencionales, existen regiones con bajas concentraciones de oxígeno disuelto, dando lugar a la metanogénesis (Wang *et al.*, 2011). El-Fadel y Massound (2001) estimaron que al año 2040, habrán emisiones de 0,34 a 0,69 Gg CH₄·año⁻¹ originadas en el tratamiento de aguas servidas.

En la Tabla 5 se expresan los porcentajes de emisiones de metano de diversas plantas de tratamiento de aguas servidas. Las emisiones están relacionadas generalmente por la volatilización del metano en el efluente de aguas servidas y los lodos digeridos, además de los sedimentadores y espesadores de lodos abiertos a la atmósfera (Daelman *et al.*, 2012).

Tabla 5. Emisiones de metano en tratamientos de aguas servidas mediante tecnologías convencionales

Unidad	Emision de metano		Carga orgánica (Ton DBO ₅ ·d ⁻¹)	Eficiencia (%)	Ref.
	g CH ₄ ·m ⁻² ·d ⁻¹	kg CH ₄ ·año ⁻¹			
FA	4 – 26	92			
LA	1 - 8	220	0,5-1	94	[1]
ALD	7 – 86	63			
FA	6-19	791-2411			
TA	2-3	4976-8036			
SSe	0,1	663-1124	81	80	[2]
ELS	1-3	1133-2001			
TL	631-978	58-89			
SP	-	17			
ALD	-	9			
SSe	-	35	19	87	[3]
ALDH	-	18			

FA: filtro aireado; LA: lodos activados; ALD: almacenador de lodos digeridos; TA: tanque anaerobio; SSe: sedimentador secundario; ELS: espesador lodos secundarios; SP: sedimentador primario; TL: transporte de lodos; ALDH: almacenamiento lodos deshidratados. [1]: Czepiel *et al.* (1993); [2]: Wang *et al.* (2011); [3]: Daelman *et al.* (2012)

1.4.2. Emisiones de metano en HFHSS

Los humedales son la mayor fuente natural de metano emitido a la atmosfera, aportado el 21% del total (IPCC, 2006). La degradación de materia orgánica por la vía metanogénica en HFHSS genera CH₄ y CO₂ como productos finales (Figura 4). Estos gases son generados en el tratamiento de aguas servidas debido a las condiciones de carga orgánica, temperatura y anaerobiosis que se generan en sistemas biológicos naturales, como lagunas anaerobias de estabilización, biofiltros o humedales construidos (Torpak 1994; Tanner *et al.*, 1997; Mander *et al.*, 2014). Picek *et al.* (2003) encontró que de las emisiones totales de carbono en un HFHSS (plantado con *Phragmites australis*), el 10,1 % se emitió en la forma de metano.

Por otro lado, la cuantificación de las emisiones y concentraciones de metano en HFHSS son importantes en el proceso de depuración, ya que nos indican la eficiencia de los procesos de degradación de MOD en sistemas de HFHSS (García *et al.*, 2010). Esto

es debido a que la tasa de emisión de CH₄ está correlacionada con la intensidad de la anaerobiosis, y por consiguiente, relacionada de forma inversa con la eficiencia de eliminación de MOD (Seghezzi, 2004; Huang *et al.*, 2005).

El metano que es emitido por los HFHSS puede ser transportado a la atmósfera por tres mecanismos: a) transporte gaseoso mediado por las macrófitas; b) difusión; c) ebullición. Siendo el primero el que más contribuye en el transporte, representando entre el 50 y el 90% del total (García *et al.*, 2007; Grünfeld y Brix, 1999; van der Nat *et al.*, 1998). Esta emisión neta es la resultante de la tasa de actividad metanogénica de las arqueas del sistema, y la oxidación del metano tanto por microorganismos metanotróficos como por vía química (Hernández, 2010).

Los factores que condicionan las emisiones de metano son:

- a) Vegetación: Las macrófitas tienen un tejido llamado arenquima, el cual tiene la cualidad del transporte de gases desde las raíces hasta los estomas y en sentido contrario (Garnet *et al.*, 2005). El transporte mediado por plantas es dependiente de la especie, puesto que estas poseen diferentes mecanismos fisiológicos de transporte (por difusión y convección). Las especies con mecanismos de convección, en general, tienen mayores tasas de emisión de CH₄ (dependiente de la temperatura ambiente) que aquellas con mecanismos difusivos (Garnet, *et al.*, 2005). Van der Nat *et al.* (1998) cuantificó emisiones 45% mayores en un HFHSS plantado con una especie que transporta gases por mecanismos convectivos (*Phragmites australis*) que un HFHSS plantado con una especie de mecanismos exclusivamente difusivos (*Schoenoplectus lacustris*). En paralelo, el arenquima permite a las plantas oxigenar sus raíces, aumentando el OD en la zona de en que estas se encuentran. Por consiguiente, hay un aumento en el POR, inhibiendo así la actividad metanogénica (Johansson *et al.*, 2004). Por otro lado, el aumento de los niveles de POR y OD otorga el microambiente necesario para el desarrollo de consorcios metanotróficos que oxidan el metano (Le Mer y Roger, 2001; Inamori *et al.*, 2007). Esta característica depende, a la vez, de la profundidad de sus raíces (Inamori *et al.*, 2007).

- b) Diseño: Aguirre *et al.* (2005) demuestra que la altura de lámina de agua es limitante en la eficiencia de eliminación de materia orgánica, y por consiguiente en las emisiones de metano (Tabla 4). En HFHSS de baja profundidad, el oxígeno difunde desde la atmósfera con mayor facilidad inhibiendo la metanogénesis por el favorecimiento reacciones alternativas (nitrificación/desnitrificación o digestión aerobia) y/o aumentando la tasa de oxidación de metano (Aguirre *et al.*, 2005). Además, factores de diseño como el tipo y tamaño del medio filtrante afectan las emisiones de CH₄ de forma significativa (Grünfeld y Brix, 1999)
- c) Temperatura: Este factor afecta a las emisiones de metano aumentando el fenómeno de convección en plantas como *Phragmites australis* (Van der Nat *et al.*, 1998). Además, la actividad microbiana aumenta a mayores temperaturas, por lo que aumenta la tasa de producción de metano por los consorcios mesofílicos y termofílicos (Torpak, 1994; Seghezzi, 2004). Johansson *et al.* (2004) encontró una correlación significativa entre la actividad metanogénica (representada como degradación de AGV) con la temperatura atmosférica y del seno del sistema. Además, a bajas temperaturas la solubilidad del CH₄ aumenta, disminuyendo la tasa de difusión y ebullición de metano (Zhu *et al.*, 2007).
- d) Características del influente: Las cargas orgánicas en el influente están positivamente correlacionadas con las emisiones de metano debido al mayor sustrato disponible (Sovik *et al.*, 2007; Inamori *et al.*, 2007; Aguirre *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Además la composición de la materia orgánica en términos de biodegradabilidad (relación DBO₅/DQO) condicionan las emisiones, al igual que el uso de medios filtrantes con mayor contenido orgánico (Grünfeld y Brix, 1999).

En la Tabla 6 se muestran las emisiones de distintos sistemas de HFHSS con diferentes cargas orgánicas aplicadas, especies de plantas utilizadas y clima. Las condiciones climáticas pueden afectar directamente las emisiones de metano debido al efecto de la temperatura sobre la actividad metanogénica. Debido a esto, y a los factores

expuestos anteriormente, las emisiones son altamente variables, con emisiones desde 19,2 a 2208,0 mg CH₄·m⁻²·d⁻¹ (García *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013).

Tabla 6: Emisiones de metano en tratamientos de aguas servidas mediante el uso de HFHSS

Especie de macrófita	Clima	VCO (g DBO ₅ ·m ⁻² ·d ⁻¹)	Emisión CH ₄		Ref.
			mg·m ⁻² ·h ⁻¹	g CH ₄ ·g ⁻¹ TOC _{inf}	
T. latifolia, P. australis y S. sylvaticus	T/F	0,6	2,6	9,90%	[1]
P. australis	T/F	10,3	3,1	1,40%	[1]
sin vegetación	F	1,8	7,1	9,60%	[2]
P. australis	T	7,2	0,8	4,30%	[3]
P. australis	B	0,5	17,5	79,30%	[4]
P. australis	T/C	8,3	7	4,00%	[5]
T. latifolia	T	2,9	4,9	7,90%	[6]
T. latifolia, Z. latifolia P. australis	T	20,3 - 5,8 ^a	92		[7]
Z. latifolia	T	20,3 - 5,8 ^a	47,6		[7]
P. australis	C	7	8,3		[8]
P. australis	C	20	16,6		[8]
P. australis	F	3,3 - 4,2 ^b	20,2		[9]
S. californicus	F	3,3 - 4,2 ^b	18,1		[9]

COA: carga orgánica aplicada; T: templado; F: frío; C: cálido; B: boreal; a: cargas medidas como g DQO·m⁻²·m⁻¹; b) Medidas estimadas por ensayos de actividad metanogénica específica. [1]:Teiter y Mander (2005); [2]: Sovik *et al.* (2006); [3]: García *et al.* (2007); [4]: Picek *et al.* (2007); [5]: Liu *et al.* (2009); [6]: Van der Zaag *et al.* (2010); [7]: Wang *et al.*, (2013); [8]: Corbella y Pigagut (2015); [9]: López *et al.* (2015).

En sistemas de HFHSS las emisiones de metano suelen ser mayores en la zona del influente. Tanner *et al.* (1997), cuantificó emisiones de metano de hasta un 24% mayores en la zona del influente que en la del efluente. En Teiter y Mander (2005) presentaron entre 10 y 20 veces mayores emisiones en la zona de entrada del influente que en la de salida. Lo anterior se debe a que en sistemas de flujo horizontal existen mayores concentraciones de materia orgánica en la zona cercana al influente debido a la

retención de esta (García *et al.*, 2010). Sin embargo, Samsó y García (2014) presentaron un modelo de HFHSS en que la zona activa de microorganismos va avanzando conforme al tiempo de operación. De esta manera, las zonas de mayor emisión de CH₄ depende de la colmatación de los HFHSS (Samsó y García, 2014).

Se ha reportado que las emisiones de metano en HFHSS son constantes al corto plazo (horas) (Brix *et al.*, 2001; García *et al.*, 2007). Por otro lado, al largo plazo, se ha cuantificado un decaimiento de ~80 % con respecto a las emisiones máximas (detectadas en el período de crecimiento de la vegetación en la zona cercana al influente (variaciones por estacionalidad) (Picek *et al.*, 2007).

Las Tablas 4 y 5 muestran que los porcentajes de emisión de CH₄ con respecto a la carga orgánica aplicada son mayores en HFHSS que en los sistemas convencionales. Las emisiones de metano en sistemas convencionales, representan el 75% de la huella de carbono (equivalentes de CO₂), mientras que los gastos energéticos con origen fósil representan el 25% (Daelman *et al.*, 2012). Datos que se deben tomar en cuenta al momento de comparar el impacto provocado por ambas tecnologías.

1.5. Microorganismos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica

Hasta ahora, las caracterizaciones microbiológicas de muestras ambientales se han llevado a cabo por técnicas tradicionales dependientes de cultivo. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares independientes de cultivo. Esto se debe a que las técnicas tradicionales solo representan el 1 % del total de microorganismos, el resto no es cultivable en condiciones de laboratorio (Kim *et al.*, 2013).

En la Tabla 5 se muestran algunos géneros microbianos que participan en la conversión de los distintos sustratos en la degradación anaerobia de materia orgánica y otros componentes de las aguas servidas. La hidrólisis es llevada a cabo por enzimas extracelulares sintetizadas por microorganismos heterótrofos anaerobios, pertenecientes principalmente a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacteria* y *Clostridium* (Gerardi, 2006). Dentro del grupo Firmicutes, el género *Clostridium* es el más representativo en sistemas de degradación anaerobia, cuyas especies son capaces de sintetizar enzimas con actividad lipasa y proteasa para degradar los lípidos y proteínas a AGV y aminoácidos,

respectivamente (Mo Kim *et al.*, 2015). Cabe destacar que especies del genero *Clostridium* suelen encontrarse en sistemas de tratamiento de residuos lignocelulósicos puesto que presentan capacidad de degradar celulosa (Cirne, *et al.*, 2006). En la acidogénesis, participan en general los mismos organismos que en la hidrólisis, predominando el género *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, entre otros (Almeida *et al.*, 2011). Estos organismos participan también en la etapa de acetogénesis, donde a partir de butirato, propionato y otros sustratos, producen acetato (Figura 4), predominando las especies del género *Clostridium* (Gerardi, 2006). La generación de acetato vía homoacetogénesis es llevada a cabo principalmente por especies del género *Clostridium* (*Clostridium aceticum*; *Clostridium thermoaceticum*) (Almeida *et al.*, 2011). La metanogénesis es llevada a cabo principalmente por la vía acetoclástica (70 %) en sistemas de tratamientos de residuos (Barber *et al.*, 2011). Los únicos géneros de este grupo son las arqueas pertenecientes a los géneros *Methanosaeta* (especies acetoclásticas especializadas) y *Methanosarcina* (especies versátiles en cuanto a sustrato, generando metano por las vías acetoclástica, hidrogenotrófica y metilotrófica) (Kendall y Bone, 2006). En sistemas de tratamiento de residuos líquidos, la metanogénesis es también llevada a cabo por géneros hidrogenotróficos como *methanococcus*, *methanobacteria*, entre otros (Gerardi, 2006). Sin embargo, participan en menor medida (27 – 30 %) que los acetoclásticos (Almeida *et al.*, 2011).

Tabla 7. Microorganismos involucrados en las reacciones bioquímicas que ocurren en los HFHSS.

Reacción	Clasificación taxonómica
Hidrólisis	<i>Bacteroides</i> ; <i>Bifidobacteria</i> ; <i>Clostridium</i>
Acidogénesis	<i>Clostridium</i> ; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bifidobacteria</i> ; <i>Lactobacillus</i>
Acetogénesis	<i>Clostridium</i>
Metanogénesis acetoclástica	<i>Methanosarcina</i> ; <i>Methanosaeta</i>
Metanogénesis hidrogenotrófica	<i>Methanococcus</i> ; <i>Methanobacteria</i> ; <i>Methanosarcina</i>
Sulfato-reducción	<i>Desulfovibrio</i> ; <i>Desulfobulbus</i> ; <i>Desulfobacterium</i> ; <i>Clostridium</i>

Nitrificación	<i>Nitrospira; Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter; Nitrospira</i>
Desnitrificación	<i>Alcaligenes; Bacillus; Pseudomonas</i>

Faulwetter *et al.* (2008); Saeed y Sun (2012); Almeida *et al.* (2011); Gerardi (2006).

1.6. Comunidades microbianas en HFHSS

Diferentes autores han caracterizado las comunidades de microorganismos en sistemas de HFHSS con diferentes diseños que tratan distintos tipos de efluentes haciendo uso de técnicas moleculares independientes de cultivo (Ibekwe *et al.*, 2003; Baptista *et al.*, 2008; Calheiros *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2010; Ramond *et al.*, 2012; Adrados *et al.*, 2014; Morató *et al.*, 2014; Sidrach-Cardona *et al.*, 2015).

En humedales construidos se han cuantificado bacterias por técnicas tradicionales obteniéndose valores del orden de $1,0 \cdot 10^6 - 1,0 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹ (Calheiros *et al.*, 2009). Por otro lado, estudios llevados a cabo por técnicas moleculares independientes de cultivo han obtenido valores de $6,0 \cdot 10^8 - 1,0 \cdot 10^9$ copias·kg⁻¹grava, tanto en HFHSS (Baptista *et al.*, 2008) como en HFS (Iasur-Kruh *et al.*, 2011). En cuanto a arqueas, Baptista *et al.* (2008) cuantificó $3,0 \cdot 10^8$ copias·kg⁻¹grava en un sistema de HFHSS asociados a altos niveles de metanogénesis (> 90 %). En HFVSS, Wang *et al.* (2013) encontró arqueas metanogénicas entre $1 \cdot 10^8 - 4 \cdot 10^8$ copias·g⁻¹ suelo. Niu *et al.* (2015) cuantificó arqueas metanogénicas, encontrando abundancias relativas entre el 20 y 50 % con respecto al total de arqueas y bacterias en HFHSS con actividad metanogénica.

Los HFHSS están colonizados por un amplio número de especies bacterianas organizadas en complejos consorcios asociados con los rizomas de las macrófitas y el suelo (Stottmeister *et al.*, 2003). Xiao fei *et al.* (2014) llevó a cabo un meta-análisis sobre los microorganismos encontrados en humedales naturales, donde el grupo α -proteobacteria y γ -proteobacteria fueron los más abundantes seguidos por el grupo Bacteroidetes. Por otro lado, en HFHSS, las bacterias más encontradas pertenecen a los grupos Proteobacteria (predominantemente las clases β -proteobacteria y γ -proteobacteria), Firmicutes, y Bacteroidetes. De estos grupos los géneros que más se han encontrado en HFHSS son *Clostridium*, *Bacillus*, *Dechloromonas*. (Ibekwe *et al.*,

2003; Calheiros *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2010; Adrados *et al.*, 2014; Morató *et al.*, 2014; Sidrach-Cardona *et al.*, 2015). Los grupos pertenecientes a la división Proteobacteria están asociados a procesos de sulfato reducción y desnitrificación (Xiao fei *et al.*, 2014). Los grupos Firmicutes y Bacteroidetes participan generalmente en la hidrólisis de compuestos orgánicos complejos y en la acidogénesis, tanto en digestores anaerobios como en humedales naturales y construidos (Almeida *et al.*, 2011; Xiao fei *et al.*, 2014) (Figura 4). Además se han encontrado grupos bacterianos asociados a la oxidación de amonio y nitrito pertenecientes a los géneros Nitrospira y Nitrosomonas, respectivamente, además de consorcios AnAmmOx en efluentes de la industria porcina y de curtiembre (Ibekwe *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2010). También se han encontrado especies desnitrificantes como *Denitratisoma Oestradiolicum*, *Dechloromonas denitrificans* y del género *Flavobacterium* (Dong *et al.*, 2010; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Morató *et al.*, 2014). Por lo que el influente con el que se alimentan los HFHSS condiciona la composición de las comunidades microbianas.

En cuanto a arqueas, Xiao fei *et al.* (2014) encontró que en suelos de humedales, el 50 % pertenece al filo *Euryarchaeota*, de las cuales 70,9 % pertenecen a la clase *Methanomicrobia*. Dentro de esta clase se encuentran los géneros metanogénicos acetoclásticos *Methanosaeta* (34 % de las secuencias pertenecientes a *Methanomicrobia*) y *Methanosarcina* (10 % de las secuencias pertenecientes a *Methanomicrobia*) (Xiao fei *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores encontraron que la vía metanogénica más abundante en un humedal natural, es la hidrogenotrófica, puesto que más del 50 % de los genes funcionales analizados (involucrados en metanogénesis) pertenecieron al grupo *Methanomicrobiales* (He *et al.*, 2015).

Dentro de los factores que modulan las comunidades microbianas, las más estudiadas son el tipo de medio filtrante utilizado, las cargas aplicadas (materia orgánica y nitrógeno amoniacal), la presencia y tipo de vegetación (Truu *et al.*, 2008). El efecto del medio filtrante sobre las comunidades microbianas, yace en que este afecta la hidráulica del sistema, además de ser el medio de soporte tanto para los rizomas de las plantas como para los consorcios bacterianos que crecen en forma de biopelícula (Stottmeister *et al.*, 2003). Con respecto a los efectos de la vegetación sobre las

estructuras de las comunidades no hay consenso claro (Truu *et al.*, 2008). Se han analizado las estructuras de las comunidades en distintos sistemas (HFHSS, HFVSS y HFS) mediante diferentes técnicas (análisis metabólico y análisis de patrón de bandeo por PCR-DGGE y RFLP;). En estos estudios, se encontró, por un lado, evidencia significativa de que las plantas no afectan las estructuras de las comunidades (DeJournett *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2015). Por otro lado se afirma que la vegetación si afecta de forma significativa (Ibekwe *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010; Calheiros *et al.*, 2010). Sin embargo, hay consenso en que otros factores como la disponibilidad de nutrientes y materia orgánica en los HC si afectan las comunidades (Truu *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010; Adrados *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2015).

Finalmente, como se expuso, se ha encontrado que las emisiones de metano dependen, principalmente, del equilibrio entre las comunidades de organismos metanogénicos y metanotróficos (Wang *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2015). Por otro lado, hay evidencia de que los exudados de las plantas podrían, eventualmente, servir como sustrato lábil para las comunidades metanogénicas (Wang *et al.*, 2013). O bien, inhibirlas y favorecer a las comunidades metanótroficas por el transporte de oxígeno de la atmósfera a la rizosfera (Johansson *et al.*, 2004). Van der Nat *et al.* (1998) documentó emisiones de metano en HFHSS plantados con *Schoenoplectus spp.* estadísticamente diferentes con aquellos plantados con *Phragmites spp.*

1.7. Hipótesis y objetivos

1.7.1. Hipótesis

La producción de metano proveniente del tratamiento de aguas servidas mediante HFHSS, es incidida significativamente por *Phragmites australis* y/o *Schoenoplectus californicus*, las que generan comunidades microbianas distintas.

1.7.2. Objetivo principal

Evaluar las producciones de metano y composición de las comunidades microbianas de la biomasa presente en HFHSS que tratan aguas servidas utilizando *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus*.

1.7.2. Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de eliminación de materia orgánica y nutrientes en HFHSS que tratan aguas servidas utilizando *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus*.
- Evaluar la producción de metano de los HFHSS en el tratamiento de aguas servidas utilizando *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus*.
- Caracterizar las comunidades microbianas de los HFHSS que tratan aguas servidas utilizando *Phragmites australis* y *Schoenoplectus californicus*.

2 METODOLOGÍA

2.1. Planta de HFHSS

2.1.1. Localización del sistema piloto de HFHSS

Para llevar a cabo el estudio se utilizó la estación experimental de humedales construidos a escala piloto, localizada en la planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS) de la comuna de Hualqui, provincia de Concepción, Región del Biobío (Chile), perteneciente a la Empresa de Servicios Sanitarios del Biobío ESSBIO.S.A. ($36^{\circ}59'26.93''$ de la latitud sur, y $72^{\circ}56'47.23''$ de longitud Oeste) (Figura 5).



Figura 5. Ubicación de la planta piloto de HFHSS en la PTAS de Hualqui ($36^{\circ}59'26.93''$ de la latitud sur, y $72^{\circ}56'47.23''$ de longitud Oeste).

2.1.2. Obtención del influente

La Figura 6 muestra el diagrama de la planta piloto, donde se observa el punto de extracción del influente, el tratamiento primario y secundario basado en HFHSS. La planta piloto se alimentó con el influente de aguas servidas extraído desde la PTAS Hualqui, con una bomba para aguas negras marca Pedrollo modelo VXm8/35-I. Las aguas servidas se extrajeron a la salida del tratamiento preliminar, luego de haber sido pre-tratadas por una cámara de rejillas (Separación de 40 mm) y un desarenador (López *et al.*, 2015) (Figura 6).

Para evitar fenómenos de colmatación en las celdas, el influente es trasladado a un tratamiento primario para eliminar sólidos suspendidos y materia orgánica (Figura 6). Este consiste en un tanque desarenador-desengrasador de 630 L, una fosa séptica de 1200 L y un tanque de bombeo de 630 L. Finalmente, el efluente se eleva a un tanque de distribución de 1000 L, el cual alimenta a por gravedad a los HFHSS.

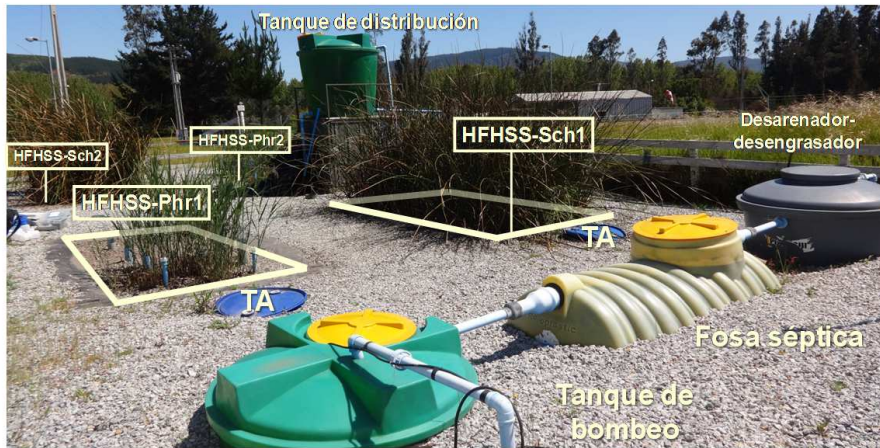
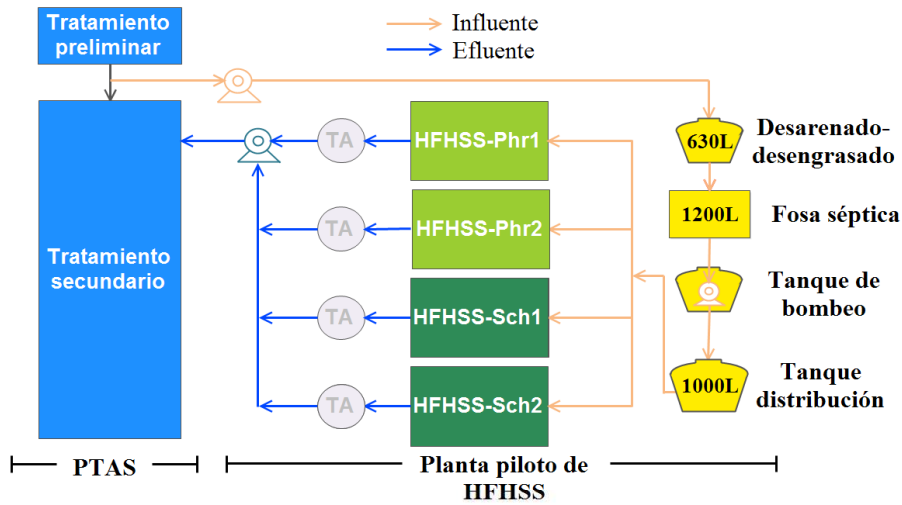


Figura 6: Planta piloto de HFHSS ubicado en la PTAS-Hualqui. HFHSS-Phr1 y HFHSS-Phr2: celdas plantadas con *Phragmites australis*; HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2: celdas plantadas con *Schoenoplectus californicus*; flechas naranjas: influente; flechas azules: efluente; TA: tanque de almacenamiento.

La planta piloto constó de 4 celdas de HFHSS en paralelo (Figura 6). Dos de los HFHSS fueron plantados con *Phragmites australis* (HFSSH-Phr1 y HFSSH-Phr2), y dos con *Schoenolpectus californicus* (HFSSH-Sch1 y HFSSH-Sch2), como se muestra en la Figura 6. Las 4 celdas de HFHSS llevan operando 4 años y 5 meses (1617 días) desde su puesta en marcha (julio del 2011).

2.1.3. Características y diseño de los HFHSS

Cada celda de HFHSS constó con un área superficial de 4,5 m² (relación largo/ancho de 2 m/m), un volumen total de 1,28 m³, con una altura promedio de 0,57 m, donde la altura de lamina de agua promedio fue de 0,4 m (Rojas *et al.*, 2013). Cada celda contenía grava como medio filtrante con un tamaño de entre 19 – 25 mm (porosidad de 0,4) (Tabla 6) (Rojas *et al.*, 2013).

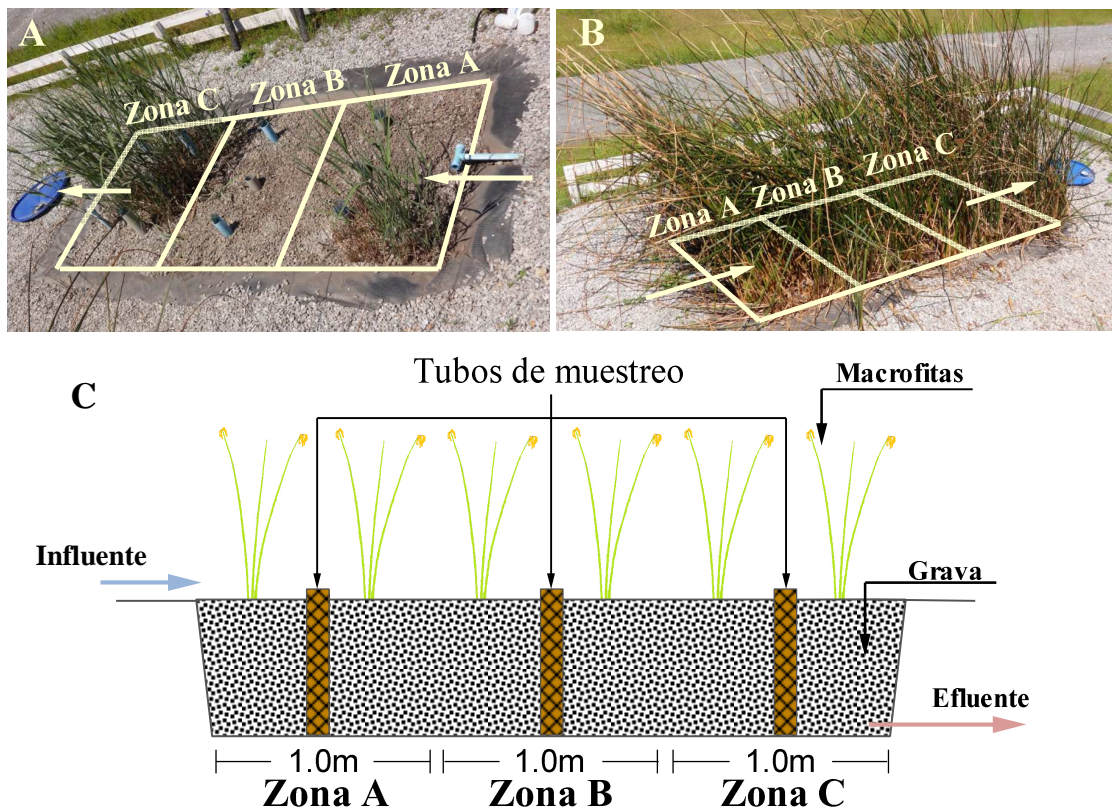


Figura 7. Zonas de muestreo de los HFHSS. A: HFHSS-Phr2 (plantado con *P. australis*); B: HFHSS-Sch2 (plantado con *S. californicus*); Las flechas indican la dirección del flujo; C: Esquema del perfil de los HFHSS

Cada celda constó de 3 muestreadores de grava y de monitoreo de parámetros *in situ*. Los muestreadores se instalaron en cada zona de los HFHSS: Zona A (zona de entrada), 0,65 m del punto de entrada; Zona B (zona media), 1,4 m del punto de entrada;

Zona C (zona de salida), 2,25 m del punto de entrada (Figura 7). El área superficial de cada zona es de 1,5 m² (Rojas *et al.*, 2013).

2.1.4. Parámetros de operación

Los parámetros de operación, características físicas y parámetros climáticos de los HFHSS se muestran en la Tabla 8. Se consideraron valores de evapotranspiración (ET) determinados empíricamente en humedales de flujo horizontal subsuperficial plantados con *P. australis*, y sin vegetación (valores entre paréntesis en Tabla 8) en un clima templado mediterráneo de la provincia de León, España (Hijosa *et al.*, 2010). Los valores de ET en HFHSS sin vegetación se utilizaron para la celda HFHSS-Phr2 donde *P. australis* no logró colonizar toda la celda (Figura 7A). Las precipitaciones fueron obtenidas a través del servicio meteorológico satelital en tiempo real de la dirección general de aguas (DGA), Ministerio de Obras Públicas, Gobierno de Chile (estación Dga Concepción).

Tabla 8. Condiciones climáticas, parámetros de diseño y operación de las celdas de HFHSS

Característica	Unidad	Valor
<i>Material</i>		
Tipo		Grava
Tamaño	mm	19 - 25
Porosidad		0,4
<i>Geometría</i>		
Área	m ²	4,5
Relación largo/ancho		2
Altura promedio	m	0,57
Altura promedio lamina de agua	m	0,41
Volumen total	m ³	1,28
<i>Operación</i>		
Caudal	m ³ ·d ⁻¹	0,134 – 0,138
TRH	d	3,7 – 3,8
Carga hidráulica	mm·d ⁻¹	29,8 – 30,7
VCO	g DBO ₅ ·m ⁻² d ⁻¹	2,5 – 9,2

<i>Condiciones climáticas</i>			
ET	(O/I)	mm·d ⁻¹	6 (2)
	(P/V)		16 (3)
PP	(O/I)	mm·d ⁻¹	3,55 ± 1,49
	(P/V)		0,43 ± 0,09

TRH: tiempo de residencia hidráulico; VCO: velocidad de carga orgánica; ET: tasa de evapotranspiración obtenidos de Hijosa *et al.* (2010); en paréntesis los valores de ET para humedales de flujo subsuperficial sin vegetación para los cálculos de la celda HFHSS-Phr2; O/I: temporada otoño/invierno; P/V: temporada primavera/verano. Características físicas obtenidas de Rojas *et al.* (2013).

2.1.5. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos e *in situ*

El monitoreo se llevó a cabo desde julio del 2013 (2 años después de la puesta en marcha) (755 días de operación) hasta diciembre del 2015 (4 años después de la puesta en marcha) (1617 días de operación), considerando las temporadas O/I (otoño/invierno) y P/V (primavera/verano). Para caracterizar el influente y efluente de cada HFHSS, las muestras fueron previamente filtradas usando filtros Whatman de poro 0,45 µm. Los parámetros fisicoquímicos se determinaron en el laboratorio, de acuerdo a los protocolos descritos en los métodos estándar (APHA, 1998). La DBO₅ se determinó por el método volumétrico Winkler (5210-B) haciendo uso de una incubadora Velp Scientifica (FTC 90E). La DQO fue medida por colorimetría (5210-B) haciendo uso de un espectrofotómetro UV-vis Thermo spectronic (Genesis 10 UV) luego de una previa digestión con un termo reactor Hach (45600-02) a 150 °C durante 2 horas. Los análisis de SST y SSV se determinaron por el método gravimétrico 2540-D (105 °C hasta peso constante) y 2540-E (550 °C durante 1 hora), respectivamente, usando una estufa Memmert (400F) y una mufla JSR (JSMF-30T). Los parámetros *in situ* se midieron en las 3 zonas de cada celda, ya mencionadas (Zona A, Zona B y Zona C) (Figura 7). En las mediciones se evaluó pH, potencial óxido reducción (POR), temperatura (T) y oxígeno disuelto (OD). La determinación de OD se llevó a cabo sólo en la Zona B debido a la baja variación de este parámetro entre cada zona (López *et al.*, 2015). El pH, POR y temperatura se determinaron con el multiparamétrico portable OAKTON (PC650-480485). El OD fue medido usando un oxímetro portable (oxi 330i/set Hanna HI 9146-04).

2.1.6. Balances de masa

Para el cálculo de las eficiencias de eliminación de contaminantes, se realizaron balances hídricos (Ecuación 11) con la finalidad de obtener el caudal de salida tomando en cuenta las tasas de ET y las precipitaciones por temporada. De esta manera la eficiencia de eliminación de contaminantes se calculó utilizando la Ecuación 11.

Ecuación 11. Balance hídrico

$$Q_i - ET + PP = Q_e$$

Donde Q_i : es el caudal de entrada; Q_e : caudal de salida, ET: tasa de evapotranspiración y PP: precipitaciones.

Ecuación 12. Cálculo eficiencias de eliminación de contaminantes

$$E_i (\%) = ((C_i \cdot Q_i - C_e \cdot Q_e) / C_i \cdot Q_e) \cdot 100$$

Donde E_i es el porcentaje de eliminación del contaminante i ; C_i : concentración influente; C_e concentración en el efluente (Hijosa *et al.*, 2010).

2.2. Evaluación de la producción de metano

2.2.1. Extracción de biomasa

Las muestras para los ensayos de actividad metanogénica y caracterización de comunidades microbianas (qPCR-DGGE) se realizaron con la biopelícula anaerobia adherida a la grava de cada HFHSS. Las muestras se obtuvieron de los core instalados dentro de los tubos de muestreos de cada zona (Figura 7). Los muestreos de grava se llevaron a cabo en la temporada de otoño/invierno del 2013 (Junio, 2013), otoño/invierno del 3^{er} año de estudio (Septiembre, 2015) y primavera/verano del 3^{er} año de estudio (Marzo, 2015). La extracción de la biopelícula se hizo mediante la metodología descrita por Morató *et al.* (2005). La biomasa se extrajo sonicando la grava durante 3 min en agua destilada y luego agitada manualmente por 1 min. La biomasa en suspensión se dejó decantar durante 1 día para un posterior análisis de SST y SSV (Morató *et al.*, 2005).

2.2.2. Determinación de la actividad metanogénica específica

Los ensayos de actividad metanogénica específica (AME) fueron realizados mediante metodologías descritas en Soto *et al.* (1993). Se llevó a cabo un cultivo con los siguientes componentes: 10 mL de solución de nutrientes (NH_4Cl ($280 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); KH_2PO_4 ($250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); CaCl_2 ($7.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); NaHCO_3 ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)); 1 mL de Na_2S ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 2 mL de una solución de ácidos grasos volátiles (AGV) (ácido acético $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido propiónico $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido butírico $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) neutralizada a pH 7 con NaOH; 87 mL de muestras de biomasa con concentraciones en los rangos de $0,16 - 1,40$, $0,34 - 1,5$ y $0,44 - 1,62 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ en las temporadas O/I del 2013, P/V del 3^{ro} y O/I del 3^{ro}, respectivamente. El cultivo se neutralizó a pH 7 con NaOH (Soto *et al.*, 1993).

En la Figura 8 se muestra el diagrama del sistema para determinar la AME. La mezcla descrita anteriormente se adicionó a una botella ambar de 100 mL conectada a una cámara de seguridad y a un frasco mariotte con una solución de NaOH ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 8). De esta manera, la generación de biogás provocará el desplazamiento de la solución de NaOH el cual es cuantificado periódicamente. La solución de NaOH tiene la finalidad de absorber el CO_2 desde el biogás a medida que este se burbujea a través de esta (Soto *et al.*, 1993). Se le inyectó nitrógeno gas (99,9 %) al sistema para eliminar la cabeza de aire. El ensayo se llevó a cabo a baño maría a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

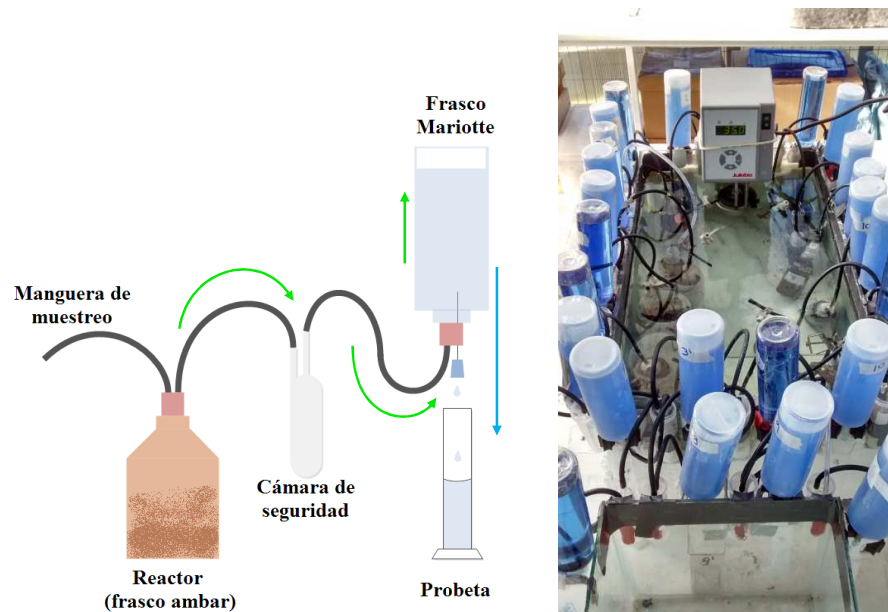


Figura 8. Sistema para la determinación de la actividad metanogénica específica (AME). Izquierda: esquema del sistema; derecha: montaje para determinación de AME. Flechas verdes: dirección de flujo de biogás; Flecha azul: dirección del flujo de solución NaOH. Modificado de Soto *et al.* (1993).

2.2.3. Determinación de cinética de degradación de ácidos grasos volátiles

Se determinó la concentración de AGV a lo largo del tiempo de operación de los ensayos de AME. Para esta determinación las muestras fueron filtradas por membranas de tamaño de poro $0,2 \mu\text{m}$ y luego analizadas por cromatografía de gases. El análisis se llevo a cabo con un cromatógrafo de gases GC Shimadzu GC-2014 (Kioto, Japón). El cromatógrafo estaba equipado con un muestreador automático Shimadzu AOC 20i (Kioto, Japón) y un detector por ionización de flama (FID). Las temperaturas de operación fueron: columna, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) con un incremento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, llegando hasta los $140 \text{ }^\circ\text{C}$; inyección a $270 \text{ }^\circ\text{C}$; FID a $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Se usó nitrógeno gas (99,9 %) a un flujo constante de $2,23 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos con el objetivo de verificar si las diferencias entre las eficiencias, calidad de los efluentes y producciones de metano en los distintos HFHSS en cada temporada de estudio fueron significativas.

En cuanto a las eficiencias de eliminación y concentración de contaminantes en el efluente, se llevó a cabo una prueba de normalidad Shapiro Wilks de los datos agrupados por parámetro. Luego, se llevó a cabo un análisis t-student (para aquellas muestras con distribución normal) y de Wilcoxon (para aquellas muestras sin distribución normal) para determinar las diferencias entre los HFHSS usando distintas plantas. Para determinar el efecto de las temporadas sobre las eficiencias de eliminación y las concentraciones en el efluente de los distintos HFHSS, se realizó un análisis de varianza ANOVA (para aquellas muestras con distribución normal) y Kruskal Wallis (para aquellos sin distribución normal).

Para evaluar si las diferencias encontradas entre las producciones de metano de los HFHSS con diferentes plantas o en las distintas temporadas, se llevó a cabo un análisis estadístico a los datos de AME. Este análisis consistió en un test de normalidad Shapiro Wilks de los datos agrupados por zona y luego por temporada. Posteriormente, se realizó un análisis t-student para verificar si HFHSSPhr1 y HFHSS-Phr2 junto con HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2 se comportaron como duplicados. Para determinar el efecto del tipo de planta, o estacionalidad se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA, para los datos con distribución normal, y Kruskal Wallis para aquellos sin distribución normal.

Para comprobar cuál serie de datos mostró diferencias en los análisis de varianza, se aplicó un test de Tukey. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$). Para los análisis se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

2.4. Caracterización de las comunidades microbianas de los HFHSS

2.4.1. Extracción de biomasa y ADN

Las muestras se extrajeron desde los tubos de muestreo ubicados en las tres zonas de las celdas como se observa en la Figura 7 (Zona A, Zona B y Zona C). Se realizaron 3

muestreos, tomando en cuenta la temporada Otoño/Invierno del 2013 (Julio, 2013) y Primavera/Verano del 3^{ro} (Septiembre, 2015). La extracción de biomasa se realizó como se explicó anteriormente en el punto 2.2.1 para la determinación de AME (Morató *et al.*, 2005).

Para la extracción de ADN, 50 mL de cada muestra se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos. El ADN se purificó a partir de 500 mg de pellet, con el kit FastDNATM SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Posteriormente el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría en un lector de microplacas Infinite F2000pro TECAN (Tecan Group Ltd, Switzerland) para luego ser almacenado a -20°C.

2.4.2. Cuantificación de bacterias y arqueas mediante PCR en tiempo real (q-PCR)

Para la cuantificación de los microorganismos presentes en las muestras extraídas del medio de soporte se realizó una reacción de PCR en tiempo real (q-PCR) con el Kit KAPA SYBR® Fast qPCR. En la Tabla 9 se muestran los partidores universales para amplificar el gen ARNr 16S de arqueas y partidores universales para bacterias. Se agregó 1µL del ADN purificado en 19µL de una mezcla que contenía 10 µL MasterMix (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche, Chile), 0,4 µL de cada partidore y 8,2 µL de H₂O grado PCR. Cabe destacar que el MgCl₂, dNTPs, SYBR Green y ADN polimerasa están contenidos en el Mix del Kit mencionado. El análisis de cada muestra se hizo por duplicados.

Tabla 9. Partidores para amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR

Dominio	Partidore	Secuencia (5'-3')	Posición	Reacción	Referencia
Bacteria	341F	CCTACGGGAGGCAGC AG	341-357	a y b	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
	907R	ATTACCGCGGCTGCTG G	907-926	b	Lane <i>et al.</i> (1985)
	341F- GC	GCclamp-GCC TAC GGG AGG CAG CAG	341-357	c	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
	534R	ATT ACC GCG GCT GG	517-534	a y c	
Arquea	344F	ACGGGGCGCAGCAGG CGCGA	344-363	a y b	Raskin <i>et al.</i> (1994)

915R GTGCTCCCCCGCCAAT 915-934 a y b Coolen *et al.*
TCCT (2004)

F: partididor forward; R: partididor reverse. Posición: ubicación del partididor en el gen ARNr 16S en pares de bases (pb); a) q-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real); b) PCR-DGGE (análisis por electroforesis en gel con gradiente denaturante); c) n-PCR (PCR anidada).

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche, Alemania). El programa consistió en un ciclo de pre-incubación de 3 min a 95 °C (ciclo de pre-incubación), seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 s (denaturación), 61 °C por 10 s (alineamiento) y 72 °C por 15 s (elongación) para arqueas. Mientras que para bacterias, la etapa de alineamiento de partididores fue a 58 °C por 20 s conservándose el mismo programa para las otras etapas. El tiempo crítico en que la amplificación es detectada fue calculado por el software LightCycler 4.05. Para la obtención de la concentración de microorganismos (N° de copias·mL⁻¹) se realizó una curva de calibración con estándares de ADN de *E. coli* de concentraciones entre 10⁻² - 10² copias· mL⁻¹ para bacterias, y de *Methanosarcina Mazei* en un rango de concentración entre 10⁻³-10¹ copias· mL⁻¹ para arqueas.

2.4.3. Análisis de comunidades microbianas por la técnica PCR-DGGE

Para el análisis de DGGE se amplificó el gen 16S rARN mediante la técnica PCR con partididores universales para ambos dominios en forma separada (Tabla 9). La solución de amplificación consistió en 1 µL de muestra de ADN diluido 10 veces, 11,3 µL de agua grado PCR, 4 µL buffer 1X PCR (Promega), 1,2 µL MgCl₂ (0,2 mM concentración final), 0,4 µL dNTPs (0,2 mM concentración final), 0,5 µL de cada partididor (concentración final 0,5 µM) y 0,1 µL de GoTaq polimerasa (con actividad enzimática de 0,0125 U·µL⁻¹).

La reacción consistió en una denaturación inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C (denaturación), 45 s a 58 °C (hibridación), 1,5 minutos a 72 °C (elongación), finalmente una etapa durante 5 minutos a 72 °C (elongación final).

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2% para corroborar que el gen de interés fue amplificado correctamente. En el caso de bacterias, se realizó una segunda reacción de PCR o PCR anidada (n-PCR), donde se utilizaron los partididores

señalados en la Tabla 7. El partidor 341F-GC contiene una cola de GC (Guanina-citocina) de 40 pb adherido al extremo 5' con el fin de evitar su completa denaturación durante el análisis. El programa de la segunda reacción consistió inicialmente en una pre denaturación de 2 minutos a 94 °C, seguido de 28 ciclos de 30 s a 94 °C (denaturación), 30 s a 55 °C (hibridación), 45 s a 72 °C (elongación) y finalmente una etapa de 3 minutos a 72 °C (elongación final).

El DGGE se llevó a cabo con 5 a 18 µL de ADN amplificado haciendo uso del kit DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, USA). El gel se hizo con un 7,5 % acrilamida/bis-acrilamida (p/v), con un gradiente denaturante perpendicular en el rango 38 – 65 % para el análisis de bacterias y de 40 – 62 % para arqueas. El gradiente se preparó a partir de una solución 0% denaturante y otra 70% denaturante (urea 7 M y formamida al 40%). El gel se dejó durante 16 horas a 60 Voltios, sumergido en un buffer TAE 1X (20 mL/L) a 60 °C (Valdebenito-Rolack *et al.*, 2010). Los geles fueron teñidos con AgNO₃ para su visualización y con bromuro de etidio para la extracción de bandas. Los patrones de bandas del PCR-DGGE fueron analizados con el software GelPro Analyzer, con el cual se generó una matriz de datos basados en presencia/ausencia de bandas con la similitud de Bray Curtis. Posteriormente se construyeron dendrogramas mediante el método UPGMA utilizando el software Prime 5.

2.4.4. Identificación de las especies presentes en las comunidades microbianas de los HFSSH mediante secuenciación

Las bandas predominantes encontradas en el análisis de PCR-DGGE se escindieron manualmente y se suspendieron en 100 µL de agua destilada MiliQ. Posteriormente se llevó a cabo una reacción de PCR con los partidores 341F-GC y 534R (bacteria); 344F y 915R-GC (arquea). Las muestras obtenidas fueron purificadas y secuenciadas por MacroGen Inc. Seúl Korea.

De las secuencias obtenidas, se realizó una comparación con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank mediante la herramienta BLASTn considerando secuencias altamente similares y especies cultivables o no.

3. RESULTADOS

3.1. Monitoreo de parámetros *in situ*

En la Tabla 10 se muestra un resumen de los parámetros *in situ* promedio en cada zona de las 4 celdas de HFHSS.

Los valores obtenidos nos indican que los parámetros analizados fueron constantes a lo largo de los HFHSS y el tiempo de monitoreo (desviación estándar < 30 %). Por otro lado, los valores del OD se muestran altamente variables (desviaciones estándar del 65 - 130 % con respecto al promedio). En consecuencia, los datos de OD nos dan información cualitativa de las bajas concentraciones de oxígeno disuelto a lo largo de los HFHSS (García *et al.*, 2004b).

Tabla 10. Parámetros *in situ* promedio por zona.

Celda	Zona	Temperatura (°C)	pH	POR (mV)	OD (mg·L ⁻¹)
HFHSS-Phr1	A	15,2 ± 4,3	7,0 ± 0,3	-273,3 ± 41,2	0,3 ± 0,4
	B	14,9 ± 4,4	6,9 ± 0,2	-274,0 ± 40,5	
	C	15,0 ± 4,6	6,9 ± 0,2	-267,0 ± 44,0	
HFHSS-Sch1	A	14,5 ± 4,3	6,8 ± 0,2	-278,4 ± 39,3	0,3 ± 0,2
	B	14,3 ± 4,4	6,9 ± 0,3	-276,2 ± 47,3	
	C	14,3 ± 4,6	6,9 ± 0,2	-270,7 ± 44,2	
HFHSS-Phr2	A	14,9 ± 4,7	6,8 ± 0,3	-281,2 ± 36,7	0,3 ± 0,4
	B	15,1 ± 4,8	6,9 ± 0,3	-283,2 ± 36,6	
	C	15,3 ± 4,9	6,9 ± 0,3	-286,9 ± 40,8	
HFHSS-Sch2	A	15,0 ± 4,6	6,8 ± 0,3	-293,3 ± 42,0	0,3 ± 0,4
	B	14,8 ± 4,5	6,8 ± 0,3	-277,9 ± 52,2	
	C	14,7 ± 4,4	6,9 ± 0,2	-274,3 ± 57,5	

HFHSS-Phr1 y HFHSS-Phr2: humedales de flujo horizontal subsuperficial plantados con *P. australis*; HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2: humedales de flujo horizontal subsuperficial plantado con *S. californicus*; A: zona de entrada del influente; B: zona media; C: Zona de salida del efluente. POR: potencial de óxido reducción; OD: oxígeno disuelto. n = 23.

En la Figura 9 se muestra el pH en cada zona de los HFHSS a lo largo de los 3 años de monitoreo. Los niveles de pH se muestran constantes a lo largo del tiempo de

estudio y la longitud de las celdas, con una desviación estándar del 4 % con respecto a la media. Los valores variaron entre 6,2 y 8,0 en todos los HFHSS. En la temporada de O/I del 2013 se observó mayor variación en los datos (6,2 – 8,0) que en las temporadas posteriores, los cuales fueron más estables (6,5 - 7,2). En general el pH promedio fue de 6,8, que se puede considerar un valor neutro.

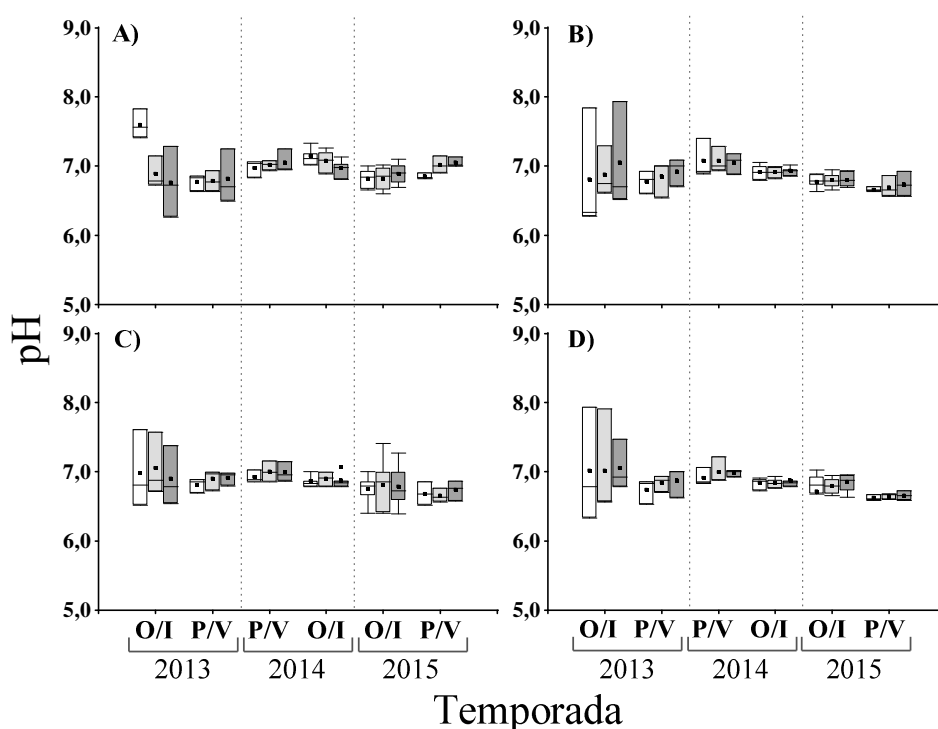


Figura 9. Comportamiento del pH en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano; Zona A (□); Zona B (■); Zona C (■).

La Figura 10 muestra el comportamiento de la temperatura en los HFHSS. Los 4 HFHSS operaron a una temperatura promedio de $14,8 \pm 3,4$ °C. En O/I se evidenciaron temperaturas en el rango 7 - 19° C, mientras que en P/V fueron mayores (31 %) con un rango de 15 a 23 °C.

La temporada O/I del 2015 presentó temperaturas un 20 % mayores (10 – 19 °C) a las de O/I del 2013 y 2014 año (7 – 13 °C). En P/V del 2015, HFHSS-Phr2 evidenció temperaturas 11 % mayores que los otros HFHSS.

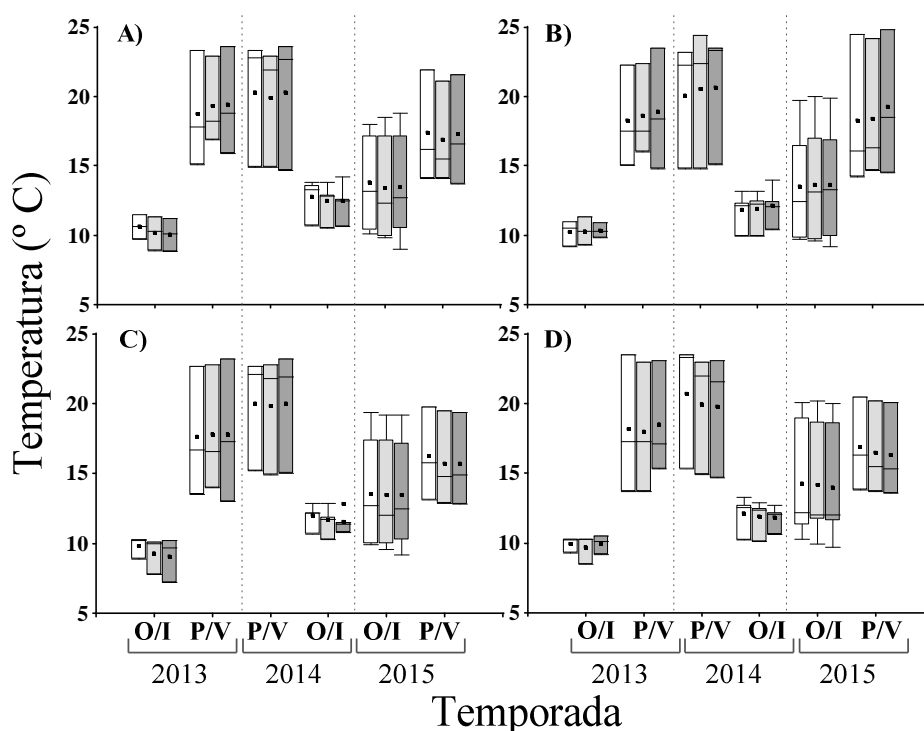


Figura 10. Comportamiento de la temperatura en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano; Zona A (□); Zona B (▒); Zona C (■).

La Figura 11 muestra el comportamiento del potencial óxido reducción (POR) a lo largo del tiempo de operación en cada zona de los HFHSS. Los HFHSS presentaron ambientes altamente reductores, con rangos de POR desde -357,9 a -149,9 mV. Los mayores valores de POR se observaron en O/I del 2013 (-160,7 a -280,3 mV), disminuyendo a -300 mV promedio en las temporadas posteriores. El comportamiento del POR en P/V del 2014 fue el más variable, con valores desde -350 a -149,9 mV. En P/V del 2015, HFHSS-Sch2 presentó un POR promedio de -300 mV, mientras que los

otros HFHSS presentaron un promedio de -200 mV. Por otro lado, en O/I del 2013, la Zona A presentó valores de POR hasta 50 mV menores a aquellos de las Zonas B y C en todos los HFHSS. En los años siguientes, los valores de POR entre zonas variaron de 0,6 a 37 mV, sin presentarse un gradiente claro a lo largo de los HFHSS. Tampoco se observó un patrón en el comportamiento del POR de las diferentes temporadas o plantas utilizadas.

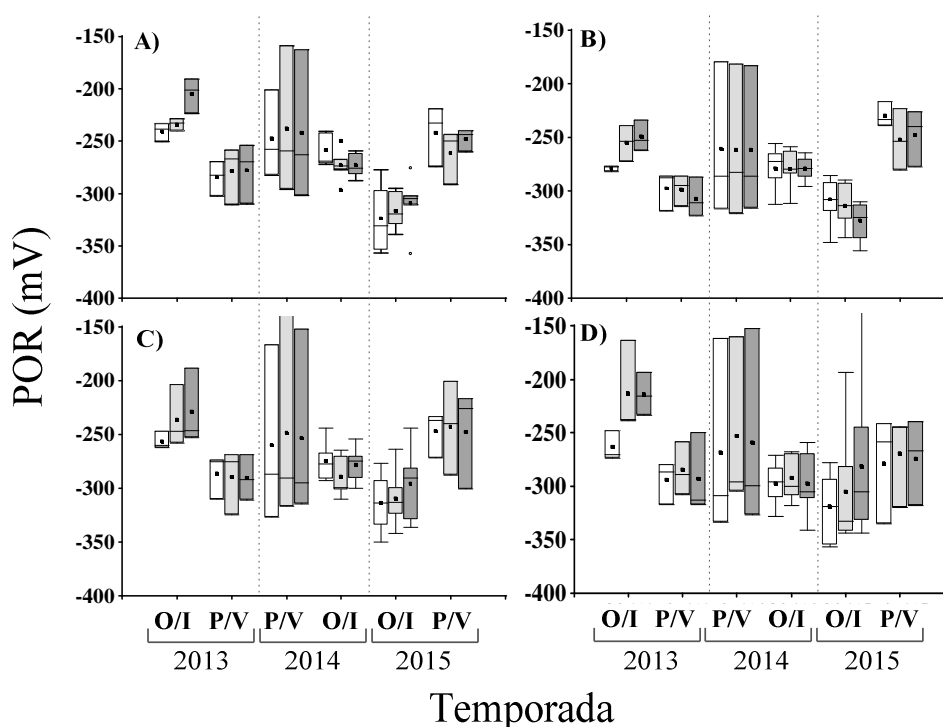


Figura 11. Comportamiento del potencial óxido reducción (POR) en cada zona de los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano; Zona A (□); Zona B (■); Zona C (■).

En la Figura 12 se muestra el comportamiento del OD en la zona media (Zona B) de cada HFHSS a lo largo del tiempo de estudio. Las concentraciones de OD fueron inferiores a $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En O/I del 2013 el OD promedio fue de 0,8 en HFHSS-Phr1 y HFHSS-Phr2 y de $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2. Luego, en P/V del 2014, el OD disminuyó un 50 % con $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En los años posteriores disminuyó entre un

25 y 75 % estableciéndose con un rango de $0,1 - 0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en todos los HFHSS. Los niveles más bajos ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se observan en O/I del 2015.

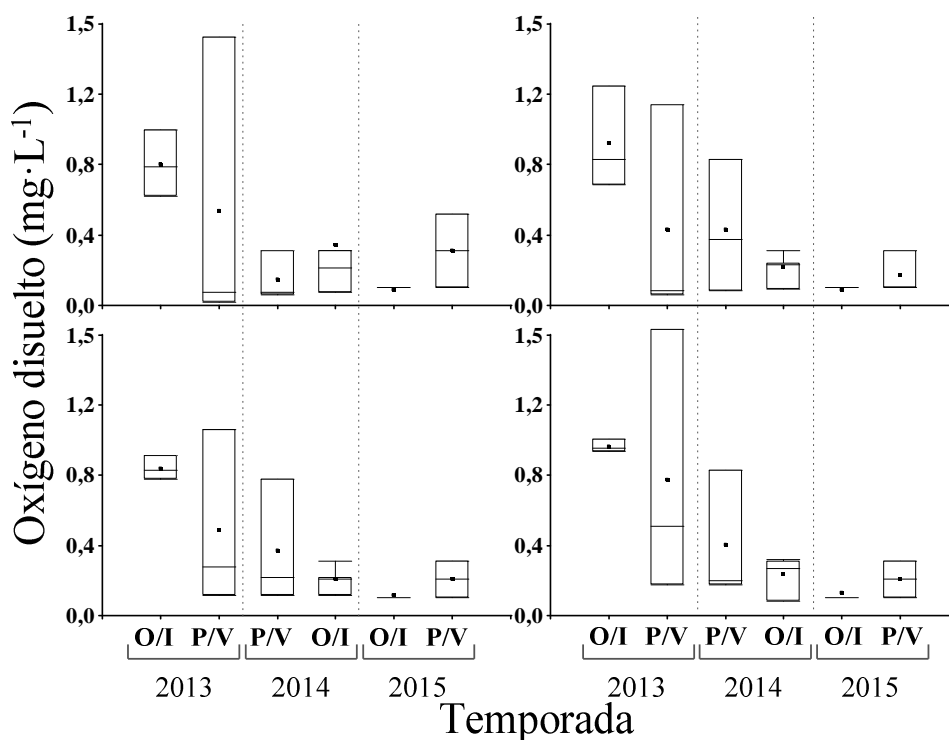


Figura 12. Comportamiento del oxígeno disuelto en los HFHSS. A) HFHSS-Phr1; B) HFHSS-Phr2; C) HFHSS-Sch1; D) HFHSS-Sch2. O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera verano.

3.2. Caracterización fisicoquímica del influente

La Tabla 11 muestra la caracterización fisicoquímica del influente en las temporadas de O/I y P/V, durante todo el tiempo monitoreado. La concentración de materia orgánica en O/I presentó variaciones de 22 al 48 % respecto del promedio de DBO_5 y DQO , respectivamente. Se obtuvieron concentraciones de DBO_5 en los rangos de $133,0 - 223,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que las concentraciones de DQO estuvieron en el rango de $174,4 - 297,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DQO . De este modo, las cargas orgánicas aplicadas durante el tiempo de monitoreo resultaron en los rangos de $4,3 - 6,3 \text{ g } \text{DBO}_5 \cdot \text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ y $6,0 - 10,2 \text{ g } \text{DQO } \text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$. Las concentraciones de DBO_5 fueron, en general, mayores (34

%) en las temporadas de O/I que en las de P/V, exceptuando el 2013 (13 % mayor en P/V). En cuanto a DQO, en el 2013 se observaron las mayores variaciones en las concentraciones, evidenciándose un aumento de 35 % en la concentración de DQO durante P/V respecto a O/I. El índice de biodegradabilidad (DBO_5/DQO) promediado en los 3 años de monitoreo fue un 30 % mayor en O/I que en P/V, con valores de $0,76 \pm 0,02$ y $0,53 \pm 0,03$, respectivamente.

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica del influente

Parámetro	T.	Año		
		2013	2014	2015
DBO ₅	O/I	133,0 ± 9,6	223,5 ± 107,3	215,2 ± 67,2
	P/V	152,2 ± 14,6	147,7 ± 46,2	142,3 ± 16,6
DQO	O/I	174,4 ± 39,2	298,5 ± 106,4	297,5 ± 97,0
	P/V	267,4 ± 137,1	287,5 ± 18,2	278,5 ± 90,4
SST	O/I	131,9 ± 51,8	272,7 ± 121,9	412,8 ± 380,7
	P/V	256,5 ± 44,5	145,5 ± 43,3	257,3 ± 109,7
SSV	O/I	95,2 ± 32,4	185,0 ± 59,3	309,5 ± 203,6
	P/V	200,5 ± 80,4	115,1 ± 37,8	235,7 ± 89,2
N-NH ₄ ⁺	O/I	98,7 ± 18,6	62,5 ± 12,7	72,9 ± 15,3
	P/V	74,9 ± 12,9	67,6 ± 8,0	73,6 ± 16,2
NT	O/I	126,7 ± 10,6	93,6 ± 20,8	97,3 ± 17,7
	P/V	106,8 ± 18,4	105,3 ± 27,8	102,2 ± 31,8
PT	O/I	13,1 ± 1,2	14,2 ± 1,2	11,6 ± 3,1
	P/V	15,5 ± 2,5	13,0 ± 1,3	13,5 ± 1,2

T: temporada; O/I: otoño/invierno; P/V: primavera/verano.

Los SST presentaron un aumento de hasta el 300 % a lo largo del tiempo de estudio. Las mayores concentraciones se encontraron en O/I (45 % con respecto a P/V), exceptuando el 2013, donde en P/V se evidenciaron concentraciones 46 % mayores que en O/I. En cuanto a los SSV se evidenciaron concentraciones un 37 y 26 % mayores en

O/I que en P/V, del 2014 y 2015, respectivamente. Mientras que O/I del 2013 presentó concentraciones 49 % menores que P/V del mismo año. La relación SSV/SST se mantuvo en un rango de 0,68 a 0,79 a lo largo del tiempo de monitoreo, exceptuando P/V del 2015 (0,92).

En cuanto a nitrógeno, se presentaron concentraciones de N-NH_4^+ y NT un 24 y 15 % mayores en O/I que en P/V del 2013. No obstante, en P/V del 2014, las concentraciones de N-NH_4^+ y NT fueron un 7 y 11 % mayores que en P/V, respectivamente. El 2015 presentó concentraciones un 1 y 5 % mayores en P/V que en O/I de N-NH_4^+ , respectivamente. La proporción promedio de N-NH_4^+ con respecto al NT fue del $70 \pm 0,05$ %. En cuanto a PT, se encontraron concentraciones 15 % mayores en P/V que en O/I del 2013. En el 2014 y 2015 las concentraciones fueron un 7 y 14 % mayores en O/I que en P/V, respectivamente.

3.3. Determinación de las eficiencias de eliminación de contaminantes de los HFHSS

3.1.1. Materia orgánica y sólidos

En la Figura 13 se muestran las eficiencias de eliminación (gráfico de barras) y concentraciones en el efluente (gráfico de cajas) de DBO_5 .

Las eficiencias de eliminación de DBO_5 se obtuvieron en un rango de 49,7 a 75,0 %. Las eficiencias de HFHSS-Phr1 fueron un significativamente ($p > 0,05$) menores (8 %) que las de HFHSS-Sch2, durante todas las temporadas de estudio. No se encontraron diferencias significativas entre las eliminaciones del resto de los HFHSS entre las temporadas en estudio ($p > 0,05$).

Las concentraciones en el efluente oscilaron entre los 10,3 y 111,1 $\text{mg DBO}_5 \cdot \text{L}^{-1}$, observándose las mayores variaciones durante O/I del 2015 con valores desde 10 a 125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Mientras que las otras temporadas variaron entre 42,6 y 112,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Las concentraciones promedio fueron de 50 $\text{mg DBO}_5 \cdot \text{L}^{-1}$, aproximadamente, exceptuando la temporada P/V del 2014, donde las concentraciones promedio aumentaron un 36 %. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las distintas temporadas, ni de los distintos HFHSS.

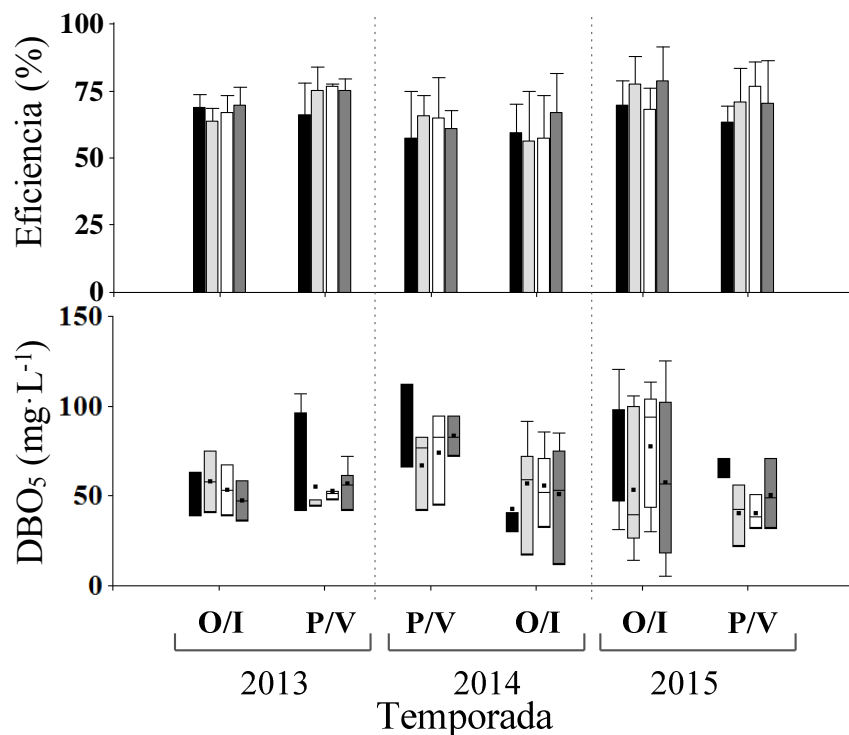


Figura 13. Eficiencias de eliminación (barras) y concentraciones (cajas) de DBO₅ en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

En la Figura 14 se muestran las eficiencias de eliminación y las concentraciones de DQO en el efluente de cada HFHSS. Las eficiencias de eliminación se encontraron en el rango 50,3 - 74,8 %. En O/I del 2013, HFHSS-Phr1 presentó eficiencias 33 % mayores que HFHSS-Phr2. Posteriormente, esta diferencia fue disminuyendo hasta un 3 % en el 2015. Las diferencias entre los distintos HFHSS y en las temporadas de monitoreo no mostraron ser estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

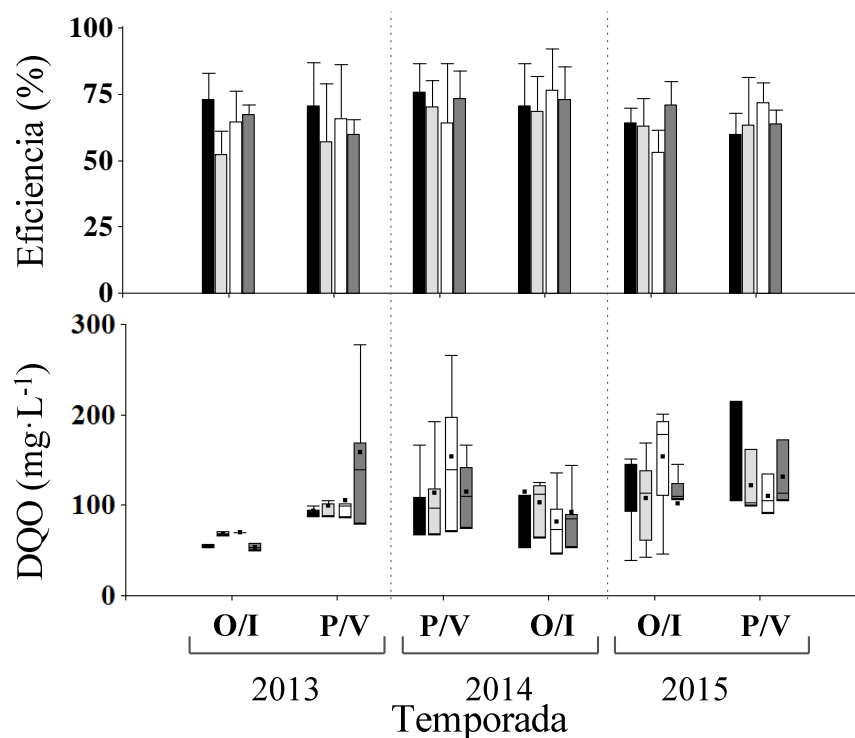


Figura 14. Eficiencias de eliminación y concentraciones en efluente de DQO. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

Las concentraciones de DQO en el efluente aumentaron desde 65,5 mg DQO·L⁻¹ promedio en 2013, hasta los 131,2 mg DQO·L⁻¹ promedio en 2015. Estas diferencias no mostraron ser significativas ($p > 0,05$) entre los HFHSS y las temporadas en estudio.

Las eficiencias de eliminación y concentración de SST en el efluente de cada HFHSS se muestran en la Figura 15. Las eficiencias de eliminación fueron del 93 % promedio. En P/V del 2015 se observó una disminución (75,4 %) significativa ($p < 0,05$) en la eficiencia de HFHSS-Phr2, con respecto a las otras temporadas de estudio. No se encontraron diferencias significativas entre los otros HFHSS, tampoco entre las temporadas en estudio ($p > 0,05$).

Las concentraciones de SST fueron bajas el 2013 (12,1 mg·L⁻¹), exceptuando los HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2, que en P/V (2013) exhibieron concentraciones 55 % mayores (25,0 y 28,9 mg·L⁻¹). Las concentraciones de SST en HFHSS-Phr1 presentaron

ser significativamente ($p > 0,05$) mayores (35 %) con respecto a HFHSS-Phr2, exceptuando en P/V del 2015 donde HFHSS-Phr1 exhibió concentraciones 23 % menores que HFHSS-Phr2. En cuanto a las temporadas, en P/V del 2015, HFHSS-Phr2 y HFHSS-Sch2 presentaron una disminución en la eficiencia de eliminación del 4 y 6 % con respecto al promedio de las otras temporadas, respectivamente. Esto se reflejó en un aumento significativo ($p > 0,05$), en las concentraciones de salida de HFHSS-Phr2 y HFHSS-Sch2 del 71 y 207 %, llegando a concentraciones de 22,4 y 56,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

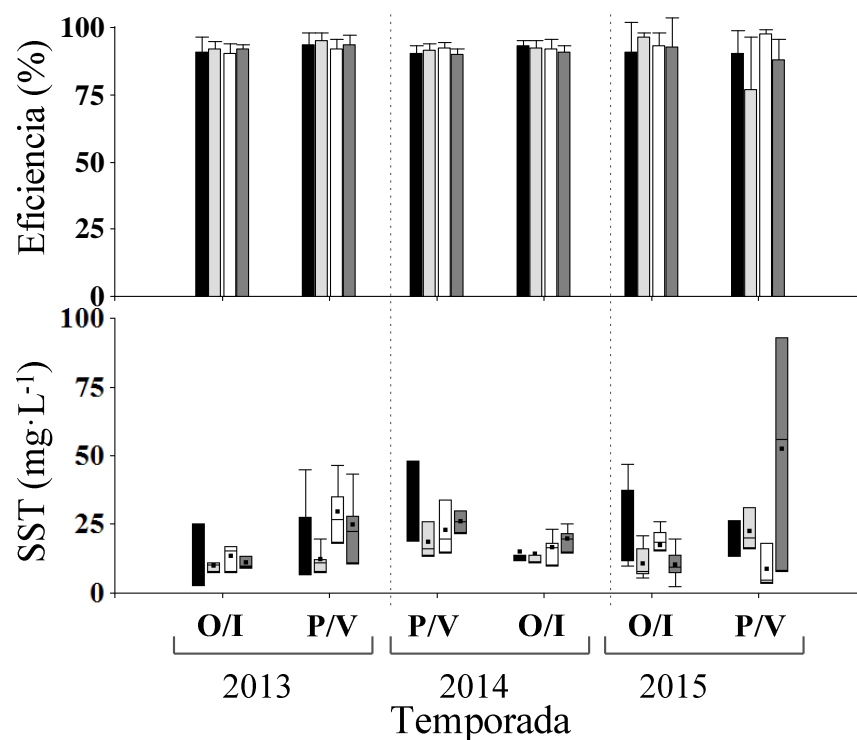


Figura 15. Eficiencias de eliminación (barras) y concentraciones (cajas) de SST en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

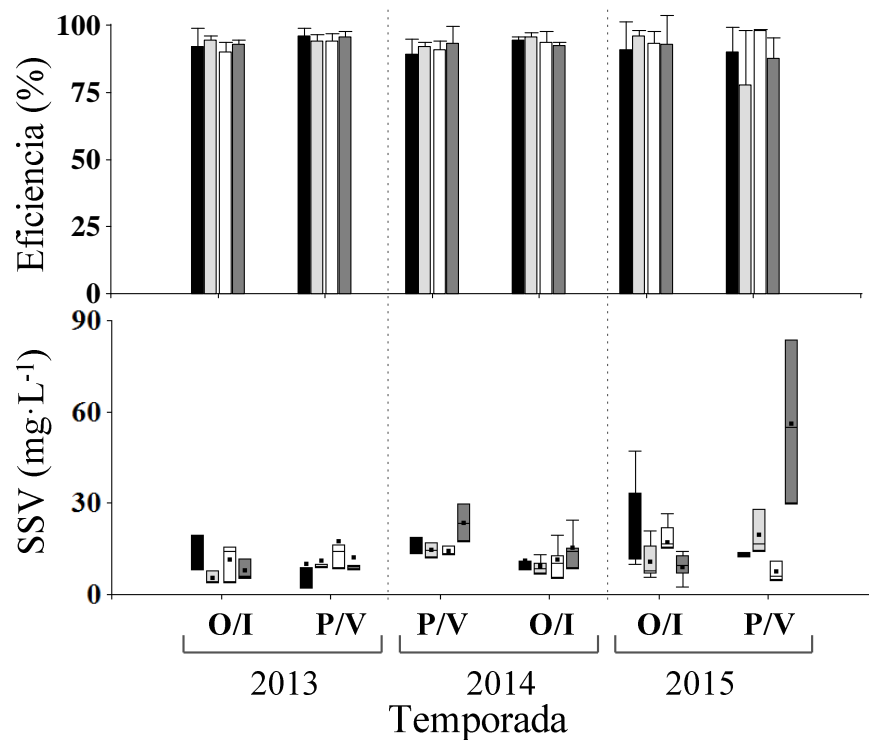


Figura 16. Eficiencias de eliminación y concentraciones de SSV en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

En la Figura 16 se presentan las eficiencias de eliminación y las concentraciones de SSV en el efluente de cada HFHSS. El comportamiento de las eficiencias de eliminación fue similar a las eficiencias de eliminación de SST. En P/V del 2015 HFHSS-Phr2 presentó eficiencias significativamente ($p > 0,05$) menores (17 %) al de las temporadas previas. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los demás HFHSS ni entre temporadas.

Las concentraciones de SSV se mostraron similares a las de SST durante el tiempo de monitoreo., En la temporada P/V del año 2015, en HFHSS-Phr2 se demostró un aumento significativo ($p < 0,05$) del 48 % en la concentración de SSV. De la misma manera, HFHSS-Sch2 presentó un aumento significativo del 83 % en la temporada P/V del 2015.

3.3.2. Nutrientes

En la Figura 17 se muestran las eficiencias de eliminación y concentraciones de $N-NH_4^+$ en el efluente de cada HFHSS. Las eficiencias de eliminación presentaron un rango de 5,1 - 49,9 %. Los HFHSS presentaron eficiencias 41 % menores en O/I que en P/V. En la temporada O/I del 2014 se mostraron eficiencias de eliminación 36 % menores a las eficiencias de O/I del 2013 y 2014. No obstante, las diferencias entre las temporadas no fueron significativas ($p > 0,05$). Las eficiencias de eliminación de HFHSS-Phr2 fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores (38 %) que aquellas de los demás HFHSS.

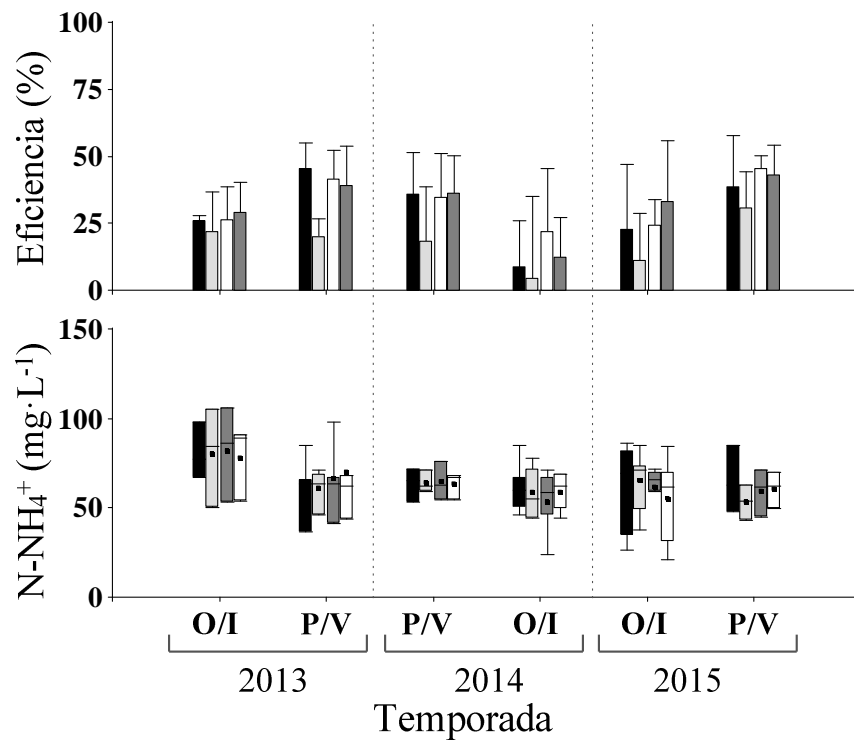


Figura 17. Eficiencias de eliminación y concentraciones de nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

Las concentraciones de $N-NH_4^+$ en el efluente de O/I del 2013 fueron en promedio $80,1 mgN-NH_4^+ \cdot L^{-1}$ con rangos entre $49,8$ y $109,6 mg N-NH_4^+ \cdot L^{-1}$.

Posteriormente disminuyeron (25 %) con rangos de 35 a 80 mg N-NH₄⁺·L⁻¹ (61,3 mg N-NH₄⁺·L⁻¹ promedio). Sin diferencias a lo largo del tiempo de monitoreo o entre los distintos HFHSS ($p > 0,05$).

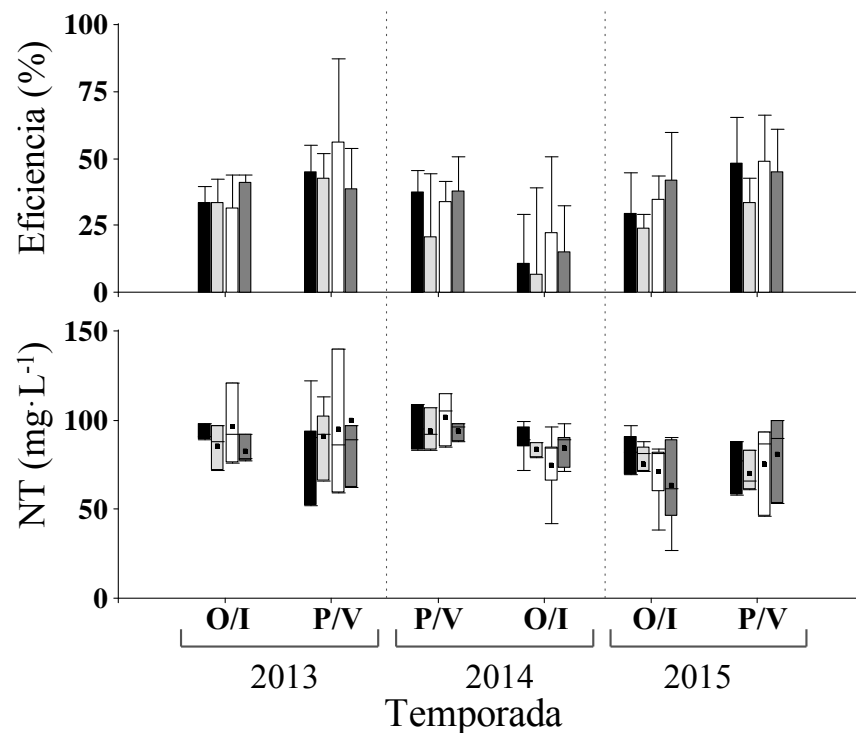


Figura 18. Eficiencias de eliminación y concentraciones de nitrógeno total (NT) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

En la Figura 18 se exhiben las eficiencias de eliminación y las concentraciones de NT en el efluente de cada HFHSS. Las eficiencias de eliminación de NT presentaron valores promedio desde 11,3 a 58,9 %. La temporada de O/I mostró eficiencias 41 % menores que P/V. Esta diferencia mostró ser significativa ($p < 0,05$) entre la temporada de O/I del 2014 y P/V del 2013 y 2014 (no así con P/V del 2015). Las eficiencias de HFHSS-Phr2 mostró ser significativamente ($p < 0,05$) menor (26 %) que las otras celdas.

Las concentraciones de los HFHSS promedio al inicio del estudio son de $89,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y luego disminuyen un 2 y un 7 % en las temporadas de P/V del 2013 y 2014, respectivamente. En O/I del 2014 las concentraciones promedio aumentan, hasta $96,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ promedio. El 2015 presenta las menores concentraciones ($73 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el efluente. No obstante ninguna de estas diferencias es significativa ($p > 0,05$).

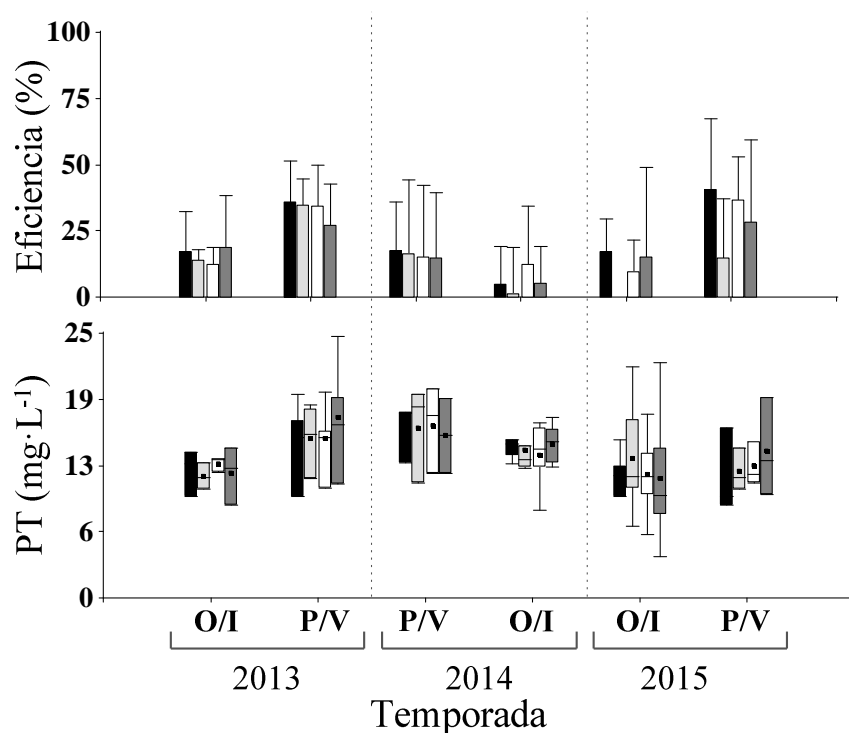


Figura 19. Eficiencias de eliminación y concentraciones de fósforo total (PT) en los efluentes. HFHSS-Phr1 (■); HFHSS-Phr2 (■); HFHSS-Sch1 (□); HFHSS-Sch2 (■). O/I: temporada de otoño/invierno; P/V: temporada de primavera/verano.

En la Figura 19 se muestran las eficiencias de eliminación y las concentraciones de PT en el efluente de cada HFHSS. En general, se observan bajas eficiencias de eliminación de PT, con valores desde 0 al 37,2 %. Las eficiencias de eliminación de HFHSS-Phr2 muestran ser significativamente ($p > 0,05$) menores a las de HFHSS-Phr1 (30 %) y HFHSS-Sch1 (23 %). Las temporadas mostraron una tendencia similar a lo observado en las eficiencias de eliminación de nitrógeno. La temporada O/I presento

eficiencias 58 % menores a las de P/V. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) en todos los HFHSS, a excepción del HFHSS-Phr2. En P/V del 2013, esta celda presentó eficiencias 72 y 63 % mayores que las temporadas de O/I del 2014 y 2015, respectivamente.

En la Tabla 12 se exhibe un resumen de las concentraciones promedio en el efluente de cada HFHSS durante las temporadas P/V y O/I de los 3 años de estudio.

Tabla 12. Tabla resumen de las concentraciones en los efluentes de los HFHSS

P.	Año	T.	HFHSS-Phr1	HFHSS-Phr2	HFHSS-Sch1	HFHSS-Sch2
			Concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			
DBO	2013	O/I	51,0 ± 17,0	74,0 ± 33,0	53,0 ± 20,2	47,3 ± 15,9
		P/V	77,2 ± 29,9	55,0 ± 16,8	52,6 ± 5,2	56,6 ± 13,0
	2014	O/I	42,7,6 ± 17,3	56,7 ± 32,3	55,5 ± 27,0	50,8 ± 34,9
		P/V	87,8 ± 23,1	67,0 ± 21,8	74,0 ± 25,8	83,0 ± 11,3
	2015	O/I	70,8 ± 30,6	53,4 ± 36,2	77,4 ± 33,0	57,4 ± 43,3
		P/V	65,0 ± 5,6	40,3 ± 17,2	42,3 ± 9,5	50,5 ± 19,4
DQO	2013	O/I	54,5 ± 2,3	84,6 ± 28,0	69,3 ± 7,6	53,7 ± 5,8
		P/V	93,1 ± 4,7	98,8 ± 7,9	104,5 ± 21,1	158,7 ± 87,7
	2014	O/I	114,2 ± 78,4	103,2 ± 28,3	82,0 ± 42,2	91,6 ± 38,4
		P/V	103,5 ± 45,6	112,9 ± 57,5	153,7 ± 94,3	114,8 ± 46,1
	2015	O/I	115,4 ± 39,1	108,0 ± 43,8	153,3 ± 55,9	101,9 ± 42,6
		P/V	162,7 ± 55,0	121,2 ± 35,4	110,1 ± 22,4	130,7 ± 36,7
SST	2013	O/I	14,4 ± 11,2	9,7 ± 1,9	13,3 ± 5,0	10,9 ± 2,3
		P/V	23,4 ± 16,7	12,3 ± 5,2	29,5 ± 13,8	24,8 ± 14,2
	2014	O/I	14,9 ± 4,7	14,3 ± 3,11	16,6 ± 5,6	19,8 ± 4,6
		P/V	29,3 ± 16,3	18,4 ± 6,8	22,7 ± 9,9	25,8 ± 5,9
	2015	O/I	21,6 ± 14,5	10,5 ± 5,8	17,4 ± 7,0	10,4 ± 5,5
		P/V	17,7 ± 7,4	22,4 ± 7,6	8,8 ± 8,0	56,3 ± 42,6
SSV	2013	O/I	12,2 ± 6,3	5,2 ± 2,1	11,2 ± 6,2	7,7 ± 3,6
		P/V	10,1 ± 7,9	11,2 ± 3,2	17,3 ± 10,6	12,2 ± 6,9
	2014	O/I	11,1 ± 3,3	9,2 ± 3,2	11,3 ± 6,3	15,2 ± 6,7
		P/V	15,6 ± 2,8	14,5 ± 2,5	14,0 ± 1,7	23,5 ± 8,8
	2015	O/I	21,0 ± 13,9	10,7 ± 5,8	16,9 ± 7,1	9,0 ± 3,9
		P/V	13,2 ± 0,8	19,6 ± 7,4	7,3 ± 3,3	52,1 ± 29,9
N- NH ₄ ⁺	2013	O/I	80,7 ± 15,8	79,8 ± 27,5	81,7 ± 26,7	78,0 ± 20,9
		P/V	62,0 ± 20,0	60,9 ± 11,5	66,6 ± 23,6	70,0 ± 29,7

	2014	O/I	61,7 ± 15,4	58,6 ± 15,7	53,4 ± 19,0	58,8 ± 11,4
		P/V	63,5 ± 9,5	64,0 ± 6,2	64,4 ± 10,8	63,1 ± 7,5
	2015	O/I	63,3 ± 23,4	63,4 ± 16,3	61,4 ± 14,3	55,3 ± 22,2
		P/V	65,3 ± 18,8	53,1 ± 9,7	59,2 ± 13,4	60,5 ± 10,4
NT	2013	O/I	92,7 ± 4,7	85,7 ± 12,7	96,3 ± 22,8	82,3 ± 8,4
		P/V	88,7 ± 28,8	90,8 ± 20,9	71,2 ± 58,2	100,0 ± 42,5
	2014	O/I	88,2 ± 10,6	83,9 ± 17,5	74,6 ± 21,2	84,2 ± 11,7
		P/V	95,7 ± 13,0	94,2 ± 12	101,7 ± 15,3	94,0 ± 5,3
	2015	O/I	74,4 ± 20,6	75,1 ± 14,1	70,9 ± 16,9	63,4 ± 23,2
		P/V	74,3 ± 15,2	69,8 ± 11,6	75,2 ± 25,5	80,7 ± 24,7
PT	2013	O/I	12,0 ± 2,1	11,5 ± 1,2	12,7 ± 0,7	11,7 ± 2,7
		P/V	14,8 ± 4,2	15,1 ± 3,5	15,0 ± 3,7	17,1 ± 6,1
	2014	O/I	14,6 ± 1,7	14,0 ± 2,3	13,4 ± 3,3	14,5 ± 2,0
		P/V	15,9 ± 2,7	16,0 ± 4,5	16,2 ± 4,0	10,2 ± 9,5
	2015	O/I	10,8 ± 3,6	13,1 ± 5,4	11,6 ± 3,8	11,2 ± 6,3
		P/V	11,5 ± 3,9	11,9 ± 2,0	12,4 ± 2,0	13,9 ± 4,6

P.: parámetro; T: temporada; O/I: otoño/invierno; P/V: primavera/verano; HFHSS-Phr1 y HFHSS-Phr2: celdas plantadas con *P. australis*; HFHSS-Sch1 y HFHSS-Sch2: celdas plantadas con *S. californicus*; DBO₅: demanda bioquímica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno; SST y SSV: sólidos suspendidos totales y volátiles, respectivamente. N-NH₄⁺ y NT: nitrógeno amoniacal y total, respectivamente; PT: fósforo total; n= 14 y 10 para las temporadas O/I y P/V, respectivamente.

3.4. Evaluación de la producción de metano en los HFHSS

3.4.1. Determinación de la actividad metanogénica específica (AME) de la biomasa extraída de los HFHSS

La Figura 20 muestran las curvas de producción específica de CH₄ de los ensayos para determinar la AME, en cada zona de los HFHSS en las temporadas de O/I del 2013 (Figura 20A y 20B), P/V (Figura 20C, 20D) y O/I del 2015 de monitoreo, (Figura 20E y 20F). Las celdas HFHSS-Phr1 con HFHSS-Phr2 y HFHSS-Sch1 con HFHSS-Sch2 se comportaron como duplicados, puesto que no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las AME.

a) *Temporada O/I del 2013*: Los ensayos en esta temporada duraron 41 días en ambos HFHSS (Figuras 20A y 20B). En la biomasa proveniente de los HFHSS-Phr se observaron producciones de metano en el rango de 2000 - 3900 mL CH₄·g⁻¹ SSV, mientras, que las de HFHSS-Sch presentaron valores entre 2000 y 2900 mL CH₄·g⁻¹

SSV. A su vez, la producción de metano por zonas, refleja que en la Zona C de HFHSS-Phr, se produjo un 25 y 50 % más metano que la de las Zonas B y A, respectivamente. De la misma manera, HFHSS-Sch produjo un 26 % más metano en la Zona C que las Zonas B y A. De esta manera, la biomasa extraída de la Zona C en ambos HFHSS fue la que más metano produjo (4000 y 2900 mL CH₄·g⁻¹ SSV para HFHSS-Phr y HFHSS-Sch, respectivamente).

Por otro lado, en la Tabla 13 se muestran las AME y las emisiones estimadas a partir de dicha actividad (en condiciones ideales). La biomasa extraída desde las Zonas C y B de los HFHSS-Phr presentó AME un 22 % mayor que aquella extraída de la Zona A. La biomasa proveniente de la Zona B de HFHSS-Sch exhibió valores AME un 22 y 56 % mayores que la biomasa de las Zonas A y C, respectivamente. Se observó que tanto las emisiones estimadas como los valores de AME fueron 20 y 8 % mayores, respectivamente, en HFHSS-Phr que aquellos obtenidos de HFHSS-Sch. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las AME de las distintas Zonas y plantas utilizadas (HFHSS-Phr y HFHSS-Sch). Por otro lado, las emisiones estimadas en HFHSS-Phr no coincidieron con los valores de AME, puesto que las emisiones se obtuvieron en el siguiente orden decreciente: Zona A > Zona B > Zona C. En el caso de las emisiones estimadas en HFHSS-Sch, se observa la misma tendencia que en los valores de AME.

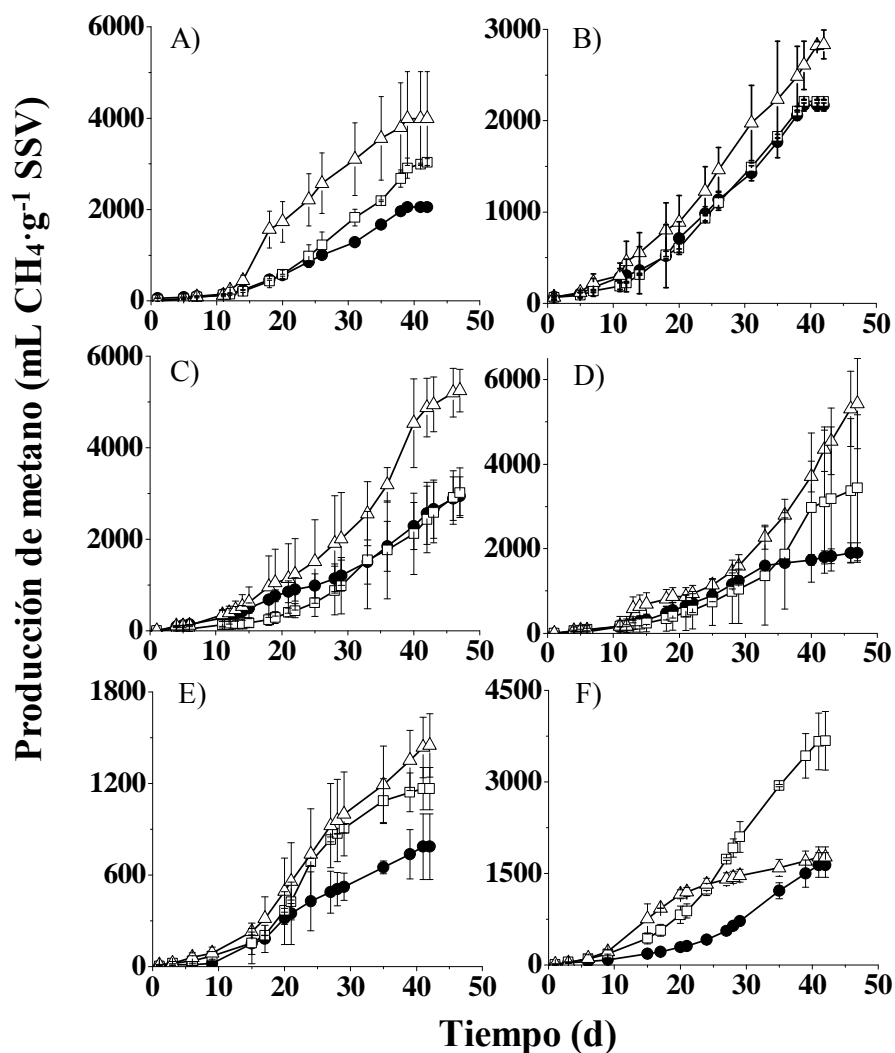


Figura 20. Producción específica de metano de la biomasa extraída desde los HFHSS. A) HFHSS con *P. australis* en la temporada otoño/invierno del año 2013; B) HFHSS con *S. californicus* en la temporada otoño/invierno del año 2013; C) HFHSS con *P. australis* en la temporada de otoño/invierno del año 2015; D) HFHSS con *S. californicus* en la temporada de otoño/invierno del año 2015. E) HFHSS con *P. australis* en la temporada primavera/verano del año 2015; F) HFHSS con *S. californicus* en la temporada de primavera/verano del año 2015. Zona A (●); Zona B (□); Zona C (Δ).

b) *Temporada O/I del 2015:* Los ensayos en ambos HFHSS duraron 48 días (Figura 20C y 20D). En esta temporada las producciones de metano de la biomasa

extraída desde los HFHSS-Phr y HFHSS-Sch se encontraron en los rangos de 3000 – 5000 y 2000 - 5500 mL CH₄·g⁻¹ SSV, respectivamente. La biomasa extraída de la Zona C de HFHSS-Phr presentó producciones 40 % mayores que en las Zonas B y A. La biomasa obtenida de la Zona C de HFHSS-Sch mostró producciones 60 y 40 % mayores que las Zonas A y B, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 13, las AME de la biomasa proveniente de la Zona C de HFHSS-Phr, exhibió valores 11 y 35 % mayores que aquellos de la biomasa obtenida de las Zonas B y A, respectivamente. En cuanto a HFHSS-Sch los valores AME obtenidos a partir de la biomasa proveniente de la Zona A, supera a las de las Zonas B y C, con valores un 58 y un 72 % mayores, respectivamente. Sin embargo ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa ($p > 0,05$). No se obtuvieron diferencias significativas entre las AME de HFHSS-Phr y HFHSS-Sch. No obstante, las AME muestran ser mayores (43 %) en la biomasa extraída desde HFHSS-Sch. Las emisiones estimadas mostraron ser 15 % mayores en HFHSS-Phr que en HFHSS-Sch.

c) *Temporada P/V del 2015*: Los ensayos duraron 45 días en ambos HFHSS (Figuras 20E y 20F). Los rangos de producción de metano en HFHSS-Phr y HFHSS-Sch fueron de 750 – 1500 y 1500 – 3700 mL CH₄·g⁻¹ SSV, respectivamente. La biomasa extraída de la Zona C de HFHSS-Phr presentó producciones de metano, 20 y 53 % mayores que aquella obtenida de las Zonas B y A, respectivamente.. En cuanto a HFHSS-Sch, la mayor producción se obtuvo en la biomasa proveniente de la Zona B con un 59 % mayor producción que las Zonas A y B.

En cuanto a los valores de AME mostrados en la Tabla 13, la biomasa proveniente de la Zona B de HFHSS-Phr mostró ser un 16 y 37 % mayor que en las Zonas C y A, respectivamente. En cuanto a la biomasa obtenida de la Zona B de HFHSS-Sch, se presentaron valores un 33 y un 38 % mayores que las Zonas C y A, respectivamente. Los valores AME de HFHSS-Phr mostraron ser 36 % mayores que los de HFHSS-Sch. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las producciones de metano entre zonas ni entre planta utilizada. En cuanto a las emisiones estimadas, HFHSS-Phr mostró emisiones 52 % mayores que HFHSS-Sch.

Tabla 13. Cargas orgánicas aplicadas, actividad metanogénica específica y emisiones de CH₄ estimadas.

T	VCO (gDBO ₅ ·m ⁻² ·d ⁻¹)	Sistema	Zona	AME (g DQO _{CH4} ·g ⁻¹ SSV·d ⁻¹)	Emisión (mg CH ₄ ·m ⁻² ·d ⁻¹)
O/I 2013	5,3 ± 1,2	HFHSS-Phr	A	0,070 ± 0,001	696,9 ± 15,4
			B	0,090 ± 0,030	407,7 ± 682,0
			C	0,090 ± 0,010	487 ± 395,7
		HFHSS-Sch	A	0,070 ± 0,030	502,7 ± 133,2
			B	0,090 ± 0,020	644,1 ± 256,6
			C	0,040 ± 0,020	308,7 ± 17,5
P/V 2015	4,3 ± 0,5	HFHSS-Phr	A	0,019 ± 0,001	1280,9 ± 6,0
			B	0,030 ± 0,008	1041,2 ± 39,0
			C	0,025 ± 0,008	743,1 ± 194,0
		HFHSS-Sch	A	0,013 ± 0,002	407,9 ± 195,0
			B	0,021 ± 0,009	630,3 ± 136,0
			C	0,014 ± 0,002	445,2 ± 150,0
O/I 2015	6,3 ± 2,2	HFHSS-Phr	A	0,289 ± 0,073	16495,8 ± 4153,3
			B	0,398 ± 0,044	15838,0 ± 1759,0
			C	0,448 ± 0,175	17073,0 ± 6663,0
		HFHSS-Sch	A	1,176 ± 0,117	54518,9 ± 5416,6
			B	0,502 ± 0,043	24921,1 ± 2115,1
			C	0,323 ± 0,145	11486,3 ± 5159,2

O/I: temporada otoño/invierno; P/V: temporada primavera/verano; VCO: velocidad de carga orgánica (promedio diario) aplicada a los HFHSS en la temporada en que se muestreó la biomasa; AME: actividad metanogénica específica; las emisiones se estimaron en condiciones óptimas con respecto a los valores de AME.

Como se mencionó, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las AME de los HFHSS utilizando *P. australis* o *S. californicus*. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temporadas en que se extrajeron las muestras de biomasa. En ambas celdas, HFHSS-Phr y HFHSS-Sch los valores de AME obtenidos en la temporada P/V del 2015, fueron menores a la obtenida en O/I del 2015 en un 93 y 97 %, respectivamente. Los valores AME obtenidos en P/V del 2015 mostraron ser un 70 y 76 % menores que los obtenidos en O/I del 2013 en

HFHSS-Phr y HFHSS-Sch, respectivamente. Mientras que entre P/V del 2015 y O/I del 2013 no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). De la misma manera, los valores AME de O/I del 2013 mostraron ser un 78 - 90 % menores que aquellos de O/I del 2015.

3.4.2. Análisis de la degradación de ácidos grasos volátiles (AGV) en los ensayos de AME

La Figura 21 muestra las cinéticas de degradación de acetato, propionato y butirato en los ensayos de AME de las muestras de biomasa obtenidas en las temporadas de O/I del 2013 de estudio y P/V del 2015.

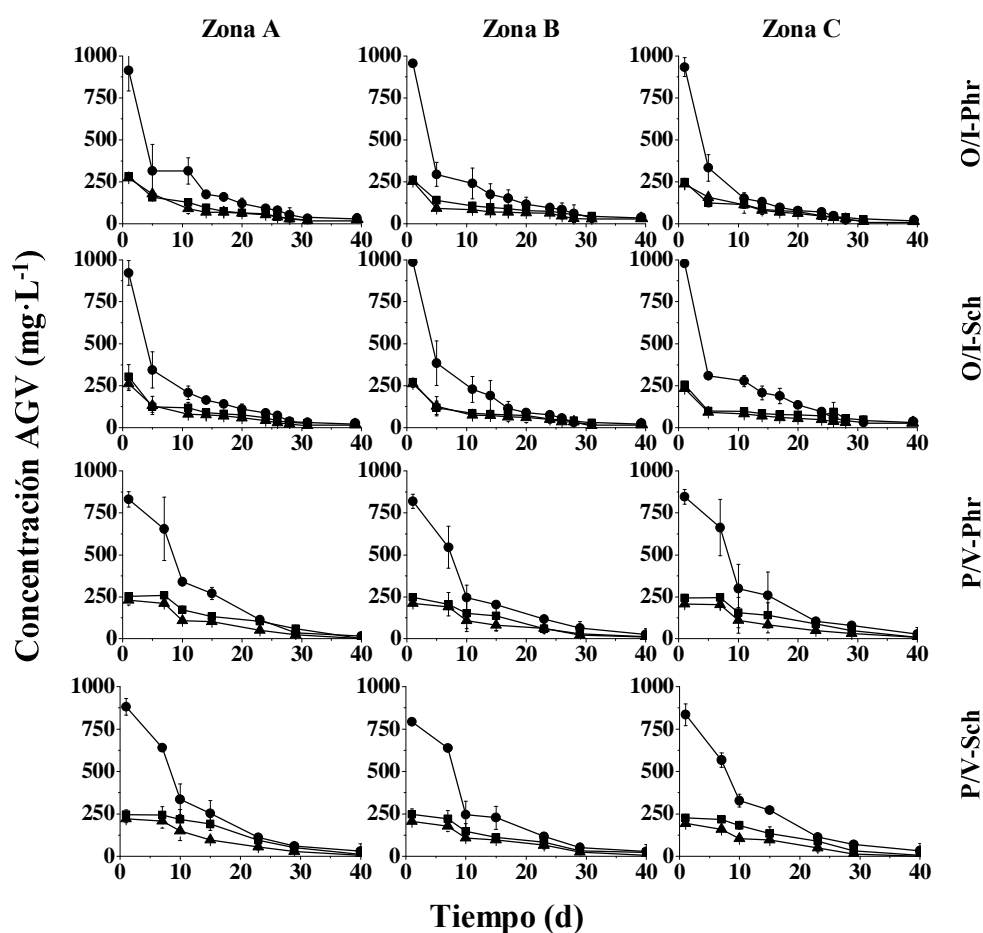


Figura 21. Curvas de degradación de ácidos grasos volátiles (AGV) en los ensayos AME de cada zona de los HFHSS. O/I: temporada otoño invierno; P/V: temporada

primavera verano. Phr: *P. australis*; Sch: *S. californicus*. acetato (●); propionato (▲); butirato (■)

a) *Temporada de O/I del 2013*: Como se muestra en la Figura 21, los AGV fueron degradados a los 40 días de ensayo. El acetato fue el AGV que presentó la mayor velocidad inicial de degradación, disminuyendo su concentración en un 65 % (promedio) los primeros 5 días de ensayo. Como se muestra en la Figura 21, la Zona C de HFHSS-Phr exhibió la mayor velocidad de degradación de acetato, disminuyendo sus concentraciones 86 % en los primeros 10 días de ensayo. Por su parte, en la Zona B y A de HFHSS-Phr, la degradación fue más lenta, con disminuciones en la concentración de acetato del 72 y 65 % luego de 10 días de ensayo. En cuanto a HFHSS-Sch, en los primeros 10 días de ensayo se observó una disminución del 79 % de la concentración de acetato en la Zona A un 81 % en la Zona B y un 75 % en la Zona C.

b) *Temporada P/V del 2013*: Como se muestra en la Figura 21, los AGV se degradaron a los 40 días de ensayo. En general, las velocidades de degradación de AGV se observaron menores que en O/I del 2013. En los primeros 10 días de ensayo la biomasa obtenida de las Zonas A, B y C de HFHSS-Phr se degradaron en un 57, 71 y 65 %. En cuanto a la biomasa obtenida de las zonas A, B y C de HFHSS-Sch presentaron disminuciones en las concentraciones de acetato del 65, 71 y 64 % luego de 10 días de ensayo.

3.5. Determinación de las estructuras microbianas presentes en los HFHSS

3.5.1. Cuantificación de microorganismos mediante la técnica PCR en tiempo real (q-PCR)

En la Tabla 14 se muestran las cuantificaciones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas presentes en la biomasa extraída en los HFHSS. El gen ARNr 16S se cuantificó en los rangos de $2,6 \cdot 10^7 - 5,6 \cdot 10^7$ y $7,5 \cdot 10^3 - 2,2 \cdot 10^5$ copias·mg⁻¹ SSV para bacterias y arqueas, respectivamente. Más aún, extrapolando las cantidades de SSV acumulados en forma de biopelícula, por kilogramo de grava, corresponde a rangos del $8,7 \cdot 10^8 - 4,2 \cdot 10^{10}$ copias·kg⁻¹ grava y $4,8 \cdot 10^6 - 3,6 \cdot 10^8$ copias·kg⁻¹ grava de bacterias y arqueas, respectivamente.

Tabla 14. Cuantificación del gen ARNr 16S de la biomasa extraída de los HFHSS

Temporada	Zona	Número de copias (Nº de copias·mg ⁻¹ SSV)			
		HFHSS-Phr		HFHSS-Sch	
		Bacteria	Arquea	Bacteria	Arquea
O/I 2013	A	3,75E+06	8,25E+03	8,37E+05	N.D.
	B	2,66E+06	7,50E+03	9,83E+06	5,52E+04
	C	1,03E+07	5,56E+04	6,74E+06	2,85E+04
P/V 2015	A	5,94E+06	3,56E+04	2,59E+07	2,22E+05
	B	6,67E+06	1,00E+05	5,56E+05	8,50E+03
	C	1,83E+06	2,84E+04	1,33E+06	1,73E+04

O/I 2013: temporada otoño/invierno del 2013; P/V 2015: temporada primavera verano del 2015.

En la temporada de O/I del 2013, el número de copias del gen ARNr 16S de arqueas obtenidas en HFHSS-Phr fue un 82 % mayor que el obtenido en HFHSS-Sch. Mientras que el número de bacterias tuvo una diferencia del 3 %. Por otro lado, en la temporada P/V del 2015, se cuantificaron un 48 y 34 % más bacterias y arqueas en HFHSS-Sch que en HFHSS-Phr.

Desde la temporada O/I del 2013 hasta P/V del 2015, el número de bacterias y arqueas en HFHSS-Phr aumentó en un 14 y 56 %, respectivamente. En cuanto a HFHSS-Sch, en el mismo período, el número de bacterias y arqueas aumentó de un 37 a un 94 %, respectivamente.

La muestra obtenida desde la Zona A de HFHSS-Sch en O/I del 2013 no presentó concentraciones detectables del gen ARNr 16S de arqueas.

3.5.2. Análisis de las estructuras de las comunidades microbianas por la técnica PCR-DGGE

En la Figura 22 se muestran las imágenes de los resultados del análisis por PCR-DGGE. Con la finalidad de secuenciar las secuencias presentes en el gel, se le asignaron a las bandas números del 1 al 24. Se encontró presencia tanto de bacterias como arqueas en los HFHSS. Los duplicados del PCR-DGGE muestran ser idénticos (Figura 22), por

lo que se acepta que las especies encontradas corresponden a las provenientes de los HFHSS.

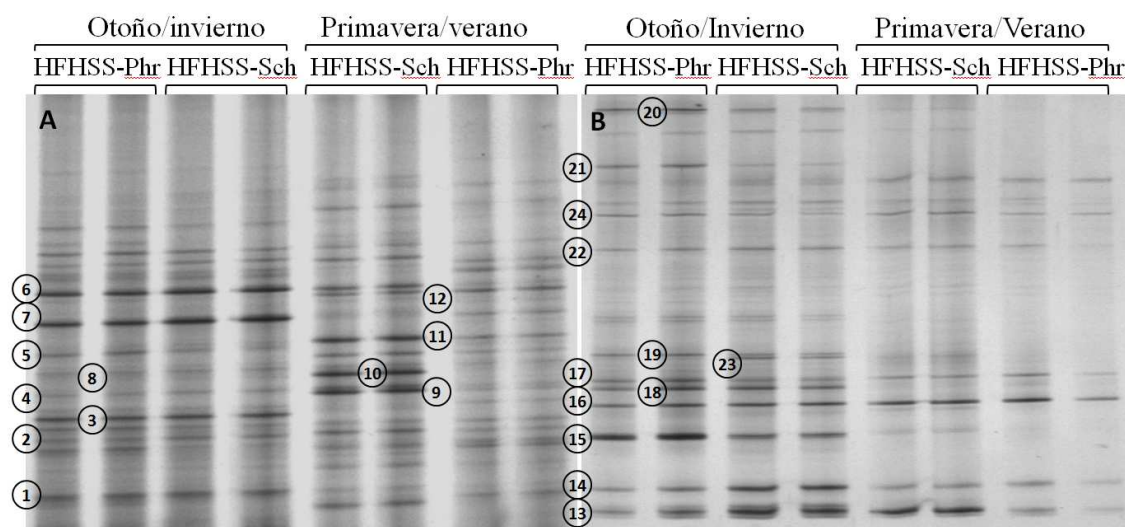


Figura 22. Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE). Los números indican las bandas extraídas para secuenciación. A) bacterias; B) arqueas

En la Figura 23 se muestran los dendrogramas de similitud construidos con el método UPGMA. En la Figura 23A se presenta el dendrograma construido a partir de los patrones de bandas de bacterias. Se puede observar que la menor similitud (51 %) se encuentra entre las comunidades de las distintas temporadas (O/I del 2013 y P/V del 2015). Por otro lado, las muestras de O/I del 2013 exhiben similitudes entre las comunidades de HFHSS-Phr y HFHSS-Sch (94 %) mayor que la similitud presentada en P/V del 2015 (63%).

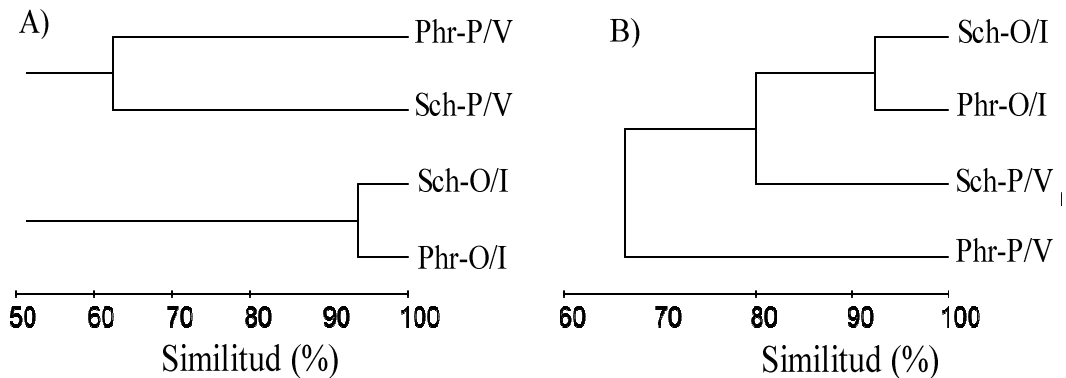


Figura 23. Dendrogramas de similitud entre las comunidades microbianas de los HFHSS plantados con *P. australis* (Phr) y *S. californicus* (Sch), en las temporadas de otoño/invierno (O/I) y primavera/verano (P/V). A) bacterias; B) arqueas.

En la Figura 23B se presenta el dendrograma construido a partir de los patrones de bandas de arqueas. Se muestra que las comunidades de HFHSS-Phr y HFHSS-Sch en la temporada O/I del 2013 de estudio fueron las más similares (93 %). Luego la comunidad de arqueas proveniente del HFHSS-Sch en P/V del 2015 se asemeja más al cluster de O/I del 2013 con un 80 % de similitud. Finalmente, la comunidad de arqueas más distante fue la de HFHSS-Phr en P/V del 2015, con un 66 % de similitud al resto de las muestras.

3.5.3. Identificación de los microorganismos presentes en los HFHSS mediante pirosecuenciación

En la Tabla 15 se muestran las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank más similares a las secuencias encontradas en cada banda extraída del DGGE, indicadas con números del 1 al 24 en la Figura 22. Las secuencias pertenecieron, en su mayoría, a microorganismos no cultivables.

a) *Bacterias*: Las secuencias encontradas pertenecieron, principalmente a los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Los géneros y subgrupos predominantes fueron *Clostridium*, *Bacteroidales*, β -proteobacteria y γ -proteobacteria, respectivamente. Específicamente, las bandas 1, 4, 6, 7 y 8 (Figura 22) se encontraron en todas las

muestras analizadas. Las bandas 1, 4, 6 y 8 se asociaron a un clon cuya especie cultivable más cercana perteneció al género *Clostridium*. La banda 7 correspondió a un clon no cultivable perteneciente a la familia *Nitrosomonadaceae* una β -proteobacteria nitrificante aerobia estricta. Las bandas 2, 3 y 5 se encontraron sólo en O/I del 2013 tanto en HFHSS-Phr y HFHSS-Sch, las cuales pertenecieron a especies de los géneros *Bacteroidales* y *Clostridium* asociadas a clones no cultivables detectados en sistemas anaerobios de tratamiento de residuos. Las bandas 9, 10, 11 y 12 se encontraron sólo en la temporada P/V del 2015, tanto en HFHSS-Phr como en HFHSS-Sch, exceptuando la banda 10, que sólo apareció en HFHSS-Sch. La banda 9 se asoció a una β -proteobacteria desnitrificante encontrada en un reactor de reducción de nitratos, sulfatos y p-cloronitrobenzeno. Las bandas 10, 11 y 12 pertenecieron al grupo Bacteroides y los subgrupos β -proteobacteria, γ -proteobacteria y.

b) Arqueas: El 91 % de las bandas perteneció a los géneros *Methanosarcina* (16 % del total de bandas) y *Methanosaeta* (75 % del total de bandas). Las bandas 13, 14, 16, 17, 22 y 24 aparecieron en todas las muestras analizadas. De estas, la 14, 16, 22 y 24 se asociaron a especies no cultivables, cuya especie más cercana fue *Methanosaeta concilii*, obteniéndose altos niveles de identidad con la secuencia de dicha especie (> 94 %). La banda 13 se asoció a un clon no cultivable proveniente de un digestor anaerobio, cuya especie cultivable más cercana fue *Methanosarcina mazei*. La especie cultivable asociada a la banda 17 resultó ser un organismo metanogénico perteneciente al orden de los Thermoplasmatales (*M. intestinalis*) encontrada, recientemente, en humedales y microbiotas de rumiantes y humanos. Las bandas 18, 19 y 21 sólo aparecieron en la temporada O/I del 2013 de estudio. Las bandas 18 y 19 se asociaron al género *Methanosaeta concilii*, mientras que la 21 a *Methanosarcina mazei*.

Tabla 15. Secuencias de bandas extraídas del DGGE asociadas a base de datos GenBank

Muestra	Secuencia asociada	Id (%)	Origen de secuencia	Análogo cultivable	Nº Acceso
Bacteria					
1	<i>Clon bacteriano N.C.</i>	97	Lodos de aguas servidas	<i>Clostridium sp.</i>	KF765651
2	<i>Clon bacteriano N.C. GDIC2IK01D8TXV</i>	97	Cultivo metanogénico de residuos vegetales	<i>Bacteroidales bacterium</i>	JF600605
3	<i>Clon bacteriano N.C. NI_3_1934</i>	96	Digestor anaerobio	<i>Antarcticimonas flava</i>	JQ121396
4	<i>Clon bacteriano N.C. RDX-5CFa3</i>	100	acuifero	<i>Clostridium sp.</i>	JX470466
5	<i>Clon bacteriano N.C. A46</i>	100	Lodos activados	<i>Clostridium sp.</i>	KP238600
6	<i>Clon bacteriano N.C. KS-150</i>	98	suelo proglacial	<i>Clostridium sp.</i>	EU809898
7	<i>bacteria Nitrosomonadaceae N.C.</i>	91	Agua de río	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i>	AF540017
8	<i>Clostridium sp.</i>	99	consorcio declorador	<i>Clostridium sp.</i>	AB596885
9	<i>bacteria desnitrificante N.C. BC84</i>	91	reactor de biofilm	<i>Alcaligenes sp.</i>	JN125790
10	<i>Clon bacteriano N.C. TIS106D04</i>	92	Agua fresca de lago	<i>β-proteobacteria Iso10-11</i>	KC624081
11	<i>clon de γ-proteobacteria N.C. HPC1173</i>	91	Sedimento marino	<i>γ-Proteobacteria HPC1173</i>	EF503561
12	<i>Clon bacteriano N.C. GDIC2IK01DPDLA</i>	99	Consorcio metanogénico de residuos vegetales	<i>Bacteroides sp.</i>	JF674519
Arquea					
13	<i>Arquea N.C. UAFB</i>	96	Digestor anaerobio	<i>Methanosarcina Mazei</i>	KJ476545
14	<i>Arquea N.C. B102P50</i>	100	Suelo saturado	<i>Methanosaeta concilii</i>	KP327890
15	<i>Methanosarcinales N.C.</i>	100	acuifero	<i>Methanosaeta concilii</i>	LN796162
16	<i>Methanosaeta sp. N.C.</i>	100	Lodo granular UASB	<i>Methanosaeta concilii</i>	KP343675
17	<i>Arquea N.C.</i>	80	Reactor anaerobio agrícola	<i>Candidatus Methanomassiliicoccus</i>	KT252415

					<i>intestinalis</i>
18	<i>Arquea N.C.</i>	96	Suelo saturado de arrozal	<i>Methanosaeta concilii</i>	AB650608
19	<i>Arquea N.C.B102P50</i>	100	Suelo saturado	<i>Methanosaeta concilii</i>	KP327890
20	<i>Arquea N.C.SGA35G</i>	99	Digestor anaerobio	<i>Methanotherix soehngeni</i>	GU389089
21	<i>Arquea N.C. E126P700</i>	100	Suelo saturado	<i>Methanosarcina mazei</i>	KP328045
22	<i>Arquea N.C.AR_44</i>	100	Suelo saturado de arrozal	<i>Methanosaeta concilii</i>	KP327890
23	<i>clon euryarchaeota N.C.</i> <i>S2C05344af</i>	100	Agua fresca	<i>Methanosaeta concilii</i>	KJ566501
24	<i>Arquea N.C. REG3547</i>	100	Suelo de humedal	<i>Methanosaeta concilii</i>	KJ645022

N.C.: no cultivable; Id: identidad;

4. DISCUSION

4.1. Monitoreo de parámetros *in situ*

Como se observa en la Tabla 10, los parámetros determinados *In situ* mostraron desviaciones < 30 % indicando estabilidad en el sistema en cuanto a pH, temperatura y POR. No así con el OD, cuyos valores se consideran cualitativos, debido a las altas desviaciones estándar con respecto a la media (65 – 130 %) (García *et al.*, 2004b).

El comportamiento del pH fue similar en los HFHSS con ambas especies de macrófitas. Los valores de pH presentaron mayor variabilidad (valores de 6,2 a 8,0) en O/I del 2013, que los valores posteriores (6,5 – 7,2). En general, las aguas servidas tienden a mostrar pH alcalino (~8) (von Sperling, 2007). Sin embargo la estabilidad del comportamiento del pH en los HFHSS (6,8 promedio) a lo largo del tiempo y la longitud coincidió con lo encontrado en literatura ($7,4 \pm 0,2$) (García *et al.*, 2004b). Los valores de pH obtenidos permiten el óptimo desarrollo de consorcios microbiológicos metanogénicos, sulfato-reductores y desnitrificantes, los cuales participan activamente en la eliminación de contaminantes en los HFHSS (Vymazal *et al.*, 1998).

La temperatura presentó variaciones espaciales menores al 3 % entre cada zona de los HFHSS. En cuanto a las variaciones con respecto al tiempo de monitoreo se observó un claro efecto de la estacionalidad. Las temperaturas presentaron ser 31 % mayores en P/V que O/I. En la temporada O/I del 2015 se observaron temperaturas 21 % superiores a O/I del 2013 y 2014. Debido a que en los primeros dos años la temperatura atmosférica de O/I fue 3 °C inferior al año 2015 (según los datos meteorológicos de la estación DGA concepción, Dirección General de Aguas, DGA Biobío, Chile). Por otro lado, en P/V, se observaron mayores temperaturas en HFHSS-Phr2 que los otros HFHSS. Esto se debe a la baja cobertura de las macrófitas en HFHSS-Phr2, careciendo del aislamiento térmico que poseen los demás HFHSS (Vymazal, 2011). Las temperaturas afectan directamente a las actividades biológicas de los distintos consorcios microbianos (Metanogénicos, nitrificantes/desnitrificantes, sulfato-reductores, etc.) (Vymazal *et al.*, 1998). Sin embargo las variaciones de temperatura observadas a lo largo de las temporadas, no generaron diferencias significativas en las

eficiencias de eliminación de materia orgánica (Figuras 13 y 14). No así, en cuanto al nitrógeno (NT y $N-NH_4^+$), que sí se observa una tendencia, estadísticamente no significativa ($p > 0,05$), al aumento (41 %) de las eficiencias de eliminación en las temporadas de P/V. Sin embargo, el aumento en las eficiencias pueden atribuirse al período de crecimiento de las macrófitas, donde la concentración de nitrógeno en el tejido vegetal puede aumentar un 50 % (Vymazal, 2007).

El POR presentó valores que se pueden considerar altamente reductores (-357,9 a -149,9 mV) a lo largo de los HFHSS y del tiempo de monitoreo (Faulwetter *et al.*, 2009). El POR no presentó variaciones superiores a los 37,9 mV entre los promedios de cada zona, contrario a lo encontrado por otros autores (García *et al.*, 2003). Esto se atribuye al tamaño de los sistemas reportados (97 % mayor superficie al del presente estudio). Por lo que en los HFHSS de la estación piloto Hualqui no se alcanza a generar el gradiente documentado por García *et al.* (2003). El POR es un parámetro que sirve de indicador de la prevalencia de distintos aceptores de electrones en el medio, y por consiguiente, de las reacciones bioquímicas predominantes en el HFHSS. De esta manera, el rango entre encontrado en este estudio (-150 a -360 mV) indica el desarrollo de consorcios sulfato-reductores (rango óptimo -100 a -200 mV) y metanogénicos (rango óptimo: -200 a -300 mV) (Faulwetter *et al.*, 2009). En consecuencia, ambos consorcios podrían, eventualmente, competir por el sustrato, debido a que los rangos de POR les permite el desarrollo. Sin embargo, existen otros parámetros que condicionan la importancia relativa de estos consorcios, donde por ejemplo, Baptista *et al.* (2003) encontró sulfato-reducción a POR de -200 mV, sin embargo aportaba sólo el 11 – 12 % de la eliminación de MOD.

Los valores de OD presentaron altas desviaciones, por lo que se considera, de forma cualitativa la acentuada anaerobiosis del sistema ($< 2 \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}$) (García *et al.*, 2004b). Como se observa en la Figura 12, el sistema fue disminuyendo los niveles de OD a lo largo del tiempo de estudio, desde los $0,8 \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta los $0,1 \text{ mg OD}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2. Caracterización fisicoquímica del influente

Las concentraciones de DBO_5 en el influente de 2013 mostraron estar de acuerdo a lo encontrado por otros autores en aguas servidas con pretratamiento, en zonas urbanas ($115 - 162 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Zurita *et al.*, 2009; Pedescoll *et al.*, 2011). Por otro lado, en P/V del 2014 y 2015 los niveles de DBO_5 mostraron ser similares a las encontradas en literatura para asentamientos rurales en latinoamérica ($230 - 470 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Vera, 2012). Los valores de DQO mostraron rangos ($174,4 - 298 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) similares a los encontrados por Zurita *et al.* (2009) ($247 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Las concentraciones de materia orgánica del influente lo clasifican dentro de las aguas servidas concentradas en cuanto a DBO_5 ($> 140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y moderadas con respecto a DQO ($210 - 300 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$) (Henze *et al.*, 2002). Las concentraciones de DBO_5 fueron un 35 % mayores en O/I que en P/V a lo largo de todo el tiempo de monitoreo. Esto se puede atribuir, por un lado, al aumento del consumo de agua (piscinas, riego y otras actividades de verano) aumentando la dilución de contaminantes (Metcalf y Eddie, 2003). Esto se refleja además, en los menores índices de biodegradabilidad encontrados en P/V (0,53) con respecto a O/I (0,74). No obstante, ambos índices demuestran que el efluente es suficientemente biodegradable como para ser tratados mediante sistemas biológicos (Metcalf y Eddie, 2003; Henze *et al.*, 2008). Las concentraciones correspondieron a cargas de $4,4 \pm 0,01$ y $5,8 \pm 0,5 \text{ g DBO}_5\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ en las temporadas de P/V y O/I, respectivamente. Las cargas orgánicas aplicadas se encuentran en el límite recomendado ($5,9 \text{ g DBO}_5\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) para HFHSS con tratamiento primario de 0,5 m de profundidad (García *et al.*, 2004).

Los SST mostraron concentraciones entre 131,9 a $412,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que concuerda a lo encontrado por Pedescoll *et al.* (2011) ($161 - 223 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en aguas servidas sin tratamiento primario (47 % más concentradas que aguas servidas con previa sedimentación). Otros autores evidenciaron concentraciones de SST en aguas servidas con tratamiento primario en el rango de $57 - 101 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zurita *et al.*, 2009; Pedescoll *et al.*, 2011; Vera, 2012). Se observó un aumento en la concentración tanto de SST como SSV de hasta el 300 % desde el 2013 al 2015. También, en O/I, se observaron concentraciones 40 % mayores que en P/V, tanto de SST como SSV. Esto se puede atribuir al mayor arrastre de sólidos por escorrentía debido a las precipitaciones en esta

temporada (Mara, 2004). La relación de biodegradabilidad de material particulado (SSV/SST: 0,64 – 0,92) determinada en el influente, se caracteriza como moderada según Henze *et al.*, (2002). A su vez, la relación SSV/SST indica que los sólidos en suspensión en las aguas servidas tienen en promedio un 76 % de componente volátil, lo que permite su degradación bajo condiciones anaerobias (Henze *et al.*, 2002; 2008).

Las concentraciones de NT y N-NH₄⁺ (93 – 127 y 62 – 98,7 mg·L⁻¹, respectivamente) exhibieron niveles similares a los documentados para asentamientos rurales (35 – 100 y 60 – 66 mg·L⁻¹, respectivamente) (Vera, 2012). Las concentraciones de nitrógeno en zonas rurales suele presentarse un 20 % mayor a zonas urbanas (Zurita *et al.*, 2009; Pedescoll *et al.*, 2011; Vera, 2012). Esto ocurre por las actividades desarrolladas por la población (industria ganadera y porcina) en las que se agregan mayores concentraciones (hasta 610 mgNT·L⁻¹) de NT y N-NH₄⁺ a las aguas servidas debido al alto contenido proteico (Chartier *et al.*, 2013). Las concentraciones de PT en el influente presentó rangos similares (13 – 16 mg·L⁻¹) a los encontrados en zonas rurales de Latinoamérica (11 – 13 mg·L⁻¹) (Vera, 2012). Los valores son entre un 0 y 90 % mayores al de zonas urbanas (Vera, 2012; Zurita *et al.*, 2009).

4.3. Determinación de las eficiencias de eliminación de contaminantes

Las eficiencias de eliminación de DBO₅ mostraron ser menores (50 - 75 %) a las presentadas comúnmente en literatura (60 – 97 %) (García *et al.*, 2005; Vymazal y Kröpfelová, 2009). Estas eficiencias no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las temporadas. Lo anterior indica que la variación del 31 % de temperatura entre las temporadas O/I y P/V, no ejerció un efecto en las actividades microbianas tal, que se haya reflejado en un cambio significativo en las eficiencias de eliminación de MO (Vymazal *et al.*, 1998). Sin embargo, esto concuerda con la ausencia de estudios que hayan reportado una relación entre mayores temperaturas con aumento de eficiencias de eliminación de MO en sistemas escala piloto (Kadlec y Wallace, 2009). Por otro lado, HFHSS-Phr2 mostró eficiencias 8 % menores que las de HFHSS-Sch2. No obstante, estas diferencias no se presentaron en HFHSS-Phr1 ni HFHSS-Sch1, por lo que se pueden atribuir a fenómenos hidráulicos y de actividad microbiana, los cuales están

gobernados por procesos estocásticos dentro de los HFHSS (Baptista *et al.*, 2008). Las concentraciones de DBO₅ en el efluente (10 – 111 mg·L⁻¹) presentaron un rango más amplio al reportado en literatura (27 – 60 mg·L⁻¹) (García *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2011; López *et al.*, 2015). Lo anterior se atribuye a que los HFHSS no alcanzaron eficiencias del 90 % de eliminación de MO, que presentan otros autores (García *et al.*, 2004b).

Las eficiencias de eliminación de DQO (65 % promedio) mostraron ser más bajas que las encontradas en literatura (Tabla 3) (70 – 97 %) (García *et al.*, 2005; Vymazal y Kröpfelová *et al.*, 2009). Sin embargo, como se observa en la Tabla 4, las eficiencias de eliminación de DQO suelen variar según diseño y carga orgánica aplicada (García *et al.*, 2004b). Las eficiencias de eliminación encontradas en este trabajo coinciden con aquellas de HFHSS más profundos (0,5 m) y de mayores cargas orgánicas aplicadas (6 – 20 g DQO m⁻²d⁻¹), mostradas en la Tabla 4 (21 – 73 %) (Vymazal y Kröpfelová, 2009). Por lo tanto, las menores eficiencias de eliminación se podrían atribuir a la profundidad y por ende, acentuada anaerobiosis de los HFHSS (García *et al.*, 2004b). Puesto que las cargas orgánicas aplicadas estuvieron dentro del rango recomendado (< 6 g DQO·m⁻²d⁻¹) (García *et al.*, 2004b).

Las eficiencias de eliminación de SST y SSV encontradas (93 %) están acorde a lo encontrado en bibliografía (68,1 – 99,0 %) (Vera *et al.*, 2011; Caselles-Osorio *et al.*, 2007). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), tanto en las eficiencias de eliminación como en las concentraciones de SST y SSV en los efluentes de los distintos HFHSS. Estas diferencias se presentaron, principalmente, entre las celdas de *P. australis*, donde en la temporada de P/V del 2015 las eficiencias de eliminación de SST y SSV disminuyeron en un 17 y 75 %, respectivamente. En esta temporada la planta piloto se detuvo por dificultades en el bombeo. Al volver a poner en marcha el sistema, pudo haber ocurrido re-suspensión de los sólidos concentrados en los lechos y las tuberías. La celda HFHSS-Phr2 puede haber presentado diferencias debido a que no posee la misma capacidad filtrante de los otros HFHSS. Esta capacidad filtrante es otorgada por la amplia cobertura de las macrófitas (85 %) en los HFHSS, característica que no posee HFHSS-Phr2 (Figura 7A), puesto que posee < 50 % de cobertura (López, 2015).

Como se muestra en la Figura 17, las eficiencias de eliminación de N-NH_4^+ se observaron menores (41 %) en O/I. Específicamente, O/I del 2014 presenta eficiencias entre un 28 y 64 % menores a las de O/I del 2013 y 2015. Esto puede ocurrir debido a que en O/I del 2013 las concentraciones de OD fueron 89 % mayores (Figura 12). Por otro lado, en O/I del 2015 las concentraciones de OD fueron similares a las del año 2014, pero las temperaturas en O/I del 2015 fueron 20 % mayores a las de O/I del 2014 (Figura 10). Debido a estos factores (menor temperatura y OD), la actividad nitrificante en O/I del 2014 podría estar inhibida (Vymazal 2007). La celda HFHSS-Phr2 presentó en promedio, eficiencias 38 % menores en relación a los demás HFHSS. Esto se atribuye a la baja cobertura de las macrófitas (< 50 %) en HFHSS-Phr2, lo cual puede afectar de dos maneras: a) hubo menor asimilación directa de nutrientes (Plaza de los Reyes *et al.*, 2011); b) o bien, por la menor concentración de OD a causa de la falta de transporte gaseoso mediado por las plantas, lo que eventualmente, limitaría el proceso aerobio de nitrificación (Vymazal 2007). Las eficiencias de eliminación de NT mostraron el mismo comportamiento, lo que nos indica que los mecanismos de eliminación de NT pueden haber sido los siguientes: asimilación por las plantas, que puede eliminar hasta 22,5 a 12,5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{año}^{-1}$ (Vymazal, 2011b); o por el proceso de nitrificación/desnitrificación el cual está condicionado por el OD, POR, concentración de NH_4^+ y la MOD (García *et al.*, 2010). Sin embargo la nitrificación/desnitrificación ocurre en rangos de POR > +100 mV, por lo que los valores encontrados (-149,9 a -357,9 mV) no favorecen a las actividades nitrificantes/desnitrificantes ya mencionadas (Faulwetter *et al.*, 2009). No obstante, los análisis moleculares exhibieron especies relacionadas a nitrificación/desnitrificación (Tabla 15).

Las eliminaciones de PT encontradas (0 - 58 %) mostraron ser similares a aquellas encontradas en bibliografía (10 - 40,9 %) (Vera *et al.*, 2011; García *et al.*, 2005). Más aún, los balances demostraron que hubo generación de PT dentro de los HFHSS, presentándose valores de eficiencias negativas de hasta - 5 %. Esto se debe a que los mecanismos de eliminación de PT son, principalmente, de adsorción y precipitación, intensificados por la presencia de metales como Fe^{3+} , Al^{2+} e iones de Ca^{2+} (Pedescoll *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2014). De este modo, el medio filtrante utilizado en

este trabajo (Grava de 40 % de porosidad) es desfavorable para eliminar PT mediante estos mecanismos, debido a que su composición (0,8 % de Fe_2O_3 ; 0,4 % de Al_2O) permite la adsorción de 0,02 – 0,05 gP·kg grava (eficiencias del 20 al 40%) (Pedescoll *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2014). En contraste, las eficiencias de eliminación de PT presentadas por otros autores son del 79 %, con medios ricos en Ca^{2+} y Fe^{3+} (Vohla *et al.*, 2005). Por otro lado, el fósforo adsorbido en la grava, puede lixiviar en sistemas con rangos de POR < -250 mV (Vohla *et al.*, 2005). Bajo el mismo contexto, se observó que en P/V las eficiencias fueron 65 % mayores a las de O/I (no significativas: $p > 0,05$), lo que se puede atribuir a que en P/V se mostraron valores de POR cercanos o superiores a los -250 mV, donde eventualmente, podría haber disminuido la tasa de lixiviación de PT.

4.4. Evaluación de la producción de metano de los HFHSS

Las emisiones de metano se estimaron a partir de las AME (en condiciones ideales) de la biomasa extraída en las temporadas de O/I del 2013 y P/V del 2015. Por tanto, hay que tener en consideración que las muestras se obtuvieron en distintas etapas de maduración del sistema (Kadlec y Wallace, 2009). Aún así, se considera que los HFHSS ya se estabilizaron luego de los 755 (1,5 años) (muestreo de O/I del 2013) y 1617 días (4 años) (muestreo de P/V del 2015) desde la puesta en marcha, al momento del muestreo. Esto bajo la consideración de que los HFHSS se estabilizan entre 75 y 90 días luego de la puesta en marcha, tomando en cuenta la aclimatación de los microorganismos y la hidráulica de los HFHSS (Weber y Legge, 2011; Ramond *et al.*, 2012). Más aún, Samsó y García (2013), mediante modelación matemática, estimaron 400 - 700 días para que la hidráulica y los distintos grupos funcionales de microorganismos se estabilicen.

Considerando que una persona genera 60 g DBO_5 al día (1 PE) (Metcalf y Eddie, 2005), las emisiones de metano generadas por los sistemas convencionales presentados en la Tabla 5, se estiman en el rango 0,25 - 45 g CH_4 ·persona⁻¹·año⁻¹. Las mayores emisiones encontradas en los sistemas convencionales fue en aquellas PTAS basadas en digestores anaerobios de materia orgánica (Wang *et al.*, 2011). Considerando que para tratar 60 g DBO_5 (1 PE) mediante un HFHSS se requiere un área superficial de 5 m²

(Bécares, 2004), las emisiones estimadas en este estudio generadas por una persona al año, están en el rango 2,7 – 4,2 kg CH₄·persona⁻¹·año⁻¹. Por ende, las emisiones estimadas superan hasta por 4 órdenes de magnitud a las de los sistemas convencionales. No obstante, las emisiones de este estudio se estimaron a partir de ensayos de AME, los cuales se llevaron a cabo en condiciones óptimas de temperatura, anaerobiosis, nutrientes y sustratos (Soto *et al.*, 1993). Por lo cual, estos valores se encuentran sobre estimados a lo que se encontraría *in situ* (Mander *et al.*, 2014).

En O/I del 2013 las producciones de metano mostraron estar en el rango de 200 – 484 mg CH₄·m⁻²·d⁻¹, obtenido de sistemas de HFHSS operando climas fríos, templados y boreales con cargas orgánicas de 0,5 a 20 g DBO₅·m⁻²·d⁻¹ (Picek *et al.*, 2007; Corbella y Pigagut, 2015; López *et al.*, 2015) (Tabla 6). En la temporada P/V de 2015 la biomasa proveniente de HFHSS-Sch presentó emisiones similares a las encontradas por los autores mencionados (Picek *et al.*, 2007; Corbella y Pigagut, 2015; López *et al.*, 2015). Por otro lado, la biomasa obtenida de HFHSS-Phr en P/V del 2015, presentó emisiones acorde al rango 1142,2 y 2208,0 mg CH₄·m⁻²·d⁻¹ presentado por Wang *et al.* (2013) en un HFHSS de policultivo con cargas orgánicas de 5,8 a 20,3 g DBO₅·m⁻²·d⁻¹. En la temporada de O/I del 2015 se estimaron emisiones (70165 mg CH₄·m⁻²·d⁻¹) desde 3 a 5 órdenes de magnitud mayores a todas aquellas encontradas en literatura (0,8 – 92 mg CH₄·m⁻²·d⁻¹) (Tabla 6). No obstante, hay que tener en cuenta que estas emisiones se consideran en condiciones óptimas de temperatura y sustrato, al contrario de las emisiones (*in situ*), que presentan los autores de la Tabla 6.

No se observaron diferencias significativas entre las producciones de metano de cada zona, no obstante, se presentó la tendencia de haber producciones desde un 61 y 92 % mayores en las Zonas C y B que en la Zona A (Figura 20; Tabla 13). Estas diferencias, se atribuyen a las diferencias de disponibilidad de sustrato y por consiguiente, actividad microbiana a lo largo de los HFHSS. Esta diferencia de disponibilidad se da debido a la colmatación de los sistemas (Caselles-Osorio *et al.*, 2007; Samsó y García, 2014; López *et al.*, 2015). Esto conlleva a un mayor desarrollo de la biomasa en dicha zona, la cual resultó ser, en promedio, un 30 % mayor (en términos de SSV adheridos a la grava) que en las Zonas B y C (datos no mostrados) que en la

Zona A. Esto se contradice por lo expuesto por otros autores, donde las emisiones en HFHSS presentan ser entre un 24 y 2000 % mayores en la zona de entrada del influente (Tanner *et al.*, 1997; Teiter y Mander, 2005). Esto se responde con lo presentado por Samsó y García, (2014) donde proponen que la actividad microbiana avanza conforme al nivel de colmatación con respecto a la longitud del sistema.

Se observaron, tanto en O/I del 2013 como en P/V del 2015, mayores producciones (12 y 36 %, respectivamente) y emisiones estimadas (8 y 52 %, respectivamente) en HFHSS-Phr que en HFHSS-Sch. Lo anterior es consistente con lo demostrado por van der Nat *et al.* (1998), quienes demostraron mayores (34 %) flujos (*in situ*) de metano en una especie de *Phragmites spp.*, que en *Schoenoplectus spp.* Por el contrario, en O/I del 2015, se observan mayores producciones (43 %) y emisiones estimadas (46 %) en HFHSS-Sch que en HFHSS-Phr. Sin embargo, ninguna de las diferencias presentadas al utilizar *P. australis* o *S. californicus* es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

La temporada P/V del 2015 presentó producciones de metano significativamente ($p > 0,05$) menores (95 %) a las muestras obtenidas en O/I del 2015, y 73 % (no significativos: $p > 0,05$) menores a las producciones en O/I del 2013. Los resultados encontrados difieren a otros trabajos donde encontraron emisiones 40 - 80 % mayores en las estaciones cálidas o de crecimiento de las macrófitas en HFHSS (Picek *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013). Esto se puede atribuir a dos razones. Por un lado, se observa en la Tabla 13, que el influente de la temporada P/V aportó cargas orgánicas un 18,9 y 31,7 % menores a las del influente en O/I del 2013 y 2015, respectivamente. Estas menores cargas (medidas como DBO_5) se reflejan en el índice de biodegradabilidad en la temporada de P/V del 2015 ($DBO_5/DQO = 0,51$), en relación a la medida en O/I del mismo año ($DBO_5/DQO = 0,72$). Además, los POR medidos en O/I del 2015 (-310 mV) se mostraron en promedio, mayores a los medidos en P/V del 2015 y O/I del 2013 (-253 y -242 mV, respectivamente). Por tanto, la cantidad y disponibilidad de la materia orgánica en el influente generan menores producciones de metano, a pesar de las mayores temperaturas encontradas en P/V (Grünfeld y Brix, 1999).

En la Figura 21 se presentan las curvas de degradación de AGV por parte de la biomasa extraída en O/I del 2013 y P/V del 2015. Al igual que como se expuso anteriormente, en los primeros 10 días de análisis la biomasa extraída en O/I degradó un 14 % más acetato que aquella extraída en P/V. Esto demuestra que la temperatura (31 % mayor) presentada en P/V, no aumentó el rendimiento de degradación de AGV en los ensayos AME. Esto concuerda con lo encontrado por Huang *et al.* (2005), quienes reportaron mayores (40 %) eficiencias de eliminación de acetato en los meses de menores temperaturas en un HC. Además concuerda con el hecho de que no se ha encontrado una relación clara entre el aumento de temperatura con mayores eficiencias de eliminación de DBO₅ (donde el acetato puede llegar a representar el 20 al 40 % de la DBO₅ total dentro de los HFHSS) (Huang *et al.*, 2005; Kadlec y Wallace, 2009).

4.5. Evaluación de las comunidades microbianas presentes en los HFHSS

La Tabla 14 muestra la cuantificación de arqueas y bacterias en los HFHSS. Se cuantificó un rango de $8,7 \cdot 10^8 - 4,2 \cdot 10^{10}$ copias·kg⁻¹ grava de bacterias. Rango similar al encontrado por Baptista *et al.* (2003) y Iasur-Kruh *et al.* (2011) ($6 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$ copias·kg⁻¹grava) en HFHSS y HFS, respectivamente. En cuanto a arqueas, se encontraron $4,8 \cdot 10^6 - 3,6 \cdot 10^8$ copias·kg⁻¹ grava. Baptista *et al.*, (2003) encontró un número similar de arqueas metanogénicas ($3,0 \cdot 10^8$ copias·kg⁻¹grava) en HFHSS con altos niveles de metanogénesis (> 90 % de la DQO eliminada). Niu *et al.* (2015) presentaron abundancias relativas de arqueas metanogénicas entre el 20 y el 50 % del total de microorganismos presentes en un HFHSS con policultivo. Los HFHSS descritos por estos autores presentaron emisiones *in situ* desde 2,4 a 11,4 mg CH₄·m⁻²d⁻¹. En el caso de este estudio, la abundancia relativa de arqueas con respecto a bacterias fueron entre el 0,01 y 0,82 % con emisiones de metano estimadas en 3 a 4 órdenes de magnitud mayores. Sin embargo hay que tener en cuenta que los análisis llevados a cabo en este estudio son en condiciones óptimas de sustrato, nutrientes y temperatura (35 °C).

En O/I del 2013 la biomasa proveniente de HFHSS-Phr exhibió un 82 % mayor número de copias de arqueas que en aquella extraída de HFHSS-Sch (con un 3 % de diferencia en bacterias). Lo que concuerda con las mayores (12 %) producciones de metano en HFHSS-Phr que en HFHSS-Sch. Mientras que en P/V del 2015 la biomasa de

HFHSS-Sch presentó un 48 y 34 % más bacterias y arqueas, respectivamente que la biomasa obtenida de HFHSS-Sch. Por otro lado, entre la temporada O/I del 2013 y P/V del 2015, se observó un aumento de arqueas del 56 y 94 % en HFHSS-Phr y HFHSS-Sch, respectivamente. El aumento de bacterias en el mismo período de tiempo fue del 14 y el 37 % en HFHSS-Phr y HFHSS-Sch, respectivamente. El aumento de bacterias y arqueas encontradas desde O/I del 2013 a P/V del 2015, no concuerda con las producciones de metano 73 % mayores en O/I del 2013, si no que por lo contrario, muestra un comportamiento inverso (Tabla 13; Figura 20). En este caso, se demuestra que no sólo la cantidad de microorganismos dictará la actividad de estos. Puesto que, de las arqueas y bacterias detectadas, también se consideran aquellos organismos no viables al momento de amplificar el gen de ARNr 16S (Nocker y Camper., 2008).

La biomasa extraída desde la Zona A de HFHSS-Sch en la temporada O/I del 2013 no presentó niveles detectables de arqueas. Esto se puede deber a la baja cantidad y calidad de los templados de ADN, que en consecuencia, no permitieron la correcta amplificación del gen ARNr 16S de arqueas (Kim *et al.*, 2013).

Los dendrogramas generados para estudiar las estructuras de las comunidades bacterianas mostraron un mayor efecto de la temporada que el tipo de planta utilizada. Esto se observa en que las similitudes de las comunidades bacterianas obtenidas en las distintas temporadas presentaron un 52 % de similitud. Mientras que entre las obtenidas desde HFHSS-Phr y HFHSS-Sch presentaron un 61 y 93 % de similitud en P/V y O/I, respectivamente. Estos valores se asocian a las diferencias entre las producciones de metano entre HFHSS-Phr y HFHSS-Sch. Estas diferencias entre las distintas plantas utilizadas fueron menores en O/I del 2013 (8 %) que en P/V del 3^{ro} (36 %), cuyas comunidades se asociaron con similitudes del 93 y 61 %, respectivamente, en ambas temporadas.

Por otro lado, las comunidades de arqueas exhibieron ser más estables al cambio de temporada. No obstante, se observó un comportamiento similar al de las comunidades de bacterias. Las comunidades extraídas desde HFHSS-Phr y HFHSS-Sch en O/I mostraron ser más similares (92 %) a las extraídas en P/V. Aun más, las comunidades extraídas desde HFHSS-Sch en P/V se asociaron más a las muestras de O/I (80 %) que a

la muestra obtenida de HFHSS-Sch en P/V (67 %). Si bien las diferencias entre las producciones de metano de los HFHSS con ambas plantas utilizadas no fueron significativas ($p > 0,05$), estas coinciden con el hecho de que la similitud entre las comunidades de HFHSS-Phr y HFHSS-Sch se asemejen más en P/V que O/I.

Los microorganismos encontrados mediante la secuenciación de los genes recuperados desde el DGGE son similares a aquellos encontrados por otros autores tanto en HFHSS (Calheiros *et al.*, 2010; Adrados *et al.*, 2014; Morató *et al.*, 2014; Sidrach-Cardona *et al.*, 2015) como en catastros realizados a los microorganismos encontrados en humedales naturales (Xiao fei *et al.*, 2014). Como muestra la Tabla 15, los resultados correspondieron principalmente (> 95 % de las bandas secuenciadas) a especies no cultivables. Lo que corrobora las ventajas de utilizar metodologías moleculares independientes de cultivo, en lugar de los análisis dependientes de cultivo, para la determinación de las comunidades microbianas. Las especies de bacterias encontradas pertenecieron, principalmente, a los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. De estos, los géneros *Clostridium*, *Bacteroidales* y los sub grupos β -proteobacteria, γ -proteobacteria fueron los predominantes. Las secuencias que se encontraron en todas las muestras se asociaron, en general, a especies pertenecientes al género *Clostridium* y *Bacteroidales*. Las cuales están comúnmente ligadas a la hidrólisis de compuestos orgánicos y posterior fermentación para la síntesis de AGV (García *et al.*, 2015). Además, de las bandas presentes en todas las muestras, se encontró que la banda 6 y 8 se asociaron a un clon no cultivable cercano a especies del género *Clostridium*, con actividad lipasa a bajas temperaturas (Srinivas *et al.*, 2011) y otro clon con actividad dehalogenasa (Ise *et al.*, 2012). La banda 7 fue otra secuencia encontrada en todas las muestras, la cual se asoció a un clon nitrificante aerobio estricto, perteneciente a la familia *Nitrosomonadaceae*, una β -proteobacteria. Si bien la identidad con la que se asoció a esta secuencia es baja (91 %), puede pertenecer a un microorganismo perteneciente a la misma familia, lo que es un indicador de la posible actividad nitrificante en los HFHSS, a pesar de las condiciones anaerobias. La presencia de este tipo de microorganismos se justificaría por el transporte de oxígeno por parte de las macrófitas (Grünfeld y Brix, 1999). También hubo especies encontradas sólo en la

temporada de O/I, dentro de estas, se encontró un clon desnitrificante perteneciente a la subdivisión β -proteobacteria. La presencia de organismos desnitrificantes y nitrificantes indican la ocurrencia de mecanismos de eliminación de nitrógeno total vía nitrificación/desnitrificación, puesto que las concentraciones de N-NO_3^- no son detectables en el influente utilizado (Rojas *et al.*, 2013). Otras de las bandas se asociaron a organismos encontrados en sistemas de tratamientos de residuos orgánicos (consorcios anaerobios) y sedimentos marinos (Tabla 15).

Los resultados obtenidos en la recuperación de bandas del DGGE de arqueas mostraron que el 100 % de las especies se asociaron a clones no cultivables. Las secuencias encontradas se asociaron en gran medida a las especies *Methanosarcina mazei* y *Methanosaeta concilii*. *Methanosarcina mazei* es una arquea versátil en cuanto a sustratos, ya que logra la generación de metano por las vías acetoclástica, hidrogenotrófica y metilotrófica (Figura 4) (Kendall y Boone, 2006). *Methanosaeta concilii* es una arquea especializada en la metanogénesis acetoclástica (Barber *et al.*, 2011). Lo que concuerda a lo encontrado por Niu *et al.* (2015) con presencia de actividad metanogénica en los HFHSS. Debido a la alta prevalencia (75%) de arqueas asociadas a *Methanosaeta concilii* se puede afirmar que la producción de metano en los HFHSS en estudio fue principalmente por la vía acetoclástica.

5. CONCLUSIONES

- Las celdas de HFHSS plantados con *P. australis* eliminaron un rango de 48 – 86 % de DBO₅, 39 – 82 % de DQO, 10 – 54 % de NT y 6 – 19 % de PT. Por otro lado las celdas de HFHSS plantados con *S. californicus* eliminaron un rango de 51 – 85 % de DBO₅, 48 – 86 % de DQO, 9 – 69 % de NT y 4 – 20 % de PT.
- Las celdas de HFHSS plantados con *P. australis* produjeron 530, 1021 y 16468 mg CH₄·m⁻²d⁻¹ en las temporadas de otoño/invierno del 2013, primavera/verano y otoño/invierno del 2015, respectivamente. Las celdas de HFHSS plantados con *S. californicus* produjeron 485, 494 y 30308 mg CH₄·m⁻²d⁻¹ en las temporadas de otoño/invierno del 2013, primavera/verano y otoño/invierno del 2015, respectivamente. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los HFHSS que utilizan las dos plantas.
- Las comunidades microbianas provenientes de los HFHSS plantados con *P. australis* y *S. californicus* se asemejaron entre un 60 y 93 %. Las comunidades microbianas extraídas en otoño/invierno y primavera/verano se asemejaron entre un 50 y 66 %. Se detectaron tanto arqueas como bacterias involucradas en la producción de metano, siendo la ruta acetoclástica la más importante, con un 75 % de las arqueas encontradas, asociadas a *Methanosaeta concilii*, una arquea acetoclástica exclusiva.
- La hipótesis planteada se acepta parcialmente, puesto que si bien se observaron diferencias en las producciones de metano en los HFHSS plantados con *P. australis* y *S. californicus*, (que generaron comunidades microbianas distintas) estas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

6. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la doctora Gladys Vidal por permitirme llevar a cabo esta tesis en el grupo al cual lidera, y por su apoyo y ayuda durante esta. También a la Doctora (c) en ciencias ambientales, Daniela López, por la siempre buena disposición a ayudar y resolver cualquier duda. Al Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA) del Centro EULA, agradezco el permanente apoyo, buenos consejos y momentos brindados durante el tiempo en el grupo.

También a los fondos entregados por el Fondo de Innovación Tecnológica de la Región del Biobío (CORFO-INNOVA BIOBIO), por el financiamiento otorgado a través del proyecto código: No. 13.3327-IN.IIP: “Recuperación de agua a partir de aguas servidas rurales mediante jardines depuradores: aplicaciones innovadoras con impacto para la comunidad rural. Al Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería (CRHIAM) por las becas de apoyo a pregrado.

A la empresa sanitaria ESSBIO por facilitar el influente y las dependencias utilizadas para el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biopelículas, especialmente a las Doctoras Katherine Sossa y Nathaly Ruiz-Tagle, por facilitar las dependencias y la ayuda en cuanto a los análisis moleculares llevados a cabo en este trabajo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrados, B., Sánchez, O., Arias, C., Becares, E., Garrido, L., Mas, J., Brix, H., Morató, J., (2014). Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. *Water Res.* 55:304-312.
- Aguirre, P., (2004). Mecanismos de eliminación de la materia orgánica y de los nutrientes en humedales construidos de flujo subsuperficial, en Nuevos Criterios para el Diseño y Operación de Humedales Construidos. (García, J., Morató, J. y Bayona, J. Ed.) CPET-Centro de Publicaciones del Campus Nord, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona. 17-30 pp.
- Aguirre, P., Ojeda, E., García, J., Barragán, J., Rafael, M., (2005). Effect of water depth on the removal of organic matter in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 40:1457-1466.
- Albuquerque, A., Oliveira, J., Semitela, S., Amaral, L., (2010). Evaluation of the effectiveness of horizontal subsurface flow constructed wetlands for different media. *J. Environ. Sci.* 22(6):820–825.
- Almeida, A., Navarrate-Rivera, E., Alvarado, A., Cervantes-Ovalle, A., Luevanos, M., Oropeza, R., Balagurusamy, N., (2011). Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 3(6):14-34.
- APHA (1999) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, D.C.

- Arias, C., Brix, H., (2004). Phosphorus removal in constructed wetlands: Can suitable alternative media be identified? En, Proceedings of the 9th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, Avignon, France. Pp. 655-661.
- Baptista, J., Donnelly, T., Rayne, D., Davenport, R., (2003). Microbial mechanisms for carbon removal in subsurface-flow wetlands. *Water Sci. Technol.* 48(5):127-134.
- Baptista, J., Davenport, R., Donnelly, T., Curtis, T., (2008). The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Res.* 42:3182–3190.
- Barber, R., Zhang, L., Harnak, M., Olson, M., Kaul, R., Ingram-Smith, C., Smith, K., (2011). Complete genome sequence of *Methanosaeta concilii*, a specialist acetoclastic methanogenesis. *Am. Soc. Microbiol.* 193:3668-3669.
- Bécares, E., (2004). Función de la vegetación y procesos de diseño de humedales construidos de flujo subsuperficial horizontal y flujo superficial, en Nuevos Criterios para el Diseño y Operación de Humedales Construidos. (García, J., Morató, J. y Bayona, J. Ed.) CPET-Centro de Publicaciones del Campus Nord, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona. 51-63 pp.
- Brix, H., (1997). Do macrophytes play a role in constructed wetlands treatment? *Wat. Sci. Tech.* 35(5):11-17.
- Brix, H., Sorrell, B., Lorenzen, B., (2001). Are Phragmites-dominated wetlands a net source or net sink of greenhouse gases? *Aquat. Bot.* 69:313-324.
- Calheiros, C., Duque, A., Moura, A., Henriques, I., Correia, A., Rangle, A., Castro, P., (2009). Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. *Ecol. Eng.* 35:744–753.
- Calheiros, C., Pires, T., Franco, A., Duque, A., Crispim, L., Moura, S., Castro, P., (2010). Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with

different plants for high salinity industrial wastewater polishing. *Water Res.* 44:5032-5038.

- Caselles-osorio, A., Puigagut, J., Segu, E., García, D., García, J., (2007). Solids accumulation in six full-scale subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 41:388-1398.

- Chartier, C., López, D., Vidal, G., (2014). Anaerobic Technology Influence on Pig Slurry Biofertilization: Evaluation of Enteric Bacteria. *Water, Air, Soil Poll.* 225:1-10.

- Cirne, D., Lehtomäi, A., Björnsson, L., Blackall, L., (2006). Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *J. App. Microbiol.* 103:516-527.

- Coolen, M., Hopmans, E., Rijpstra, W., Muyzer, G., (2004). Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Organic Geochem.* 35:1151-1167.

- Cooper, P., (2009). What can we learn from old wetlands? Lessons that have been learned and some that may have been forgotten over the past 20 years. *Desalination* 246:11-26.

- Corbella, C., Puigagut, J., (2015). Effect of primary treatment and organic loading on methane emissions from horizontal flow constructed wetlands treating urban wastewater. *Ecol. Eng.* 80:79-84.

- Czepiel, P., Crill, P., Harriss, R., (1993). Methane emissions from municipal wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 27(12):2472-2477.

- Daelman, M., van Voorthuizen, E., van Dongen, U., Volcke, E., van Loodrecht, M., (2012). Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Res.* 46:3657-3670.

- DeJournett, T., Arnold, W., LaPara, T., (2007). The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. *App. Soil Ecol.* 35:648–659.
- Di Rienzo J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, I. Tableda, M., Robledo, C., (2011). Infostat Statistical software. Infostat group, FCA National University of Córdoba, Argentina 336 pp.
- Dong, X., Reddy, G., (2010). Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresource Technol.* 101:1175–1182.
- Dusek, J., Picek, T., Cízková, K., (2008). Redox potential dynamics in a horizontal subsurface flow constructed wetland for wastewater treatment: Diel, seasonal and spatial fluctuations. *Ecol. Eng.* 34:223-232.
- El-Fadel, M., Massound, A. (2001) Methane emissions from wastewater management. *Environ. Polut.* 114:117-185.
- Faulwetter, J., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M., Brisson, J., Camper, A., Stein, O., (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecol. Eng.* 35:987-1004.
- García, J., (2004a). Humedales construidos para controlar la contaminación: perspectiva sobre una tecnología en expansión, en Nuevos Criterios para el Diseño y Operación de Humedales Construidos. (García, J., Morató, J. y Bayona, J., Ed.) CPET-Centro de Publicaciones del Campus Nord, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona. 7-17 pp.
- García, J., Aguirre, P., Mujeriego, R., Huang, Y., Ortiz, L., Bayona, J., (2004b). Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Water Res.* 38:1669-1678.

- García, J., Aguirre, P., Barragan, J., Mujeriego, R., Matamoros, V., Bayona, J., (2005). Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands *Ecol. Eng.* 25:405–418.
- García, J., Capel, V., Castro, A., Ruíz, I., Soto, M., (2007). Anaerobic biodegradation tests and gas emissions from subsurface-flow constructed wetlands. *Bioresource Technol.* 98:3044-3052.
- García, J., Corzo, A., (2008). Depuración con humedales artificiales: Guía práctica de diseño, construcción y explotación de sistemas de humedales de flujo subsuperficial. Departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental de la Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona. 98 pp.
- Garcia, S., Jangid, K., Whitman, W., Das, K., (2015). Transition of microbial communities during the adaptation to anaerobic digestion of carrot waste. *Biores. Technol.* 102:7249-7256.
- García, J., Ojeda, E., Sales, E., Chico, F., Píriz, T., Aguirre, P., Mujeriego, R., (2003). Spatial variations of temperatura, redox potential and contaminants in horizontal flow reed beds. *Ecol. Eng.* 21:129-142.
- García, J., Rousseau, D., Morató, J., Lesage, S., Matamoros, V., Bayona, J., (2010). Contaminant Removal Processes in Subsurface-Flow Constructed Wetlands: A Review. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 40(7):561-661.
- Garnet, K., Megonigal, P., Litchfield, G., Taylor, G., (2005). Physiological control of leaf methane from wetland plants. *Aquat. Bot.* 81:141-155.
- Gerardi, M., (2006). Wastewater Microbiology (Gerardi, M. Ed.) John Wiley & Sons, Inc. (New Jersey). 237 pp.

- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J., Arvin, E., (2002). Wastewater treatment; Biological and Chemical Processes, in Environmental Engineering. (Henze, M. Ed.) Springer-Verlag, Heidelberg. 28pp.
- Henze, M., Van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D., (2008). Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design. (Editor Henze, M.) Springer-Verlag, Heidelberg 36 pp.
- Hernandez, E., (2010). Suelos de humedales como sumideros de carbón y fuentes de metano. *Tierra latinoamericana*. 28(2):137-147.
- Huang, Y., Ortiz, L., Aguirre, P., García, J., Mujeriego, R., Bayona, J., (2005). Effect of design parameters in horizontal flow constructed wetland on the behavior of volatile fatty acids and volatile alkylsulfides. *Chemosphere*. 59:769-777.
- Iasur-Kruh, L., Hadar, Y., Minz, D. 2011. Isolation and bioaugmentation of an estradiol-degrading bacterium and its integration into a mature biofilm. *App. Environ. Microbiol.* 77(11):3734-3740.
- Ibekwe, M., Catherine, M., Lyon, S., (2009). Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. *App. Environ. Microbiol.* 69(9):5060-5069.
- Inamori, R., Gui, P., Dass, P., Matsumura, M., Xu, K., Kondo, T., Inamori, Y., (2007). Investigating CH₄ and N₂O emissions from eco-engineering wastewater treatment processes using constructed wetland microcosms. *Process Biochem.* 42:363–373.
- International Panel on Climate Change (IPCC) (2006) IPCC 2006 Guidelines for National Greenhouse Gas Inventory (S. Eggleston, L. Buendía, K. Miwa, Ngara, T. Tanabe, K. Ed.) IGES, Japón.

- Ise, K., Suto, K., Inoue, C. 2011. Microbial diversity and changes in the distribution of dehalogenase genes during dechlorination with different concentrations of cis-DCE. *Environ. Sci. Technol.* 45:5339-5345.
- Johansson, A., Gustavsson, A., Öquist, M., Svensson, B., (2004). Methane emissions from a constructed wetland treating wastewater – seasonal and spatial distribution and dependence on edaphic factors. *Water. Res.* 38:3960 – 3970.
- Kadlec, R. Wallace, S., (2009). *Treatment Wetlands*. CRC Press Taylor & Francis Group. 12 pp.
- Kim, J., Lim, J., Lee., C., (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* 31:1358-1373.
- Kendall, M., Boone, D., (2006) The order *Methanosarcinales*, En *The Prokaryotes* 3rd ed. (Dworkin, M., Flakow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. Ed.) pp. 244-256. Springer.
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J., García, J., (2011). Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. *Ecol. Eng.* 37(2):99–112.
- Lane D., Bernadette, P., Olsen, G., Stahl, D., Sogin, M., Pace, N., (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6955-6959.
- Le Mer, J., Roger, P., (2000). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.* 37:25-50.
- Liu, C., Xu, K., Inamori, R., Ebie, Y., Liao, J., Inamori, Y., (2009). Pilot-scale studies of domestic wastewater treatment by typical constructed wetlands and their greenhouse gasemissions. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 3(4):477–482.

- Lopez, D., Fuenzalida, D., Vera, I., Rojas, K., Vidal, G., (2015). Relationship between the removal of organic matter and the production of methane in subsurface flow constructed wetlands designed for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 83, 296-304.
- López, D., (2016). Evaluación estacional de humedales construidos de flujo horizontal subsuperficial para la depuración de aguas servidas en zonas rurales: implicancias en la generación de metano. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile. Pp 216.
- Mara, D., (2003). Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries (Mara, D. Ed.). Editorial Earthscan, Londres. 1 pp.
- Metcalf, Eddy., (2003). Wastewater Engineering Treatment and Reuse. Editorial McGraw-Hill, New York. 27-118 pp.
- Mo Kim, Y., Min Jang, H., Lee, K., Chantrasakdakul, P., Kim, D., Park, K.m (2015). Changes in bacterial and archaeal communities in anaerobic digesters treating different organic wastes. *Chemosphere.* 141:134-137.
- Morató, J., Codony, F., Mas, J., (2005). Utilization of a packed-bed biofilm reactor for the determination of potential of biofilm accumulation in water systems. *Biofouling* 21:151-160.
- Morató, J., Codony, F., Sánchez, O., Pérez, L., García, J., Mas, J., (2014). Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 481:81-89.
- Muyzer, G., De Waal, E., Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microb.* 59:695-700.

- Nguyen, L., (2000). Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecol. Eng.* 16:199-221.
- Niu, C., Zhixing, H., Ying, G., Chang, J., Zhenmei, L., (2015). Effect of plant species richness on methane fluxes and associated microbial processes in wetland microcosms. *Ecol. Eng.* 84:250-259.
- Nocker, A., Camper, A., (2008). Novel aproches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *Microbiol. Lett.* 291:137-142.
- Pedescoll, A., Corzo, A., Alvarez, E., García, J., Puigagut, J., (2011). The effect of primary treatment and flow regime on clogging development in horizontal subsurface flow constructed wetlands: an experimental evaluation. *Water Res.* 45(12): 3579-3589.
- Pessoa, C. Jordao, E., (1982). tratamento de esgotos domésticos. 2. Editorial Rio de Janeiro, ABES.
- Picek, T., Cizkova, H., Dusek, J., (2007). Greenhouse gas emissions from a constructed wetland plants as important sources of carbon. *Ecol. Eng.* 31 (2):98–106.
- Plaza de los Reyes, C., Vera, L., Salvato, M., Borin, M., Vidal, G., (2011). Consideraciones para la eliminación del nitrógeno en humedales artificiales. *Tecnología del agua* 330:40-49.
- Plaza de los Reyes, C., Vidal, G., (2007). Humedales construidos: Una tecnología a considerar para el tratamiento de aguas residuales. *Tecnología del agua* 288:34-48.
- Ramalho, R., (1996). Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverte S.A., Barcelona. pp. 27.
- Ramond, J., Welz, P., Cowan, D., Burton, S., (2012). Microbial community structure stability, a key parameter in monitoring the development of constructed wetland mesocosms during start-up. *Res. Microbiol.* 163:28-35.

- Raskin, L., Stromley, J., Rittmann, B., Stahl, D., (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microb.* 60:1232-1240.
- Reyes-Contreras, C., Hijosa-Valsero, M., Sidrach-Cardona, R., Bayona, J., Bécares, E. (2012). Temporal evolution in PPCP removal from urban wastewater by constructed wetlands of different configuration: A medium-term study. *Chemosphere* 88:161–167.
- Rojas, K., Vera, I., Vidal., G., (2013) Influence of season and species *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus* on the removal of organic matter and nutrients contained in sewage wastewater during the start up operation of the horizontal subsurface flow constructed wetland. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquía.* 69:289-299.
- Rojas, K., (2012). Puesta en marcha de un sistema piloto de humedales construidos de flujo subsuperficial para la depuración de aguas servidas rurales: consideración de indicadores de sustentabilidad. Habilitación presentada para optar al título de Ingeniero Ambiental, Universidad de Concepción, Chile, 114 pp.
- Romero, J., (2004). Tratamiento de Aguas Residuales 3^{ra} ed (Romero, J., Ed.). Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería, Bogotá, Colombia, 1248 pp.
- Saeed, T., Sun, G., (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management* 112:429-448.
- Samsó, R., García, J., (2013). Bacteria distribution and dynamics in constructed wetland based on modelling results. *Sci. Total Environ.* 461-462:430-440.
- Samsó, R., García, J., (2014). Catridge Theory: A description of the functioning of horizontal subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment, based modeling results. *Sci. Total Environ.* 473-474:651-658.

- Scholz, M., Lee, B., (2005). Constructed wetlands: a review, *Int. J. Environ. Stud.* 62:4, 421-447.
- Seghezzi, L., (2004). Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions, Ph. D. thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- Sidrach-Cardona, R., Sánchez, O., Garrido, L., Mas, J., Bécares, E., (2015). Molecular characterization of microbial communities in constructed wetlands: the effect of plant species, organic matter and hydraulic design, en *Wastewater Treatment*. (Editor Lydia M. Barret) pp. 46 – 67, Nova Science Publishers Inc.
- Song, M., Shin, S., Hwang, S., (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 101:S23-S28.
- Sophonsiri, C., Morgenroth, E., (2004). Chemical composition associated with different particle size fractions in municipal, industrial, and agricultural wastewaters. *Chemosphere.* 55(5): 691-703.
- Soto, M., Méndez, R., Lema J., (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity test. Theoretical basis and experimental set up. *Water Res.* 27, 1361–1376.
- Sjøvik, A., Augustin, J., Heikkinen, K., Huttunen, J., Necki, J., Karjalainen, S., Kløve, B., Liikanen, A., Mander, Ü., Puustinen, M., Teiter, S., Wachniew, P., (2006). Emission of the greenhouse gases nitrous oxide and methane from constructed wetlands In Europe. *J. Environ. Qual.* 35(6):2360–2373.
- Srinivas, T., Singh, S., Pradhan, S., Pratibha, M., Kishore, K., Singh, A., Begum, Z., Prabakaran, S., Reddy, G., Shivaji, S. 2011. Comparison of bacterial diversity in proglacial soil from Kafni Glacier, Himalayan Mountain ranges, India, with the bacterial diversity of other glaciers of the world. *Extremophiles.* 15:673-690.

- Stein, O., Borden-Stewart, D., Hook, P., Jones, W., (2007). Seasonal influence on sulfate reduction and zinc sequestration in subsurface treatment wetlands. *Water Res.* 41-3440-3448.
- Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R., Moormann, H., (2004). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22:93– 117.
- Superintendencia de Servicios Sanitarios. (2008) Regulación del sector sanitario en Chile. Gobierno de Chile.
- Superintendencia de Servicios Sanitarios. (2014). Informe anual de coberturas urbanas de servicios sanitarios. Gobierno de Chile.
- Tanner, C., Adams, D., Downes, M., (1997). Methane emissions from constructed wetlands treating agricultural wastewaters. *J. Environ. Qual.* 26:1056-1062.
- Tanner, C., Sukias, J., Upsdell, M., (1998). Organic matter accumulation during maturation of gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Water Res.* 32(10):3046–3054.
- Tanner, C., (2001). Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Sci. Technol.* 44(11-12):9-17.
- Tanner, C., Sukias, J., (1995). Accumulation of organic solids in gravel-bed constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 32(3):229-239.
- Teiter, S., Mander, Ü., (2005). Emission of N₂O, N₂, CH₄ and CO₂ from constructed wetlands for wastewater treatment and from riparian buffer zones. *Ecol. Eng.* 25(5):528-541.
- Torpak, H., (1994). Temperature and organic loading dependency of methane and carbon dioxide emissions rates of a full-scale anaerobic waste stabilization pond. *Water Res.* 29(4):1111-1119.

- Truu, M., Jaanis, J., Truu, J., (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 307:3958– 3971.
- United States Environmental Protection Agency (U.S.EPA) (2000). Manual Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters (September).
- van der Nat, F., Middelburg, J., Van meteren, D., Wielemakers, A., (1998). Diel methane emission matters from *Scirpus lacustris* and *Phragmites australis*. *Biogeochemistry* 41:1-22.
- van der Zaag, A., Gordon, R. Burton, D., Jamieson, R., Stratton, G., (2010). Greenhouse gas emissions from surface flow and subsurface flow constructed wetlands treating dairy wastewater. *J. Environ. Qual.* 39 (2):460–471.
- Vera, I., García, J., Sáez, K., Moragas, L., Vidal, G., (2011). Performance evaluation of eight years experience of constructed wetlands systems in Catalonia as alternative treatment for small communities. *Ecol. Eng.* 37(2): 364-371.
- Vera, I., (2012). Análisis del funcionamiento y patrones asociativos de sistemas de tratamiento convencionales y naturales de aguas servidas para la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Chile. 236
- Vera, I., Araya, F., Andrés, F., Sáez, K., Vidal, G., (2014). Enhanced phosphorus removal from sewage in mesocosm-scale constructed wetland using zeolite as medium and artificial aeration. *Environmental Technol.* 35(13):1639-1649.
- von Sperling, M., (2007). Wastewater Characteristic, Treatment and Disposal (Von Sperling, M., Ed.). IWA Publishing. London. 42 pp.
- Vhola, C., Pöldvere, E., Noorve, A., Kuusemets, V., Ü., Mander, (2005). Alternative filter media for phosphorous removal in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *J. Environ. Sci. Heal.* 40:1251-1264.

- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., Haberl, R., Perfler, R., Laber, J., (1998). Removal mechanisms and types of constructed wetlands, en: Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe (Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., Green, N., Haberl, R., Ed.) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands pp. 17-66.
- Vymazal, J., (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 380(1-3):48-65.
- Vymazal, J., (2011a). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience, *Envir. Sci. Tech. Lib.* 45(1):61-69.
- Vymazal, J., (2011b). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. *Hydrobiologia* 674:133–156.
- Vymazal, L. Kröpfelová, L., (2009). Removal of organics in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: A review of the field experience. *Sci. Total Environ.* 407:3911-3922.
- Wang, Y., Inamori, R., Kong, H., Xu, K., Inamori, Y., Kondo, T., Zhang, J., (2008). Influence of plant species and wastewater strength on constructed wetland methane emissions and associated microbial populations. *Ecol. Eng.* 32:22-29.
- Wang, J., Zhang, J., Xie, H., Qi, P., Ren, Y., Hu, Z., (2011). Methane emissions from a full-scale A/A/O wastewater treatment plant. *Biores. Technol.* 102 (9):5479-5485.
- Wang, Y., Yang, H., Ye, C., Chen, X., Huang, C., Zhang, J., (2013). Effects of plant species on soil microbial processes and CH₄ emissions form constructed wetlands. *Environ. Pol.* 174:273-278.
- Xiaofei, L., Junbao, Y., Yuquin, F., Bin, M., Fanzhu, Q., Kay, N., Huifeng, W., (2014). A Meta-Analysis of the bacterial and archeal diversity observed in wetland soils. *The scientific World Jo.* <http://doi.org/10.1155/2014/437684>.

- Zaror, C., (2000). Introducción a la Ingeniería Ambiental para la Industria de Procesos. Departamento de ingeniería química, Facultad de ingeniería, Universidad de Concepción. 154 pp.
- Zhao, Y., Liu, B., Zhang, W., Hu, C., Shuqing, A., (2010). Effects of plant and influent C:N:P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 30:441-449.
- Zhu, N., An, P., Krishnakumar, B., Zhao, L., Sun, L., Mizuochi, M., Inamori, Y., (2007). Effect of plant harvest on methane emission from two constructed wetlands designed for the treatment of wastewater. *J. Environ. Manage.* 85(4):936-943.

9. ANEXO

Análisis estadístico

Tabla 1. Determinación de normalidad de los datos de producción de metano, agrupados por zona.

Celda	Valor p		
	Zona A	Zona B	Zona C
HFHSS-Phr1	0,3391	0,0128 ^a	0,0246 ^a
HFHSS-Phr2	0,2424	0,2300	0,0708
HFHSS-Sch1	0,0256 ^a	0,1429	0,1100
HFHSS-Sch2	0,0789	0,2276	0,3452

Se considera distribución normal con $p > 0,05$.

Tabla 2. Determinación de normalidad de los datos de producción de metano agrupados por temporada; a: agrupación de datos sin distribución normal

Celda	Valor P		
	O/I 2013	P/V 2015	O/I 2015
HFHSS-Phr1	0,6673	0,9201	0,6319
HFHSS-Phr2	0,9952	0,1877	0,7431
HFHSS-Sch1	0,3167	0,8043	0,4772
HFHSS-Sch2	0,0917	0,0896	0,2826

Se considera distribución normal con $p > 0,05$.

Tabla 3. Comparación de duplicados

Comparación	Zona A	Zona B	Zona C
HFHSS-Phr1 vs HFHSS-Phr2	0,7785	0,4	>0,9999
HFHSS-Sch1 vs HFHSS-Sch2	>0,9999	0,8706	0,5539

Se consideran diferencias significativas con $p > 0,05$

Tabla 4. Comparación de producciones de metano

Comparación	Zona	Valor p
<i>P. australis</i> vs <i>S. californicus</i>	A	0,9725
	B	0,6793
	C	0,7888
Entre Temporadas	-	<0,0001
Entre Zonas	-	0,8420

Se consideran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Tabla 5. Interacción entre planta utilizada y temporada sobre los promedios de las producciones de metano de las zonas de cada celda.

Interacción	Celda	Relación entre medias			
P/V 2015	HFHSS-Sch1	A			
P/V 2015	HFHSS-Sch2	A	B		
P/V 2015	HFHSS-Phr1	A	B		
P/V 2015	HFHSS-Phr2	A	B		
O/I 2013	HFHSS-Sch1	A	B	C	
O/I 2013	HFHSS-Phr1	A	B	C	
O/I 2013	HFHSS-Phr2		B	C	D
O/I 2013	HFHSS-Sch2		B	C	D
O/I 2015	HFHSS-Phr1			C	D
O/I 2015	HFHSS-Phr2			C	D
O/I 2015	HFHSS-Sch1			C	D
O/I 2015	HFHSS-Sch2				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes.