



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas



Comportamiento de actividad microbiana heterótrofa y nitrificante en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purín de cerdo

Tesis para optar al título de Bioingeniería

Rodrigo Bladimir Badillo Navarrete

2010

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	2
INDICE DE TABLA.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCION.....	9
1.1 Características de los residuos porcinos.....	9
1.2 Impactos ambientales asociados.....	10
1.3 Alternativas de minimización de estos impactos.....	10
1.4 Humedales artificiales.....	13
1.4.1 Red Trófica en los humedales.....	14
1.4.2 Eliminación de materia orgánica.....	17
1.4.3 Nitrificación.....	17
1.4.4 Factores asociados a la nitrificación.....	19
1.4.5 Desnitrificación.....	21
1.4.6 Factores asociados a la desnitrificación.....	21
2 HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	24
2.1 Hipótesis.....	24
2.2 Objetivo General.....	24
2.3 Objetivos Específicos.....	24
3 MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Humedal construido.....	25
3.1.1 Características.....	25
3.1.2 Puntos de muestreo.....	26
3.2 Análisis de la fracción líquida del humedal.....	26
3.3 Toma de muestra y caracterización del sedimento del humedal.....	27
3.4 Métodos analíticos.....	27
3.4.1 Métodos físico-químicos de caracterización de aguas.....	27
3.4.2 Actividad nitrificante.....	28

3.4.3. Actividad heterotrófica	28
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo.....	31
4.2 Caracterización de la fracción líquida del humedal construido.....	32
4.3 Caracterización del sedimento del humedal	34
4.3.1 Biomasa humedal	34
4.4 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante en el sedimento del humedal	36
4.4.1 Actividad heterotrófica y Actividad Nitrificante a lo largo del humedal	38
4.4.2 Actividad bacteriana con respecto a la estación del año	39
4.4.3 Relación entre zonas con plantas y zonas sin plantas.....	39
4.4.4 Relación de actividad bacteriana entre zonas superficiales y zonas fondo del sedimento	40
4.5 Capacidad de oxidación de materia orgánica y nitrificante del humedal	41
4.6 Humedal	43
5 DISCUSION.....	45
5.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo.....	45
5.2 Caracterización de la fracción líquida del humedal construido.....	45
5.3 Caracterización del sedimento del humedal	46
5.3.1 Biomasa humedal	46
5.4 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante en el sedimento del humedal	47
5.4.1 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante a lo largo del humedal	47
5.4.2 Actividad bacteriana con respecto a la estación del año	48
5.4.3 Relación entre zonas con plantas y zonas sin plantas.....	49
5.4.4 Relación de actividad bacteriana entre zonas superficiales y zonas de fondo del sedimento.....	50
5.5 Capacidad de oxidación de materia orgánica y nitrificante del humedad	50
6. CONCLUSIONES.....	52
7. CONSIDERACIONES FUTURAS.....	53
8. REFERENCIAS	54
AGRADECIMIENTOS	58

INDICE DE TABLA

TABLA 1. ESPECIES EMERGENTES MAS UTILIZADAS EN TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	16
TABLA 2. FACTORES ASOCIADOS AL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LA NITRIFICACIÓN.	21
TABLA 3. FACTORES ASOCIADOS AL CRECIMIENTO DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES.....	23
TABLA 4. CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE DE ESTUDIO	31
TABLA 5. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA DEL HUMEDAL CONSTRUIDO	33
TABLA 6. PORCENTAJE DE HUMEDAD Y ST DE MUESTRA DE SEDIMENTO.	34
TABLA 7. BIOMASA DEL SEDIMENTO Y DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA DEL HUMEDAL.....	35
TABLA 8. ACTIVIDAD BACTERIANA A ESCALA ESPACIAL Y TEMPORAL DEL HUMEDAL ARTIFICIAL .	37
TABLA 9. RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN LAS ZONAS CON PLANTAS Y ZONAS SIN PLANTAS.	40
TABLA 10. RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN LAS ZONAS SUPERFICIALES/FONDO DEL SEDIMENTO DEL HUMEDAL.....	41
TABLA 11. CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA POR ZONAS.....	42
TABLA 12. CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE AMONIO POR ZONAS	42
TABLA 13. CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE NITRITO POR ZONAS	42

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CONFIGURACIÓN DE LOS SISTEMAS HFS Y HFSS, RESPECTIVAMENTE (STOTTMISTER, 2003).	14
FIGURA 2. IMAGEN SATELITAL DEL HUMEDAL DEL “FUNDO SAN GUILLERMO” (36°33’19,61’’S; 71°51’49,64’’W)	25
FIGURA 3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA BIOMASA PRESENTE EN EL HUMEDAL ARTIFICIAL.	30
FIGURA 4. IMAGEN EN MICROSCOPIA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ENCONTRADA EN EL HUMEDAL ARTIFICIAL.	35
FIGURA 5: ACTIVIDAD BACTERIANA SUPERFICIAL DEL SEDIMENTO A LO LARGO DEL HUMEDAL. ..	38
FIGURA 6:. ACTIVIDAD BACTERIANA DEL FONDO DEL SEDIMENTO A LO LARGO DEL HUMEDAL	38
FIGURA 8 SEGUIMIENTO FOTOGRÁFICO DE OPERACIÓN HUMEDAL ARTIFICIAL PRIMAVERA 2009 - VERANO 2010.....	44

ABREVIATURAS

CE:	Conductividad eléctrica
g:	gramos
g/L:	gramos / litro
DBO ₅ :	Demanda biológica de oxígeno
DQO:	Demanda química de oxígeno
DQO _T :	Demanda química de oxígeno total
DQO _S :	Demanda química de oxígeno soluble
min:	Minuto
mg:	Miligramo
NT:	Nitrógeno Total
N-NH ₄ ⁺ :	Nitrógeno en forma de amonio
N-NO ₂ ⁻ :	Nitrógeno en forma de nitrito
N-NO ₃ ⁻ :	Nitrógeno en forma de amonio
ST:	Sólidos totales
SV:	Sólidos Volátiles
SST:	Sólidos suspendidos totales
SSV:	Sólidos suspendidos volátiles
T°:	Temperatura
VCO:	Velocidad de consumo de oxígeno (mgO ₂ /mgSSV·min)

RESUMEN

En los últimos años en Chile, el consumo y la exportación de carne de cerdo han ido en aumento, lo que trae consigo la generación de residuos con alta carga orgánica (34 g/L de DQO_T) y nutrientes (2 g/L de nitrógeno), debido a ello se han implementado alternativas de tratamiento de bajo costo y ambientalmente sustentables como lo son los humedales artificiales, que permiten un equilibrio entre costo de operación y rendimiento. En estos sistemas la actividad microbiana es la principal vía de degradación de estos residuos. Por esta razón, se evaluó la actividad microbiana heterótrofa y nitrificante en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purines de cerdo. Para ello se midió el consumo de oxígeno del medio como indicador de la actividad bacteriana (heterotrófica, amonio oxidante, nitrito oxidante). Se obtuvo que la actividad heterotrófica promedio en la parte superficial del sedimento fue de 0,34 mgO₂/mgSSV·min; la actividad amonio oxidante fue de 0,26 mgO₂/mgSSV·min y la actividad nitrito oxidantes fue de 0,25 mgO₂/mgSSV·min. En el caso del fondo del sedimento la actividad bacteriana disminuye 2,3 veces comparada con la actividad bacteriana heterótrofa de la superficie. Para el caso de las amonio oxidantes y nitrito oxidantes esta disminución es de 1,8 y 1,4 veces, respectivamente, con respecto a la que se encuentra en la superficie. Con estos resultados, se determinó que existe una mayor actividad bacteriana en las zonas superficiales que en las zonas de fondo del humedal construido. Además, se determinó que la mayor actividad se produjo en temporada de primavera-verano. Por último, se determinó que las bacterias heterotróficas presentan una mayor actividad que las nitrificantes, debido a la elevada concentración de materia orgánica en el medio (DQO_T >1 g/L).

ABSTRACT

In recent years in Chile, the consumption of pigs exports have been increasing, which brings the generation of waste with high organic load, 34 g/L of DQO_T , and nutrients, such as 2 g/L of nitrogen, despite the fact that many systems have been implemented to reduce the amount of suspended solids and organic matter, causing severe environmental impacts. That is why new alternatives are being implemented, such as constructed wetlands, which allows a balance between operating costs and performance. For this reason, we evaluated the nitrifying and heterotrophic microbial activity in surface flow constructed wetland for treatment of pig slurry. To do this we measured the oxygen consumption of the medium as an indicator of bacterial activity (heterotrophic, ammonia oxidation, nitrite oxidation). It was found that the average heterotrophic activity in the superficial part of sediment was 0,34 $mgO_2/mgSSV \text{ min}$, ammonium oxidizing activity is 0,26 $mgO_2/mgSSV \text{ min}$ and nitrite oxidizing activity is 0.25 $mgO_2/mgSSV \text{ min}$. In the case of bottom sediments, it decreases activity 2,3 times compared to heterotrophic bacterial activity of the surface, in the case of ammonium oxidizers and nitrite oxidizers, this declination is 1,8 and 1,4 times, respectively, with respect to that found on the surface. With these results, it was determined that there is increased activity in the surface areas in the background areas of the constructed wetland. It was determined that most activity occurred in spring-summer season. It was concluded that heterotrophic bacteria have a higher activity than nitrifiers, due to the high concentration of organic matter in the medium ($DQO_T > 1 \text{ g / L}$).

1 INTRODUCCION

1.1 *Características de los residuos porcinos*

El consumo de la carne de cerdo ha ido en aumento tanto a nivel nacional, como mundial, lo que se puede reflejar en la producción y exportación de la carne de cerdo. En Chile la producción neta de los años 1997 y 2008, fue de 184.693 y 473.975 toneladas, respectivamente. De esta manera los datos de exportación para los años 1997 y 2008 fueron 4.665 y 136.245 toneladas, invirtiéndose más de 400 millones de dólares, en el último año. Debido al aumento de la producción del rubro pecuario, ha aumentado con ellos la generación de residuos, dentro de los cuales está producción de purines (Asprocer, 2009; INE, 2009).

Los purines, corresponden a la mezcla de excretas (45% orina y 55% heces) del animal, junto con el agua empleada en el lavado de los planteles, los que están constituidos por un 90% de humedad y un 10% de materia seca (Choi, 2007; Peralta, 2005; Asprocer, 2008).

La formación de purines esta determinada por la tasa de producción de excretas, que a su vez va a depender de varios factores, como: el número y la madurez fisiológica de los animales, la calidad y cantidad de alimento ingerido por los animales, el volumen de agua consumida por los animales, y el clima local (Peralta, 2005). En general, la producción de excretas varía entre 1 y 5 L/día por animal, cuya concentración en materia orgánica, para el caso de los planteles de cerdo en Chile, alcanzan los 14.000 mg /L de DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno medida a los 5 días). A su vez estos residuos presentan concentración de sólidos totales (ST) de 6.600 mg/L aproximadamente, y de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) de 2.250 mg/L, 210 mg/L, y 423 mg/L, respectivamente. En cuanto al pH, este varía entre 6 y 8, tendiendo a la neutralidad en la medida que las excretas sean más frescas. Otras características de los purines de cerdo son la presencia de patógenos (e.g. coliformes fecales > 1000 NMP/mL), metales pesados como el cobre (Cu) y zinc (Zn) (en concentraciones de 250 mg/kg y 526 mg /kg, respectivamente), y compuestos específicos tales como: antibióticos, probióticos, entre otros, utilizados como promotores de crecimiento y/o para evitar enfermedades (Peralta, 2005; Asprocer, 2009; Anh, 2006). Esta composición dificulta la disposición final de estos residuos, ya que conlleva diversos impactos ambientales asociados.

1.2 Impactos ambientales asociados

Los impactos ambientales asociados a los purines están relacionados con su disposición en suelos y/o cuerpos de aguas, generando diversos problemas, debido a su composición en materia orgánica, sólidos, nutrientes y patógenos, principalmente.

En el caso de la materia orgánica, esta es utilizada como fuente de energía y de carbono para las bacterias organotrofas que habitan los cuerpos de agua. Es por ello que el aumento de la tasa de crecimiento y del metabolismo microbiano, causan el agotamiento del oxígeno disuelto en la columna de agua, provocando la disminución y/o pérdida de organismos acuáticos (Gerardi, 2002).

Así mismo, el contenido de nitrógeno presente en estos residuos, provoca la eutrofización de los sistemas acuáticos, debido al crecimiento excesivo de algas, disminuyendo el contenido de oxígeno disuelto en la columna de agua. Esto ocurre por la oxidación de ión amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) y a nitrato (NO_3^-) utilizando el oxígeno disuelto presente en el medio, y la consiguiente pérdida de organismos acuáticos (Gerardi, 2002). La pérdida de la calidad del agua a causa de los distintos componentes de los residuos, puede generar toxicidad a los organismos acuáticos, debido a la contaminación de las aguas. De esta manera el NO_3^- puede causar problemas de toxicidad, debido a su mayor difusión hacia las napas subterráneas o cuerpos de agua cercanos, que al ser ingerido por el ser humano (específicamente por niños) provoca enfermedades como la “metahemoglobinemia” o “síndrome del niño azul” (Gerardi, 2002).

La contaminación del agua a causa de los patógenos, puede causar a su vez una serie de enfermedades como mastitis, salmonelosis, shigelosis, cólera, diarreas, entre otros, esto por el consumo de verduras o agua contaminada con estos efluentes (Peralta, 2005). Debido esto se hace necesario reducir los impactos ambientales asociados a estos residuos.

1.3 Alternativas de minimización de estos impactos

Para minimizar los distintos impactos ocasionados por los purines de cerdo existen diversos tipos de tratamientos, que dependerán de las características del efluente, la calidad de este en relación a la normativa vigente, los costos asociados al tratamiento y su disposición final (Chamy *et al.*, 2003).

Actualmente en el sector porcino se está trabajando con la reducción de contaminantes en el origen, tratando así de generar menos residuos o menos tóxicos, con el fin de hacer más fácil su

disposición final. En el caso de cerdos, en países desarrollados, principalmente, se está trabajando sobre el alimento, mejorando su composición de acuerdo a los requerimientos energéticos de cada estado fisiológico, sobre todo en relación a los nutrientes, con el objetivo de disminuir en las excretas de los animales la cantidad de nutrientes ingeridos, promoviendo la asimilación de estos nutrientes en el organismo: ejemplo de esto es el uso de enzimas para disminuir la cantidad de fósforo de las excretas (Babot, 2004).

Si la gestión de estos residuos se realiza al final, los sistemas de tratamientos considerados corresponden a: tratamientos primarios, tratamientos secundarios y tratamientos terciarios.

Los tratamientos primarios son utilizados para disminuir la cantidad de sólidos en el purín, de los cuales pueden haber varios tipos, como tamices y prensas, que tienen una eficiencia de reducción entre el 5 y 15%; sistemas de filtración, tales como filtros de prensa, filtros de banda y filtros de arena, que presentan mejores eficiencias (entre un 20 a 30%). Otros sistemas físicos de separación de sólidos en el purín son separadores estacionarios, prensas tornillo y tambor rotatorio (Zaror, 1998). Sin embargo, las experiencias más eficientes hasta el momento han resultado de la utilización de tratamientos físico-químicos, que usan flocculantes orgánicos (polímero poliacrilamida) previo a una separación mecánica. Utilizando esta tecnología, se ha desarrollado con éxito sistemas para obtener un material sólido con más de 50% de materia seca y una fracción líquida con más de un 97% de reducción en los sólidos en suspensión (Zaror, 1998).

En general, las eficiencias de los sistemas de separación de la fracción sólida de la líquida son muy variables, dependiendo de la composición y volúmenes a tratar, así como de las condiciones de operación de los equipos. En este sentido, se debe tener especial cuidado de respetar los caudales de diseño, ya que este es uno de los factores más determinantes que afecta la eficiencia de los sistemas (Asprocer, 2008).

Los tratamientos secundarios son los encargados de reducir la materia orgánica presente en las aguas residuales, a través de mecanismos biológicos. Dichos mecanismos consisten en la asimilación de la materia orgánica por los microorganismos. Dependiendo si estos procesos ocurren en presencia o ausencia de oxígeno serán tratamientos biológicos aerobios o anaerobios (Peralta, 2005).

Actualmente estos sistemas de tratamiento biológico se pueden clasificar en dos tipos de sistemas, convencionales y no convencionales.

Los sistemas convencionales corresponden a los utilizados tradicionalmente para el tratamiento de aguas municipales, que pueden ser usados para el tratamiento de purines, entre estos destacan los filtros percoladores, lodos activados, procesos de digestión anaeróbica y lagunas anaeróbicas. Estas últimas son mayormente utilizadas en el tratamiento de purines en instalaciones de pequeña y mediana escala. Estos sistemas tienen distinto rango de eficiencia, en relación a la reducción de materia orgánica; entre un 55% y hasta un 97% en el caso de uso de lodos activados. En relación a los nutrientes como el nitrógeno, las eficiencias de reducción en estos sistemas se encuentran entre el 0% y 25% (Asprocer, 2008; Zaror, 1998).

Los digestores anaeróbicos de lecho fluidizado ascendente de lodo o UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Bed”), son los reactores más aplicados en la actualidad, para aguas residuales en general. El rendimiento de estos reactores varía entre los 70 y 90% en la reducción de la DBO₅ y entre un 60 y 85% de DQO (Demanda Química de Oxígeno), además se produce biogás como sub-producto, y se trabaja con una biomasa reducida, en comparación a los métodos aeróbicos. Aunque en cuanto a nutrientes, como el nitrógeno, la eficiencia de reducción puede alcanzar sólo entre un 10 y 20% (Chamy *et. al.*, 2003; Gabiatti *et. al.*, 2009).

Entre los sistemas no convencionales utilizados en el tratamiento de purines de cerdo, se encuentran los sistemas de humedales artificiales, filtros de suelos y la lombricultura. Los dos primeros mencionados son sistemas de bajo costo cuya eliminación de materia orgánica expresada en DBO₅ está entre el 60 a 99% (este último valor referente a filtros de suelos); sólidos totales 60 a 99% y nitrógeno total Kjeldahl o NTK entre 50 y 95%. La desventaja de estos sistemas es la cantidad de terreno que se necesita para su instalación. La lombricultura es una alternativa muy eficiente, con rango de eliminación de DBO₅ del 80 al 90%, de sólidos suspendidos totales entre 80 a 99% y de NTK 50 a 90%; el problema principal de este sistema es su costo de construcción (Asprocer, 2008).

Tratamiento terciario se aplican para la eliminación de contaminantes específicos, que no han sido eliminados en el tratamiento primario, ni secundario como es el caso de los nutrientes (nitrógeno y fósforo). Entre las operaciones que se utilizan en el tratamiento terciario de aguas residuales están: la microfiltración, la coagulación y precipitación, la adsorción por carbón activado, el intercambio iónico, la ósmosis inversa, la electrodiálisis, la remoción de nutrientes por medios biológicos, la cloración y la ozonización (Asprocer, 2008; Zaror, 1998).

En el caso de los nutrientes, estos son eliminados mediante sistemas biológicos, los que están basados en el ciclo del nitrógeno, específicamente en las etapas de nitrificación y desnitrificación, y una tendencia actual es dirigirse a procesos avanzados como ANAMOX (oxidación anaeróbica del amonio) presente en sedimentos marinos, entre otros. Estos procesos han sido aplicados en el tratamiento de aguas residuales para disminuir el contenido de nitrógeno (Ahn, 2006). Dentro de los procesos convencionales de reducción de nitrógeno, las tecnologías se fundamentan en la nitrificación y desnitrificación, o la combinación de estos procesos. El problema de estos sistemas es el alto costo de inversión y operación que se requiere para ser implementado en la pequeña y mediana empresa.

Debido a lo antes descrito y a la necesidad de buscar alternativas para explotaciones medianas y pequeñas es que se presenta como una alternativa eficiente y de bajo costo, el uso de humedales artificiales como tratamiento terciario, previa reducción de la materia orgánica.

Los humedales construidos son definidos como áreas inundadas por aguas superficiales o profundas, donde predomina una vegetación de tipo hidrófila (Brix, 1997). El funcionamiento del humedal, como un sistema de tratamiento, se fundamenta en tres principios básicos: la actividad bioquímica de los microorganismos; el aporte de oxígeno a través de los vegetales durante el día, y el apoyo físico de un lecho inerte que sirve como soporte, tanto para los microorganismos como para los vegetales, además de servir como material filtrante (Brix, 1997).

Los humedales construidos han reportado reducciones en efluentes de aguas servidas en las concentraciones de los sólidos suspendidos (SS) en un 51%; la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), en un 71%; el nitrógeno total (NT), en un 55%; el fósforo total (PT), en un 50%; los coliformes fecales (CF), en un 78%; y el nitrógeno amoniacal, en un 75% (Svengsouk *et al.*, 2001; Coleman *et al.*, 2000).

1.4 Humedales artificiales

Los humedales artificiales son los utilizados en un gran rango de tratamientos de residuos líquidos que van desde el tratamiento de aguas servidas hasta vertidos líquidos industriales; bajo estas circunstancias, de acuerdo al comportamiento hidráulico, se clasifican en dos tipos de humedales: a) humedales de flujo superficial (HFS), b) humedales de flujo subsuperficial (HFSS), presentados en la Figura 1. (Stottmister, 2003). Otra clasificación es basada en el tipo de material vegetal empleado y adaptado al tipo de residuo líquido a tratar, los que se dividen en: a)

sistema de macrófitas flotantes, con especies de plantas que no presentan enraizamiento en el fondo, tales como: lenteja de agua (*Lemna sp.*) y jacinto de agua (*Eichornia crassipes*); b) sistema de macrófitas sumergidas, con especies de plantas que tienen su sistema foliar sumergido en la columna de agua (*Soetes lacustris*, *Lobelia dortmanna*, *Egeria densa*, y *Elodea canadensis*); y c) sistema de macrófitas emergentes, compuesto por especies de plantas enraizadas en el fondo con sus hojas y tallos sobre la superficie del agua, siendo comúnmente empleadas *Phragmites spp.*, *Typha spp.*, *Scirpus spp.* y *Carex spp.* (Plaza de los Reyes, 2010; Ñique, 2002).

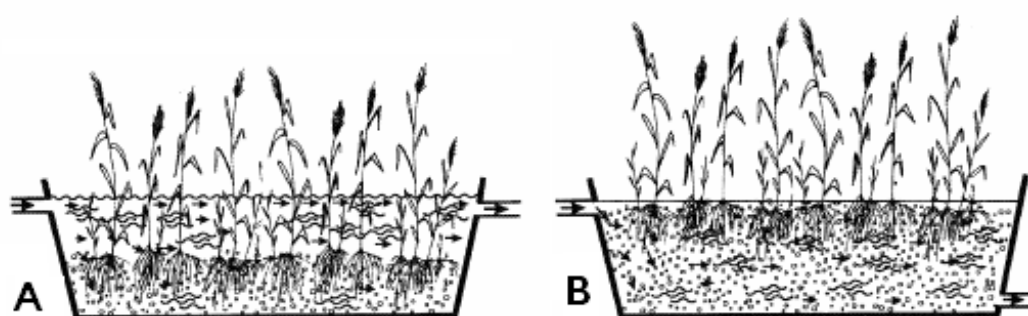


Figura 1. Configuración de los sistemas HFS y HFSS, respectivamente (Stottmister, 2003).

El humedal de tipo flujo superficial (HFS), es un sistema de baja profundidad, conformado por una geomembrana, para evitar la precolación del líquido hacia las napas subterráneas de agua, una capa de gravilla o estructuras porosas que permitan el sustento de las plantas macrófitas. Los niveles de agua en estos sistemas varían entre 10 a 60 cm de profundidad, imitando a los sistemas naturales en cuanto a apariencia y función (Stottmister, 2003; Chen *et. al.*, 2006)

Los humedales de flujo subsuperficial (HFSS) contienen un relleno de tipo granular que permite el paso del agua a través de él, actuando como un filtro y soportando las raíces de las plantas emergentes. Este lecho granular tiene altas tasas de reacción y asimilación con los contaminantes, por lo que puede tener un área menor que un sistema superficial. El medio poroso puede ser suelo arcilloso, arena o grava (Lara, 1999; Plaza de los reyes, 2007).

1.4.1 Red Trófica en los humedales

Biológicamente los humedales están considerados como los ecosistemas de gran biodiversidad, que presentan una gran cantidad de organismos invertebrados, principalmente insectos y que son

la base alimenticia de una compleja red trófica en la que participan anfibios, aves, reptiles y una gran variedad de herbívoros (Kadlec, 2009). En el caso de los humedales artificiales, esta red trófica se reduce, ya que son construidos en zonas delimitadas con un amplio control sobre ellos, reduciéndose a plantas, animales (aves y roedores) e insectos, microalgas y bacterias.

El mayor beneficio que entregan las plantas es la transferencia de oxígeno a la zona de la raíz. Su presencia física en el sistema (los tallos y rizomas) permite la penetración a la tierra o medio de apoyo y el transpore de oxígeno de manera profunda, más allá de lo que llegaría naturalmente a través de la sola difusión. Lo más importante de la vegetación de los humedales es la parte sumergida de las hojas, raíces y tallos muertos, que permiten su degradación, ya que sirven como soporte para el crecimiento de la película microbiana que es la responsable de gran parte del tratamiento que ocurre en este sistema (Kadlec and Knight, 1996). Las plantas emergente que frecuentemente se encuentran en la mayoría de los humedales para aguas residuales incluyen *Thypha sp.*, *Scirpus sp.*, *Phragmites sp.*, *Carex sp.* Algunos detalles de estas plantas y otras usadas usualmente en el tratamiento de aguas, se presentan en la Tabla 1 (Brix, 1997). *Thypha sp.* y *Scirpus sp.* o una combinación de estas especies, son las dominantes en la mayoría de los humedales artificiales en los Estados Unidos. También existen algunos sistemas con *Carex sp.*, siendo esta última la especie dominante en los humedales artificiales Europeos. Cuando se diseñan sistemas que específicamente buscan un incremento en los valores del hábitat, además de conseguir el tratamiento del agua residual, usualmente se incluye una gran variedad de plantas, especialmente para proporcionar alimentación y nido a las aves y otras formas de vida acuática.

Tabla 1. Especies emergentes más utilizadas en tratamiento de aguas residuales

Familia	Nombre latino	Nombre común	T deseable, °C	Máxima salinidad tolerable, ppm	Rango pH.
Ciperáceas	<i>Carex sp.</i>	-	14 - 32		5 – 7,5
	<i>Scirpus lacustris</i>	Junco de laguna	18 - 27	20	4 – 9
Gramíneas	<i>Phragmites australis</i>	Carrizo	12 - 23	45	2 - 8
Iridáceas	<i>Iris</i>	Lirio			
	<i>pseudacorus</i>	amarillo			
Juncáceas	<i>Juncus sp</i>	Juncos	16 - 26	20	5 – 7,5
Tifáceas	<i>Thypha sp.</i>	Espadaña	10 - 30	30	4 - 10

El aporte natural de los nutrientes a las aguas superficiales es limitado. Sin embargo, la descarga no controlada de desechos sólidos, aguas residuales domésticas e industriales, detergentes hechos a base de fosfatos y el uso excesivo de fertilizantes, provocan un enriquecimiento de nutrientes en las aguas, que promueve su desmejoramiento progresivo, lo que provoca, un fenómeno conocido como eutrofización (del griego “eú”, bien, y “trophé”, alimentación), que es un proceso natural de envejecimiento de agua estancada o de corriente lenta con exceso de nutrientes y que acumula en el fondo materia vegetal en descomposición. Las principales manifestaciones de dicho fenómeno son el rápido crecimiento de malezas acuáticas y algas, la coloración verde grisáceo del agua, la producción de malos olores y la disminución en las concentraciones de oxígeno disuelto (Gerardi, 2002). De hecho, la descomposición de la maleza remueve el oxígeno disuelto del agua haciendo difícil y a veces imposible, la vida acuática. Durante las épocas cálidas la sobrecarga de nutrientes provenientes de las descargas genera el crecimiento acelerado de vegetales, como algas, microalgas, cianobacterias, los cuales, al morir y ser descompuestos por bacterias aeróbicas, provocan el agotamiento del oxígeno disuelto en la capa superficial de agua y causan la muerte de los diferentes organismos acuáticos que consumen oxígeno en los cuerpos de agua (Gerardi, 2002).

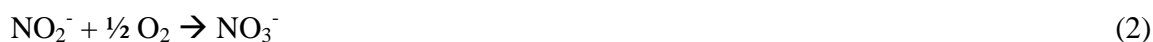
Las bacterias presentes en el humedal son las encargadas de la mayor actividad de eliminación de materia orgánica, nutrientes, entre otros compuestos. Los mecanismos de remoción biológica de nitrógeno incluyen: la desnitrificación, incorporación a tejidos vegetales, la adsorción de amonio, procesos de anamox y la mineralización de nitrógeno orgánico (Plaza de los Reyes, 2010). Siendo la nitrificación el mecanismo microbiano limitante en la eliminación de nitrógeno dado a que se ha encontrado que las mayores eliminaciones se encuentran dadas por procesos de desnitrificación (Plaza de los Reyes, 2010). Las distintas actividades bacterianas de importancia para la eliminación de materia orgánica y nitrógeno se explican a continuación:

1.4.2 Eliminación de materia orgánica

Las bacterias heterótrofas formadoras de biopelículas, junto con las suspendidas en la columna de agua, son las responsables de la degradación de materia orgánica. Las biopelículas son formadas en las superficies de sedimentos, en la vegetación en descomposición y también en una relación simbiótica con los tallos de la vegetación del humedal. Se ha descrito que, en los lugares donde el oxígeno ya es casi nulo, existen procesos asociados a la degradación de materia orgánica por medio de bacterias facultativas o bacterias anaerobias, formando procesos de hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis del sustrato. La principal etapa limitante en el caso de los purines es la hidrólisis, pues la mayor parte de la DQO entrante en este sistema es recalcitrante, ya que la mayor parte biodegradable del efluente es eliminada en el tratamiento secundario, sea por lagunas aeróbicas o anaeróbicas. Además la producción de metano está limitada por la acidificación del medio en la formación de ácidos grasos volátiles, ya que las arqueas responsable de la metanogénesis se inhiben en pH menores a 6,5, además este fenómeno es el causante de la generación de malos olores en el medio ambiente (Kadlec y Wallace, 2008; Chang-Gyun, 2009)

1.4.3 Nitrificación

La nitrificación corresponde a la oxidación biológica del nitrógeno la cual se realiza en 2 etapas: la oxidación de ión amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-), y la del NO_2^- a nitrato (NO_3^-) en presencia de oxígeno, como aceptor de electrones. Las reacciones estequiométricas de esta fase están dadas por:



Esta oxidación es realizada por bacterias nitrificantes, de carácter autótrofas, que requieren de una fuente de carbono inorgánico (como carbonatos: CO_2^- , bicarbonato o HCO_3^-) para realizar el proceso. Las principales bacterias nitrificantes descritas pertenecen al género *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, de características gram-negativas y aerobias estrictas. Aunque las bacterias nitrificantes pueden crecer y reproducirse en presencia de muchos compuestos orgánicos, algunas formas simples de compuestos orgánicos pueden ser causante de inhibición de esta actividad y por ende una pérdida de nitrificación. Estos compuestos inhibitorios incluyen alcoholes y ácidos, o algunos compuestos del grupo amino, como las metilaminas (CH_2NH_2) (Gerardi, 2002).

Para la primera etapa de oxidación del nitrógeno actúan las bacterias amonio oxidantes (BAO), las cuales ocupan el NH_4^+ como fuente de energía. Entre los géneros de BAO se destacan *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, aunque se han descrito un par de bacterias que también estarían participando de este proceso como *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*. Las bacterias *Nitrosomonas* son células esféricas (cocos gram-negativas), de un tamaño aproximado entre 0,5 y 1,5 μm , poseen movilidad, viven en un rango de pH entre 5,8 y 8,5, su reproducción es por fisión binaria, cuyo tiempo de generación es entre 8 a 36 horas, viven en un rango de temperatura que varía de 30° a 35° C y presentan citomembrana (Henze *et al.*, 1997; Gerardi, 2002).

La siguiente fase de la nitrificación es la oxidación de NO_2^- a NO_3^- la cual esta dada por bacterias nitrito oxidantes (BNO), que son principalmente del género *Nitrobacter*, aunque igual que en la fase anterior se han descrito otros géneros que son capaces de cumplir esta misma función como *Nitrosospira*, *Nitrocystis* y *Nitrococcus*. Las bacterias *Nitrobacter* se caracterizan por presentar una forma de bacilos gram-negativos, un tamaño aproximado entre 0,5 y 1,0 μm , no presentar movilidad, como en el caso de las *Nitrosomonas*, su rango de pH es entre 6,5 y 8,5, su reproducción es por germinación, el tiempo de generación es entre 12 a 60 horas y la temperatura en las que crece van de los 32° C a los 42° C. Al igual que las *Nitrosomonas* poseen citomembrana, donde se ha descrito que ocurren los procesos de oxidación del amonio y del nitrito mayoritariamente en este lugar de la célula bacteriana (Ma *et al.*, 2009; Kim, 2007; Prez *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008).

El proceso de la nitrificación se ubica en las zonas con más disponibilidad de oxígeno, esto es próximo a las raíces de las plantas, la capa superficial del sedimento, en general en las partes con mayor contacto con la columna de agua, las zonas bajo las raíces presentan un menor potencial

eléctrico, indicando reacciones de nitrato oxidación o desnitrificación dependiendo del sustrato, si es nitrato o nitrito, respectivamente (Barber, 2009; Kadlec y Wallace, 2008)

1.4.4 Factores asociados a la nitrificación

- *Temperatura*. Un factor relevante para el proceso de nitrificación es la temperatura, ya que las bacterias involucradas son de carácter mesófilas, cuyo crecimiento óptimo se ha descrito entre 28 y 36° C (Bernet y Spérandio, 2009),

- *Oxígeno disuelto (OD)*. La nitrificación es muy susceptible a las bajas concentraciones de oxígeno disuelto u OD, y con esto se puede relacionar las temperaturas óptimas de crecimiento con la cantidad de OD que necesita cada grupo bacteriano, en el caso de BAO necesitan una menor temperatura, ya que estas necesitan de una mayor concentración de O₂ disuelto para el proceso de oxidación del amonio, y como la concentración de O₂ disuelto en el medio son inversamente proporcional a la temperatura, se da preferencia a esta clase de bacterias a temperaturas más bajas. De esta manera es necesario conocer los distintos parámetros y valores que controlan las distintas etapas de la nitrificación, en relación a sus cepas bacterianas para mantener un ambiente óptimo de operación de los sistemas de tratamiento basados en la etapa de nitrificación (Bernet y Spérandio, 2009; Winkler, 1995).

- *pH*. El pH óptimo para la nitrificación ocurre alrededor del pH 7,0 – 7,5 o levemente alcalino (pH = 8,0), en condiciones ácidas la reacción de nitrificación se detiene. El pH tiene un efecto indirecto en el equilibrio químico, especialmente, entre el amonio y el amoniaco (NH₄⁺/NH₃) con una relación de 24:1, respectivamente según la tabla de Wuhrman y Woker, para el pH 8,0, y entre el nitrito y el ácido nitroso (NO₂⁻/HNO₂). Es sabido que el amonio libre y el ácido nitroso pueden inhibir la reacción de nitrificación, en el primer caso se ha descrito que concentraciones entre 10-150 mg/L de amonio causan inhibición de las *Nitrosomonas* y concentraciones entre 0,2-2,8 mg/L de HNO₂ se inhiben las *Nitrobacter* (Bernet y Spérandio, 2009; Winkler, 1995; Ma *et al.*, 2009; Choi, 2007)).

- *Compuestos inhibidores*. Dentro de los compuestos que bajan el crecimiento bacteriano, inhiben la nitrificación bacteriana, o pueden afectar los procesos de una completa nitrificación, se encuentran algunos compuestos orgánicos (compuestos sulfurados, anilinas, fenoles, metales (Cu, Ni, Cr, Zn, Co)) (Hezen, 2002; Bernet y Spérandio, 2009). Estos compuestos pueden actuar a nivel de la oxidación catalítica y los efectos de la inhibición de la mayoría de los compuestos

están dado por competencia con el sitio activo, donde se realiza esta oxidación (Bernet y Spérandio, 2009). En el caso del Cu, se ha descrito que inhibe la actividad de Nitrosomonas en cultivo puro en concentraciones entre 0,05-0,56 mg Cu/L (Henze *et al.*, 1997). En el caso del Zn que es otro metal pesado presente en los purines de cerdom se ha descrito inhibición de bacterias de genero Nitrosomonas en cultivo puro en concentraciones cercanas a 4mg/L (Henze *et al.*, 1997)

- *Cinéticas de crecimiento.* Con los distintos parámetros señalados se han descrito numerosas cinéticas asociadas al crecimiento de bacterias nitrificantes, para Nitrosomonas a 15 °C:

$$\mu_m(T^{\circ}C) = \mu_m(15^{\circ}C) \exp^{0,11(T-15)} \text{ día}^{-1} \quad (1)$$

Siendo μ_m = tasa específica de crecimiento bacteriana máxima (1/día); T=temperatura (°C). Donde $\mu_m = 0,18$ para 15 °C (Winkler, 1995). Otros autores han señalado como $\mu_m = 1,2$ a 35 °C. (Güven, 2008).

El coeficiente de saturación o K_s , para ambas etapas de la nitrificación se puede resumir en:

$$K_s \text{ a } T^{\circ}C = k_s \exp^{0,118(T-15)} \quad (2)$$

Siendo para la oxidación de amoníaco un k_s de 0,405 g(nitrógeno)/m³ a 15° C (Winkler, 1995) y 0,5 g(nitrógeno)/m³ a 35 °C (Güven,2008).

Para el caso de oxidación de nitritos el coeficiente de saturación esta dado por:

$$K_s \text{ a } T^{\circ}C = k_s \exp^{0,146(T-15)} \quad (3)$$

Cuyo k_s para una temperatura de 15°C es 0,625 g(nitrógeno)/m³ y para 35° C es de 1,5 g(nitrógeno)/m³ (Winkler, 1995; Güven,2008).

- *Tipo de plantas.* Dentro de los factores a considerar es la producción de oxígeno disuelto en el humedal por las plantas asociadas a estos sistemas, pues la capacidad de entregar oxígeno por las arénquimas de las macrófitas varía según la especie. En el caso de *Scirpus sp.*, este es capaz de entregar 3,87-15,5 g O₂/m²·d, en el caso de *Typha sp* puede entregar 0,04 g O₂/m²·d al sistema. Dentro de los beneficios de *Typha sp.* se encuentra su capacidad para generar extremidades radiculares permitiendo una mayor formación de biopelículas bacterianas, formando una interacción simbiótica con las plantas y el sistema (Coleman *et al.*, 2000).

En la Tabla 2 se muestra un resumen de las condiciones óptimas de nitrificación tomando como ejemplo las cepas de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* principalmente, pudiendo observar de mejor manera las diferencias entre cada una de ellas (Ma *et al.*, 2009; Kim, 2007; Prez *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008).

Tabla 2. Factores asociados al crecimiento bacteriano de la nitrificación.

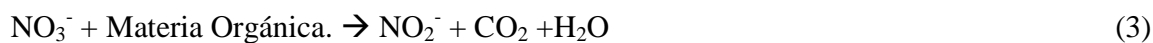
Parámetros	BAO	BNO
OD	> 2,0 mg O ₂ /L	> 0,5 mg O ₂ /L
Temperatura	30-35 °C <i>Nitrosomonas</i>	32-42°C <i>Nitrobacter</i>
pH	5,8 – 8,5	6,5 - 8,5
Alcalinidad	7,1 mg CaCO ₃ /mg N-NH ₄ ⁺ oxidado	_____
Metales Pesados	Cu, Níquel, Cromo, Zn y Cobalto	
Interferentes		

BAO= Bacterias amonio oxidante

BNO= Bacterias nitrito oxidante

1.4.5 Desnitrificación

Siguiendo con el ciclo del nitrógeno la siguiente etapa corresponde a la desnitrificación. Este proceso a diferencia de la nitrificación, esta basada en la reducción del nitrato y nitrito a nitrógeno molecular o N₂, bajo condiciones en ausencia de O₂ (anóxicas). A diferencia de las bacterias anteriores, las desnitrificantes son bacterias heterotróficas, que utilizan como fuente de carbono y energía la materia orgánica. Las principales bacterias desnitrificantes pertenecen a los géneros *Thiobacillus*, *T. desnitrificans*, *Alcaligenes* y *Paracoccus*, entre otras. Además existen organismos de otros reinos como protozoos y algunos géneros del reino fungi, capaces de realizar este proceso (Anh, 2006; Gerardi, 2002). La reacción estequiométrica del proceso de desnitrificación se detalla a continuación:



1.4.6 Factores asociados a la desnitrificación

- *Oxígeno disuelto.* En general un factor que determinan la desnitrificación es la baja disolución de oxígeno, ya que las bacterias que participan de este proceso son anóxicas y en presencia de oxígeno la reacción se inhibe. Se ha descrito que a concentraciones de 0,15 mg/L de O₂ disuelto

las bacterias pertenecientes a *F. canadensis* se inhibe el consumo de nitrato (Cuervo *et. al.*, 2009).

- *Sustrato*. La concentración de óxidos de nitrógenos es relevante, pues estudios con *Alcaligenes odorans* han mostrado que la reacción entre 0,04 y 6,2 g NO₃⁻/L es una reacción de primer orden, a menos que existan acumulación de intermediarios de nitrógeno. Respecto al NO₂⁻ la reacción disminuye bajo concentraciones de 0,27 g NO₂⁻/L (Cuervo *et. al.*, 2009).

- *pH*. Al ser bacterias organotróficas necesitan de iones bicarbonato, por lo tanto la literatura muestra rangos de pH entre 7,0 y 9,0. Se ha descrito que al disminuir el pH se inhibe la desnitrificación al formarse ácido nitroso el cual es muy tóxico para las bacterias. En pH 6 y 7 es generado NO y sobre pH 7 se produce N₂ (Cuervo *et. al.*, 2009; Anh, 2006).

- *Temperatura*. Las temperaturas de desnitrificación se han descrito que ocurren entre los 5 y 35°C siendo el rango más ideal entre los 20 y 35°C, incluso existen consorcios bacterianos que su punto óptimo de crecimiento se encuentra sobre el rango de los 40° C y estas son conocidas como bacterias termófilas (Cuervo *et. al.*, 2009; Anh, 2006; Henze *et al.*, 1997).

- *Relación C/N*. Además como son bacterias heterótrofas, necesitan carbono orgánico para los procesos de reducción de nitritos y nitratos, y esto requiere que la proporción entre carbono orgánico y nitrógeno deba ser > 6 (Anh, 2006; Cuervo *et. al.*, 2009; Henze *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 2000).

El modelo de la desnitrificación se puede representar por el modelo de Monod, teniendo en cuenta los sustratos, donde S= carbono orgánico y N_t= sustratos nitrogenados, y los coeficientes de saturación K_s y K_n. Los coeficientes de saturación del nitrógeno son muy bajos por lo que no se consideran, ósea la ecuación con la que se ha de trabajar es:

$$\mu = \mu_m S / (K_s + S) \tag{4}$$

Los parámetros mostrados en la Tabla 3 indican las condiciones óptimas para el proceso de desnitrificación (Anh, 2006; Henze *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 2000).

Tabla 3. Factores asociados al crecimiento de bacterias desnitrificantes.

Parámetros	Bacterias Desnitrificantes
OD	< 0,1 mg O ₂ /L
Temperatura	30–40 °C
	40-60 °C
pH	7– 9
C/N	> 6

2 HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La actividad microbiana heterótrofa y nitrificante asociada a la reducción de materia orgánica y nitrógeno en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purín de cerdo presenta diferente comportamiento entre la fase superficial y fondo de suelo del humedal y la estación del año.

2.2 Objetivo General

Evaluar la actividad microbiana nitrificante y heterótrofa en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purín de cerdo en la fase superficial y fondo de éste, haciendo un seguimiento en diferentes estaciones del año.

2.3 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar físico-químicamente la columna de agua de un humedal artificial de flujo superficial.
2. Evaluar la actividad microbiana nitrificante en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purín de cerdo
3. Evaluar la actividad microbiana heterótrofa en un humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de purín de cerdo.
4. Comparar el comportamiento de las distintas actividades microbianas heterotróficas y nitrificantes obtenidas en el humedal artificial en la fase superficial y fondo de éste y a diferentes estaciones del año

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Humedal construido

El humedal construido que representa un sistema alternativo para el tratamiento de purines de cerdos, provenientes de un tratamiento secundario, dado por una laguna anaeróbica, se encuentra en el plantel de cerdos del “Fundo San Guillermo”, ubicado en la comuna de Coihueco, Región del Biobío (Figura 2).



Figura 2. Imagen Satelital del humedal del “Fundo San Guillermo” (36°33′19,61″S; 71°51′49,64″W)

3.1.1 Características

El humedal esta constituido por una zona inundada de agua, que tiene una forma similar a la de un reactor flujo pistón, que entre las zonas donde giran los canales, se encuentran divididos por tabiques, que hacen funcionar el medio como un gran sistema batch. Las dimensiones de este humedal son de un largo total de 635 m de largo y 5 m de ancho, con una profundidad de 1 m, con un área útil aproximada de 3175 m² y de un volumen útil de 3175 m³. El humedal está conformado por una geomembrana en el fondo, para impedir fugas de líquidos a las napas subterráneas, a continuación sigue una capa de gravas y sedimentos que sirve de sustento para

todos los seres vivos que habitan en él, incluyendo los microorganismos encargados del tratamiento de las aguas residuales.

El agua es uno de los elementos más importantes de un humedal ya que para que pueda ser considerado como tal ésta debe estar presente casi permanentemente. Debido a su gran extensión y poca profundidad, a diferencia de otros ecosistemas acuáticos, los humedales poseen una fuerte interacción y dependencia con los procesos de evapotranspiración y precipitaciones. Estos procesos afectan su hidrología a veces de manera drástica e incluso pueden influir en su eficiencia para tratar aguas residuales. Este sistema presenta una configuración de flujo horizontal en el cual el agua residual proveniente de la laguna anaeróbica ingresa al sistema manteniéndose en éste durante un periodo de entre 10 a 15 días.

La eficiencia de los humedales como sistemas de tratamiento está condicionada fundamentalmente por la actividad microbiológica que en ellos se lleva a cabo. Es por esto que, al diseñar y construir un humedal artificial, se debe tomar muy en cuenta la creación de un ambiente propicio para el crecimiento de los microorganismos. Es aquí donde entran en juego las plantas macrófitas a utilizar, en este caso las plantas que predomina en este sistema es la especie *Typha angustifolia L.*, aunque también es posible encontrar otras especies como: *Scirpus californicus*. Con esto se pueden encontrar protozoos, bacterias y algas microscópicas que son sólo algunos de los tipos de microorganismos que crecen en los humedales y que se encargan de tratar el agua residual.

3.1.2 Puntos de muestreo

Para la toma de muestras de la fracción líquida del humedal y sedimentos presentes en el sistema, se establecieron puntos de muestreo los que fueron definidos según las características de accesibilidad al sistema, encontrándose el punto de muestreo M1 a la entrada del sistema y el M6 en la salida de éste. Las muestras líquidas fueron tomadas en los puntos M1 al M6 indicados en la Figura 2.

3.2 Análisis de la fracción líquida del humedal

La toma de muestra de la fase líquida del humedal, se hizo en la superficie de la columna de agua, correspondiente a los primeros 15 cm de profundidad, en los que se extrajeron 1,5 L en cada punto de muestreo, y fueron conservadas a 4 °C, para su posterior caracterización físico-

química. Se determinó $DQO_{(T)}$ y $DQO_{(S)}$ (Demanda química de oxígeno, total y soluble) por método fotométrico; ST (sólidos totales); SV (sólidos volátiles); SST (sólidos suspendidos totales); SSV (sólidos suspendidos volátiles); alcalinidad total y parcial (AT y AP); nitrógeno total (NT); amonio ($N-NH_4^+$); nitrito ($N-NO_2^-$); nitrato ($N-NO_3^-$).

3.3 Toma de muestra y caracterización del sedimento del humedal

En las zonas de muestreos M1 a la M6, indicados en la Figura 2, se procedió a extraer muestras de suelo, mediante la utilización de un core de poliuretano (PVC), con dimensiones de 1 m de largo y 10 cm de diámetro. Las muestras que tienen una largo aproximado de 20 cm de diámetro son dispuestas en bolsas herméticas para ser almacenadas a 4 °C, para su posterior medición de actividad heterotrófica, actividad amonio oxidante y actividad nitrito oxidante, de la capa superficial, correspondiente a los primeros 5 cm de la parte superficial del core, y de la capa más profunda, correspondiente a los últimos 5 cm de la muestra de sedimento.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Métodos físico-químicos de caracterización de aguas

Para determinar las características físico-químicas de la fracción líquida del humedal en los distintos puntos de muestreo, se evaluaron distintos parámetros como: DQO_t , DQO_s , ST (sólidos totales), SV (sólidos volátiles), SST (sólidos suspendidos totales), SSV (sólidos suspendidos volátiles), DBO_5 (Demanda Biológica de oxígeno), de acuerdo con los protocolos establecidos en Standard Methods (APHA – AWWA – WPCF, 1985). Otros parámetros evaluados mediante Spectroquant NOVA-60 como: Fosfato (kit Merck, método Phosphor-molybdenum blue, código 1.00613.0001); NT (kit Merck, método Koroleff digestion, 2,6-dimethylphenol, código 1.14729.0001) y NH_4^+ (kit Merck, método Indophenol Blue, código 1.14752.0001). Parámetros como: pH, oxígeno disuelto (OD) y conductividad eléctrica (CE) fueron medidos mediante electrodos (pHmetro: Hi Tech Instruments Modelo PHB-4, conectado a un medidor de pH/mV/°C; OD, Sudelab Modelo DDB-303A; conductivímetro: Hi Tech Instruments Modelo DDB-303A). La alcalinidad (AT y AP), se determinó según lo establecido por Ripley (1986), siendo la AI la diferencia entre la AT y AP.

3.4.2. Actividad nitrificante

El método empleado corresponde a la medición de desaparición de NH_4^+ y NO_2^- , bajo condiciones aeróbicas, para ello a través del líquido se burbujea en continuo aire saturado en agua. Los ensayos se efectuarán en viales de 20 mL de volumen. Para este ensayo se requiere una concentración de biomasa de 2,0 g SSV/L, previamente lavada con buffer fosfato para eliminar iones que pudiesen afectar el ensayo. Se empleará un tampón de fosfato 0,025 M, y un sustrato concentrado. La temperatura de operación se fijará $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y se colocó un sensor de oxígeno y las muestras se tomaron una vez estabilizado el sistema. Aproximadamente a los 5 minutos del inicio del experimento, se inyectará mediante a una microjeringa, 10 μL de una solución concentrada de sulfato amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) 0,25 M y nitrito de sodio (NaNO_2) 0,25 M, según corresponda para los ensayos de actividad amonio oxidante y nitrito oxidante. El ensayo se finalizó antes de llegar al 30% de saturación, lo que ocurre 10 minutos después del inicio del experimento. La actividad específica del lodo, se calculó a partir de la pendiente de la curva de desaparición del sustrato frente al tiempo, y la concentración de biomasa según el método normalizado (Mosquera, 1998, APHA, 1985).

3.4.3. Actividad heterotrófica

El método empleado corresponde a la medición de la desaparición de materia orgánica bajo condiciones aeróbicas, para ello a través del líquido se burbujea en continuo aire saturado en agua. Los ensayos se efectuaró en viales de 20 mL de volumen. Para este ensayo se requiere una concentración de biomasa de 2,0 g SV/ g muestra, previamente lavada con tampón fosfato para eliminar iones que pudiesen afectar el ensayo. Se empleó un tampón de fosfato 0,025 M, y un sustrato concentrado. La temperatura de operación se fijó en $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y se usa un sensor de oxígeno y se tomó muestras una vez estabilizado el sistema. Aproximadamente a los 5 minutos del inicio del experimento, se inyectarán mediante a una microjeringa 10 μL de una solución concentrada de acetato (CH_3COOH) 0,75 M. Se finalizó el ensayo antes de llegar al 30% de saturación y esto ocurre después de 10 minutos del inicio del experimento. Se comprobó la temperatura al finalizar el ensayo. La actividad específica del lodo, se calcula a partir de la pendiente de la curva de desaparición del sustrato frente al tiempo, y la concentración de biomasa según el método normalizado (Mosquera, 1998; APHA, 1985).

Para llevar a cabo estos experimentos de actividad heterotrófica, amonio oxidante y nitrito oxidante, se empleó un sistema de monitorización de oxígeno (BOM, Modelo YSI 5300). En la Figura 3 se muestra el equipo de respirometría empleado. Este sistema está provisto de un electrodo de oxígeno (sensor polarográfico de oxígeno, Modelo YSI 5331) que se encuentra en una celda dotada de un agitador magnético y en la que se realizó el ensayo, el sistema es termostatzado a 22°C.

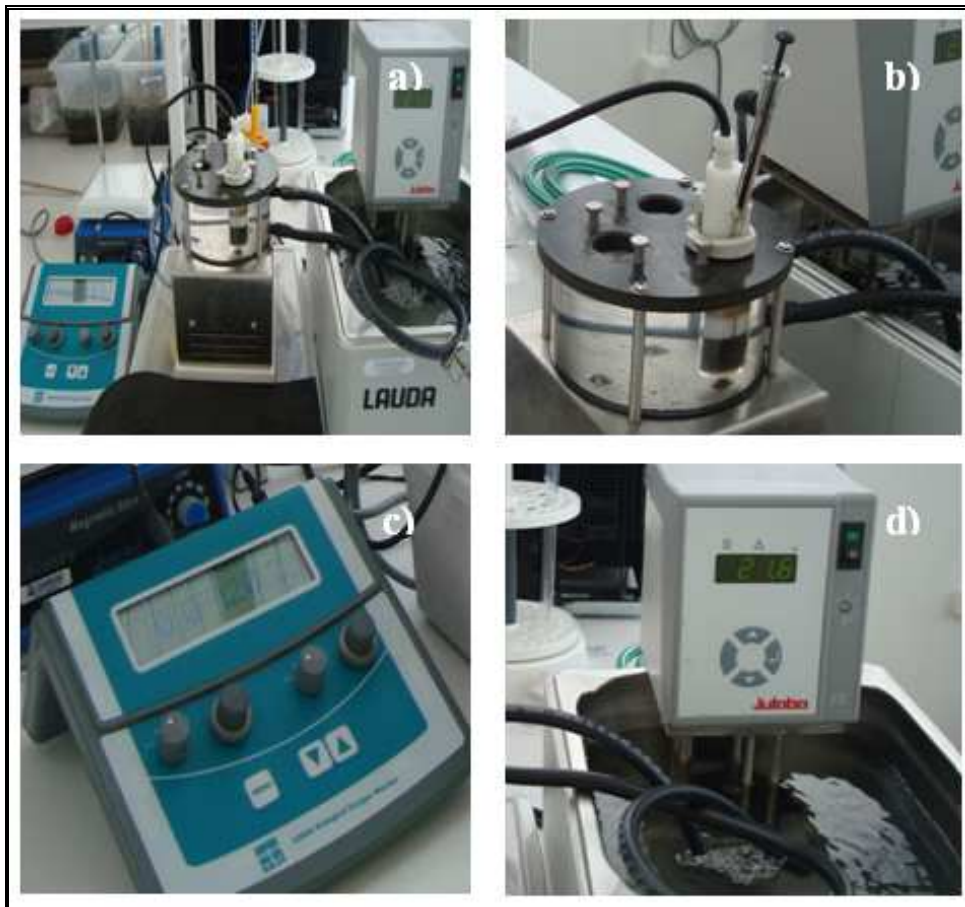


Figura 3. Ensayo de actividad de la biomasa presente en el humedal artificial.) Equipo de respirometría. b) Celda de medición con electrodo de oxígeno e inyección de sustrato, c) Monitor biológico de oxígeno y d) Baño termoregulado.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo

Los resultados obtenidos de la caracterización del efluente antes del ingreso al tratamiento secundario, obtenidos de las muestras de noviembre y diciembre, se presentan en la Tabla 4. El pH del efluente es un pH neutro cercano a 7. Las altas cargas de materia orgánica se representan en la DQO del medio en donde sobrepasan los 30 g /L. Entre los nutrientes se observa una alta carga de nitrógeno sobrepasando los 2 g/L y el amonio presente en el medio también bordean los 2 g/L. En el caso de la alcalinidad se observa una gran capacidad tampón del medio por las altas concentraciones de CaCO₃ como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Caracterización del efluente de estudio

Parámetros	Unidades	Promedio
pH	-	7,27 ± 0,50
DQO _T	g /L	34,90 ± 1,98
DQO _S	g /L	17,99 ± 2,77
NT	mg /L	2.110 ± 68
N -NH ₄ ⁺	mg /L	2.150 ± 70
Alcalinidad total (CaCO ₃)	mg/L	4.678 ± 252
Alcalinidad parcial (CaCO ₃)	mg/L	2.781 ± 44
Alcalinidad intermedia (CaCO ₃)	mg /L	1.897 ± 208

4.2 Caracterización de la fracción líquida del humedal construido

La caracterización del efluente desde el punto M1 al M6 de las muestras tomadas el 23/11/2009, reflejan la variación de los distintos parámetros físico químicos a lo largo del humedal construido, cabe mencionar que en los sectores M1 y M2 la abundancia de plantas es mucho menor con respecto a los sectores M3 al M6, mostrando una mayor variación en cuanto a temperaturas de las muestras tomadas. Se observó que en los sectores M2 y M3 presentaban una alta concentración de microalgas, reflejadas en la DQO con valores 0,388 g DQO/L y la concentración de sólidos totales que se incrementan considerablemente en las zonas mencionadas. Los parámetros medidos en las zonas del humedal se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de la fracción líquida del humedal construido

Parámetros	Unidades	M1	M2	M3	M4	M5	M6
T°	°C	19,1 ± 1,1	18,8 ± 0,9	18,1 ± 0,8	18,0 ± 0,7	18,3 ± 0,7	17,9 ± 0,9
pH	-	7,05 ±0,02	7,47 ±0,02	7,11 ±0,26	7,16 ±0,02	7,16 ±0,10	10,30 ±0,37
DQO _T	mg/L	67,22 ±10,21	388,40 ±21,71	100,79 ±15,01	49,41 ±5,91	117,50 ±12,61	210,11 ±24,71
DQO _S	mg/L	51,82 ±13,46	224,85 ±19,30	77,53 ±10,84	30,82 ±2,62	52,82 ±14,46	161,83 ±4,84
DBO _{5T}	mg/L	0,6	18,0	18,0	3,6	1,8	24,0
N-NH ₄ ⁺	mg/L	6,2	0,3	1,0	1,5	0,5	1,8
ST	g/L	0,125 ±0,020	0,667 ±0,133	1,762 ±0,264	0,311 ±0,062	0,301 ±0,060	0,215 ±0,039
SV	g/L	0,001 ±0,000	0,012 ±0,003	0,014 ±0,004	0,017 ±0,011	0,025 ±0,010	0,035 ±0,012
SST	g/L	0,010 ±0,001	0,098 ±0,021	0,032 ±0,006	0,020 ±0,004	0,012 ±0,007	0,023 ±0,400
CE	μS	0,08 ±0,01	0,10 ±0,01	15,52 ±1,78	7,14 ±7,06	78,39 ±18,83	69,84 ±16,12
P. Redox	Mv	-13,4 ±0,4	-36,3 ±0,6	-17,2 ±0,4	-19,6 ±0,5	-27,2 ±0,5	-186,8 ±15,0

4.3 Caracterización del sedimento del humedal

La fracción sólida del humedal fue caracterizada por el tipo de suelo, presentando características de un suelo arcilloso/limoso, además el % de humedad de suelo y la concentración de sólidos totales (ST) y la relación entre los gramos de sólidos volátiles (g SV) por gramo de sólidos totales (ST) se presentan en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de Humedad y ST de muestra de sedimento.

Zonas	Humedad (%)	ST (g)	SV/ ST
M1	45,52	0,46 ± 0,01	0,139 ± 0,006
M2	45,71	0,46 ± 0,07	0,120 ± 0,003
M3	52,23	0,52 ± 0,66	0,125 ± 0,006
M4	61,89	0,60 ± 0,04	0,152 ± 0,033
M5	62,19	0,62 ± 0,06	0,126 ± 0,022
M6	71,47	0,71 ± 0,03	0,092 ± 0,006

ST: Sólidos Totales; SV: Sólidos Volátiles

4.3.1 Biomasa humedal

Para la obtención de la biomasa del humedal se calcularon los sólidos volátiles de las muestras de sedimento obteniéndose una concentración de biomasa promedio de 0,069 g de sólidos volátiles (SV) por gramo de muestra los detalles se muestran en la columna numero 2 de la Tabla 6. Las muestras líquidas se midieron en sólidos suspendidos volátiles (SSV) por litro (L) con una concentración promedio de 0,0219g/L como se muestra en la tercera columna de la Tabla 7.

Tabla 7. Biomasa del sedimento y de la fracción líquida del humedal

Zonas	Sedimento SV (g)	Efluente SSV (g/L)
M1	0,059 ±0,004	*
M2	0,056 ±0,010	*
M3	0,065 ±0,002	0,008 ± 0,008
M4	0,092 ±0,016	0,015 ± 0,001
M5	0,078 ±0,006	0,060± 0,004
M6	0,066 ±0,002	0,049 ± 0,010

SV: Sólidos Volátiles; SSV: Sólidos Suspendingos Volátiles; *Valores menores a $3 \cdot 10^{-5}$ (g/L) de SSV

Se observó al microscopio la fracción líquida del humedal encontrándose principalmente microalgas, de 2-10 μm pertenecientes a la especie *Chlorella vulgaris* (Figura 4).



Figura 4. Imagen en microscopía *Chlorella vulgaris* encontrada en el humedal artificial.

4.4 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante en el sedimento del humedal

La actividad heterotrófica y nitrificante se determinó a lo largo del humedal y de la variación de la temperatura en tiempo, esta actividad se determinó utilizando como sustrato acetato como fuente de carbono obteniendo una velocidad de utilización del oxígeno (VUO) y amonio y nitrito para observar la actividad nitrificante. En la Tabla 8 se resume la actividad medida en $\text{mgO}_2/\text{mgSV}\cdot\text{min}$ a lo largo del humedal en las distintas fechas de muestreos, los sustratos utilizados y la profundidad de la toma de muestra, que es superficial (S) si corresponde a los primeros 2 cm de la muestra y fondo si está dentro de los 15-20 cm de profundidad, cabe mencionar que en las fechas de Noviembre 2009, Diciembre 2009 y Enero 2010, las temperaturas promedios mensuales antes de los muestreos fueron 16,2°C, 20,8 °C, 22,4 °C, respectivamente.

Tabla 8. Actividad bacteriana a escala espacial y temporal del humedal artificial

		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
Primavera	Actividad heterotrófica	Superficie	0,77(±0,31)	0,24(±0,18)	0,12(±0,06)	0,58(±0,37)	0,07(±0,00)	0,13(±0,08)
		Fondo	0,12(±0,33)	0,23(±0,13)	0,03(±0,05)	0,44(±0,41)	0,09(±0,05)	0,07(±0,02)
	Actividad amonio oxidante	Superficie	0,78(±0,44)	0,37(±0,14)	0,05(±0,05)	0,46(±0,38)	0,04(±0,00)	0,09(±0,06)
		Fondo	0,07(±0,42)	0,21(±0,15)	0,16(±0,04)	0,26(±0,40)	0,37(±0,18)	0,05(±0,03)
	Actividad nitrito oxidante	Superficie	0,53(±0,40)	0,27(±0,08)	0,13(±0,03)	0,64(±0,58)	0,19(±0,00)	0,07(±0,02)
		Fondo	1,60(±0,81)	0,23(±0,13)	0,10(±0,01)	0,46(±0,10)	0,21(±0,06)	0,13(±0,12)
Verano	Actividad heterotrófica	Superficie	0,51(±0,17)	0,25(±0,08)	0,41(±0,41)	0,34(±0,24)	0,29(±0,10)	0,13(±0,02)
		Fondo	0,51(±0,69)	0,19(±0,11)	0,55(±0,27)	0,34(±0,12)	0,14(±0,07)	0,16(±0,09)
	Actividad amonio oxidante	Superficie	0,29(±0,38)	0,40(±0,05)	0,11(±0,06)	0,46(±0,39)	0,19(±0,07)	0,12(±0,03)
		Fondo	0,25(±0,22)	0,25(±0,08)	0,24(±0,14)	0,17(±0,06)	0,36(±0,19)	0,07(±0,03)
	Actividad nitrito oxidante	Superficie	0,28(±0,06)	0,32(±0,14)	0,12(±0,01)	0,49(±0,34)	0,18(±0,07)	0,20(±0,08)
		Fondo	0,03(±0,03)	0,29(±0,09)	0,16(±0,12)	0,24(±0,06)	0,30(±0,29)	0,29(±0,06)
Otoño	Actividad heterotrófica	Superficie	1,35(±0,83)	0,06(±0,03)	0,22(±0,09)	0,09(±0,05)	0,09(±0,07)	0,001(±0,00)
		Fondo	0,08(±0,06)	0,09(±0,05)	0,19(±0,11)	0,13(±0,09)	0,40(±0,40)	0,03(±0,02)
	Actividad amonio oxidante	Superficie	0,73(±0,31)	0,01(±0,00)	0,17(±0,05)	0,03(±0,02)	0,04(±0,01)	0,001(±0,00)
		Fondo	0,08(±0,04)	0,04(±0,01)	0,13(±0,04)	0,04(±0,01)	0,16(±0,11)	0,03(±0,02)
	Actividad nitrito oxidante	Superficie	0,77(±0,37)	0,01(±0,01)	0,21(±0,11)	0,04(±0,02)	0,02(±0,01)	0,001(±0,001)
		Fondo	0,06(±0,05)	0,04(±0,02)	0,12(±0,04)	0,03(±0,02)	0,03(±0,03)	0,12(±0,11)

Medida como mgO₂/mgSSV·min

4.4.1 Actividad heterotrófica y Actividad Nitrificante a lo largo del humedal

La actividad promedio bacteriana de la parte superficial y fondo del sedimento a lo largo del humedal en la época de verano, se presenta en la Figura 5 y la Figura 6, respectivamente.

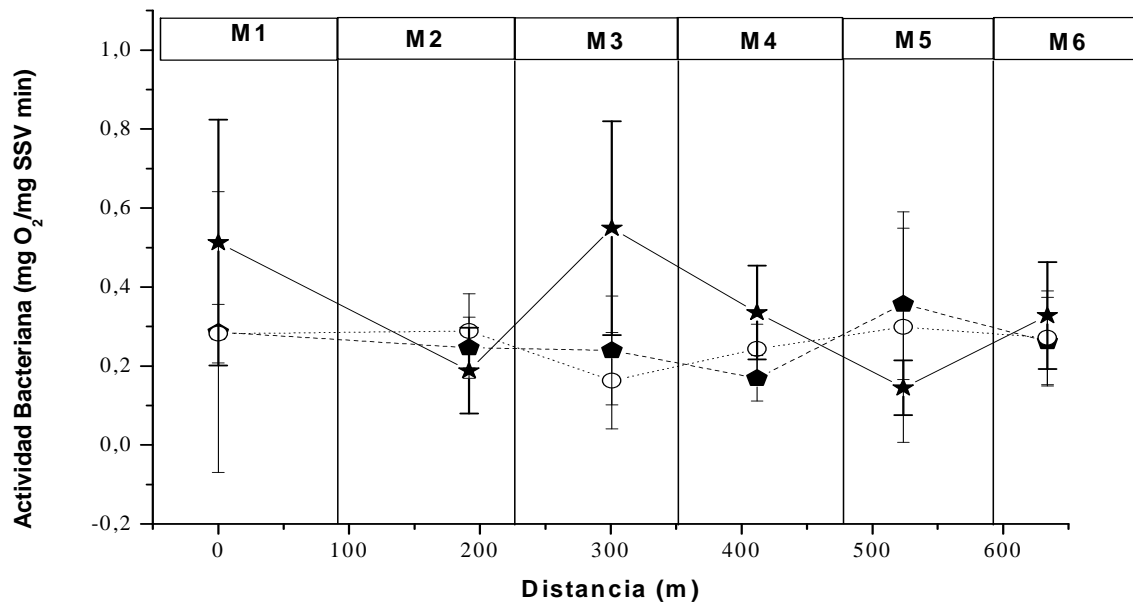


Figura 5: Actividad bacteriana superficial del sedimento a lo largo del humedal.

★ Heterotróficas; ◆ Amonio oxidantes; ○ Nitrito oxidantes

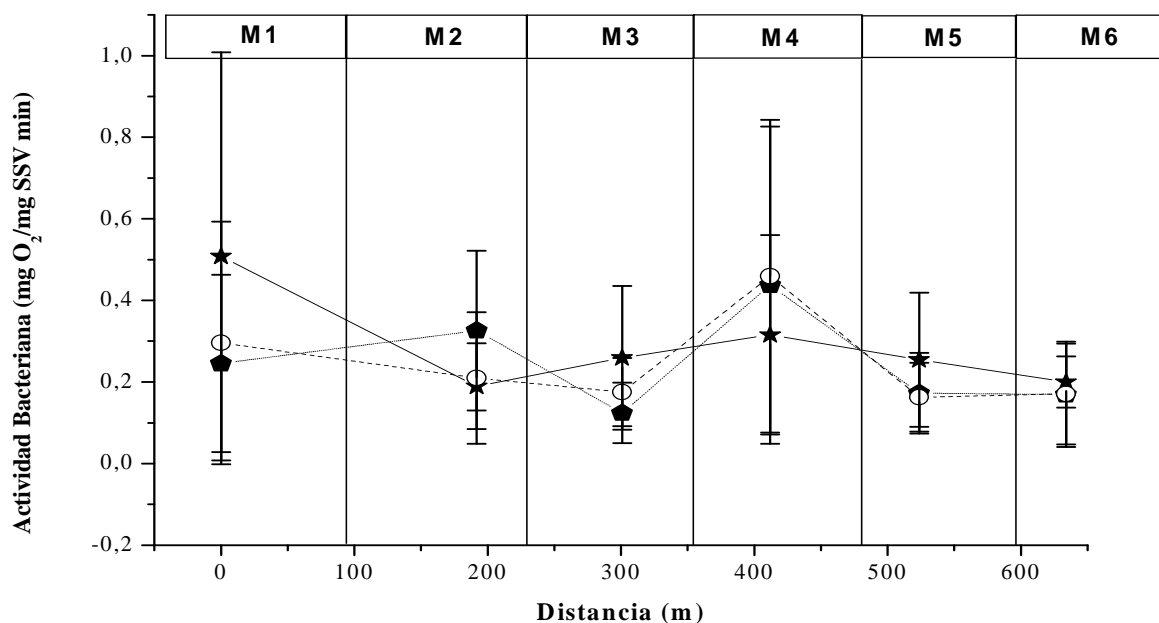


Figura 6: Actividad bacteriana del fondo del sedimento a lo largo del humedal

★ Heterotróficas; ◆ Amonio oxidantes; ○ Nitrito oxidantes

4.4.2 Actividad bacteriana con respecto a la estación del año

En la Figura 7 se muestra la actividad global del sistema en la fase superficial del terreno y la parte del fondo con respecto al avance de la estación de año de los distintos muestreos, mostrando una mayor actividad en el periodo de verano, donde la temperatura promedio de este fue de 18,7° C con mínimas de 7,75° C y máximas de 33,5° C, en la temporada de Primavera el promedio fue de 13,1° C con mínimas de 1,39° C y máximas de 16,44° C, en el caso de la temporada de otoño el promedio de las temperaturas fueron de 11,9° C con mínimas de 1,00° C y máximas de 23° C.

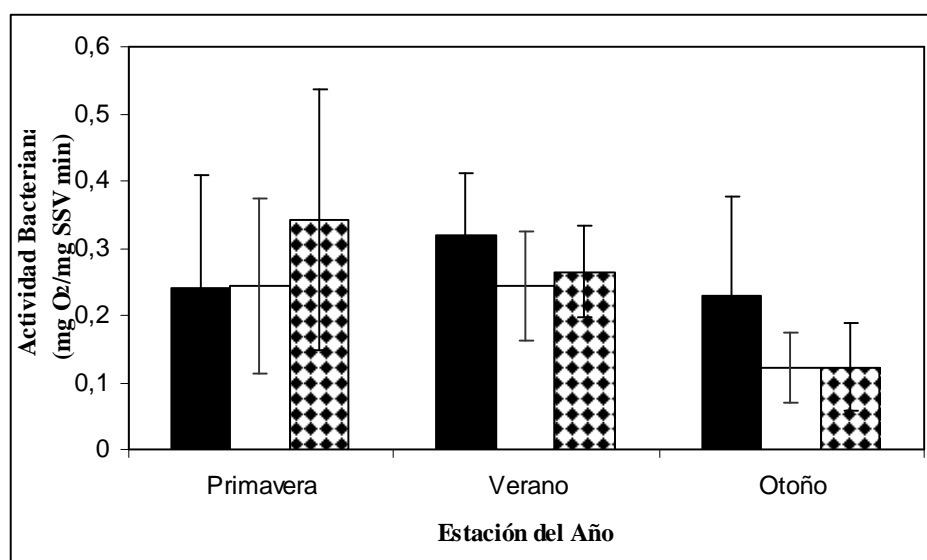


Figura 7. Actividad promedio bacteriana y su relación con la temperatura
■ Heterotróficas; □ Amonio oxidantes ◆ Nitrito oxidantes

4.4.3 Relación entre zonas con plantas y zonas sin plantas

Para observar la diferencia de la actividad entre las zonas con plantas (CP) y las zonas sin plantas (SP) se hizo una relación entre las actividades de estas zonas mostrando los siguientes resultados en la Tabla 9, observando resultados mayores a 1 en todos los promedios de las relaciones mostrando así una mayor actividad en las zonas con presencia de plantas.

Tabla 9. Relación de la actividad bacteriana en las zonas con plantas y zonas sin plantas.

	Zona / Temporada	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Promedio
Actividad Heterotrófica	Primavera	1,743	0,861	3,453	0,225	0,684	1,725	1,448
		(±0,171)	(±0,024)	(±0,060)	(±0,457)	(±0,021)	(±0,039)	(±0,129)
	Verano	3,101	0,934	1,482	0,345	0,414	0,545	1,137
		(±0,370)	(±0,010)	(±0,132)	(±0,233)	(±0,127)	(±0,061)	(±0,155)
	Otoño	4,286	0,795	2,897	0,221	5,160	0,276	2,272
		(±0,629)	(±0,012)	(±0,142)	(±0,101)	(±0,236)	(±0,014)	(±0,189)
Actividad Amonio Oxidante	Primavera	2,900	0,684	0,281	0,295	5,168	1,657	1,831
		(±0,294)	(±0,078)	(±0,082)	(±0,278)	(±0,195)	(±0,024)	(±0,159)
	Verano	3,775	0,849	1,210	0,189	1,592	0,584	1,367
		(±0,218)	(±0,037)	(±0,023)	(±0,301)	(±0,088)	(±0,036)	(±0,117)
	Otoño	2,519	0,674	1,837	0,317	2,713	0,295	1,392
		(±0,248)	(±0,006)	(±0,063)	(±0,023)	(±0,064)	(±0,013)	(±0,070)
Actividad Nitrito Oxidante	Primavera	17,039	0,425	1,248	0,228	2,781	2,335	4,009
		(±1,343)	(±0,187)	(±0,018)	(±0,492)	(±0,132)	(±0,058)	(±0,372)
	Verano	1,365	1,149	1,739	0,279	2,708	1,133	1,395
		(±0,063)	(±0,030)	(±0,055)	(±0,292)	(±0,156)	(±0,022)	(±0,103)
	Otoño	3,080	0,354	2,587	0,318	0,539	0,071	1,158
		(±0,299)	(±0,020)	(±0,103)	(±0,028)	(±0,011)	(±0,077)	(±0,090)

4.4.4 Relación de actividad bacteriana entre zonas superficiales y zonas fondo del sedimento

Para observar la diferencia de la actividad entre las zonas superficial del sedimento correspondiente a los 5 primeros cm y las zonas de fondo correspondientes a los 5 cm del fondo de un core de 20 cm aproximadamente, mostrando los siguientes resultados en la Tabla 10.

Tabla 10. Relación de la actividad en las zonas superficiales/fondo del sedimento del humedal.

	Zona / Temporada	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Promedio
Actividad Heterotrófica	Primavera	6,395	1,050	3,469	1,317	0,768	1,907	2,484
		(±0,461)	(±0,008)	(±0,060)	(±0,099)	(±0,015)	(±0,045)	(±0,115)
	Verano	1,009	1,309	0,744	1,017	1,984	0,861	1,154
		(±0,003)	(±0,041)	(±0,099)	(±0,004)	(±0,101)	(±0,015)	(±0,044)
	Otoño	15,902	0,639	1,114	0,664	0,223	0,023	3,094
		(±0,892)	(±0,022)	(±0,016)	(±0,032)	(±0,222)	(±0,023)	(±0,201)
Amonio Oxidante	Primavera	10,689	1,781	0,282	1,749	0,098	1,651	2,709
		(±0,500)	(±0,116)	(±0,082)	(±0,139)	(±0,237)	(±0,024)	(±0,183)
	Verano	1,165	1,611	0,452	2,696	0,524	1,720	1,361
		(±0,029)	(±0,107)	(±0,093)	(±0,203)	(±0,120)	(±0,036)	(±0,098)
	Otoño	8,864	0,312	1,302	0,789	0,235	0,033	1,922
		(±0,459)	(±0,017)	(±0,028)	(±0,005)	(±0,087)	(±0,022)	(±0,103)
Nitrito Oxidante	Primavera	0,333	0,703	1,250	1,390	0,892	0,524	0,849
		(±0,756)	(±0,081)	(±0,018)	(±0,128)	(±0,016)	(±0,045)	(±0,174)
	Verano	0,954	1,115	0,762	2,014	0,599	0,678	1,020
		(±0,010)	(±0,023)	(±0,027)	(±0,174)	(±0,085)	(±0,067)	(±0,064)
	Otoño	12,695	0,325	1,787	1,182	0,434	0,006	2,738
		(±0,501)	(±0,021)	(±0,066)	(±0,004)	(±0,014)	(±0,088)	(±0,116)

4.5 Capacidad de oxidación de materia orgánica y nitrificante del humedal

La oxidación en el humedal está dada por las bacterias nitrificantes que oxidan el amonio y el nitrito, y bacterias heterotróficas que son capaces de oxidar la materia orgánica. Con la medición de las actividades podemos calcular y observar la capacidad de oxidación que tiene el sistema en el tiempo, generando valores de operación ideales del humedal, en las distintas estaciones del año por el área de cada zona de monitoreo del humedal. Las Tablas 11, 12 y 13 muestran la capacidad total de oxidación de materia orgánica, amonio y nitrito, respectivamente, multiplicado por el área de las zonas, obteniéndose así una capacidad de oxidación total del sistema en un ambiente con oxígeno disuelto saturado para la temperatura de 21 °C, que es de 8,55 mg/L de oxígeno.

Tabla 11. Capacidad de oxidación de materia orgánica por zonas

	Primavera 2009	Verano 2009-2010	Otoño 2010
M1	27,845	27,693	38,823
M2	21,766	19,055	6,311
M3	15,495	30,547	13,135
M4	27,693	21,519	7,083
M5	5,936	13,650	15,608
M6	3,177	4,561	0,542
Total	101,912 ±10,681	117,026 ±9,496	81,502 ±13,465

Medido como: g CH₃COO/min

Tabla 12. Capacidad de oxidación de amonio por zonas

	Primavera 2009	Verano 2009-2010	Otoño 2010
M1	11,469	5,866	8,985
M2	10,444	11,476	0,831
M3	2,961	4,517	3,913
M4	7,865	8,075	0,813
M5	4,619	6,989	2,538
M6	0,895	1,243	0,210
Total	38,253 ±4,231	38,167 ±3,445	17,290 ±3,288

Medido como: g N-NH₄/ min

Tabla 13. Capacidad de oxidación de nitrito por zonas

	Primavera 2009	Verano 2009-2010	Otoño 2010
M1	153,287	48,868	70,129
M2	96,507	83,427	8,027
M3	22,520	28,604	32,876
M4	93,403	72,636	7,490
M5	35,037	47,050	4,931
M6	13,470	24,146	6,137
Total	414,225±54,505	304,731 ±23,504	129,589 ±26,010

Medido como: g N-NO₂ / min

4.6 Humedal

El humedal está constituido por plantas macrófitas en la que predomina en este sistema es la especie *Typha angustifolia*, aunque también es posible encontrar otras especies como: *Scirpus californicus*. En la figura 8 se muestra un seguimiento fotográfico al humedal artificial del fundo San Guillermo de la temporada de primavera-verano, donde se ve el crecimiento de las plantas, la floración en temporada de verano y la reducción de agua en esta última temporada de verano 2010.









Zona	Primavera 2009	Verano 2009- 2010
M1		
M2		
M3		
M4		



Figura 8 Seguimiento fotográfico de operación humedal artificial primavera 2009 - Verano 2010

5 DISCUSION

5.1 Caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo

La caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo evidenció que el efluente de estudio tiene una alta concentración de materia orgánica que se refleja en la alta DQO_T presente en éste, como se observar en la DQO_T de 34,9 g DQO/L, levemente menor presentado por Moral *et al.*(2008), posiblemente por el manejo de los purines y la forma en realizar la limpieza de los planteles. El pH del efluente es muy cercano al pH neutro, bordeando el pH 7,27, por lo que no requiere tratamiento antes de entrar al sistema de laguna anaerobia y posteriormente al humedal artificial. Otra de las características que presentan este tipo de residuos son las altas cargas de nutrientes en este caso la alta carga de nitrógeno total (N_T) 2 g N_T/L, similar a los estudios realizados por Llona y Faz (2006), en el cual el nitrógeno libre se encuentra principalmente en forma de amonio, ya que el pH es cercano a 7 y por esto según la tabla presentada por Wuhrman y Woker (1948) el 99% del nitrógeno libre se encuentra de la forma de amonio y solo el 1% está como amoniaco. El sistema muestra una buena capacidad tampón por la alta concentración de CaCO₃ equivalente presente en el sistema, que es de 4,6 g CaCO₃ /L.

5.2 Caracterización de la fracción líquida del humedal construido

Se caracterizó la fase líquida del humedal desde el punto M1 al M6 donde se evaluaron parámetros fisicoquímicos. Se observa un incremento en la concentración de todos ellos desde el punto M2 en adelante debido a la existencia de microalgas en la fracción líquida desde ese punto al M6 en el muestreo de noviembre de 2009 y la presencia de microalgas en todo el sistema en los muestreos de diciembre 2009 y enero 2010. El aumento de la DQO_T se puede atribuir a la presencia de *Chlorella vulgaris*, que es clasificada dentro de las algas verdes, unicelulares, del Filo *Chlorophyta*. Tiene una forma esférica, cerca de 2-10 µm de diámetro. *Chlorella* puede crecer fácilmente en altos niveles de nitratos y fosfatos y luz solar directa (Parra *et al.*, 1983). El amonio, tiene una reducción desde el la zona M1 que es 6,2 mg de N-NH₄⁺ a 1,8 N-NH₄⁺ en la zona M6, el nitrógeno ocupado por las plantas y la mayoría de las bacterias esta fijado como amonio, quien es transformado a glutamato a través del ciclo de síntesis glutamina sintetasa/glutamato. (Rodríguez-Barrueco *et al.*, 1985). El potencial redox es negativo en la mayoría de las zonas indicando un ambiente preferentemente anóxico donde las reacciones que

predominan en este potencial son amonio oxidantes, ya que el de nitrito oxidante requiere de un potencial redox positivo de 420 mV, en el caso del M6 se da una característica muy negativa, lo que estaría indicando una zona principalmente anaerobia donde el principal aceptor de electrones es el carbono del CH₄ donde el potencial redox es cercano de los -200mV.

5.3 Caracterización del sedimento del humedal

Es un suelo arcilloso con una coloración amarilla, en estado seco, además en el fondo del humedal artificial se encuentra una capa de grava que da soporte a las plantas que aquí habitan. En este suelo se encuentra una mayor cantidad de materia inorgánica que materia orgánica reflejada en el coeficiente dado por el cociente SV/ST cuyo valor es 0,16 (\pm 0,094) el que refleja la mayor concentración de compuestos no volátiles. El sedimento en las zonas más anóxicas M5 y M6 con potenciales redox -27 mV y -186 mV, respectivamente, presentan una coloración más oscura que el de las otras zonas, y un olor característico al de los lodos anaerobios, dando a simple vista una percepción de que está ocurriendo alguna fase de la metanogénesis, además se refleja por el potencial redox de esta zona que es aproximado -200 mV.

5.3.1 Biomasa humedal

Fue estimada por la cantidad de sólidos volátiles en cada zona de muestreo, donde la concertación de sólidos volátiles por gramo de muestra de sedimento se mantuvo relativamente constante a lo largo del humedal, con una concentración promedio de 0,06934 (\pm 0,01223) “g SV/g de muestra de sedimento”. En el caso de las muestras líquidas se observa un incremento de la concentración de sólidos a lo largo del humedal dado principalmente por la presencia de microalgas pertenecientes a la especie *Chlorella vulgaris* (Parra *et al.*, 1983). Debido a la diversidad de actividades microbianas, como nitrificación, desnitrificación, heterotrófica, anamox, entre otras, descritas en los humedales, se presume la existencia de una gran biodiversidad que se encuentra en este humedal artificial y con esto, se puede prever que no se encuentra una selección bacteriana como ocurre en un reactor, existiendo una mayor diversidad de bacterias presente en el medio. Dentro de las actividades microbianas se ha postulado que existe un potencial de respiración el cual se ha calculado poniendo la muestra de suelo en un respirómetro y sin añadirle sustrato se observa la línea basal de respiración endógena de las bacterias presentes (Gagnon *et al.*, 2007). La mayoría de los humedales son considerados en general como sistemas anóxicos (AIT, 2000), pero son numerosos los factores que pueden influir

en el diseño de la condición redox en los humedales, tales como, el subsuelo, tiempo de residencia hidráulico y la profundidad del humedal, el potencia redox tiende a aumentar desde la entrada hasta la salida debido a la biodegradación progresiva de los componentes que representan la materia orgánica (García *et al.*, 2003; Headley *et al.*, 2005), En el caso del humedal para tratamiento de efluentes de purines de cerdo, tiende a mantenerse el potencial, pues las altas cargas de materia orgánica son difícil de degradar en estos sistemas y se observó que en la última zona de muestreo el potencial redox disminuyo considerablemente, pues en esta zona se plantea una acumulación de materia orgánica debido al manejo del humedal. Por ello se postula que es posible encontrar actividad metanogénica en esta zona de muestreo (M6). Por otra parte, el potencial redox tiende a disminuir con la profundidad (García *et al.*, 2003). Sin embargo, el potencial redox con la variación de la profundidad no siempre ocurre, debido a la mezcla vertical de agua a través de la matriz de los humedales (Headley *et al.*, 2005). Es por ello posible encontrar actividad amonioxidante y nitritoxidante en el sedimento del humedal artificial, y posiblemente bacterias como *nitrosomonas* y *nitrobacter*.

5.4 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante en el sedimento del humedal

La actividad bacteriana fue medida por medio de la técnica descrita por Mosquera *et al.* (1998) respirometría. Sin embargo, la actividad de degradación en la columna de agua no fue posible medirla por la presencia de microalgas, las cuales fueron un interferente ya que actuaron como un falso negativo, pues, en vez de degradarse el oxígeno al inyectar el sustrato este aumentaba dando una pendiente positiva, por la fotosíntesis de la microalga *Chlorella vulgaris*, por ello se tomó en cuenta sólo el sedimento para la obtención de actividad bacteriana y se considero que la variación de la columna de agua era baja debido a la mezcla vertical de agua a través de la matriz de los humedales (Headley *et al.*, 2005). Se utilizó acetato de sodio como fuente de carbono para las bacterias heterotróficas, sulfato de amonio para las bacterias amonio oxidantes y nitrito de sodio para la medición de bacterias nitrito oxidantes.

5.4.1 Actividad heterotrófica y actividad nitrificante a lo largo del humedal

La actividad heterotrófica a lo largo del humedal en la parte superficial del sedimento, revela una disminución entre el punto M1 y M2 en un 64%, además cabe mencionar que estas zonas fueron consideradas como zonas de sacrificio, pues las plantas de este sector se había muerto por la alta cantidad de nutrientes y materia orgánica y el mal manejo operacional del sistema; es por ello que

la alimentación en la fecha de muestreo se realizó desde la zona 3. Aquí la actividad heterotrófica llega a un máximo de 0,54 mgO₂/mgSSV·min que tiende a disminuir hasta el punto M6 0,32 mgO₂/mgSSV·min, sin embargo, las actividades en la parte superficial del sedimento del humedal es de 0,34 mgO₂/mgSSV·min, con un rango que varía entre 0,11 y 0,87 mgO₂/mgSSV·min. La actividad amonio oxidante esta en un promedio del humedal de 0,26 mgO₂/mgSSV·min con un rango entre 0,03 a 0,59 mgO₂/mgSSV·min, observando un incremento a lo largo del humedal. En el caso de la actividad nitrito oxidantes, esta se encuentra en el rango promedio de 0,25 mgO₂/mgSSV·min con valores que fluctúan entre los 0,07 y 0,65 mgO₂/mgSSV·min.

En la parte del fondo del humedal, la actividad heterotrófica disminuye desde 0,50 a 0,20 mgO₂/mgSSV·min. En promedio, la actividad heterotrófica de este sector es de 0,24 mgO₂/mgSSV·min con un rango de actividad de 0,03 a 0,70 mgO₂/mgSSV·min. La actividad promedio amonio oxidante en esta parte del muestreo es de 0,24 mgO₂/mgSSV·min con una rango entre 0,01 a 0,68 mgO₂/mgSSV·min. En el caso de la actividad amonio oxidante en el fondo del humedal es de 0,24 mgO₂/mgSSV·min con rangos de actividad que van de los 0,01 a 0,85 mgO₂/mgSSV·min.

Considerando estos resultados se comprobó una mayor actividad en la parte superficial del sistema, posiblemente por la mayor concentración de O₂ disuelto en la columna de agua

5.4.2 Actividad bacteriana con respecto a la estación del año

La presencia de bacterias heterotróficas en el mundo se encuentra en un gran rango de temperatura, que va desde los 0° a 87°C, teniendo el óptimo crecimiento bacteriano a los 37° C. Sin embargo, la mayor actividad en las bacterias aeróbicas heterotróficas se encuentra entre los 0 y los 20°C por la concentración de oxígeno disuelto en el medio, pues a mayor temperatura la concentración de oxígeno disuelto es menor. En el caso de la actividad heterotrófica presente en el humedal, se alcanzó, en el periodo de verano 0,31 mgO₂/mgSSV·min a una temperatura promedio de 18,7° C

La actividad amonio oxidante optima en un ambiente controlado se alcanza a los 35° C para *nitrosomonas* y entre los 35° a 42°C en *nitrobacter* 0,15 mgO₂/mgSSV·min (Molano, 2004). En el caso del humedal se observó que la mayor actividad se vio en la temporada de primavera 0,24 mgO₂/mgSSV·min con una temperatura promedio de 13,1 °C manteniendo la actividad en la

temporada de verano y en el caso del otoño esta actividad descendió a la mitad 0,12 mgO₂/mgSSV·min, dado principalmente por la disminución de plantas y temperatura en el humedal.

En el caso de las bacterias nitrato oxidantes la máxima actividad se alcanzó en época de primavera 0,34 mgO₂/mgSSV·min, con temperaturas promedio de 13,1 °C con mínimas de 1,36 °C y máximas de 16,44 °C, además se puede dar explicación a estos valores, pues en estas fechas fue donde se encontró mayor cantidad de fracción líquida en el humedal, ya que en las temporadas de verano y otoño la evaporación del humedal fue mayor, viéndose reflejada en la cantidad de agua presente en este, habiendo secciones secas del humedal y partes húmedas.

5.4.3 Relación entre zonas con plantas y zonas sin plantas

Uno de los objetivos de este estudio es ver la relación que existe entre las zonas con y sin presencia de plantas. La Tabla 9 muestra una relación entre 2 parámetros, donde se observa que la actividad promedio en las distintas estaciones y zonas los valores son mayores a 1, mostrando que existe una mayor actividad en las zonas más cercanas a los sectores con plantas, aumentando en aproximadamente un $1,77 \pm 0,88$ el promedio de la actividad entre zonas en las que se encuentran colonizadas por plantas y las que no. En general los humedales tienen un promedio de $3,04 \pm 1,76$ mgO₂/L disuelto, siendo este mayor en las zonas con presencia de plantas, ya que a la difusión pasiva del oxígeno se suma el entregado por las plantas que dependiendo de la especie son capaces de entregar mayor o menor cantidad de oxígeno al medio. En el caso de *Sirpus sp.* ésta planta entrega concentraciones de oxígeno que va desde los 2,3 a 11,1 mgO₂/m²d, donde la mayor cantidad son entregas en las raíces apicales, las de color blanco. Por otro lado el caso de *Typha sp.* puede entregar alrededor de 0,04 mgO₂/m²·d. Las bajas concentraciones de oxígeno entregadas por las plantas no son suficientes para satisfacer la demanda de oxígeno total para la oxidación de materia orgánica y de nutrientes como es el caso del nitrógeno, es por esto que estos sistemas deben ser tratados como sistemas anóxicos o sistemas combinados aeróbicos-anóxicos. (Achintya *et al.*, 2005; Cassandra *et al.*, 2005)

5.4.4 Relación de actividad bacteriana entre zonas superficiales y zonas de fondo del sedimento

Se creó un coeficiente que relaciona la actividad bacteriana entre las zonas superficiales o cercanas a la columna de agua y las zonas del fondo del sedimento, lo que muestra que existe una mayor actividad en la zona superficial, por la mayor aireación existente en esta. En la literatura encontramos un potencial redox alrededor de los + 300 mV, en el humedal el potencial redox disminuye a un ambiente preferentemente facultativo, donde el potencial se encuentra bajo los 0 mV hasta los -36 mV, donde los últimos aceptores de electrones son el NO_3^- y el Fe^{3+} a excepción de la zona de muestreo 6 que es de -186 mV, postulando que en esta zona es anaeróbica donde el aceptor de electrones es el SO_4^- y ocurre formación de metano (Kadlec y Wallace, 2009), el olor producido en el humedal en la zona de muestreo número M5 y M6, es un primer indicio de la presencia de bacterias metanogénicas en este sector.

En la época de otoño, las bacterias heterotróficas alcanzan una mayor actividad en la zona superficial, una posible causa es que las bajas temperaturas permiten mayor concentración de oxígeno disuelto en la parte superficial del sedimento, alcanzado una actividad 2,3 veces mayor en la superficie que en el fondo. Para el caso de las bacterias amonio oxidante el mayor valor se obtiene en época de primavera que es 1,8 veces mayor en la zona superficial. Lo mismo sucede con las bacterias nitrito oxidantes, el índice de mayor actividad en la zona superficial se alcanza en período de primavera y llega a ser 4,0 veces mayor la actividad en la zona superficial que la del fondo. Sin embargo existe un punto perteneciente a la zona de muestreo M1 que sobrepasa en 12 veces el valor promedio, si no se considera este periodo igual lo situamos como en el que la actividad promedio superficial es mayor en el período de primavera en 1,4.

5.5 Capacidad de oxidación de materia orgánica y nitrificante del humedal

La capacidad de oxidación de materia orgánica calculada multiplicada por el área del humedal nos da la capacidad de oxidación total del humedal. En este caso resulta un total de 100,14 g CH_3COO^- /min en los 3175 m² del humedal. Sin embargo, la literatura se obtiene que la degradación de materia orgánica en esta misma área es de 24,6 g CH_3COO^- /m², si se multiplicara por el área y lo transformamos a minutos obtenemos que la actividad en la literatura es de 54,23 g CH_3COO^- /min siendo menor a lo obtenido en este trabajo, posiblemente la baja concentración de SSV, las elevadas concentraciones de interferentes como: metales pesados Cu, Zn pueden inducir

o provocar la formación de óxidos en bajas concentraciones, que afectan a los resultados, que con la baja concentración de SSV aumentan considerablemente los errores producidos en estas mediciones. Otros interferentes son compuestos específicos tales como: antibióticos, probióticos, entre otros, utilizados como promotores de crecimiento y/o para evitar enfermedades (Peralta, 2005; Asprocer, 2009; Anh, 2006).

Además se observó que el consumo de nitrógeno interno de un humedal es bajo comparado con la eliminación externa del nitrógeno en forma de N_2 o N_2O , por lo que las eficiencias de eliminación internas son bajas. La oxidación de amonio, en el mejor de los casos descrito en el libro de Kadlec y Wallace (2009), sería que en el sistema eliminara 2,29 g $N-NH_4$ /min, muy alejado de lo que se obtuvo que fue 31,23 g $N-NH_4$ /min, se sigue sobreestimando los resultados por los supuestos antes mencionado, la baja concentración de SSV e interferentes del sistema.

Para el caso de la nitrito oxidación, los valores son igualmente sobreestimados, en este caso la actividad heterotrófica es de 282,84 g $N-NO_2$ / min, siendo que, en literatura la máxima eliminación de NO_2 que se ha descrito es de 28,27 g $N-NO_2$ / min. No obstante los promedio de la literatura son anuales, por lo que se está obviando la temporada de invierno donde la actividad de la vegetación entra en estado de senescencia y con ella la actividad bacteriana debiese disminuir, así que, si consideráramos las bajas temperaturas, estaríamos acercándonos a valores más cercanos a los encontrados en literatura. (Kadlec y Wallace, 2009)

6. CONCLUSIONES

- La caracterización fisicoquímica del efluente de purín de cerdo evidenció que el efluente de estudio tiene una alta concentración de materia orgánica que se refleja en la alta DQO presente en este, obteniéndose un valor de 34,9 g DQO/L, y altas concentraciones de nutrientes como es el caso de nitrógeno (2 g N_T/L).
- Se pudo constatar que existe una mayor actividad en las zonas superficiales que en las zonas de fondo del humedal construido instalado. En el caso de las actividades heterotróficas existe una relación promedio de hasta 2,3 veces mayor en zonas superficiales respecto de zonas de fondo. Por su parte, la actividad amonio oxidante y nitrito oxidante alcanza a ser 1,8 y 1,4 veces mayor en zonas superficiales respecto de zonas de fondo del humedal en cuestión, respectivamente.
- Respecto de la influencia de la temperatura sobre la actividad microbiana, se determinó que la mayor actividad se produjo en temporada de verano con 0,31 mgO₂/mgSSV·min para bacterias heterotróficas, primavera-verano de 0,24 mgO₂/mgSSV·min para actividades amonio-oxidantes y primavera para actividades nitrito oxidantes con 0,34 mgO₂/mgSSV·min.
- Respecto de la comparación de actividad bacteriana entre zonas con planta y sin ellas, se puede concluir que para las 3 actividades estudiadas se detectó actividad de 1,77 veces mayor en zonas con de plantas versus zonas sin presencia de ellas.
- De acuerdo a este estudio, se pudo determinar, que las bacterias heterotróficas presentan una mayor actividad que las nitrificantes, debido a la elevada concentración de materia orgánica en el medio (DQO_T >1 g/L) y a la características de la cinéticas de crecimiento de estas bacterias.
- Debido a lo antes indicado se acepta la hipótesis planteada en este trabajo.

7. CONSIDERACIONES FUTURAS

De acuerdo a la metodología empleadas, se obtuvo valores de actividades bacterianas (heterótrofas, amonio oxidante y nitrito oxidante) elevados comparados con la literatura. En el caso de actividades heterotróficas, los valores determinados son 1,84 veces mayores que en literatura, en el caso de las amonio oxidantes 9,27 veces superior, mientras que en el caso de nitrito oxidantes es de 10,00 veces mayor. A la luz de estos resultados, se sugiere la implementación de un método alternativo al utilizado (Mosquera, 1998). Es muy probable que debido a la gran biodiversidad de la cadena trófica que presenta el humedal (por ejemplo, presencia de microalgas), los componentes de las muestras seleccionadas presentan elementos de interferencias para las medidas, lo que no hace válida la metodología seleccionada en este estudio.

8. REFERENCIAS

- Achintya B., Tian Z., 2005. Quantification of oxygen release by bulrush (*Scirpus validus*) roots in a constructed treatment wetland. *Biotechnology and Bioengineering* Volume 89, Issue 3, pages 308–318
- Ahn, Y.-H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41: 1709-1721.
- Ahn, Y.-H y Choi, H.-C. 2006. Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochemistry*, 41: 1945-1950.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Pollution Control Federation (WPCF). 1985. Standard methods for examination of water and wastewater 16th ed. Washington.
- Asprocer. 2008. Alternativas para el manejo de purines. *Asociación gremial de productores de cerdo*, 32 pp.
- Babot, D., Andrés, N., de la Peña, L., Chávez, E. 2004. Técnicas de gestión medioambiental en producción porcina. Proyecto Trama, 135 pp.
- Beltran, C., Bornhardt, C., Muñoz, C., Antileo, C. 2008. Operación continua de un reactor de biopelícula nitrificante mediante un sistema de control supervisor de pH y oxígeno disuelto. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
- Bernet, N., Delgenes, N., Akunna, J. C., Delgenes, J. P., Moletta, R. 2000. Combined anaerobic-aerobic SBR for the treatment of piggery wastewater. *Water Research*, 34: 611-619.
- Bernet, N., Spérandio, M. 2009. Principles of nitrifying processes. In *Environmental Technologies to treat Pollution*. IWA Publishing, 512 pp.
- Brix, H. 1987. Treatment of wastewater in the rizosphere of wetland plants-the root zone method. *Water Science and Technology*, 19: 107-118.
- Brix, H. 1998. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?. *Water Science and Technology*, 35: 11-17.
- .
- Cassandra L., Li Zhang T., y Mitsch.W., 2008. Aquatic metabolism as an indicator of the ecological effects of hydrologic pulsing in flow-through wetlands. *Ecological Indicators* Volume 8, Issue 6, November 2008, Pages 795-806

- Chamy, R., Carrera, J., Jeison, D., Ruíz, G. 2003. Avances en biotecnología ambiental: tratamiento de residuos líquidos y sólidos. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Segunda Edición, 255 pp.
- Coleman, J., Hench, K., Garbutt, K., Sextone, A., Bissonnette, G., Skousen, J. 2000. Treatment of domestic wastewater by three plantspecies in constructed wetland. Department of Biology, West Virginia University, Morgantown, 128: 283-295.
- Cuervo-López f., Martínez S., Texier A., Gómez A. 2009. Principles of denitrifying processes. In: Environmental Technologies to treat Pollution. IWA Publishing, 512 pp.
- Gabiatti, N., Zacharias, N., Schmidell, W., Kunz, A., Soares, H. 2009. Comparação entre os sistemas de digestão anaeróbia e nitrificação/desnitrificação no tratamento de águas residuárias da suinocultura. I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais, Florianópolis, Brasil, 607 pp.
- Gagnon, V., Chararenc, F., Comeau, Y., Brisson, J. (2007). Influence of Macrophytes Species on Microbial Density and Activity in Constructed Wetlands. *10th IWA International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control*, p. 249-254
- Choi, E., Yun, Z., Chung, T. 2004. Strong nitrogenous and agro-wastewater: current technological overview and future direction. *Water Science and Technology*, 49: 1–57.
- García, J., Ojeda, E., Sales, E., Chico, F., Píriz, T., Aguirre, P. y Mujeriego, R. (2003). Spatial variations of temperature, redox potencial, and contaminants in horizontal flow reed beds. *Ecological Engineering* 21: 129-142.
- Gerardi, M. 2002. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. *Wastewater Microbiology Series*, 193 pp.
- Headley T., Herity F. and Davison L., 2005. Treatment at different depths and vertical mixing within a 1-m deep horizontal subsurface-flow wetland. *Ecological Engineering* 25: 567-582.
- Henze, M. 2002. Basic biology processes. In: *Wastewater treatment – Biological and Chemical Processes*, Springer Editorial 65-129.
- Jianlong, W. 2008. Nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in a sequence hybrid biological reactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16: 778-784.
- Kadlec, R., and R. Knight (1996), *Treatment Wetlands*. Boca Raton. New York.USA. pp

- Kadlec R. y Wallace S., 2009 Treatment Wetland, Second Edition. Taylor & Francis Group, 1021 pp.
- Kim, J.-H., Guo, X., Park, H.-S. 2008. Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochemistry*, 43: 154–160.
- Llona, C. M. and Faz, C. A., 2006. Efectos en el sistema suelo-planta despues de tres años de aplicación de purín de cerdo como fertilizante en un cultivo de Brocoli. Efectos en el sistema suelo-planta, 41-51. Universidad Católica de Temuco, Chile y Universidad Politecnica de Cartagena, España.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Ma, Y., Peng, Y., Wang, S., Yuan, Z., Wang, X. 2009. Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant. *Water Research*, 43: 563–572.
- Molano A. 2004. Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter sp.*, *Rhizobium ssp.*, *Azospirillum sp.*) para un sistema para un sistema de compost windrow, *Umbral Científico*, Fundación Universitaria Manuela Beltrán, Colombia, Número 5
- Mosquera C., A. 1998. Eliminación biológica de carbono y nitrógeno de efluentes de la industria conservera de productos marinos. Tesis para optar al grado de Doctor, Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa A., Moreno-Caselles, J., Paredes, C. and Rufete B., 2008. Salinity, organic content, micronutrients and heavy metals in pig slurries from South-eastern Spain. *Waste Management*, 28: 367-371.
- Peralta, J. 2005. Recomendaciones técnicas para la gestión ambiental en el manejo de purines de la explotación porcina. *Colección de Libros INIA* (Instituto de Investigación Agropecuarias), N°18, 204 pp.
- Plaza de los Reyes, C., Vidal, G., 2007. Humedales construidos: una alternativa a considerar para el tratamiento de aguas residuales. *Tecnología del Agua*, 288: 34-48
- Plaza de los Reyes, C., Vera, L., Salvato, M., Borin, M., Vidal, G. 2010. Consideraciones para la eliminacion de nitrogeno en humedales artificiales. Enviado: *Tecnología del Agua*

- Prez, R., Gal, A., Dosta, J., Mata-Ivarez, J. 2007. Biological nitrogen removal (BNR) using sulfides for autotrophic denitrification in a sequencing batch reactor (SBR) to treat reject water. *Industrial & Engineer Chemical*, 46: 6646-6649.
- Rodríguez-Barrueco, C. Sevillano García, F. Subramaniam, P. 1985. La fijación de nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. Centro de Edafología y Biología Aplicada de Salamanca. Temas monográficos. número 16.
- Rozzi, A. 1986. Parámetros de operación y control de los procesos anaerobios. 3^{er} Seminario: Depuración anaerobia de aguas residuales. Valladolid.
- Svengsouk, L, Mitsch, W. 2001. Dynamics of mixtures of *typha latifolia* and *schoenoplectus tabernaemontani* in nutrient-enrichment wetland experiments. *American Naturalist*, 145: 309-324.
- Stottmister, U., Wiebner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kastner, M., Bederski, O., Muller, R.A., Moormann, H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22: 93-117.
- Winkler, M. 1995. Eliminación de nitrógeno y fósforo. Tratamiento biológico de aguas de desecho. Editorial Limusa, S.A. 338 pp.
- Zaror, C. 1998. Introducción a la ingeniería ambiental para la industria de procesos, Universidad de Concepción, Chile, 498 pp.
- Zeng, W., Peng, Y.- Wang, S., Peng, C. 2008. Process control of an alternating aerobic-anoxic sequencing batch reactor for nitrogen removal via nitrite. *Chemical Engineer Technology*, 31: 582–587.

Páginas Web

- Asociación gremial de productores de cerdos, Asprocer. Último acceso abril de 2009. www.asprocer.cl.
- Instituto Nacional de Estadísticas, INE. Último acceso abril de 2009. www.ine.cl.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma me han ayudado a finalizar este trabajo exitosamente, y de forma especial:

Agradecer el esfuerzo y la paciencia de mi familia, por acompañarme, apoyarme y entenderme con cada decisión que he tomado en mi vida, sea buena o mala, ellos siempre están ahí. A mi madre Elia Navarrete Garrido por su apoyo incondicional y creer siempre en mi, a mi padre Sergio Badillo Ortiz, por su esfuerzo y preocupación, a mi hermano Claudio Badillo por dar la gota de tranquilidad en los momentos más duros.

Quiero agradecer enormemente a mi tutora Gladys Vidal, por recibirme y confiar en mí, en la oveja negra de su familia, pero siempre creyendo en que hay un diamante en bruto dentro de mí, por abrir las puertas de su grupo de investigación y enseñarme que trabajar en grupo, el esfuerzo y la dedicación son las mejores armas para triunfar.

Al grupo de Biotecnología Ambiental del EULA, por mostrar una gran familia capaz de cosechar no solo publicaciones, si no, sentimientos de compañerismos. A Marisol Belmonte por entregarme sus conocimientos de nitrificación-desnitrificación y por ser una madre en los momentos difíciles, a Catalina Plaza de los Reyes por ser una gran tutora en el tema de humedales y una excelente amiga, agradecer también a Daniela López, Soledad Chamorro, Jaqueline Decap, Guillermo Pozo por el ánimo entregado siempre y por el tiempo que me dedicaron más de alguna vez.

Quiero agradecer de forma especial a mis compañeros de carrera Guillermo Fernández, Ángela Seguel, Cindy Figueroa, Pía Oyarzúa por ser de gran apoyo, preguntarme cada segundo por cuando terminaras la tesis, por insistirme en que debo finalizar un ciclo, por ser un grupo especial y con el que se puede contar para cualquier cosa.

Al Consejo Nacional de Producción Limpia por otorgarme un premio de mención honrosa del concurso “Tesis sobre Producción Limpia en la Región del Bío-Bío 2009”, que me facilitó bastante sobre el desarrollo experimental del trabajo realizado.