

**Evaluación de la fitorremediación como alternativa de tratamiento de
aguas contaminadas con hidrocarburos**

**JANNETH ASTRID CUBILLOS VARGAS
MAESTRÍA EN ECOTECNOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
PEREIRA
OCTUBRE DE 2011**

**Evaluación de la fitorremediación como alternativa de tratamiento de
aguas contaminadas con hidrocarburos**

**Tesis de maestría presentada a la escuela de postgrados
Facultad de ciencias ambientales
Universidad Tecnológica de Pereira**

**Janneth Astrid Cubillos Vargas
Cod. 24.694.469**

**Director
Dr. Ing. M.Sc. Diego Paredes Cuervo**

**Pereira
Octubre de 2011**

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me brindaron un apoyo en el desarrollo de la investigación y en carrera profesional: a mi familia, a los estudiantes de la Escuela de Tecnología Química: Cesar Espinoza y Ferney Velasco, al personal de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Universidad, al Laboratorio de Procesos Biológicos y al Laboratorio de Aguas, al Grupo de Investigación en Agua y Saneamiento y a la Escuela de Posgrados de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira.

A mi Director Dr. Ing. MSc. Diego Paredes Cuervo, por su orientación, confianza y apoyo en las diferentes etapas de la investigación, así como en mi proceso profesional. Al Dr. Peter Kuschik del Helmholtz Center for Environmental Research-UFZ, Leipzig, Alemania, por su orientación.

Finalmente, y no menos importante quiero agradecer a COLCIENCIAS por la financiación de la investigación y a la Universidad Tecnológica de Pereira por su soporte en el desarrollo de la misma.

CONTENIDO

| | | |
|------|---|----|
| 1 | RESUMEN..... | 1 |
| 2 | INTRODUCCION..... | 2 |
| 3 | JUSTIFICACIÓN | 5 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 7 |
| 4.1 | Objetivo General..... | 7 |
| 4.2 | Objetivos Específicos | 7 |
| 5 | HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN | 7 |
| 6 | REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 8 |
| 6.1. | Hidrocarburos derivados del petróleo..... | 8 |
| 6.2. | Mecanismos para la Fitorremediación de hidrocarburos..... | 11 |
| 6.3. | Rutas de degradación de hidrocarburos en humedales | 16 |
| 6.4. | Humedales construidos para el tratamiento de aguas contaminadas | 17 |
| 6.5. | Necesidades de nutrientes en la fitorremediación de hidrocarburos | 26 |
| 6.6. | Experiencias de humedales con agua contaminadas con hidrocarburos | 27 |
| 7 | MATERIALES Y METODOS | 30 |
| 7.1. | Descripción del experimento | 30 |
| 7.2. | Programa de monitoreo..... | 31 |
| 7.3. | Diseño experimental..... | 32 |
| 7.4. | Análisis estadístico..... | 33 |
| 8 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| 8.1 | <i>Resultados etapa I – Sin adición de hidrocarburos (HTP)</i> | 35 |
| 8.2 | <i>Resultados etapa II – Con adición de hidrocarburos (HTP)</i> | 44 |
| 8.3 | <i>Remoción de hidrocarburos en los humedales experimentales</i> | 57 |
| 8.4 | <i>Análisis Microbiológicos</i> | 64 |
| 9 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 69 |
| 10 | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 71 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características de biodegradación de hidrocarburos del petróleo..... | 10 |
| Tabla 2. Procesos de fitorremediación aplicados a diferentes contaminantes | 15 |
| Tabla 3. Medición de parámetros | 32 |
| Tabla 4. Factores de estudio..... | 32 |
| Tabla 5. Arreglos resultantes | 32 |
| Tabla 6. Variables del experimento | 33 |
| Tabla 7. Hipótesis estadísticas planteadas en la investigación..... | 34 |
| Tabla 8. Estadística descriptiva - agua residual afluyente Fase I..... | 35 |
| Tabla 9. Valores promedio parámetros medidos en campo | 36 |
| Tabla 10. Reducciones de materia orgánica en las unidades experimentales Fase I..... | 39 |
| Tabla 11. Transformaciones de nitrógeno en las unidades experimentales..... | 42 |
| Tabla 12. Resultados ANOVA Fase I: Eficiencia de remoción de DBO ₅ (%) | 44 |
| Tabla 13. Resultados prueba post- hoc: Eficiencia de remoción de DBO ₅ (%) | 44 |
| Tabla 14. Resultados ANOVA Fase I: Eficiencia de remoción de NT (%) | 44 |
| Tabla 15. Resultados prueba post- hoc: Eficiencia de remoción de NT (%) | 44 |
| Tabla 16. Estadística descriptiva - agua residual afluyente Fase II..... | 45 |
| Tabla 17. Valores promedio parámetros medidos en campo Fase II..... | 46 |
| Tabla 18. Reducciones de materia orgánica en las unidades experimentales Fase II..... | 48 |
| Tabla 19. Reducciones de nitrógeno en las unidades experimentales fase II | 53 |
| Tabla 20. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de DBO ₅ (%)..... | 56 |
| Tabla 21. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de NT (%)..... | 56 |
| Tabla 22. Estadística descriptiva concentraciones y cargas de hidrocarburos..... | 58 |
| Tabla 23. Remociones de carga de HTP | 60 |
| Tabla 24. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de HTP (%)..... | 61 |
| Tabla 25. Resultados muestreo HTP interior de humedales | 62 |
| Tabla 26. Balance de masas para hidrocarburos | 63 |
| Tabla 27. Resultados análisis microbiológicos..... | 65 |
| Tabla 28. Resultados descriptivos Coliformes (expresados como unidades Log) | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Simbiosis plantas-microorganismos en sistema de fitorremediación | 13 |
| Figura 2. Esquema de mecanismos de remoción en fitorremediación..... | 16 |
| Figura 3. Clasificación de los humedales según Stottemeister <i>et al.</i> , (2003). A, laguna con plantas flotantes; B, Humedal de flujo horizontal superficial con plantas emergentes; C, Humedal de flujo horizontal subsuperficial; D, Humedal de flujo vertical. | 20 |
| Figura 4. Desarrollo de pelos radiculares para mayor área de adhesión de microorganismos | 25 |
| Figura 5. Esquema sistema de tratamiento experimental | 30 |
| Figura 6. Comportamiento del caudal Fase I | 37 |
| Figura 7. Comportamiento del pH Fase I..... | 37 |
| Figura 8. Comportamiento de la temperatura Fase I..... | 37 |
| Figura 9. Eficiencias de remoción de materia orgánica | 39 |
| Figura 10. Cargas orgánicas | 39 |
| Figura 11. Concentraciones de DQO afluentes y efluentes de los humedales..... | 40 |
| Figura 12. Concentraciones de DBO ₅ afluentes y efluentes de los humedales | 40 |
| Figura 13. Concentraciones de SST afluentes y efluentes de los humedales | 41 |
| Figura 14. Concentración promedio especies | 43 |
| Figura 15. Cargas superficiales de nitrógeno promedio Fase I..... | 43 |
| Figura 16. Comportamiento del caudal Fase II | 46 |
| Figura 17. Comportamiento del pH Fase II..... | 47 |
| Figura 18. Comportamiento de la temperatura Fase II..... | 47 |
| Figura 19. Evolución de las macrófitas con la adición del hidrocarburo - Fase II | 47 |
| Figura 20. Comportamiento de eficiencias de DQO | 49 |
| Figura 21. Comportamiento de eficiencias de DBO ₅ | 49 |
| Figura 22. Eficiencias de remoción de materia orgánica Fase II | 50 |
| Figura 23. Cargas orgánicas Fase II | 50 |
| Figura 24. Concentraciones de DQO afluentes y efluentes de los humedales Fase II..... | 50 |
| Figura 25. Concentraciones de DBO ₅ afluentes y efluentes de los humedales Fase II | 50 |
| Figura 26. Concentraciones de SST afluentes y efluentes..... | 51 |
| Figura 27. Eficiencias de remoción de materia orgánica – HF Fase II | 51 |
| Figura 28. Cargas orgánicas – HF Fase II..... | 51 |
| Figura 29. Concentraciones de DQO, DBO ₅ y SST afluentes y efluentes..... | 52 |
| Figura 30. Concentración promedio especies de nitrógeno – HSSP y HSSC Fase II | 54 |
| Figura 31. Cargas superficiales de nitrógeno – HSSP y HSSC Fase II | 54 |
| Figura 32. Concentración promedio especies de nitrógeno – HF Fase II | 54 |
| Figura 33. Cargas superficiales de nitrógeno – HF Fase II | 54 |
| Figura 34. Gráfico de Perfil: Remoción DBO ₅ | 57 |
| Figura 35. Gráfico de Perfil: Remoción NT | 57 |
| Figura 36. Muestras con HTP para análisis en laboratorio..... | 58 |
| Figura 37. Equipo Soxhlet -cuantificación de HTP | 58 |
| Figura 38. Residuo de HTP en proceso de cuantificación..... | 58 |
| Figura 39. Comportamiento de las concentraciones afluentes y efluentes..... | 59 |
| Figura 40. Cargas aplicadas de HTP..... | 60 |
| Figura 41. Eficiencias de remoción logradas | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 42. Gráfico de Perfil: Remoción HTP..... | 62 |
| Figura 43. Comportamiento del HTP en los humedales a 1.5m de distancia desde el afluente. | 63 |
| Figura 44. Comportamiento del HTP en los humedales a diferentes distancias desde el afluente. | 63 |
| Figura 45. Toma de muestra para análisis microbiológico HSSP | 65 |
| Figura 46. Toma de muestra HSSC | 65 |
| Figura 47. Siembra de microorganismos degradadores de HTP..... | 65 |
| Figura 48. Siembra de microorganismos anaerobios..... | 65 |
| Figura 49. Recuento de microorganismos..... | 66 |
| Figura 50. Remoción de Coliformes Totales (expresados como unidades Log) | 67 |
| Figura 51. Remoción de E. Coli | 67 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1.Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase I | 81 |
| Anexo 2.Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase I | 81 |
| Anexo 3.Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 82 |
| Anexo 4.Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 82 |
| Anexo 5.Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase II | 83 |
| Anexo 6. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase II | 83 |
| Anexo 7.Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 84 |
| Anexo 8.Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 84 |
| Anexo 9. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de HTP. Fase II | 85 |
| Anexo 10.Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 85 |

1 RESUMEN

A lo largo de los años, la explotación, producción, transporte, almacenamiento y comercialización de hidrocarburos del petróleo y sus derivados, se han convertido en una problemática ambiental debido a los grandes vertimientos de combustibles que se generan. Las complejas características que presentan estos compuestos los ha clasificado como contaminantes primarios (USEPA, 2001), ya que por su solubilidad en el agua pueden ser fácilmente movilizados, incrementando la posibilidad de ser incorporados en otros ambientes, ingeridos por el hombre y dar origen a enfermedades (ATSDR, 1999). Ante esta situación, diferentes alternativas convencionales y biológicas se han aplicado con el fin de reducir el efecto que dichos vertimientos ocasionan y para ello, investigadores a nivel mundial se han enfocado en evaluar la fitorremediación como una solución que por su costo–efectividad y aporte paisajístico pueden ser usados para biorremediar estas aguas mezcladas con combustibles, reduciendo el riesgo de contaminación de los ríos y quebradas.

Con este proyecto de investigación realizó la evaluación de la aplicabilidad de la fitorremediación como alternativa tecnológica para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos (HC) procedente del petróleo, bajo las condiciones propias de Risaralda, especialmente como una posible solución a las descargas líquidas generadas en las estaciones de servicio en el departamento. Para ello se adecuaron en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira, tres humedales construidos a nivel piloto sembrados con *Phragmites sp*, que permiten realizar una comparación sobre el efecto de la reducción del contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), DBO₅ y Nitrógeno total, bajo diferentes condiciones operativas, usando dos humedales de flujo subsuperficial plantado y sin plantar y un humedal flotante (floating wetlands).

Los humedales construidos con matriz de suelo demostraron remover hidrocarburos totales de petróleo, logrando eficiencias superiores al 50 % en aguas contaminadas con altas concentraciones de estos compuestos. Los principales procesos de remoción que tuvieron lugar en la reducción del contenido del HC, se asociaron a la volatilización de los compuestos, la absorción y retención en el medio filtrante, además a los procesos microbiológicos llevados a cabo dentro de los humedales. El humedal sin matriz de suelo y plantas sembradas, no mostró tolerancia a los hidrocarburos.

En términos de remoción de materia orgánica (DBO₅), el humedal con matriz de suelo y plantas (HSSP) sugirió ser el sistema más efectivo, ya que durante el periodo de funcionamiento logró eficiencias de remoción superiores al 92 % ($p < 0.05$). Los humedales con medio filtrante no presentaron diferencias significativas en las tasas de remoción de nitrógeno y por otra parte, la adición del hidrocarburo no afectó la remoción de este compuesto.

2 INTRODUCCION

El constante ingreso de sustancias químicas derivadas del petróleo al medio ambiente, no solo ha mejorado el nivel de vida del hombre, sino también ha generado una directa e indirecta acumulación de estos compuestos en el agua, suelo o aire, que actualmente, se constituye en una problemática ambiental que afecta a la salud humana y al ecosistema. En el sector petrolero se generan problemas de contaminación a causa de la producción de combustibles o sus derivados en las plantas petroleras, incluso en la comercialización, transporte, almacenamiento y manipulación, donde se pueden generar fugas en los tanques de almacenamiento y/o derrames, creando grandes impactos debido a la solubilidad que presentan en el agua, los hidrocarburos y sus derivados.

En términos de salud pública, la movilidad de los hidrocarburos por medio del agua, pueden causar afectación, dada su toxicidad al ser ingeridos o permanecer en contacto prolongado con estos; según la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades de los Estados Unidos (ATSDR, 1999), los hidrocarburos pueden originar problemas en el sistema nervioso central, el sistema inmunológico, neumonía, cáncer y otros.

Los vertimientos de combustibles en las actividades de comercialización, se constituye en uno de los mayores impactos en este sector petrolero, ya que estos compuestos principalmente en las estaciones de servicio no reciben un adecuado tratamiento cuando son expuestos al suelo o agua (con las especificaciones técnicas necesarias), y por lo tanto, son dispuestos de forma no idónea. Lo anterior conduce a problemas de contaminación por escurrimiento de aguas que posteriormente, se dirigen al alcantarillado en zonas urbanas, y al suelo o quebradas en zonas rurales. Del mismo modo, en los casos de eventuales derrames de combustibles, generalmente estos son lavados y el agua producto de esta limpieza, finalmente llega a las fuentes hídricas de las cuales se realiza el abastecimiento humano.

En Colombia, el procesamiento del petróleo ha generado contaminación de los recursos hídricos (superficial y subterráneos) debido a los derrames de hidrocarburos que se presentan desde hace ya varios años, algunos como accidentes de transporte de combustible y otros que han obedecido a ataques terroristas contra las instalaciones petroleras (Benavides *et al.*, 2006); uno de los eventos más representativos para el país, fueron los ataques al oleoducto Caño Limón Coveñas, que generó un derrame de cerca 3000 barriles de petróleo (Miranda, 2005).

En el contexto de Risaralda, los derrames de hidrocarburos generalmente no obedecen a eventos accidentales, sino a los ocasionados en las estaciones de servicio. Al año 2007 en el departamento, se cuenta con cerca de 70 Estaciones de Servicio, de las cuales el 20 %

tienen más de 20 años en funcionamiento con equipos que cuentan con un periodo de uso extenso y en consecuencia algún grado de deterioro; además, no cuentan con estrategias de contingencia como accesorios o tanques contenedores para el caso imprevisto de derrames (CARDER y UTP, 2007).

Dentro de las actividades realizadas en estas estaciones, no solo se encuentra la venta de combustibles líquidos, sino también se incluyen servicios de lubricación, lavado general y/o motor, servicio de diagnóstico, trabajos menores de mantenimiento automotor, venta y cambio de lubricantes, baterías y accesorios (Ministerio de Medio Ambiente, 1999). Las anteriores actividades, habitualmente originan vertimientos que se caracterizan por contener grasas y aceites, hidrocarburos, sólidos suspendidos, detergentes y concentraciones variables de metales, los cuales por medio de lavado y precipitación son conducidos a la red de alcantarillado y fuentes hídricas superficiales. Dichas descargas, ocasionan precipitados, una reducción de la concentración de oxígeno disuelto en el agua y la generación de una película densa que disminuye la difusión del oxígeno de la atmósfera hacia el agua, impidiendo el paso de luz.

En Colombia, la reglamentación existente sobre los vertimientos de hidrocarburos y sus derivados se basa en el decreto 4741 del año 2005 y la Ley 253 de 1996, en los cuales clasifican las emisiones de aceites e hidrocarburos mezclados con agua como residuos peligrosos, según el anexo I y II (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005). Así mismo, en términos de derrames de petróleo, se cuenta con el Decreto 1594 de 1984 (hoy decreto 3930 de 2010) que prohíbe el vertimiento de residuos líquidos provenientes del lavado de vehículos sin tratar (Art. 95), y obliga a las estaciones de servicio a contar con planes de contingencia para la prevención y control de derrames de hidrocarburos (Art. 96).

Sin embargo, la normas actuales no restringen específicamente el contenido de hidrocarburos totales en el agua, ya que solo la resolución 2115 de 2007 en el artículo 5, reconoce como sustancia que posee efecto adverso a la salud a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). No obstante, toda esta reglamentación no es de estricto cumplimiento, debido a la poca investigación existente en el país respecto a los posibles aplicaciones de tratamiento para estos residuos generados en las estaciones de servicio.

A nivel mundial, diferentes tecnologías han sido evaluadas para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, pero no obstante el uso de tratamientos fisicoquímicos donde se emplea carbón activado, microorganismos, sustancias químicas, aire y otros, implican relativos altos costos de inversión y operación (Sursula *et al.*, 2002) que dificultan su aplicación. La fitorremediación es una alternativa emergente, que representa un menor costo-efectivo, posee ventajas estéticas, captura gases efecto invernadero, no requiere de una fuente de energía diferente a la solar y tiene una gran aplicabilidad bajo diferentes rangos de concentración de contaminantes (Schnoor, 1997; Guendy, 2008).

La fitorremediación se basa entonces, en el uso de plantas y su interacción con los microorganismos que se ubican en la rizósfera, con el fin de remover, transformar, secuestrar o degradar sustancias contaminantes contenidas en el suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas (Susarla *et al.*, 2002); es por esto que los humedales construidos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos de compleja degradación.

Los sistemas de humedales han sido empleados desde la década de los 50`s y a través de los años han sido perfeccionados en términos de sus diseños para lograr mejores eficiencias en el tratamiento de las aguas residuales, por esta razón, han sido evaluados con diferentes tipos de residuos como aguas residuales domésticas, lixiviados de rellenos sanitarios, aguas de escorrentía y provenientes de actividades de agricultura (Vymazal, 2005; Kadlec and Wallace, 2009). Recientemente, y como respuesta de los alcances logrados con estos sistemas, los humedales construidos han sido también evaluados para tratar aguas residuales provenientes de diferentes tipos de industrias, dado su componente de sustancias tóxicas y de difícil degradación; tal es el caso de las industrias relacionadas con procesamiento de metales, minería, papel, petróleo y explosivos (Haber *et al.*, 2003).

Estos humedales han sido catalogados como sistemas naturales por su combinación de plantas, suelo, agua y microorganismos, con lo cual se busca crear condiciones apropiadas para la descomposición de los contaminantes, una vez son sometidos a los procesos bajos los cuales operan estos sistemas (filtración, sedimentación, adsorción, precipitación química, entre otros); Brix (1994), los clasifica según su tipo de flujo y vegetación dominante, siendo durante años los humedales de flujo horizontal subsuperficial los mas empleados; aunque recientemente, gran interés ha surgido por los humedales flotantes como una innovación de los diseños convencionales.

La problemática de contaminación de aguas por residuos de hidrocarburos, aunque ha sido considerablemente estudiada a nivel europeo, requiere de evaluación en las condiciones del trópico, lo que demuestra la necesidad de investigar en el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, empleando soluciones económicas, factibles y sencillas como la fitorremediación.

La presente investigación, fue desarrollada en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira, con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de la fitorremediación para reducir el contenido de hidrocarburos procedentes del petróleo en las aguas residuales, como una futura solución para las estaciones de servicio del departamento de Risaralda.

3 JUSTIFICACIÓN

El aumento de la demanda de combustibles y la notable aparición de estaciones de servicio nuevas en el departamento de Risaralda, ha convertido los compuestos derivados del petróleo en sustancias de alto interés a nivel ambiental y de salud pública, dado su nivel de toxicidad y persistencia en el ambiente. Los derrames accidentales que durante años han contaminado suelos y aguas con hidrocarburos, y los vertimientos de aguas mezcladas con combustibles generados durante las actividades diarias en las estaciones de servicio, ahora requieren de una pronta remediación, ya que la presencia de estos no solo afectan la capa superficial del suelo y las fuentes hídricas superficiales por disposición o escorrentía, sino que también puede ser fácilmente desplazado hacia las capas freáticas, alterando las características de las aguas subterráneas.

En el año 2005, el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, en la búsqueda de soluciones que reduzcan el impacto generado al medio ambiente por vertimiento y disposición no adecuada de residuos peligrosos, ha creado "la política ambiental para la gestión integral de residuos o desechos peligrosos (RESPEL)", dentro de los cuales se encuentran los residuos de hidrocarburos. Esta condición, aumenta la relevancia de la exploración de tecnologías de tratamiento que fortalezcan la investigación y minimicen los impactos al medio ambiente debido a este tipo de residuos.

Es en este sentido entonces, que surge la necesidad de atender la problemática generada por la inadecuada disposición de los vertimientos producidos en estaciones de servicio de gasolina, principalmente a nivel urbano, donde se concentra el mayor número de las estaciones del departamento (CARDER y UTP, 2007); y por consiguiente, el empleo de la fitorremediación como alternativa de tratamiento de aguas contaminadas con combustibles puede aportar una solución económica, eficiente y viable para reducir el aporte contaminante de estos compuestos a las fuentes de agua, de donde este recurso es captado para el abastecimiento.

Los humedales construidos a pesar del largo tiempo que han sido evaluados alrededor de todo el mundo, son sistemas complejos que aun no tienen bien definidas las condiciones óptimas de funcionamiento bajo todos los tipos de residuos contaminantes existentes, es por esto que falta conocimiento en el área y así mismo, bajo el tratamiento de agua contaminadas con hidrocarburos, los humedales construidos no han sido acogidos por el sector petrolero, ya que son considerados como una caja negra donde se desconocen los procesos de remoción que en ellos ocurren y las bases de diseño y operación exactas para garantizar un buen funcionamiento (Emeka, 2008).

Es por esto que durante esta investigación, se pretende contribuir de manera positiva a la comunidad científica que trabaja con humedales construidos y al sector petrolero,

empleando esta Ecotecnología para investigar el efecto de la variación a la tecnología en el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, mediante la comparación del uso de un humedal flotante con plantas "floating wetland", un humedal de flujo subsuperficial plantado y un humedal de flujo subsuperficial sin plantar, para aportar un referente a nivel departamental y nacional, y cubrir las deficiencias de información existente respecto a experiencias sobre el tema en el país (bajo condiciones de clima tropical).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la aplicabilidad de la fitorremediación como alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos (HC).

4.2 Objetivos Específicos

- Establecer la influencia de la configuración de tres humedales construidos, sobre las eficiencias de reducción de materia orgánica (DBO_5) y de nitrógeno total (NT) en el tratamiento de aguas residuales.
- Evaluar las eficiencias de remoción de hidrocarburos totales logradas en un humedal flotante y humedales construidos de flujo subsuperficial.
- Determinar el efecto de la presencia de hidrocarburos totales sobre las tasas de remoción de nitrógeno total y DBO_5 .

5 HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Las hipótesis planteadas para la investigación son:

- La ausencia de matriz de suelo en los humedales flotantes, permite una mayor reducción del contenido de hidrocarburos por procesos de evaporación.
- La presencia de hidrocarburos totales incide en la reducción del contenido de nitrógeno y DBO_5 en los humedales, afectando la salud de las plantas y la efectividad del tratamiento.

6 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

6.1. Hidrocarburos derivados del petróleo

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por átomos de hidrogeno y carbono. Estos compuestos se definen porque presentan características físico-químicas de acuerdo a su estructura molecular y al número de átomos que los conforman. Según los grados API (densidad del hidrocarburos) que poseen, son clasificados y tienen un aspecto característico, algunos de ellos son claros y livianos y se evaporan fácilmente y otros, son líquidos densos y oscuros que no son evaporados (United States Department of Health and Human Services, 1999).

En general, los hidrocarburos se encuentran divididos en tres grupos: acíclicos cuya fórmula química es C_nH_{2n+2} y sus cadenas son abiertas; cíclicos saturados de fórmula general C_nH_{2n} con cadenas cerradas, y los hidrocarburos cíclicos no saturados más conocidos como hidrocarburos aromáticos, C_nH_{2n-6} (Chow, 1997), cuya base estructural es el anillo bencénico como el BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, monoaromático) o los PAHs (Naftaleno, Fenantreno y Antraceno, poliaromáticos) (Universidad de Antofagasta, 2005).

Los hidrocarburos totales derivados del petróleo (HCTP) están comprendidos por compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos, los cuales a pesar de su alto peso molecular, cuentan con un gran potencial de absorción y son más fácilmente degradados y mineralizados bajo condiciones aerobias (Imfeld, *et al.*, 2009). Estos compuestos y sus derivados (gasolina, keroseno, aceites, combustibles y parafinas, asfaltos, entre otros) si bien, son muy usados en procesos industriales, domésticos, agrícolas y de transporte, también generan aportes contaminantes al agua, aire y suelos. Su ingreso al medio ambiente no solo es debido a su uso en actividades humanas, sino también a causa de accidentes industriales, comerciales o privados y del mismo modo, por derrames o escapes en las estructuras de extracción, conducción y almacenamiento. Estos últimos son los eventos más frecuentes y los que contribuyen más daño al ambiente, ya que alteran las características y propiedades de aguas superficiales y subterráneas, así como de sedimentos (United States Department of Health and Human Services, 1999).

Los combustibles de mayor uso (diesel, gasolina corriente, entre otros) se caracterizan por la presencia de una gran variedad de hidrocarburos que contienen múltiples componentes orgánicos con diferentes grados de solubilidad, de allí que su comportamiento difiera uno de otro; tales como los compuestos del BTEX que son altamente móviles en el ambiente mientras que los componentes de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), generalmente se adhieren al suelo permaneciendo atrapados en una fase orgánica (Kamath *et al.*, n.d.).

La gasolina por ejemplo, presenta hidrocarburos de cadenas cortas de alcanos entre 6 – 10 carbonos, como n-alcanos, isoalcanos, isopentanos, 2,3-dimetilbutano, n-butano y n-pentano; así como cicloalcanos (ciclobutano – ciclodecano) y compuestos aromáticos volátiles como hidrocarburos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno); los PAHs se encuentran en una menor proporción debido a su alto peso molecular. El diesel es un compuesto que posee hidrocarburos con cadenas entre 10 – 20 carbonos, tiene una mayor proporción de cicloalcanos y PAHs, y también tiene presencia de BTEX aunque en menor concentración; el diesel es más denso, menos volátil y menos soluble (hidrofóbicos) y por ende es menos móvil que la gasolina (Kamath *et al.*, n.d; Huaiquilaf, 2008).

Los hidrocarburos monoaromáticos (BTEX) son un importante compuesto de la gasolina, que comprenden entre el 10 y 59 % de su peso, siendo el tolueno la sustancia predominante (Celis, 2009; Vieira *et al.*, 2007). Los BTEX son más solubles en agua (low Kow: 1.8 a 3.2) que los compuestos cíclicos de alto peso molecular, y por lo tanto pueden desplazarse con facilidad en medios acuosos. Son fácilmente biodegradados bajo condiciones donde hay disponibilidad de oxígeno (EPA, 1994) pero sin embargo, pueden ser degradados bajo condiciones anaerobias. Phelps and Young, en el año 1999 en una investigación realizada en Estados Unidos para la remoción anaerobia de BTEX y gasolina en sedimentos acuáticos encontró que estos compuestos pueden ser degradados vía reducción por aceptadores de electrones (nitrato, sulfato, carbonato y hierro). Así mismo, Kadlec and Wallace (2009), reportan que los BTEX pueden ser fácilmente removidos vía volatilización debido a su naturaleza, enfatizando que el uso de humedales de flujo superficial pueden ser una buena alternativa para ello.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) constituye un amplio grupo de hidrocarburos compuestos por 2-7 anillos de benceno, se caracterizan por tener una baja solubilidad en agua ($\log Kow > 4$) y baja volatilidad, por lo que pueden tener una vida media en el ambiente desde semanas hasta varios años (Sverdrup *et al.*, 2003); los PAHs de bajo peso molecular (2-3 anillos de benceno) pueden ser fácilmente degradados por procesos biológicos, mientras que los de alto peso molecular pueden ser resistentes a la degradación microbiana e hidrofóbicos (Sun *et al.*, 2010). Estos hidrocarburos están ampliamente distribuidos en el ambiente y tiene efectos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos, ya que son compuestos recalcitrantes y bioacumuladores (Haritash and Kaushik, 2009), por lo que son motivo de atención respecto a métodos de degradación. Los PAHs pueden ser fácilmente encontrados en derrames, filtraciones y vertimientos de combustibles.

En general, los hidrocarburos con mayor solubilidad en agua son los más fácilmente biodegradables, mientras que aquellos compuestos con mayor peso molecular (cadenas más largas o con anillos) son menos solubles en agua y tienen tasas de biodegradación más lentas. Según Kadlec and Knight (1996), las principales rutas para la remoción de

hidrocarburos por medio de humedales son la volatilización, la degradación biológica o microbiana, la oxidación fotoquímica, la sedimentación, la adsorción, la filtración y precipitación química. Los alcanos son principalmente degradados por volatilización mientras que los compuestos aromáticos por ser más solubles en agua no se evaporan con facilidad.

En la tabla 1, se presentan las características de tratabilidad de algunos hidrocarburos.

Tabla 1. Características de biodegradación de hidrocarburos del petróleo (Fuente: Nope, 2007).

| Tipo | Características de tratabilidad |
|---|--|
| Alcanos | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Por ser HC lineales son los más biodegradables. ▪ Alcanos con número de carbonos de 5C a 10C inhiben la degradación cuando están a altas concentraciones. ▪ 30 % del crudo del petróleo son n-alcanos y alcanos ramificados con tamaño de 1 a 10 átomos de carbono |
| Alquenos | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Biodegradabilidad poco conocida. |
| Cicloalcanos (Hidrocarburos cíclicos) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Su biodegradabilidad tiende a decrecer con el incremento del número de anillos en su estructura. ▪ Son menos degradables que sus isómeros de cadena lineal pero más degradables que PAHs |
| Aromáticos | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiene estructuras basadas en la molécula del benceno (compuesto más simple), tolueno, etilbenceno y los tres xilenos. ▪ Presenta altas pérdidas abióticas (volatilización). |
| Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Consiste en dos o más anillos de benceno, en el cual se encuentran incluidos 16 contaminantes prioritarios, algunos de los cuales se sospecha que son cancerígenos. ▪ Un incremento en peso molecular y el número de anillos en su estructura produce un decremento en la solubilidad y volatilidad e incrementa la capacidad de adsorción. |

El efecto de los derivados del petróleo sobre la salud humana y el medio ambiente, se ha convertido en un tema de interés, y a pesar de la gran variedad existente de estos y a la difícil cuantificación de cada uno de ellos, el departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos desde el año 1999, ha recomendado realizar su medición en conjunto. Esta complejidad que sustentan los hidrocarburos ha llevado a que cada vez se realice más investigación en todo el mundo, respecto a la degradación de estos compuestos, implementando diferentes tecnologías para evaluar la efectividad del tratamiento en aguas contaminadas, mostrándose mayor interés en la fitorremediación por tratarse de una técnica natural, donde las plantas tienen la habilidad de transformar los contaminantes orgánicos a compuestos menos tóxicos e incluso a CO₂ y H₂O (Guendy, 2008).

6.2. Mecanismos para la Fitorremediación de hidrocarburos

Diferentes alternativas de tratamiento de aguas y suelos contaminados han sido investigadas y empleadas con el fin de reducir el contenido de los contaminantes orgánicos e inorgánicos que son descargados directa o indirectamente a las fuentes superficiales y subterráneas de agua. El uso de tratamientos fisicoquímicos donde se emplea carbón activado, microorganismos, sustancias químicas, aire y otros, incurren en relativos altos costos de inversión y operación que dificultan su aplicación (Sursula *et al.*, 2002). La fitorremediación es una alternativa emergente, que representa un menor costo-efectivo, posee ventajas estéticas, captura gases efecto invernadero, no requiere de una fuente de energía diferente a la solar y tiene una gran aplicabilidad bajo diferentes rangos de concentración de contaminantes (Schnoor, 1997; Guendy, 2008).

La limitación de su empleo se basa en la disponibilidad del contaminante (baja profundidad) y la generación de condiciones tóxicas para las plantas y microorganismos, la posibilidad de incorporar los contaminantes a la cadena alimenticia, además de los largos tiempos de adaptación de las plantas y degradación de los compuestos.

En los últimos años, la fitorremediación ha sido ampliamente investigada con el fin de entender los procesos de toma y metabolismo de los compuestos orgánicos e inorgánicos por parte de las plantas (Bock *et al.*, 2002), ya que la complejidad del sistema implica una serie de procesos que dependen de los mecanismos que ocurren en su interior, puesto que durante la fotosíntesis, las plantas llevan a cabo la incorporación de la biomasa, la producción de energía en tanto que, se realiza la respiración celular, y la generación de exudados. Según Kamath (n.d.), las investigaciones y aplicaciones de la fitorremediación para el tratamiento de la contaminación con hidrocarburos se han llevado a cabo desde hace más de 15 años, generando información útil que ha sido empleada para el mejoramiento de los diseños de sistemas de remediación.

El término fitorremediación como tal, surgió en los años 90's a partir de las investigaciones realizadas con humedales construidos para la remediación de ambientes contaminados con hidrocarburos y la acumulación de metales pesados en plantas usada en la agricultura (EPA, 2000), y es definida como una opción tecnológica que ha sido desarrollada y usada para remediar medios impactados con diferentes tipos de contaminantes. Se basa en el uso de plantas y su interacción con los microorganismos que se ubican en la rizósfera, con el fin de remover, transformar, secuestrar o degradar sustancias contaminantes contenidas en el suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas (Susarla *et al.*, 2002); puede ser empleada para remover metales, pesticidas, solventes, explosivos, aceites derivados del petróleo, hidrocarburos derivados del petróleo, compuestos clorinados, lixiviados y compuestos volátiles en el aire (EPA, 1999; Interstate Technology and Regulatory Cooperation, 2001; Newman and Reynolds, 2004).

La aplicabilidad de la fitorremediación depende del tipo de medio impactado y de los objetivos de remediación (tipo de contaminante) o tipo de proceso que es preferible que ocurra. Según la cooperación interestatal de tecnología y regulación (2001) estos procesos incluyen: estabilización, secuestro, asimilación, reducción, degradación, metabolización y/o mineralización. Dietz and Schnoor (2001) dicen que los procesos en la fitorremediación inician cuando el contaminante se pone en contacto con la raíz de la planta, ya que éste es absorbido o mezclado con la estructura de la raíz y su pared celular; después de esto pueden ocurrir tres pasos, por una parte los contaminantes son tomados vía difusión e incorporados en la pared y membrana celular; por otro lado los contaminantes son tomados y transformados inmediatamente dando paso a la transpiración del mismo, llevándolo desde la raíz hasta las hojas y, finalmente el compuesto es tomado, metabolizado y localizado en las partes de la planta mediante las fases de conversión, conjugación y compartimentación.

Dentro de los procesos de fitorremediación, la transpiración de las plantas han sido usados como una medida indirecta para inferir la eficiencia en la toma del contaminante por parte de la misma; siendo esta eficiencia dependiente de la especie de la planta, la edad, estado de salud y propiedades fisicoquímicas de la zona de raíces. Así mismo, la tasa de transpiración de las macrófitas varía con el tipo de planta, área foliar, nutrientes, humedad del suelo, temperatura, condiciones de viento y humedad relativa.

Existen diferencias entre los procesos ocurridos por parte de los microorganismos y las plantas en un sistema de fitorremediación, ya que en las plantas los contaminantes son localizados al interior de sus partes, utilizando mecanismos de desintoxicación del compuesto xenobiótico y transformándolo en metabolitos no tóxicos, lo cual es descrito como el efecto del hígado verde; contrario a esto, los microorganismos metabolizan el contaminante pasándolo a dióxido de carbono y agua (Kamath, n.d.). Sin embargo, en la fitorremediación se presenta una simbiosis entre las plantas y los microorganismos de la rizósfera (Fig. 1), mediante la pérdida de carbono ocurrida por las raíces (rizodeposición), permitiendo la proliferación de microorganismos en la endorizósfera y ectorizósfera (Jones *et al.*, 2004). Del mismo modo, los microorganismos pueden disminuir la toxicidad para las plantas de algunos compuestos, mediante el uso de enzimas hasta transformarlos en ácidos, alcoholes, CO₂ y agua.

La zona de raíces juega un papel importante en la remediación de hidrocarburos, ya que la generación de exudados proporciona una conexión entre los microorganismos y las plantas generando el efecto rizósfera, sin embargo el tipo de exudado generado depende de planta y otros factores como tipo de suelo, cantidad de nutrientes, pH, disponibilidad de agua, oxígeno, temperatura y otros. Así mismo, la liberación de enzimas por parte de las raíces, permite la transformación orgánica de los compuestos mediante reacciones químicas catalizadas (Frick *et al.*, 1999).

La fitorremediación puede ser empleada *in situ* o *ex situ* y, según el mecanismo ocurrido en el interior del sistema, suelo, plantas o microorganismos, pueden prevalecer los siguientes procesos:

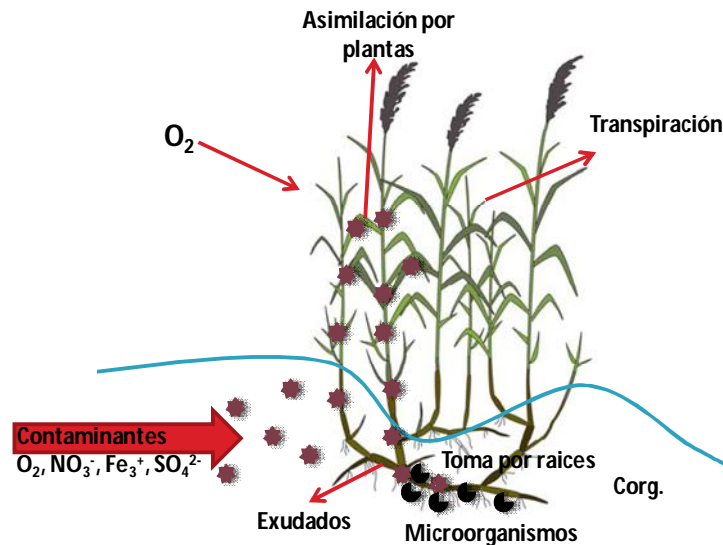


Figura 1. Simbiosis plantas-microorganismos en sistema de fitorremediación
(Fuente: Elaboración propia)

- **Fitoextracción o fitoacumulación:** se refiere a la toma del contaminante por parte de la planta específicamente por sus raíces, debido a la capacidad que algunas especies tienen para acumular compuestos incorporándolos a sus tejidos. En este proceso la planta absorbe y/o concentra el compuesto contaminante en sus partes cosechables, tejidos de hojas y tallos (Carpena y Bernal, 2007), principalmente cuando éste no es degradado rápida o completamente. La fitoacumulación generalmente es usada para remediar agua o suelos contaminados con metales, por lo tanto se usan plantas hiperacumuladoras, con altas tasas de crecimiento y gran producción de biomasa, donde la cosecha de las plantas permite la remoción del contaminante del medio afectado.

La aplicación de este mecanismo puede verse afectada por la naturaleza lipofílica del compuesto, la cual se caracteriza por el coeficiente de partición agua-octanol, $\text{Log } K_{ow}$ (Imfeld *et al.*, 2009). Según Schnnor (1997), la Fitoextracción es un mecanismo eficiente para remover BTEX, solventes clorinados, e hidrocarburos alifáticos de cadena corta, ya que poseen un $\text{Log } K_{ow}$ entre 1 – 3.5. Los compuestos que poseen un $\text{Log } K_{ow} > 3.5$, son compuestos hidrofóbicos y por tanto, se encuentran muy limitados a las raíces de las plantas y no pueden ser incorporados fácilmente; y los contaminantes que son solubles en agua con un $\text{Log } K_{ow} < 1.0$, no son transportados a través de las membranas de la planta pasivamente.

- **Rizodegradación:** según la cooperación interestatal de tecnología y regulación (2001), la rizodegradación es también conocida como fitoestimulación, y corresponde a la

toma del contaminante dentro de la zona de raíces de las plantas, debido a la actividad microbiana asociada a la rizósfera. Esta actividad se ve favorecida debido a las proteínas y enzimas que producen los exudados de carbono, energía, nutrientes, azúcares, amino ácidos y otros compuestos que garantizan las condiciones apropiadas para el crecimiento microbiano (Van Deeps, 2006). Del mismo modo, las raíces proporcionan un medio de soporte para las bacterias, contienen una fuente de carbono y transfieren el oxígeno desde el ambiente, estimulando la degradación aerobia. Para propiciar este tipo de mecanismo dentro de la fitorremediación, las plantas a usar deben proveer un gran sistema de raíces (largas y ramificadas).

Según Mentaberry (2008), la rizodegradación puede ocurrir rápidamente mediante la combinación de procesos físicos y químicos en las raíces muertas (quelación, intercambio iónico, adsorción), a velocidad intermedia donde se incluye la captura intracelular, deposición en la vacuola y translocación de los contaminantes a los tallos, o lentamente por mecanismos de precipitación mediada por la raíz y generación de exudados.

De acuerdo con Kamath (n.d.), la rizodegradación puede ser el mecanismo más significativo para la remoción de los hidrocarburos derivados del diesel, ya que los PAHs por ser hidrofóbicos y por su facilidad de ser retenidos en suelos, disminuye la biodisponibilidad para la toma por parte de las macrófitas y su fitodegradación, haciendo que este tenga un mayor contacto con la zona de raíces donde su remoción sea efectuada.

- **Fitoestabilización:** se refiere al uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, inmovilizándolos en el suelo y agua a través de las raíces. Este mecanismo es principalmente aplicable a contaminantes metálicos, ya que en ocasiones es recomendable inmovilizar el compuesto, debido a su incompleta o difícil biodegradación. Según Van Deeps (2006), la fitoestabilización toma ventaja de los cambios físico-químicos inducidos por las plantas en el suelo, los cuales pueden promover la precipitación de los metales en la zona de raíces, principalmente mediante los cambios de pH propiciados por ellas mismas.
- **Fitodegradación:** Este mecanismo también es conocido como fitotransformación, en este, los compuestos contaminantes son transformadas a moléculas más simples, para después ser incorporados a los tejidos y ayudar al crecimiento de la planta. En este proceso las enzimas y proteínas de las plantas dan paso a reacciones químicas que generan un rompimiento de las moléculas de los contaminantes, según Dietz and Schnoor (2001), la Fitodegradación se da bajo tres fases: conversión (reacciones oxido- reducción, hidrólisis), conjugación (con azúcares y aminoácidos) e incorporación a la planta (vacuola, pared celular), los cuales son usados por estas para su propia desintoxicación.

Durante la fase I y II, los productos de las reacciones oxido-reducción son conectados con azúcares y aminoácidos, alterando la solubilidad y toxicidad del contaminante por parte de la planta. En la fase III, una vez la conjugación está dada, los compuestos xenobióticos pueden ser removidos como residuos, siendo segregados dentro de las vacuolas o pared celular (Kamath, n.d.).

- **Fitovolatilización:** para el crecimiento de las plantas, estas necesitan de compuestos orgánicos y agua, por lo tanto estas toman el contaminante, lo llevan a los tallos y hojas, lo evaporan y volatilizan mediante los estomas abiertos de las hojas, liberando el compuesto en una forma modificada a la atmosfera (USEPA, 1998); sin embargo este mecanismo no demuestra ser una solución terminal para tratar el contaminante, ya que bajo ciertas circunstancias este puede pasar a la atmosfera en condiciones aún tóxicas.

La fitovolatilización puede ser un proceso de remoción importante para los compuestos hidrofóbicos volátiles como los bencenos y compuestos del BTEX, siendo este mecanismo de particular importancia en los sistemas de humedales de flujo Subsuperficial donde la directa volatilización es restringida por las bajas tasas de difusión de contaminantes a través de la zona no saturada de agua (Kadlec and Wallace, 2008).

Según Frick *et al.* (1999), los procesos primarios que remueven hidrocarburos de aguas y suelos contaminados, son aquellos que tienen incluidos la degradación, acumulación y volatilización de los compuestos. En la tabla 2 se presenta la aplicabilidad de los procesos llevados a cabo en la fitorremediación a diferentes tipos de contaminantes, y en la figura 2 se esquematizan los mecanismos de remoción según su ubicación en la planta.

Tabla 2. Procesos de fitorremediación aplicados a diferentes contaminantes
(Fuente: Adaptado de Dietz and Schnoor, 2001)

| Proceso | Contaminante | Planta |
|---------------------------|---|--|
| <i>Fitoextracción</i> | Metales pesados, Compuestos hidrofóbicos | Pastos, plantas freáticas (Sauces, álamos) |
| <i>Rizodegradación</i> | Compuestos orgánicos biodegradables (BTEX, HTP, PAHs, PCBs, pesticidas), metales, compuestos hidrofóbicos, radionucleótidos | Pastos, plantas freáticas (Sauces, álamos), plantas acuáticas emergentes y subemergentes |
| <i>Fitoestabilización</i> | Metales pesados, Compuestos hidrofóbicos | Pastos, plantas freáticas (Sauces, álamos) |
| <i>Fitodegradación</i> | Herbicidas, compuestos alifáticos clorinados, compuestos aromáticos, residuos de amonio y nutrientes | Pastos, plantas freáticas (Sauces, álamos), leguminosas (alfalfa, trébol) |
| <i>Fitovolatilización</i> | Metales (Se, As, Hg), compuestos orgánicos volátiles (BTEX, MTBE) | Plantas de humedales (juncos, cañas, espadañas) |

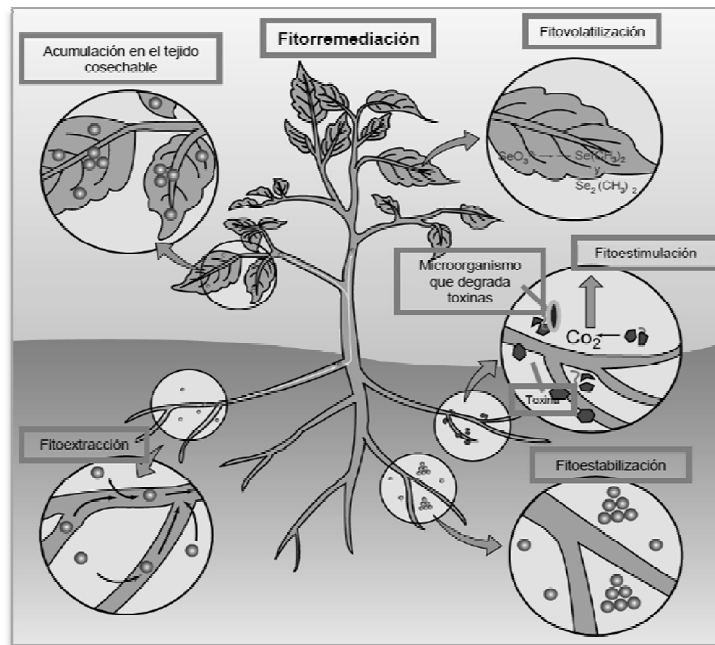


Figura 2. Esquema de mecanismos de remoción en fitorremediación
(Fuente: Tomado de Mentaberry, 2008).

6.3. Rutas de degradación de hidrocarburos en humedales

La degradación de hidrocarburos en sistemas de humedales puede ocurrir no solo por asimilación por parte de las plantas sino también de la actividad aerobio o anaerobia de los microorganismos que en estos se encuentre, siendo esta última, la que mayor aporte realiza en la descomposición de estos complejos compuestos. Las comunidades bacterianas asociadas a las raíces de las plantas en un humedal, según la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, toman de los compuestos orgánicos mediante el rompimiento de sus cadenas de carbono, la energía suficiente para su desarrollo y creación de nueva biomasa; por lo tanto, entre más larga y compleja sea la estructura molecular del hidrocarburo, más difícil el proceso de degradación para los microorganismos.

La tasa de degradación aerobia es más rápida que la anaerobia, debido a que el oxígeno es el aceptor de electrones más fácilmente usado por los microorganismos. Para que los hidrocarburos sean usados como sustrato, los microorganismos deben tener enzimas monooxigenasas que son dependientes de oxígeno, con la cual oxidan los alcanos mediante la intrusión de un átomo de oxígeno al último átomo de carbono de la cadena, convirtiendo este compuesto en una molécula más reactiva, la cual por oxidación con otras enzimas puede ser llevada hasta ácidos grasos. En el caso de los hidrocarburos aromáticos, se debe desestabilizar el anillo mediante enzimas monooxigenasas, por medio de la incorporación de uno o dos grupos OH (reacciones de hidroxilación), desequilibrando

la molécula y permitiendo su rompimiento mediante la incorporación de otra enzima dioxigenasa (Widdel and Rabus, 2001).

Por otro lado, la degradación anaeróbica de hidrocarburos solo ha sido investigada desde los años 80's, encontrándose que estos compuestos pueden ser metabolizados vía aceptores de electrones, donde las bacterias deben usar el nitrato, sulfato, hierro o carbonato para reducir la molécula (Phelps and Young, 1999), pero sin embargo las rutas metabólicas de degradación aún se consideran desconocidas. Lovley (1997) sugiere que la remoción de BTEX vía anaerobia puede ser desarrollada mediante reducción de sulfato y nitrato, para lo cual es común adicionarlos para estimular la remoción; pero también pueden ser removido bajo condiciones metanogénicas, siendo estos procesos referidos como aceptores terminales de electrones.

6.4. Humedales construidos para el tratamiento de aguas contaminadas

Los humedales construidos son definidos como ecosistemas naturales intermedios, entre un medio acuático y terrestre, donde el nivel del suelo se mantiene saturado por agua la mayor parte del tiempo. Estos sistemas fueron creados por el hombre con base en los resultados de investigaciones efectuadas para el tratamiento de aguas residuales y con el fin de simular los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en un humedal natural. Según Todd *et al.* (2003), los sistemas naturales son diseños ambientalmente amigables, y han sido aplicados por más de tres décadas para incrementar el rango de tecnologías que proporcionan soluciones para el manejo del recurso hídrico.

El uso de los humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales se inició en el año 1966 con los trabajos realizados por Kathe Seidel en el "Max Planck institute" en Alemania, cuando ella encontró absorción y metabolización de nutrientes, sustancias orgánicas y tóxicas por parte de plantas (*Scirpus lacustris*). Años más tarde, Reinhold Kickuth (1981) desarrolló trabajos con esta tecnología incluyendo el concepto "Root zone method" con el uso de suelos de alto contenido de arcilla, lo cual ocasionó problemas hidráulicos y operacionales a los sistemas. Entre los años 70 y 80's el concepto de humedales construidos fue introducido en otros países como Australia, Dinamarca, Reino Unido, Estados Unidos y otros países (Vymazal and Kröpfelová, 2008); reportándose como el primer sistema piloto construido en América entre los años 1973-1976, aquel que fue construido por Brookhaven National Laboratory cerca de Brookhaven, New York (Guessner *et al.*, 2005).

Los humedales construidos han demostrado ser excelentes tratamientos para la descontaminación de aguas bajo diferentes condiciones climáticas (Reed *et al.*, 1995), ya que la presencia de plantas y su interacción con los microorganismos asociados a la zona radicular, permiten la generación de procesos físicos, químicos y biológicos que mejoran la calidad del agua; estos sistemas pueden retener una gran variedad de compuestos

orgánicos, así como sedimentos y metales pesados, por lo que funcionan como digestores de materia orgánica y purificadores biológicos de aguas contaminadas. Estos diseños ecológicos, han sido extensivamente investigados desde hace varios años (Reed *et al.*, 1995; Schnoor, 1997; Lakatos *et al.*, 1997; Vélez and Paredes, 2007; Ghermandi *et al.*, 2007; Guendy, 2008; Vymazal, 2009), catalogándose como sistemas eficientes tratando diversos contaminantes (drenaje de minas, lixiviados de rellenos sanitarios, aguas lluvias urbanas y residuos agrícolas). Son sistemas económicos, en términos operacionales y de mantenimiento comparados con tratamientos convencionales y centralizados, haciéndolos una alternativa viable para pequeñas áreas rurales principalmente, en los países en vía de desarrollo.

Según Stottmeister *et al.* (2003), en los humedales se pueden encontrar como principales mecanismos de remoción, la filtración y sedimentación de partículas suspendidas, la adsorción, incorporación del contaminante a la planta, la degradación microbial y la precipitación, para lo cual, tanto las plantas como el medio filtrante y los microorganismos tienen una función individual y relacionada entre sí.

En los humedales, las plantas cumplen un papel primordial, ya que aun cuando no está bien definido el proceso de liberación de oxígeno en la zona de raíces, algunos autores comentan que esta condición favorece un ambiente aerobio para los microorganismos; Vanier and Dahab (2001), expresan que el flujo de oxígeno hacia las raíces de las *Phragmites* puede llegar a ser hasta de 4.3 g/m^2 . Las plantas también facilitan el proceso de filtración a medida que las raíces abren paso al flujo del agua, reteniendo sólidos y sirviendo de soporte para las bacterias por medio de su zona radicular (Sousa, *et al.*, 2001). Según Emeka (2008), el papel de las plantas en los humedales también ha sido controversial para algunos autores, ya que se ha documentado en algunas investigaciones que las macrófitas pueden mejorar la remoción de contaminantes, pero en otros casos cuando se compara la remoción lograda por las plantas con la remoción de los microorganismos, se demuestra que las plantas solo cumplen un papel secundario en el tratamiento de aguas residuales mediante los sistemas de humedales.

Existe un gran número de plantas que han sido usadas para el tratamiento de aguas en los humedales, desde árboles como Ciprés, Sauces y otros, hasta plantas emergentes (Cañas, Espadañas, Juncos) y flotantes (Lemna, Buchón de agua, Lechuga de agua, etc.) (Reed *et al.*, 1995), donde su uso ha dependido de las características de flujo deseado en el humedal. De acuerdo con Kadelc and Wallece (2009), las plantas son un componente importante en los humedales, ya que sin éstas solo se hablaría de filtros de suelo, arena, grava o lagunas.

Igualmente, diferentes investigaciones alrededor del mundo han resaltado el papel de los microorganismos en los procesos que ocurren en el interior de los humedales (Stottmeister *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2008; Tanner and Sukias, 2006), ya que en estos

ecosistemas existe una alta actividad biológica que fomenta el desarrollo de diferentes especies bacterianas con la habilidad de transformar los contaminantes comunes en subproductos menos peligrosos, alterar las condiciones de óxido-reducción y recircular nutrientes, además de soportar tanto condiciones aerobias como anaerobias dentro de los sistemas. Los compuestos orgánicos y nutrientes presentes en el agua residual, le sirven a los microorganismos como fuente de carbono para la generación de nuevas células así como, les provee electrones que les sirve para extraer energía. Es reconocido que la remoción de contaminantes en tratamiento con humedales es debida principalmente a la actividad bacteriana y según Faulwetter *et al.* (2009), los microorganismos han sido la base de esta tecnología desde el principio de su creación.

En los humedales construidos, la existencia de una relación de simbiosis entre plantas y microorganismos hace que la concentración de los contaminantes sea reducida, por tanto que las raíces de las plantas, sirven de medio de soporte a los microorganismos y estos a su vez procesan la materia orgánica y nutrientes del agua residual regresando al medio del humedal compuestos menos tóxicos para las macrófitas.

El sustrato o matriz de suelo es un componente no menos importante que las plantas o los microorganismos, ya que este además de propiciar procesos de precipitación y filtración, brinda el soporte para las plantas y del mismo modo para algunas bacterias. Sin embargo Vanier and Dahab (2001), dicen que las raíces de las plantas soportan mayor diversidad y cantidad de microorganismos que el medio filtrante. Comúnmente se emplea suelo, grava o arena, pero sin embargo, la selección del tipo de medio de soporte debe realizarse de acuerdo a la conductividad hidráulica que este proporciona al sistema, con el fin de garantizar el buen direccionamiento del flujo de agua. El exceso de sólidos y biomasa en un agua residual puede ocasionar problemas de taponamiento si la matriz de suelo no posee una adecuada porosidad, permitiendo la acumulación de estos en el sustrato y dando paso a la formación de caminos preferenciales, reducción del tiempo de retención hidráulico (TRH) y del volumen efectivo del humedal (Tanner and Sukias, 1995; Caselles *et al.*, 2007; Lianfang *et al.*, 2009; Turon *et al.*, 2009).

Los humedales construidos generalmente han sido clasificados de acuerdo al tipo de flujo que presentan, tradicionalmente los han catalogado como humedales de flujo superficial (nivel del agua por encima de la superficie del suelo) y flujo subsuperficial (nivel del agua por debajo de la superficie del suelo); sin embargo Brix y Arias (2007) han realizado algunos avances en el concepto de humedales verticales como una innovación al diseño tradicional. Kadlec and Wallace (2009) han reconocido los humedales construidos en tres tipos o clases: humedal horizontal de flujo superficial, humedal horizontal de flujo subsuperficial, y humedal de flujo vertical; y de acuerdo a la forma como las macrófitas crecen en el sistema, son clasificados en: sistemas con plantas flotantes, sistemas con plantas sumergidas y sistemas con plantas emergentes o enraizadas. Contrario a esto, Stottmeister *et al.* (2003), nombran tres tipos de humedales según el medio filtrante:

sistemas con poco medio filtrante y crecimiento predominante de plantas emergentes, sistemas con suelo activo y plantas emergentes y sistemas sin medio filtrante activo con crecimiento intensivo de plantas flotantes y sumergidas.

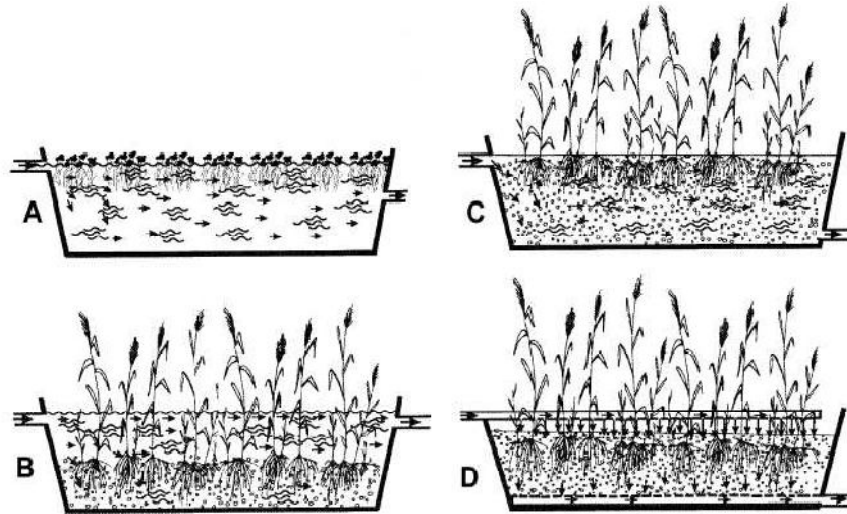


Figura 3. Clasificación de los humedales según Stottmeister *et al.*, (2003). A, laguna con plantas flotantes; B, Humedal de flujo horizontal superficial con plantas emergentes; C, Humedal de flujo horizontal subsuperficial; D, Humedal de flujo vertical.

- **Humedales de flujo horizontal superficial:** Este tipo de humedal es diseñado para simular las condiciones de un humedal natural (EPA, 1993) en el cual, el medio filtrante es de poca altura y la lámina de agua se encuentra expuesta a la atmósfera, es decir, el nivel del agua está por encima del medio de soporte o material filtrante. Generalmente este humedal tiene plantas emergentes distribuidas a lo largo del sistema, proporcionando oxígeno en las zonas profundas, dado que por su tipo de flujo se presentan ambientes aerobios en la superficie y ambientes anaerobios en el subsuelo. El agua en este humedal corre a bajas velocidades de forma horizontal y así mismo es evaporada debido a su exposición a la atmósfera.

Los humedales construidos de flujo superficial comúnmente consisten en camas o canales con un fondo o suelo impermeable, son densamente plantados por diferentes especies de macrófitas sumergidas, emergentes y flotantes; típicamente, poseen profundidades de 0.3 m (Kadlec, 2009), aunque algunos autores reportan profundidades mayores, 0.1 – 0.8 m (Reed *et al.*, 1995; El-Sheikh *et al.*, 2010). En los humedales de flujo superficial el material sedimentable es más rápidamente removido que en los humedales de flujo subsuperficial, debido a los fenómenos de deposición y filtración que en estos ocurren (Emeka, 2008). En estos sistemas la mayor fuente de inyección de oxígeno es la aireación del agua por su exposición a la atmósfera y la remoción de nitrógeno también es eficiente por los procesos de nitrificación/denitrificación que en ellos ocurren. Los mecanismos de

remoción de contaminantes que predominan son sedimentación, filtración, oxidoreducción, adsorción y precipitación (Kadlec and Wallace, 2009).

Aunque este tipo de humedal presenta características similares a las lagunas, su diferencia radica en los ciclos biogeoquímicos que en estos ocurren, razón por la cual no pueden ser clasificados como lagunas (Emeka, 2008). En Europa, los humedales de flujo horizontal superficial no son tan usados como los humedales de flujo subsuperficial y de flujo vertical, ya que estos son un diseño muy antiguo (Vymazal, 2005) y presentan limitantes como generación de olores, mosquitos y bajas remociones. Autores como Naz *et al.*, (2009) evaluaron dos humedales construidos de flujo superficial y flujo subsuperficial horizontal sembrados con *Phragmites australis* y *Canna indica*, tratando agua residual doméstica del campus de la Universidad de Harran, Sanliurfa en Turquía, con el fin de comparar cuál de los dos tipos de flujo funciona mejor y encontraron que el humedal de flujo subsuperficial tiene mayor potencial para la remoción de materia orgánica y sólidos suspendidos totales que el humedal de flujo superficial.

Kadlec (2009), considera que no existe una diferencia marcada respecto a la eficiencia de los humedales de flujo superficial con los de flujo subsuperficial, puesto que generalmente los segundos son operados bajo cargas orgánicas mayores que los primeros, lo cual da la impresión de que su eficiencia es mayor; pero aun así, el autor comenta que los humedales de flujo superficial tienen ventaja en remoción de contaminantes cuando estos tratan aguas residuales con moderada a alta DBO, SST, Nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y fósforo, mientras que los humedales de flujo subsuperficial son más efectivos para tratar bajos niveles de DBO, nitratos y patógenos.

En los humedales de flujo superficial, las plantas proporcionan ventajas como reducción del crecimiento de algas por el cubrimiento de la superficie del agua, aporte estético al sistema de tratamiento, condiciones de alimento y hábitat para animales.

- **Humedales de flujo horizontal subsuperficial:** Estos sistemas consisten igualmente en canales con suelo o membrana impermeable para evitar el riesgo de filtración de los contaminantes hacia el subsuelo, y son alimentados al inicio o entrada del humedal, haciendo que el agua fluya a través de un medio poroso (filtrante) por debajo de la superficie del suelo, sin dejar que el agua residual se encuentre en contacto con la atmósfera, esto permite la formación de zonas aerobias, anóxicas y anaerobias, siendo principalmente la zona aerobia aquella donde se encuentran las raíces y rizomas de las plantas y donde se genera la liberación de oxígeno para el sustrato (Vymazal, 2009). Este tipo de flujo en los humedales, permite que predominen ciertas rutas y mecanismos de degradación de los contaminantes, favorecidas por las condiciones anaerobias (Stottmeister *et al.*, 2003).

La remoción de contaminantes en estos sistemas, ocurre debido al contacto de los microorganismos adheridos a las raíces de las plantas, y medio filtrante con los compuestos presentes en el agua residual. Los humedales de flujo subsuperficial son más efectivos que los de flujo superficial pero sin embargo, son susceptibles a sobrecargas, flujos superficiales y obstrucciones del medio filtrante, reduciendo su eficiencia en el tratamiento. Los humedales de flujo subsuperficial, se han empleado para cargas hidráulicas menores que los humedales de flujo superficial, posiblemente por consideraciones de costos debidos al medio filtrante (Kadlec and Wallace, 2009).

Diferentes tipos de medios han sido usados a través de la historia de los humedales, suelo, arcilla, arena, grava y otros, los cuales se han empleado como soporte para las plantas, encontrándose algunas desventajas de unos sobre otros, principalmente por su porosidad y tendencia a taponamiento, ya que esta condición lleva al mal funcionamiento de los sistemas.

Los humedales de flujo subsuperficial han sido usados desde hace más de 30 años para el tratamiento de diferentes tipos de contaminantes, inicialmente fueron usados para el tratamiento de aguas residuales domésticas pero debido a los resultados demostrados y las eficiencias logradas con estos sistemas, su uso se ha extendido para tratar otro tipo de contaminantes como productos farmacéuticos, aguas residuales de refineries de aceites, residuos químicos, pulpa de papel, procesamiento de comidas, vertimientos de la agricultura, lixiviados, metales y otros (Vymazal, 2009). Según Halverson (2004), en los humedales de flujo subsuperficial, la remoción de metales se da por reacciones de oxidación e hidrólisis de los metales en la capa aerobia superficial y reacciones de reducción microbiana en la capa subsuperficial para la precipitación del metal.

Comparado con los humedales de flujo superficial, los de flujo subsuperficial presentan ciertas ventajas, no genera mosquitos y presenta mayor área superficial para la creación de la biopelícula debido al medio filtrante, lo cual mejora las reacciones que allí ocurren y la efectividad del humedal (Reed *et al.*, 1995; Halverson, 2004; Emeka, 2008).

- **Humedales flotantes:** Los humedales construidos han implicado tradicionalmente el uso de plantas acuáticas flotantes o plantas emergentes con sus raíces arraigadas a los sedimentos del humedal o a un medio filtrante, con el agua atravesando la zona de la raíz (flujo subsuperficial) o entre los tallos de las plantas (flujo superficial). Los humedales flotantes son sistemas innovadores que usan plantas emergentes que crecen como una red de raíces flotante por debajo de la superficie del agua y pueden ser utilizados para mejorar su calidad. Las raíces de las plantas cuelgan debajo de la columna de agua y proporcionan una gran superficie para el crecimiento de los microorganismos (Headley and Tanner, 2007).

El papel de las plantas en los humedales flotantes, está enfocado principalmente a permitir el paso del agua a través de sus raíces, facilitando la toma de nutrientes y metales, y al mismo tiempo promover los procesos de sedimentación y filtración directa de compuestos (White *et al.*, 2009). En este tipo de humedales, la capacidad de flotar que tienen las plantas es el resultado de factores como la captura de gases generados durante el metabolismo anaerobio y la ocurrencia de espacios de aire entre las raíces de las macrófitas, los cuales dependen del tipo de planta, edad, tasa de generación de metano y acumulación de lodos (Headley and Tanner, 2006; Kadlec and Wallace, 2009). Van de Moortel (2008) sugiere que la flotabilidad de las plantas se da por su capacidad de atrapar burbujas de gases en la zona de raíces y la creación de una capa de sustrato orgánica.

En ocasiones, para que las plantas tengan la habilidad de flotar es necesario brindar ayuda a través de una estructura flotante que permita el anclaje de las macrófitas en su fase inicial, hasta que el humedal haya generado suficiente metano dentro de los sedimentos; por esta razón es importante considerar la especie de planta a usar. Headley and Tanner (2006) recomiendan el uso de: *Typha latifolia*, *T. angustifolia*, *Phragmites australis*, *Panicum hemitomon*, *Glyceria maxima*, *Carex lasiocarpa*, *Menyanthes trifoliata*, *Myrica gale* and *Chamaedaphne calyculata*.

Dentro del diseño de los humedales flotantes, la principal consideración a tener en cuenta es el soporte de las plantas. Según Nakamura and Mueller (2008), estos humedales son clasificados en tres tipos: con marco de soporte, que permite que las raíces de las plantas crezcan dentro de la columna de agua (marcos o balsas de madera, bambú, fibras naturales o acero inoxidable, tuberías de PVC, etc.); sin marco de soporte en los cuales se utilizan fibras de coco, plástico o polipropileno, creando una red como base para el crecimiento de plantas y otros diseños (con uso de llantas, botellas reusadas, etc.).

El empleo de los humedales flotantes a pesar de la poca publicación existente sobre investigaciones realizadas respecto a este sistema, ha surgido desde hace varias décadas; de acuerdo con Nakamura and Mueller (2008), los sistemas flotantes iniciaron en los años 80's y llamaron la atención porque su instalación realizó un aporte paisajístico, mejorando la calidad del agua y creando hábitats para aves y peces en los lugares donde fueron ubicados. El primer reporte de este tipo de humedales en Alemania fue conducido por Hoeger in 1988, quien los llamo "Schwimmkampen"; y desde 1991 en China, estos sistemas se han usado como una tecnología con plantas terrestres sin suelo, flotando en el agua que generalmente usan materiales de polímero para crear una especie de balsa flotante que sirva de acople para el crecimiento de las plantas (Gao *et al.*, 2008).

En la década de los 90's y 2000, las empresas Bestmann-Green-Systems (Alemania) and Biohaven Environmental (China), han desarrollado los humedales flotantes con diferentes aplicaciones para descontaminar cuerpos de agua, bajo la premisa de su efectividad y

permanente remoción de nutrientes, pero sin embargo aún se evidencia el desconocimiento de los sistemas y por lo tanto los resultados en términos de calidad de agua.

Headley and Tanner (2006), quienes han desarrollado investigación en el tema dicen que desde hace ya dos décadas se han usado los humedales sin medio filtrante, como una modificación al diseño de los humedales convencionales, para tratar un amplio rango de contaminantes, encontrándose excelentes resultados, siendo los principales mecanismos de remoción, la captura de gases generados durante el metabolismo anaeróbico de compuestos orgánicos y la ocurrencia de espacios aerobios dentro de los rizomas de las plantas. Por otra parte, Duncan (2009) define que los mecanismos de remoción de los humedales flotantes son absorción y utilización de nutrientes y sólidos suspendidos por parte de las plantas, además de la remoción de metales y partículas coloidales suspendidas por medio de bacterias aerobias y anaerobias de la rizósfera. El autor también explica que la generación de una biopelícula en las raíces de las plantas, permite la metabolización de los nutrientes y metales al interior de los estomas y raíces de las plantas.

Li *et al.* (2007) explican que los sistemas radiculares de los humedales flotantes, al usar plantas acuáticas o terrestres han sido eficientes para la remoción de nutrientes o metales pesados del agua, y han mostrado mayor eficiencia que los sistemas de humedales convencionales para eliminar nitrógeno y fósforo en forma disuelta. BioHaven Environmental (n.d.), comentan la capacidad de remoción de compuestos como derivados de petróleo, pesticidas, productos farmacéuticos y algunos metales como cobre (Cu) y Zinc (Zn) (investigación en el instituto de investigación nacional del agua y la atmósfera - NIWA, New Zealand Headley and Tanner, 2007). Adicionalmente, Pan *et al.*, (2007) han reportado que los acercamientos a los cultivos hidropónicos para el tratamiento de aguas residuales han revelado grandes potenciales para la remoción de sólidos suspendidos.

Los humedales flotantes han sido desarrollados con el uso de plantas emergentes porque estas generalmente requieren mayor cantidad de nutrientes (nitrógeno y fosforo), lo cual representa una mayor remoción de contaminantes. Por otra parte, las plantas emergentes poseen raíces más largas y proveen una mayor área superficial y adaptaciones como la formación de pelos radiculares (Fig.4) que maximizan el área para la adherencia de los microorganismos (Tanner and Headley, 2011; BioHaven Environmental, n.d.), mejorando así la toma de nutrientes desde el agua.

Estos sistemas son fáciles de instalar, rápido establecimiento y simple cosecha, y permiten obtener un beneficio extra en la reducción de nutrientes por medio de la cosecha de tallos y biomasa (White *et al.*, 2009), también proporcionan un mayor contacto entre las raíces de las plantas y el agua residual (las raíces se encuentran libres en la columna de agua) forzando la toma de nutrientes desde el agua, bajo los principios de los cultivos

hidropónicos, sin embargo LIFE-Environmental Funding (2005), resalta que estos sistemas pueden ser más efectivos si la materia orgánica y los sólidos suspendidos se encuentran en bajas concentraciones.

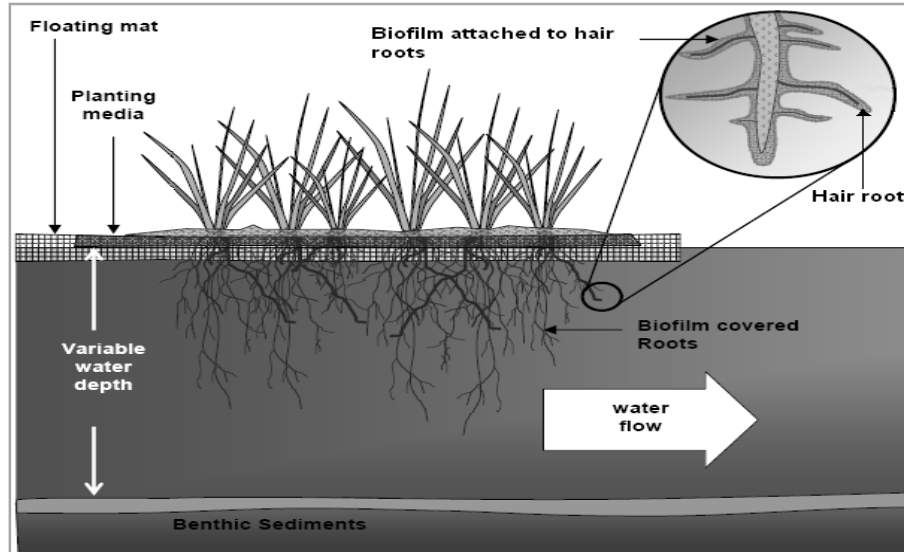


Figura 4. Desarrollo de pelos radicales para mayor área de adhesión de microorganismos (Fuente: Modificado de Headley and Tanner, 2006).

A través de la estructura de las macrófitas usadas en los humedales flotantes, así como la capacidad de flotar que estas adquieren con los procesos de respiración de los microorganismos (el aire expulsado por los microorganismos es tomado por las plantas y almacenado en las raíces, rizomas y hojas; Hoeger, 2010), los humedales flotantes tienen ventajas como: permitir la captura directa de los compuestos solubles desde la superficie de la columna de agua en forma de nutrientes para las plantas (Kadlec and Wallace, 2009) como ocurre en los cultivos hidropónicos (Pan *et al.*, 2007); no presentan problemas por la variación de los niveles de agua, no tienen restricciones en términos a la profundidad de la columna de agua, facilitan los procesos de filtración y anclaje de microorganismos a las raíces (mayor área superficial en las raíces por crecimiento libre de las mismas), previene el crecimiento de algas debido a que la tasa de asimilación de nutrientes por parte de las plantas es más rápida que la de los microorganismos (Headley and Tanner, 2006) y a causa de la rápida desnitrificación que ocurren en estos sistemas (Duncan, 2009). También genera ventajas económicas en comparación de los humedales convencionales debido a que no se requiere inversión en compra e instalación del medio filtrante.

A pesar que los humedales flotantes han sido principalmente empleados para propósitos ornamentales (Van de Moortel, 2008), algunos autores han reportado que dentro de las funciones de estos sistemas, se ha encontrado el mejoramiento de la calidad del agua (remoción de materia orgánica, nutrientes, metales, algas y otros compuestos) y funciones ecológicas como mejoramiento del hábitat y paisaje, por medio del establecimiento de

diferentes especies de plantas, microorganismos y hasta árboles, creando hábitats para la ubicación de de huevos de aves y peces (Duncan, 2009).

6.5. Necesidades de nutrientes en la fitorremediación de hidrocarburos

Las plantas para su crecimiento y correcto desarrollo de sus funciones requieren de nutrientes, para lo cual modifican el ambiente donde se encuentran facilitando las condiciones para la toma de agua y adquisición de estos; por esta razón, las plantas tienen mecanismos para incrementar la solubilidad, la difusión potencial y la toma de nutrientes desde el suelo. Estos mecanismos dependen de factores bióticos y abióticos como pH, potencial redox, disponibilidad y presencia de microorganismos (Jones *et al.*, 2004).

La toma y asimilación de nutrientes por parte de las plantas se debe a los procesos de transformación del nitrógeno de forma inorgánica a compuestos orgánicos que sirvan para la formación de células y tejidos nuevos, por lo tanto el potencial de toma de nutrientes por parte de las macrófitas es limitado a su tasa de crecimiento y concentración de nutrientes en sus tejidos (Vymazal, 2007). Según Vanier and Dahab (2001), la capacidad de toma de nutrientes por parte de plantas emergentes está entre los 1000 a 2500 kg de N/Ha-año.

Las dos formas de nitrógeno más asimilables son el nitrógeno amoniacal y los nitratos (NH_4^+ y NO_3^-), por lo tanto en aguas ricas en nitratos, éste puede ser la principal fuente de nitrógeno. En general, en la fitorremediación de aguas contaminadas, las plantas mediante sus raíces directa o indirectamente modifican la química del suelo, por medio de la liberación de exudados que sirven como fuente de energía para los microorganismos, acelerando la descomposición de la materia orgánica y estimulando la disolución de minerales insolubles para facilitar la captura de nutrientes (Jones *et al.*, 2004).

Esta captura de nutrientes realizada por las raíces no solo se presenta desde los sedimentos de los humedales sino también desde el agua, principalmente en las plantas flotantes. En este proceso los microorganismos formados en la rizósfera también cumplen una función, dado que realizan la conversión desde su forma inorgánica a orgánica, facilitando la asimilación de este nutriente por las micorrizas de las plantas (Jones *et al.*, 2004). Según Mitsch and Gosselink (1986), el ion amonio en los humedales puede ser tomado por las plantas mediante su zona radicular o por los microorganismos anaeróbicos, convirtiéndolo nuevamente a materia orgánica.

En la biodegradación de un suelo o agua contaminada con hidrocarburos, el aumento de la cantidad de carbono puede crear insuficiencias de nitrógeno y fósforo, debido a su inmovilización por procesos microbianos y a los requerimientos que tienen los microorganismos y las plantas para su crecimiento y correcto desempeño en la reducción de los contaminantes (Kirkpatrick *et al.*, 2006; Guendy, 2008). Según Pardo *et al.* (2004) y

Ramírez *et al.* (2009), si existe poca disponibilidad de nutrientes en el medio se puede limitar la degradación microbiana de los hidrocarburos, y por lo tanto es necesario ajustar la proporción C:N:P, mediante la adición de algún tipo de fertilizante que permita estimular el proceso de biodegradación; contrariamente, si existe una adecuada disponibilidad de nutrientes, el crecimiento de las raíces de las plantas permitirá un mayor contacto entre las comunidades microbianas de la rizósfera y la concentración de del hidrocarburo, acelerando la degradación del compuesto (Kirkpatrick *et al.*, 2006). Una relación comúnmente usada para la remoción de hidrocarburos ha sido C:N:P de 100:10:1.

La degradación de los hidrocarburos y las transformaciones del nitrógeno en la fitorremediación, comprende diferentes procesos microbianos que dependen de las condiciones aerobias o anaerobias de la matriz de suelo, los cuales pueden aumentar o disminuir la biodisponibilidad de los nutrientes para las plantas (Mitsch and Gosselink, 1986). Chaineau *et al.* (2005), demostraron en sus investigaciones que la concentración de los nutrientes en procesos de biodegradación de crudo debe ser controlada, ya que puede afectar la asimilación del contaminante y la presencia de poblaciones microbianas, siendo el excesivo contenido de nitrógeno un factor inhibitorio en la reducción de algunos compuestos orgánicos, esto a causa del efecto tóxico provocado por la acumulación de nitritos y óxidos de nitrógeno generados por los procesos de denitrificación bajo condiciones anaerobias y en medios de bajo pH (Ramírez *et al.*, 2009).

Así mismo, Vallejo *et al.* en el año 2005, demostraron que la adición de nutrientes (sales inorgánicas y fertilizantes inorgánicos) a sistemas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, bioestimularon la degradación de los HTP por parte de los microorganismos, notándose una diferencia significativa en los contenidos de hidrocarburos respecto a los tratamientos con nutrientes y controles, además del consumo marcado de nitratos y fósforo.

6.6. Experiencias de humedales con agua contaminadas con hidrocarburos

A pesar de la poca disponibilidad de información existente en Colombia, sobre el empleo de la fitorremediación en aguas contaminadas con hidrocarburos, a nivel internacional se han encontrado algunos reportes base, donde esta tecnología ha sido considerablemente investigada. En Francia en el año 1999, Salmon *et al.* usaron dos humedales artificiales de flujo superficial, uno plantado con *Typha latifolia* y otro con *Lemna minor* (tomado como control) para tratar agua residual con hidrocarburos (30 a 60 ppm de hidrocarburos) encontrándose los mejores resultados en el humedal plantado con *Typha* para una concentración efluente inferior a 8 ppm, lográndose hasta 90 % de eficiencia de remoción de este compuesto; también encontraron desarrollo de bacterias aerobias heterotróficas (10^6 bact/ml) y bacterias que utilizan el hidrocarburo como fuente de carbono (10^5 bact/ml), demostrando la interacción de plantas y microorganismos para la remoción de los hidrocarburos. En esta investigación, las *Typhas* ayudaron a retener los hidrocarburos

dentro de la cama del humedal y evitar su salida con el efluente permitiendo así, que el mecanismo de remoción dominante fuera la biodegradación.

Así mismo, Corseuil and Moreno (2001) a nivel de laboratorio, evaluaron en Brasil la fitorremediación como una alternativa de tratamiento de agua subterránea contaminada con gasolina mezclada con etanol, para ello emplearon sauce cultivados en medio hidropónico mostrándose una reducción de etanol y benceno mayores al 99 % en menos de una semana de tratamiento, según los autores, la toma de los dos contaminantes fue confirmada por los controles empleados y por la capacidad de transpiración de las plantas, además de la toxicidad manifestada por las macrófitas que solo se presentó cuando las concentraciones de etanol alcanzaron valores superiores a 2000 mg/l.

De otra parte, Omari *et al.* (2003) en Londres, emplearon dos humedales de flujo subsuperficial (unidad experimental sembrada con *Typha* y control) para remover hidrocarburos de un agua residual con iguales concentraciones de diesel, alcanzando eficiencias de remoción de 80, 78 y 72 % en la superficie, medio y fondo del humedal plantado y 72, 69 y 63 % en el humedal control, lo que indica que la *Typha* reveló una capacidad de remoción complementaria a la adsorción del sustrato en el medio filtrante (grava). Los autores concluyen que los mecanismos de remoción presentes en su investigación fueron, adsorción del contaminante al sustrato, toma por parte de las plantas y degradación microbiana.

En una investigación realizada por Gessner *et al.* (2005) se demostró que la implementación de humedales para la remoción de cianuro e hidrocarburos en agua subterránea es una opción factible, en esta investigación los autores reportaron una remoción del 67 % de los compuestos orgánicos de la gasolina y el diesel, mediante el uso de humedales de flujo superficial plantados con *Ceratophyllum demersum* y *Potamogeton spp.* En el año 2007, Bedessem *et al.* evaluaron la viabilidad de implementar un tratamiento con 4 humedales de flujo vertical con aireación forzada para la remoción de MTBE, HCTP (del diesel) y BTEX del agua subterránea contaminada con el vertimiento de una refinería, obteniéndose hasta un 88 % de remoción para BTEX y mínimas remociones de MTBE, siendo el sistema de aireación forzada viable para mejorar la remoción de Benceno (con tasas de 13 a 21 %).

Así mismo, se ha investigado sobre el empleo de plantas específicas como la *Phragmites* mediante la evaluación de los pigmentos de clorofila y humedad como un indicador de productividad y biomasa de las plantas en un humedal de flujo subsuperficial a escala piloto, mostrándose que los contaminantes del petróleo (MTBE y BTEX) pueden ser degradados eficientemente por este tipo de plantas. En esta investigación el proceso de transpiración contribuyó notablemente a la biodegradación de los HC (Guendy, 2008).

Recientemente, doce humedales de flujo vertical sembrados con *Phragmites australis* fueron monitoreados en la Universidad de Edinburgo, Escocia, donde seis de ellos fueron ubicados a la intemperie y seis fueron evaluados bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz. El agua residual tratada fue contaminada con benceno a una concentración de 1 g/l y las remociones alcanzadas fueron satisfactoriamente altas (97-100 %). Durante el primer año de investigación no se evidenció efecto en la degradación del hidrocarburo respecto a las condiciones ambientales, pero en el segundo año se presentaron diferencias entre las estaciones de primavera e invierno (Emeka, 2008). En este trabajo el autor demostró que la *Phragmites* no tuvo un papel representativo en la remoción del hidrocarburo, ya que según el análisis estadístico de los datos mostraron que no había diferencias significativas entre los humedales plantados y los no plantados. Los principales mecanismos de remoción del hidrocarburo fueron la volatilización y la biodegradación.

Fountoulakis *et al.* (2009) investigaron a escala piloto un humedal de flujo superficial, un humedal de flujo subsuperficial y un filtro de grava para remover compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) y alquilbenceno sulfonato en un agua residual efluente de un tratamiento primario en el sur de Grecia. Los humedales sembrados contaban con plantas como *Phragmites australis* y *Arundo donax* y los resultados mostraron que el humedal de flujo subsuperficial tuvo las mayores eficiencias de remoción – 79 % y 55 % (respectivamente), comparado con los datos logrados por el humedal de flujo superficial (68 % y 30 %) y el filtro de grava (73 % y 41 %), sugiriendo estos resultados que el principal mecanismo de remoción de estos compuestos fue la absorción al medio filtrante.

7 MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo el desarrollo del proyecto de investigación y dar cumplimiento al objetivo general propuesto, la metodología se planteó de la siguiente manera:

7.1. Descripción del experimento

El proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), donde se adecuaron 3 humedales piloto construidos para tratar agua residual contaminada con hidrocarburos.

• **Unidades experimentales**

La configuración de los tres humedales implementados en la investigación constaron de canales en concreto con una altura de 0.80 m y un área superficial de 1.95 m², correspondientes a las dimensiones: 0.65 m de ancho y 3.00 m de largo. Los humedales funcionaron en paralelo y bajo diferentes condiciones operativas como se observa en la Figura 5:

- Humedal con matriz de suelo y plantas, HSSP (flujo horizontal subsuperficial)
- Humedal sin matriz de suelos y plantas, HF (floating wetland)
- Humedal con matriz de suelos, sin plantas, HSSC (flujo horizontal subsuperficial control)

Las plantas sembradas en los dos humedales fueron *Phragmites australis* (planta que ha demostrado ser tolerante a los hidrocarburos – Frick *et al.*, 1999; Guendy, 2008), y el medio de soporte usado fue grava con un diámetro efectivo entre ½ y 1½ pulgadas (1.3 y 3.8 cm) y porosidad promedio del 50 %. La densidad inicial de plantas sembradas por humedal fue de 20 plantas/m².

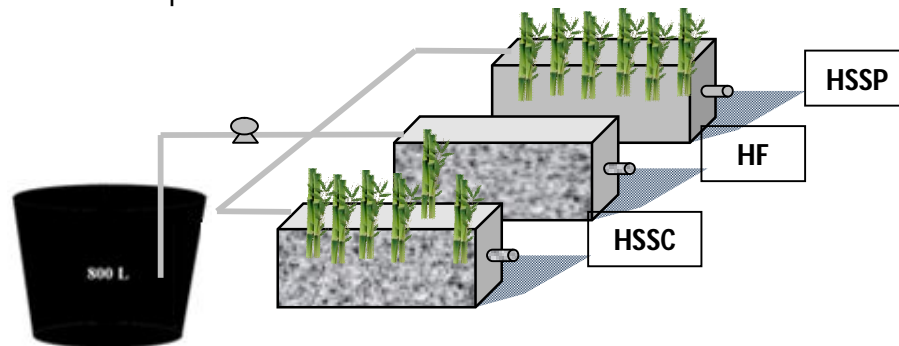


Figura 5. Esquema sistema de tratamiento experimental (Fuente: Elaboración propia)

La adecuación de los humedales se llevó a cabo mediante la implementación de tuberías de entrada y salida de los humedales, así como la adición de la grava y la siembra de plantas. La adecuación del humedal flotante, se realizó mediante la instalación de una red plástica que permitió el sostenimiento de las plantas en su etapa inicial, mientras la red de raíces adquiría su habilidad de flotar. Una vez terminada la instalación de los sistemas, se sometieron en una etapa de aclimatación, donde se inundaron con agua residual doméstica durante un periodo de dos meses para permitir la formación de biomasa y crecimiento de las plantas.

Los sistemas de humedales fueron evaluados durante dos etapas. Una etapa inicial sin adición de hidrocarburos para verificar la capacidad de remoción de materia orgánica y nitrógeno, así como la adaptación de las plantas al compuesto químico una vez se adicionara en la siguiente etapa; y una segunda etapa, donde se adicionó una concentración constante de hidrocarburos mediante la dosificación de un caudal de 2 ml/10min de diesel por medio de un sistema de venoclips con el fin de obtener una concentración afluente promedio de 1000 mg/l de hidrocarburos.

Durante la primera etapa, la alimentación de los tres humedales se realizó con agua residual doméstica proveniente del campus universitario y en la segunda etapa, la alimentación se realizó con un agua residual contaminada con hidrocarburos, la cual fue elaborada con agua residual doméstica generada en la Universidad, combustible Diesel y Urea como fuente de nitrógeno cuando este fue necesario (bajas concentraciones afluentes). En ambas etapas, el caudal de alimentación fue en promedio de 130 l/d (carga hidráulica de $0.07 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{d}$) y se controló mediante el empleo de bombas peristálticas, permitiendo un suministro igual y constante del flujo de agua para los tres humedales.

7.2. Programa de monitoreo

El monitoreo de las unidades experimentales se ejecutó durante un periodo de once meses, tomando muestras semanales a la entrada y en los tres efluentes de los humedales, para un total de 4 puntos de muestreo. Las muestras de agua colectada fueron analizadas en el laboratorio de procesos biológicos de la facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica, siguiendo los procedimientos del Standard Methods (APHA, 2000). Las muestras de agua para el análisis del contenido de HTP se analizaron mediante el método Gravimétrico (Soxleth).

Las variables a medir se realizaron con los métodos y frecuencia que se observan en la tabla 3:

Tabla 3. Medición de parámetros (Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | Método de medición | Frecuencia |
|---|--------------------------------|------------|
| pH | Potenciométrico | Diario |
| Temperatura, T° | Termómetro de mercurio | |
| Caudal afluente y efluente, Qa, Qe | Volumétrico | |
| Hidrocarburos Totales, HTP | Gravimétrico | Semanal |
| Demanda Química de Oxígeno, DQO | Reflujo cerrado, Titulométrico | |
| Demanda Bioquímica de Oxígeno, DBO ₅ | Potenciométrico | |
| Sólidos suspendidos totales, SST | Gravimétrico | |
| Nitrógeno amoniacal, NH ₃ | Titulométrico | |
| Nitratos, NO ₃ ⁻ | Espectrofotometría de UV | Quincenal |
| Nitritos, NO ₂ ⁻ | Colorimétrico | |

7.3. Diseño experimental

En la presente investigación, los factores de estudio son tratamiento o configuración y adición de hidrocarburo (HTP), para un total de 6 arreglos como se presenta en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Factores de estudio (Fuente: Elaboración propia).

| Factor | Niveles | N° Niveles | N° arreglos |
|---------------|---|------------|-------------|
| Tratamiento | Humedal con matriz de suelo y plantas | 3 | 3 * 2 = 6 |
| | Humedal con matriz de suelo sin plantas | | |
| | Humedal sin matriz de suelo y plantas | | |
| Adición de HC | Sin adición de HC | 2 | |
| | Con adición de HC | | |

Los tratamientos resultantes al combinar los factores y niveles son los siguientes:

Tabla 5. Arreglos resultantes (Fuente: Elaboración propia)

| N° | Descripción |
|----|--|
| 1 | Humedal : Matriz de suelo, plantas, Sin HC – C 1 |
| 2 | Humedal : Matriz de suelo, plantas, Con HC – C 2 |
| 3 | Humedal : Matriz de suelo, sin plantas, Sin HC – C 1 |
| 4 | Humedal : Matriz de suelo, sin plantas, Con HC – C 2 |
| 5 | Humedal : Sin matriz de suelo, plantas, Sin HC – C 1 |
| 6 | Humedal : Sin matriz de suelo, plantas, Con HC – C 2 |

El trabajo experimental fue desarrollado sin replicas, debido a que la unidad de análisis considerada fue el agua residual a tratar, con la cual se determinaron las variables de respuesta (tabla 6). En el desarrollo de esta investigación se estimaron como número de réplicas, al número de muestreos realizados para el análisis de laboratorio, para lo cual se establecido un total de 42 réplicas que se tomaron durante los 11 meses de monitoreo.

En el experimento las principales variables a tener en cuenta para el análisis estadístico fueron:

Tabla 6. Variables del experimento (Fuente: Elaboración propia)

| Variables no controladas | Variables de control | Principales variables de respuesta |
|--------------------------|--|---|
| Condiciones ambientales | <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento • Adición de HC | <ul style="list-style-type: none"> • % Reducción de hidrocarburos totales (HTP) • % Reducción de materia orgánica (DBO₅) • % Reducción de Nitrógeno total |

7.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicó un diseño de submuestreo en las unidades experimentales (humedales construidos), teniendo en cuenta el error experimental. El modelo matemático empleado para la fase I fue un modelo unifactorial y en la segunda fase un modelo bifactorial.

Modelo fase I:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \epsilon_{ij}$$

Modelo fase II:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \lambda_j + (T\lambda)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, T; \quad j = 1, 2, \dots, \lambda$$

Donde,

Y_{ij} = Variable respuesta observada en el arreglo ij

μ = Es la media general de la variable de repuesta

T_i = Efecto del i-esimo arreglo (factor tratamiento), en el nivel i

λ_j = Efecto del i-esimo arreglo (factor adición de HC), en el nivel j

ϵ_{ij} = error experimental

- **Hipótesis estadísticas**

Las hipótesis estadísticas planteadas para la investigación se presentan a continuación:

Tabla 7. Hipótesis estadísticas planteadas en la investigación (Fuente: Elaboración propia)

| Factor | Hipótesis nula - Ho | Hipótesis alternativa - Ha |
|---|--|--|
| Hipótesis entre arreglos | | |
| Tratamiento | No hay diferencia significativa en la reducción de DBO ₅ y nitrógeno total en los tres tratamientos HSSP = HF = HSSC | Existen diferencias significativas en la reducción de DBO ₅ y nitrógeno total en los tres tratamientos HSSP ≠ HF ≠ HSSC |
| | No hay diferencia significativa en la reducción de HTP en los tratamientos HSSP = HF = HSSC | Existen diferencias significativas en la reducción de HTP en los tratamientos HSSP ≠ HF ≠ HSSC |
| Adición de HC | No hay diferencia significativa en la reducción de DBO ₅ y nitrógeno total en los humedales, operando con y sin adición de HC. C 1 = C 2 | Existen diferencias significativas en la reducción de DBO ₅ y nitrógeno total en los humedales operando con y sin adición de HC. C 1 ≠ C 2 |
| Hipótesis interacciones entre arreglos | | |
| | Configuración * Adición HC = 0 | Configuración * Adición HC ≠ 0 |

• **Análisis de varianza**

Inicialmente, a las variables de respuesta planteadas (DBO₅, NT y HTP) se aplicaron pruebas de significación: normalidad (Kolmogorov) y homogeneidad de varianzas (Levene), con el fin de verificar que los datos provenían de poblaciones normales (Anexo 1); y del mismo modo, se efectuó un análisis de estadística descriptiva para las variables de control medidas en las dos fases del experimento (DQO, SST, nitritos, nitratos, etc.).

Para comprobar las hipótesis estadísticas planteadas en la investigación (Tabla 7), se procedió a realizar un análisis individual de varianza (ANOVA) mediante el empleo del software estadístico SPSS (Statistical Package for Social Science) versión 17. La hipótesis estadística nula se rechazó para un nivel de significancia del 95 % ($\alpha < 0.05$).

El ANOVA para la fase I y variables DBO₅ y NT se realizó mediante un modelo unifactorial, debido a la presencia de un solo factor (tratamiento); en la fase II para la variable de respuesta: remoción de HTP, también se empleó un modelo de un solo factor (solo existió una sola concentración de alimentación de hidrocarburos); sin embargo, para las variables: remoción de DBO₅ y remoción de NT durante esta misma fase, se aplicó un modelo de dos factores para desarrollar el análisis del efecto individual y en conjunto de las variables independientes o factores: Tratamiento y Adición de hidrocarburos (Fase I y Fase II).

Para el caso donde fue necesario realizar comparaciones entre factores, se aplicó la prueba de comparación de Tukey (post-anova) que permite determinar cuáles de las variables analizadas presentan diferencias significativas entre los arreglos estudiados.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los humedales construidos fueron implementados en las instalaciones de la planta de tratamiento de aguas residuales en el mes de Octubre de 2009, seguido por su aclimatación durante tres meses (noviembre de 2009 – Enero de 2010) y finalmente, se dio inicio a su monitoreo en el mes de Enero del año 2010. La investigación fue dividida en dos etapas, donde se evaluaron los sistemas sin y con adición de hidrocarburos; durante las dos etapas, los humedales funcionaron bajo un tiempo de retención hidráulico teórico (TRH) de 98 horas, los cuales se conservaron mediante el control del caudal aplicado y el nivel del agua dentro de cada unidad de tratamiento.

8.1 Resultados etapa I – Sin adición de hidrocarburos (HTP)

Durante la primera etapa, se evidenció un agua residual afluyente con las siguientes características (tabla 8):

Tabla 8. Estadística descriptiva - agua residual afluyente Fase I (Fuente: Elaboración propia)

| | N* | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Promedio | Desviación estándar |
|---|----|--------------|--------------|----------------|---------------------|
| pH afluyente | 19 | 7.36 | 8.65 | 7.99 | 0.39 |
| Temperatura afluyente (°C) | 19 | 19 | 26 | 23 | 2.19 |
| DQO afluyente (mg/l) | 19 | 118 | 529 | 272 | 102 |
| DBO afluyente (mg/l) | 18 | 46 | 215 | 111 | 50 |
| Relación afluyente DBO/DQO | 18 | 0.24 | 0.73 | 0.42 | 0.13 |
| SST afluyente (mg/l) | 19 | 28 | 402 | 114 | 87 |
| Nitrógeno amoniacal afluyente (mg - NH ₃ /l) | 17 | 40 | 123 | 75 | 24 |
| Nitritos afluyente (mg/l) | 13 | 0.02 | 0.45 | 0.06 | 0.12 |
| Nitratos afluyente (mg/l) | 14 | 2.28 | 13 | 9.07 | 2.87 |
| Nitrógeno total afluyente (mg/l) | 10 | 59 | 124 | 77 | 20 |

*N: número de muestras

Las concentraciones de materia orgánica medida como DBO₅ y DQO en el agua residual afluyente corresponden a un agua residual doméstica diluida (Crites y Tchobanoglous, 1998). Así mismo, y de acuerdo a las desviaciones estándares halladas para estos dos parámetros, la concentración de materia orgánica para esta primera fase, se mostró variable, lo que obedeció a las fluctuaciones de la población estudiantil en el campus universitario. También se puede afirmar que el grado de biodegradabilidad del agua residual se estima medio, ya que la relación de DBO₅/DQO se encuentra en un valor aproximado de 0.42.

La concentración promedio de nitrógeno amoniacal afluyente fue alta, ya que según Kadlec and Wallace (2009), las aguas residuales municipales y domésticas generalmente presentan concentraciones entre 20 y 60 mg/l, estando en este caso entre 40 y 123 mg -

NH_3/l , razón por la cual en la primera etapa, no fue necesario adicionar ninguna fuente de nutriente. Con el fin de verificar los efectos que podría tener este compuesto en el tratamiento y específicamente en las plantas, se realizó el cálculo del porcentaje de amonio libre presente en la concentración máxima medida en el afluente (123 mg/L), mediante la ecuación de Anthonisen *et al.*, (1976), lo cual dio como resultado un porcentaje de 5.67 % de amonio libre que puede ser tóxico para las condiciones de pH y temperatura promedio propias de la investigación durante la primera fase. La conversión del amonio volátil y el ion NH_4^+ dependen principalmente del pH y la temperatura, siendo éste significativo a pH superior de 9.5 unidades y temperaturas altas (30 °C) (Paredes, 2009).

A lo largo de esta fase I, se evaluaron diariamente parámetros de campo como el caudal afluente y efluente de cada uno de los humedales (156 días de operación), así como el pH y temperatura, con el fin de monitorear las condiciones mínimas necesarias para el funcionamiento de un sistema biológico. En la tabla 9 y figuras 6 - 8 se presentan los resultados:

Tabla 9. Valores promedio parámetros medidos en campo (Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | Tratamiento | N* | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Promedio | Desviación estándar |
|------------------|-------------|-----|--------------|--------------|----------------|---------------------|
| Caudal (l/d) | HSSP | 77 | 20 | 207 | 97 | 35 |
| | HSSC | 89 | 29 | 219 | 122 | 31 |
| | HF | 75 | 27 | 207 | 103 | 33 |
| | Afluente | 102 | 42 | 159 | 128 | 13 |
| pH (Und) | HSSP | 73 | 6.83 | 8.67 | 7.28 | 0.29 |
| | HSSC | 84 | 6.94 | 8.29 | 7.81 | 0.32 |
| | HF | 76 | 7.04 | 8.46 | 7.46 | 0.24 |
| | Afluente | 91 | 7.06 | 8.65 | 7.86 | 0.39 |
| Temperatura (°C) | HSSP | 73 | 20 | 34 | 24 | 2.82 |
| | HSSC | 83 | 20 | 30 | 24 | 2.19 |
| | HF | 74 | 20 | 30 | 23 | 2.16 |
| | Afluente | 90 | 19 | 33 | 25 | 3.47 |

*N: número de muestras

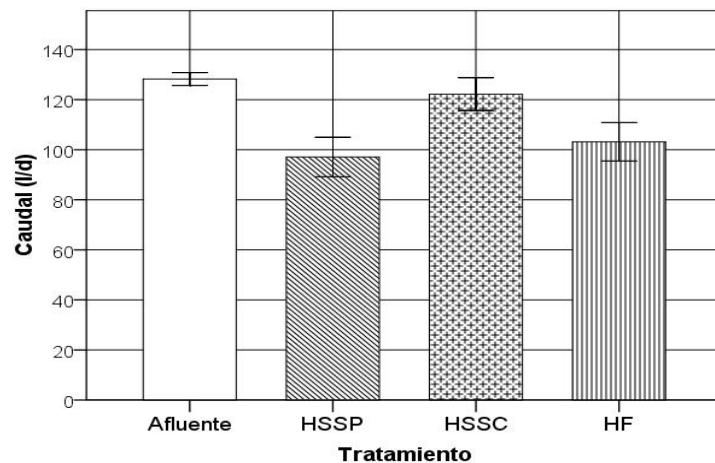


Figura 6. Comportamiento del caudal Fase I
(Fuente: Elaboración propia)

El caudal afluente a los tres humedales se presentó estable, sin embargo, los caudales promedio de las salidas de los sistemas, se mostraron más bajos debido a la pérdida de agua correspondiente a la evapotranspiración, ya que estos valores durante la primera fase fueron del 30 % para el HSSP, 15 % para el HSSC y 27 % para el HF, siendo menor en el HSSC, dada la ausencia de plantas, por lo tanto solo se presentó el fenómeno de evaporación. Las tasas de evapotranspiración en un sistema de humedales pueden variar ampliamente y esto depende las condiciones de microclima en el humedal, razón por la cual, este parámetro no solo es de importancia a nivel ecológico sino también, por su influencia en la pérdida de agua en un proceso de tratamiento (Kuschik *et al.*, 1999). Según Reed *et al.* (1995), la pérdida de agua debida a la evapotranspiración puede reducir su volumen pero concentrar el contaminante en el sistema, así el humedal demuestre remociones considerables en términos de masa.

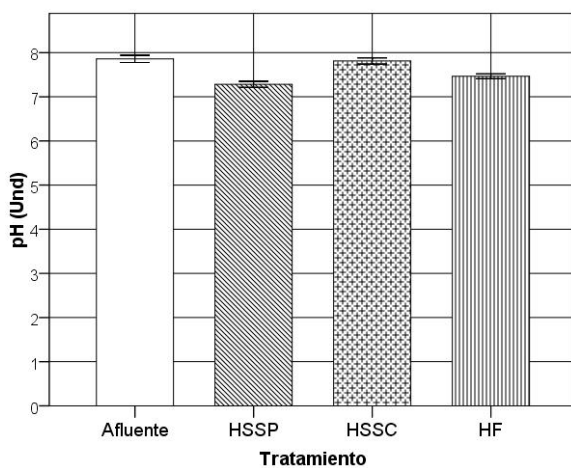


Figura 7. Comportamiento del pH Fase I
(Fuente: Elaboración propia)

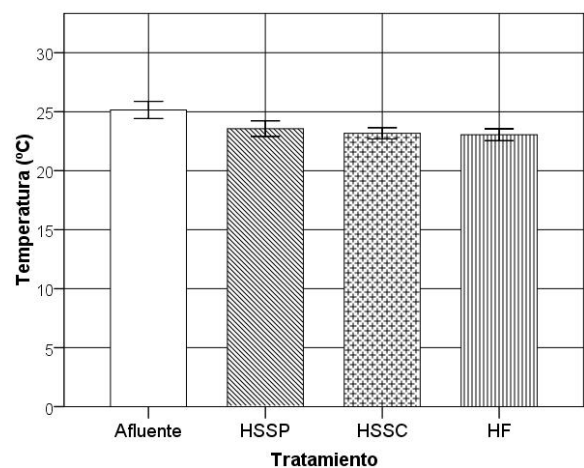


Figura 8. Comportamiento de la temperatura Fase I
(Fuente: Elaboración propia)

En cuanto al pH, no se detectó diferencia en términos de entrada y salida de los sistemas, ya que los valores aún continuaban entre 7 y 8 unidades, lo que es adecuado para el desarrollo de los microorganismos y plantas. No obstante, los HSSP y HF presentaron un pH un poco menor comparado con el HSSC, lo que se puede atribuir a los procesos llevados a cabo por las plantas y a los procesos de transformación del nitrógeno.

En términos de temperatura, los valores registrados presentaron pocas variaciones y estas obedecían principalmente a las características climáticas del lugar donde fueron implementados los sistemas de tratamiento; el rango de temperatura para todos los sistemas se mantuvieron entre 19 y 33 °C.

La evaluación de los humedales se enfocó hacia la reducción de las cargas orgánicas superficiales aplicadas, debido a la influencia que representa la evapotranspiración en el flujo de agua que pasa a través de los sistemas.

En general, los tres humedales tuvieron altas tasas de remoción de materia orgánica para los parámetros de DQO, DBO₅ y SST (tabla 10). No obstante, los mejores resultados fueron sustentados en el humedal con matriz de suelo y plantas (HSSP) para una DQO y DBO₅ de 84 % y 92 % respectivamente ($p < 0.05$), siendo su mayor eficiencia atribuida no solo a las plantas sino también a la presencia de matriz filtrante, debido a que su área superficial permite el anclaje de microorganismos y aumenta la capacidad de absorber sustancias (Reed *et al.*, 1995; Lara, 1999, Stottmeister *et al.*, 2003). De otra parte, se demuestra que el humedal usado como control, a pesar de no poseer plantas sembradas, reporta datos similares al HF para las condiciones de esta investigación.

Algunos autores como Stottmeister *et al.*, (2003), han reportado que las plantas son de gran importancia en el tratamiento de aguas mediante humedales, donde consideran que la zona de reacción activa de los humedales construidos es la zona de raíces, donde se llevan a cabo los procesos fisicoquímicos y biológicos, pero sin embargo estos autores también reconocen que la matriz filtrante cumple un papel decisivo, ya que no solo permiten el sostenimiento de las plantas, sino que también favorece la formación de microorganismos que desarrollan en mayor proporción la remoción de compuestos.

Contrario a lo anterior, el humedal sin matriz de suelo y plantas (HF) mostró ser relativamente mejor para reducir el contenido de SST en el agua, debido a su capacidad de acumulación de sólidos; sin embargo, el análisis de varianza aplicado indicó que, no existen diferencias significativas en la remoción de sólidos en los humedales con y sin medio filtrante ($p > 0.05$). Investigaciones realizadas por LIFE-Environmental Funding (2005), concluyen que los sistemas de humedales flotantes tienen grandes capacidades para la remoción de sólidos y nutrientes del agua residual.

Tabla 10. Reducciones de materia orgánica en las unidades experimentales Fase I
(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | | HSSP | | HSSC | | HF | |
|------------------|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) |
| DQO | Promedio | 84 | 16 | 78 | 15 | 75 | 14 |
| | D. Estándar | 7.83 | 7.12 | 13 | 7.00 | 12 | 7.64 |
| DBO ₅ | Promedio | 92 | 6.78 | 88 | 6.54 | 85 | 6.45 |
| | D. Estándar | 4.07 | 3.18 | 5.26 | 2.98 | 8.43 | 3.43 |
| SST | Promedio | 89 | 6.98 | 89 | 7.02 | 93 | 7.33 |
| | D. Estándar | 7.72 | 5.76 | 9.92 | 5.66 | 8.08 | 6.24 |

En las figuras 9-13, se muestran los resultados de eficiencias de remoción, cargas orgánicas y concentraciones afluentes y efluentes para los tres parámetros (DQO, DBO₅ y SST) en cada uno de los humedales.

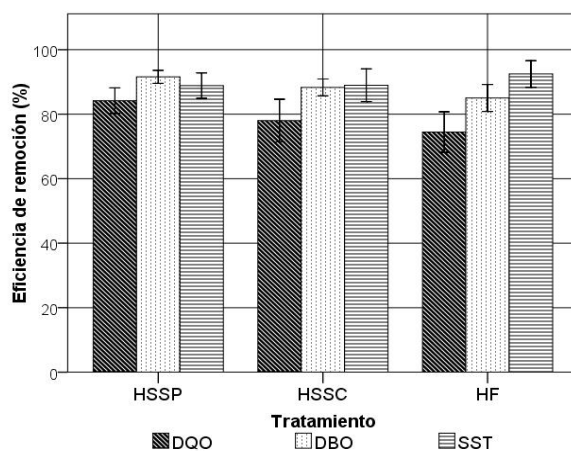


Figura 9. Eficiencias de remoción de materia orgánica (Fuente: Elaboración propia)

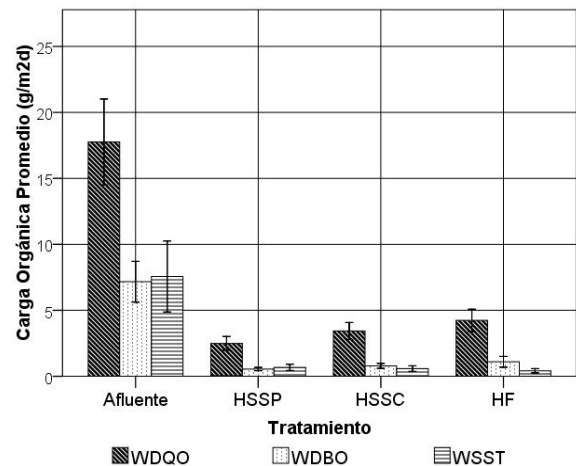


Figura 10. Cargas orgánicas (Fuente: Elaboración propia)

En términos de DQO, se obtuvo una concentración afluente promedio de 272 mg/l (+/- 102) que correspondió a una carga orgánica superficial de 18 g/m²d. Las cargas orgánicas a la salida de los humedales fueron tan bajas como 2.45 g/m²d para HSSP, 3.36 g/m²d para HSSC y 3.99 g/m²d para HF.

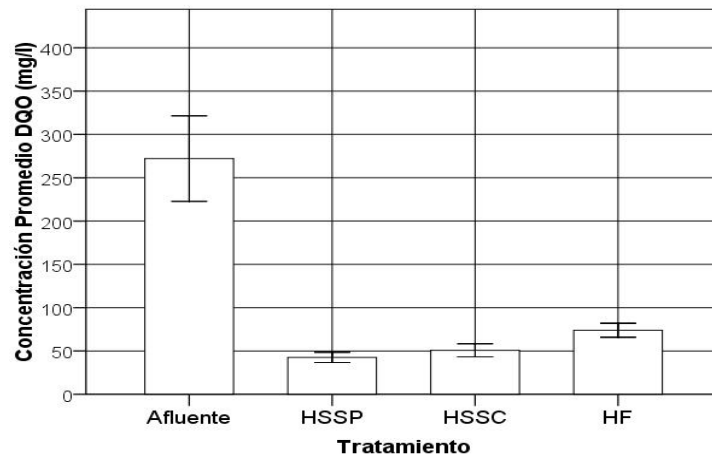


Figura 11. Concentraciones de DBO afluentes y efluentes de los humedales (Fuente: Elaboración propia)

La DBO_5 , se evaluó en los sistemas durante un periodo de 24 semanas (18 muestreos), durante los cuales se obtuvieron concentraciones afluentes promedio de 111 mg/l (+/-50) que corresponden a una carga orgánica superficial de 7.32 g/m²d, las concentraciones de los efluentes de los humedales fueron de 9.57 mg/l en el HSSP, 12 mg/l en el HSSC y 19 mg/l en el HF. En este sentido, el humedal flotante continúa presentando los menores resultados para remover materia orgánica y el humedal con plantas y matriz de suelo fue el que mayor remoción logró. Para este parámetro, los tres humedales se mantuvieron estables a pesar de las fluctuaciones de las concentraciones afluentes, revelando la capacidad de los sistemas para soportar variaciones de carga.

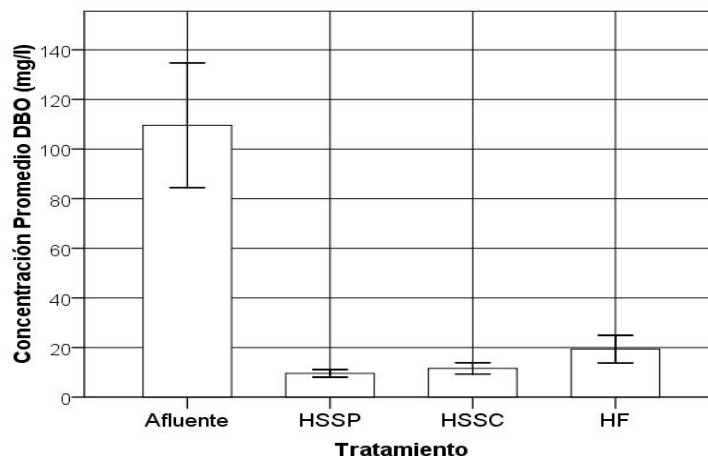


Figura 12. Concentraciones de DBO_5 afluentes y efluentes de los humedales (Fuente: Elaboración propia)

Las eficiencias de remoción logradas para la DBO_5 , se mostraron igualmente altas, ya que los valores para los tres humedales fueron superiores al 80 %, encontrándose estos

valores dentro de los reportados por la literatura (Maehlum and Stalnacke, 1999; Verhoeven and Meuleman, 1999; Dialynas *et al.*, 2002).

En la remoción de SST para esta primera etapa, se presentaron variaciones de cargas afluentes de SST entre 1.65 y 24 g/m²d, pero aun así, los efluentes fueron más bajos que 0.65 g/m²d, siendo el HF aquel que obtuvo las mejores remociones ($p > 0.05$), logrando concentraciones medias efluentes de 7.34 mg/l de SST, respecto a concentraciones afluentes promedio de 114 mg/l, lo cual al relacionar estos resultados con otros estudios realizados donde reportan un rango de SST en efluentes de 3 - 23 mg/l, estos sistemas se muestran eficientes (EPA, 2000). Según Duncan (2009), los humedales flotantes pueden lograr reducciones de SST entre el 30 y 80 %, lo que demuestra que en este caso, el humedal flotante empleado tuvo un buen funcionamiento para este parámetro.

Según los resultados encontrados en la reducción de los sólidos en el humedal flotante, se puede inducir que los sistemas de humedales construidos no dependen de los medios filtrantes para mejorar las características de un agua residual en términos de SST, aunque no manifestaron diferencias significativas respecto a los resultados logrados en los sistemas con medio. Lo anterior, concuerda con Headley and Tanner (2006), quienes reportan que el medio filtrante no es relevante en un sistema de humedales construidos, ya que durante décadas se han empleado los humedales flotantes como una modificación de los humedales convencionales para tratar diferentes tipos de contaminantes, encontrándose excelentes resultados.

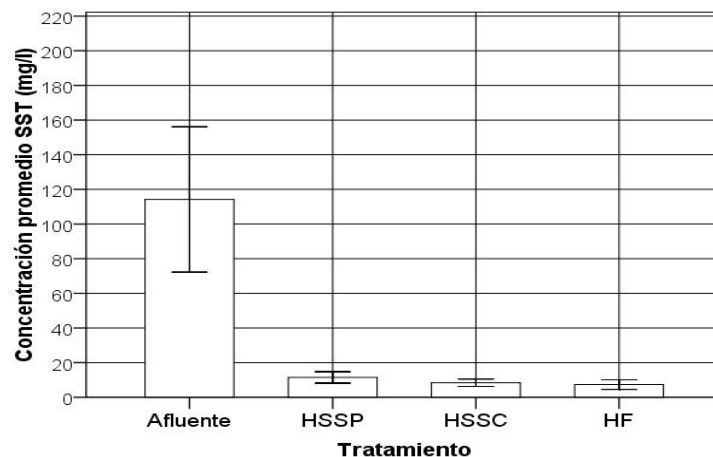


Figura 13. Concentraciones de SST afluentes y efluentes de los humedales (Fuente: Elaboración propia)

Por otra parte, la evaluación de la remoción del nitrógeno mediante los humedales experimentales, se llevó a cabo por medio de la determinación del nitrógeno en forma amoniacal, nitritos y nitratos, para lo cual se encontraron los resultados expuestos en la tabla 11.

Tabla 11. Transformaciones de nitrógeno en las unidades experimentales
(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | | HSSP | | HSSC | | HF | |
|-------------------|-------------|----------------|--|----------------|--|----------------|--|
| | | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) |
| N-NH ₃ | Promedio | 16 | 1.22 | 10 | 0.96 | 37 | 2.20 |
| | D. Estándar | 37 | 2.34 | 39 | 2.25 | 33 | 2.18 |
| N-NO ₂ | Promedio | 29 | 0.003 | 18 | 0.003 | -221 | -0.001 |
| | D. Estándar | 172 | 0.009 | 90 | 0.009 | 357 | 0.001 |
| N-NO ₃ | Promedio | 70 | 0.45 | 60 | 0.42 | 56 | 0.38 |
| | D. Estándar | 22 | 0.19 | 39 | 0.21 | 31 | 0.20 |
| NT | Promedio | 23 | 1.37 | 23 | 1.43 | 43 | 2.39 |
| | D. Estándar | 30 | 1.85 | 30 | 1.99 | 21 | 1.60 |

La remoción de nitrógeno en estos sistemas no fue muy alta, ya que contrastando los resultados de los tres sistemas, el mayor porcentaje de remoción de nitrógeno total fue sustentado por el humedal sin matriz de suelo y plantas (HF), siendo este del 43 %; teniendo en cuenta que las concentraciones afluentes se encontraban en promedio en 77 mg/l (5.14 g/m²d) y las efluentes en 66 mg/l para el HSSP, 62 mg/l para el HSSC y 57 mg/l para el HF.

Según Kuschik *et al.* (2003), en una evaluación que se realizó a 268 humedales construidos en Europa, los humedales de flujo subsuperficial pueden llegar a remover entre 30 y 40 % de nitrógeno total, pero los autores aclaran que esto puede depender de la temperatura y las condiciones fisiológicas de la planta. No obstante, Vanier and Dahab (2000) reportan que la capacidad de toma de nutrientes por parte de las macrófitas emergentes puede variar desde 0.27 hasta 0.68 g/m²d de nitrógeno, para lo cual los valores encontrados en la presente investigación son superiores (1.37 – 2.39 g/m²d).

En el proceso de remoción de nitrógeno, un factor de importancia es la disponibilidad del oxígeno para las transformaciones de los compuestos, razón por la cual el humedal flotante pudo presentar la mayor remoción del nitrógeno, ya que este no solo cuenta con la aireación del agua aportada por las plantas, sino también porque la superficie de esta se encuentra en contacto con el aire. Según Duncan (2009), los principales mecanismos de remoción en los humedales flotantes, son la absorción y la utilización por medio de las bacterias aerobias y anaerobias que se encuentran en la rizósfera de nutrientes y sólidos suspendidos, lo que genera una incorporación de sustancias en las raíces y tallos de las macrófitas permitiendo altas tasas de remoción de estos parámetros. Este mismo autor comenta que los humedales flotantes pueden lograr remociones de nitrógeno total entre 33 y 50 %, rango en el cual, el HF reportó sus resultados. Vymazal (2005) comenta que en los humedales de flujo subsuperficial por no tener una superficie de agua expuesta a la

atmosfera, los mecanismos de volatilización, adsorción y toma de nitrógeno son más limitados.

En las figuras 14-15, se representa el comportamiento promedio del nitrógeno total y las subespecies medidas.

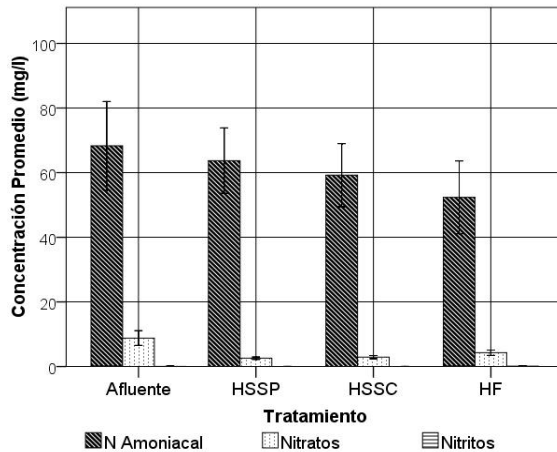


Figura 14. Concentración promedio especies de nitrógeno (Fuente: Elaboración propia)

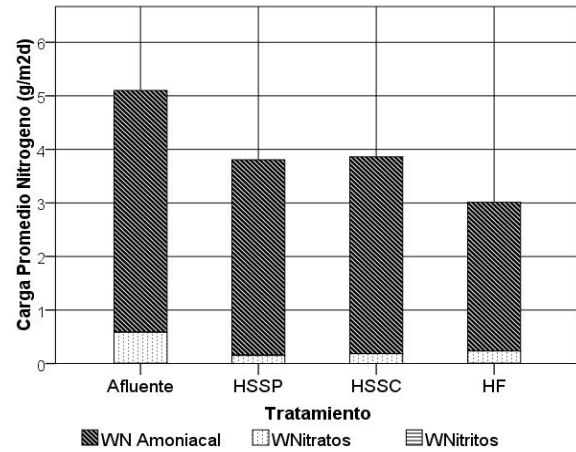


Figura 15. Cargas superficiales de nitrógeno promedio Fase I (Fuente: Elaboración propia)

En general, los sistemas plantados presentaron tasas de remoción de las especies del nitrógeno un poco más altas que el sistema sin plantas (Brix, 1997; Kadlec y Wallace, 2009), sin encontrar diferencias marcadas entre los resultados ($p > 0.05$). Es claro que existe un relativo efecto de las plantas en la remoción de este parámetro, cuando estas se encuentran en etapa de crecimiento, que es donde mayor cantidad de nitrógeno en forma amoniacal asimilan (Ye *et al.*, 2009).

En estas unidades, los nitritos se presentaron en cantidades casi indetectables y en ocasiones con aumentos de su concentración en los efluentes, dando eficiencias negativas como se observa en la tabla 11, esto se debe a la formación de nitritos durante el proceso transformación del nitrógeno (estado de oxidación intermedio entre el amonio y los nitratos) y dada su poca estabilidad química (Kadlec and Wallace, 2009).

En este orden de ideas, el análisis de varianza realizado para la fase I y variables de respuesta: remoción de DBO_5 y NT, que se muestra en las tablas 12 – 15, confirmaron que existen diferencias significativas ($p = 0.010 < 0.05$) en la remoción de DBO_5 entre las tres configuraciones de humedales, siendo dichas diferencias marcadas entre los sistemas HF y HSSP (prueba de Tukey). Contrariamente en la variable NT, no se evidenció diferencia entre las medias de los datos ($p = 0.169 > 0.05$) según el análisis de varianza, el cual se confirmó con la prueba post-hoc.

Tabla 12. Resultados ANOVA Fase I: Eficiencia de remoción de DBO₅ (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Media cuadrática | F | Significación |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|---------------|
| Entre Grupos | 386.415 | 2 | 193.208 | 5.029 | 0.010 |
| IntraGrupos | 1959.422 | 51 | 38.420 | | |
| Total | 2345.837 | 53 | | | |

Tabla 13. Resultados prueba post- hoc: Eficiencia de remoción de DBO₅ (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Prueba | Tratamiento | N | Subset $\alpha = 0.05$ | |
|-----------|-------------|----|------------------------|---------|
| | | | 1 | 2 |
| Tukey HSD | HF | 18 | 85.0221 | |
| | HSSC | 18 | 88.2901 | 88.2901 |
| | HSSP | 18 | | 91.5746 |
| | Sig. | | 0.263 | 0.259 |

Tabla 14. Resultados ANOVA Fase I: Eficiencia de remoción de NT (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Media cuadrática | F | Significación |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|---------------|
| Entre Grupos | 2830.774 | 2 | 1415.387 | 1.897 | 0.169 |
| Intra Grupos | 20143.414 | 27 | 746.052 | | |
| Total | 22974.188 | 29 | | | |

Tabla 15. Resultados prueba post- hoc: Eficiencia de remoción de NT (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Prueba | Tratamiento | N | Subset $\alpha = 0.05$ |
|-----------|-------------|----|------------------------|
| | | | 1 |
| Tukey HSD | HSSC | 10 | 22.7698 |
| | HSSP | 10 | 23.0679 |
| | HF | 10 | 43.5234 |
| | Sig. | | 0.224 |

8.2 Resultados etapa II – Con adición de hidrocarburos (HTP)

Durante la segunda etapa, se realizó la adición de diesel como fuente de hidrocarburo mediante la dosificación de un caudal de 2 ml/10min a cada una de las unidades experimentales como se especificó en la metodología propuesta.

Las características del agua residual afluyente con la adición de diesel se resumen en la tabla 16, y cabe resaltar que en esta fase se realizó la adición de urea como fuente de nitrógeno en aquellos eventos donde su contenido evidenciaba por debajo de 50 mg/l, ya que este nutriente es importante para la degradación de hidrocarburos como se especificó en la revisión de literatura. Adicionalmente, se quería controlar este parámetro para verificar su comportamiento al adicionar el diesel y el efecto del mismo en los humedales.

Tabla 16. Estadística descriptiva - agua residual afluyente Fase II (Fuente: Elaboración propia)

| | N* | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Promedio | Desviación estándar |
|--------------------------------------|----|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------|
| pH afluyente | 22 | 7.06 | 8.94 | 7.72 | 0.50 |
| Temperatura afluyente (°C) | 22 | 18 | 29 | 22 | 1.53 |
| DQO afluyente (mg/l) | 22 | 536 | 2,149 | 1,236 | 453 |
| DBO afluyente (mg/l) | 17 | 128 | 962 | 492 | 278 |
| Relación afluyente DBO/DQO | 17 | 0.19 | 0.72 | 0.43 | 0.17 |
| SST afluyente (mg/l) | 20 | 29 | 1,060 | 457 | 279 |
| Nitrógeno amoniacal afluyente (mg/l) | 19 | 11 | 253 | 75 | 52 |
| Nitritos afluyente (mg/l) | 22 | 0.00 | 0.25 | 0.02 | 0.05 |
| Nitratos afluyente (mg/l) | 21 | 5.86 | 21 | 13 | 3.42 |
| Nitrógeno total afluyente (mg/l) | 18 | 17 | 268 | 90 | 55 |

*N: número de muestras

Durante la segunda fase, las características del agua residual afluyente cambiaron debido a la adición del diesel, esto causó un aporte de material orgánico incrementando notablemente la concentración de DQO, DBO₅ y SST, pasando de una concentración promedio de DQO de 272 mg/l en la primera fase a una concentración de 1236 mg/l en la segunda fase, es decir 4.5 veces mayor a la fase I. La variabilidad de los datos del afluyente tal como ocurrió en la fase I, se debió a la transición de la población en el campus universitario, ya que este no fue un parámetro de control. En esta fase, la biodegradabilidad del agua residual representada como la relación DBO/DQO, no cambió (0.43), dado que los HTP son fuente principalmente de carbono y así mismo, conservaron la biodegradabilidad.

El contenido del nitrógeno en el afluyente, se conservó similar al de la fase I, sin embargo en esta etapa se presentaron algunos datos tan bajos como 17 mg/l de nitrógeno amoniacal y por lo tanto, fue necesario adicionar urea para incrementar este valor por encima de 50 mg/l como se había planteado anteriormente.

Igualmente que en la fase I, se realizó el monitoreo de los parámetros de campo como caudal, pH y temperatura. Los resultados se presentan en la tabla 17:

Tabla 17. Valores promedio parámetros medidos en campo Fase II (Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | Tratamiento | N* | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Promedio | Desviación estándar |
|------------------|-------------|----|--------------|--------------|----------------|---------------------|
| Caudal (l/d) | HSSP | 82 | 33 | 213 | 121 | 29 |
| | HSSC | 87 | 37 | 233 | 125 | 32 |
| | HF | 50 | 58 | 213 | 106 | 33 |
| | Afluente | 96 | 85 | 156 | 125 | 18 |
| pH (Und) | HSSP | 83 | 6.86 | 8.02 | 7.35 | 0.31 |
| | HSSC | 84 | 6.67 | 8.17 | 7.46 | 0.33 |
| | HF | 67 | 6.50 | 8.61 | 7.53 | 0.36 |
| | Afluente | 84 | 6.73 | 9.22 | 7.82 | 0.62 |
| Temperatura (°C) | HSSP | 80 | 18.30 | 28.10 | 21.42 | 1.66 |
| | HSSC | 77 | 18.50 | 26.20 | 21.35 | 1.54 |
| | HF | 61 | 18.40 | 25.60 | 21.04 | 1.59 |
| | Afluente | 77 | 12.70 | 29.67 | 21.16 | 3.86 |

*N: número de muestras

Los caudales en esta fase tuvieron un comportamiento estable (figura 16), con algunas desviaciones a las salidas debidas al efecto de la evapotranspiración, la cual para esta segunda etapa, se presentó del 13 % para el humedal con matriz de suelo y plantas (HSSP), 10 % para el humedal con matriz de suelo y sin plantas (HSSC) y de 24 % para el humedal sin matriz de suelo con plantas (HF).

Comparando el comportamiento de la evapotranspiración durante las dos etapas de evaluación de los sistemas, se observa una reducción de ésta en la fase II, lo que estima fue a causa de la toxicidad de los HTP en las plantas, ya que una vez el diesel ingresó a los humedales, las macrófitas fueron afectadas por el compuesto, evidenciándose con un cambio en el aspecto y decaimiento de las mismas.

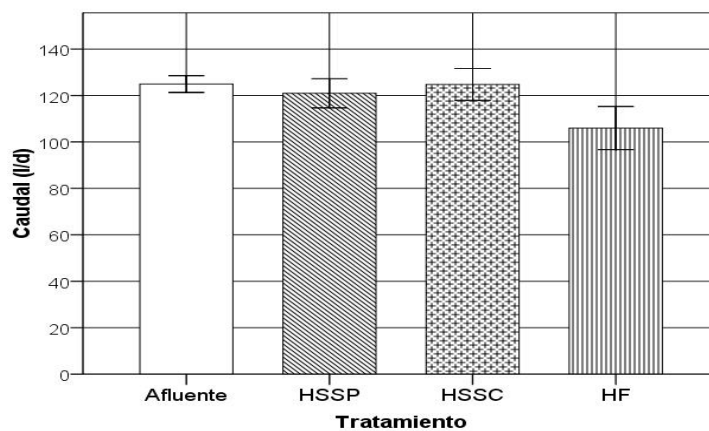


Figura 16. Comportamiento del caudal Fase II (Fuente: Elaboración propia)

En la figura 17 y 18, se muestra el comportamiento del pH y temperatura en los tres humedales respectivamente, siendo ambos parámetros estables durante el monitoreo, ya que para los tres casos, el valor del pH se mantuvo entre 7 y 8 unidades tanto a la entrada como a la salida de los sistemas; y el valor de temperatura osciló entre 20 y 25 °C.

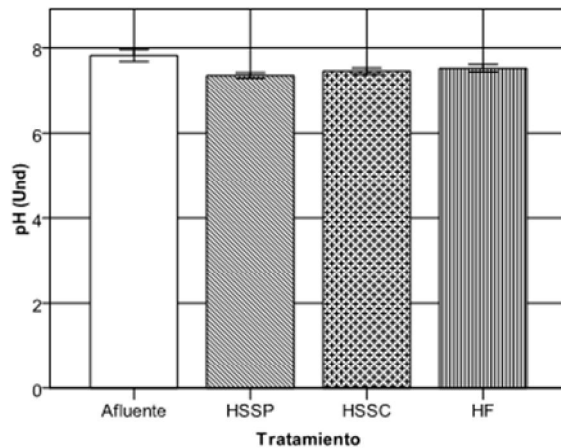


Figura 17. Comportamiento del pH Fase II (Fuente: Elaboración propia)

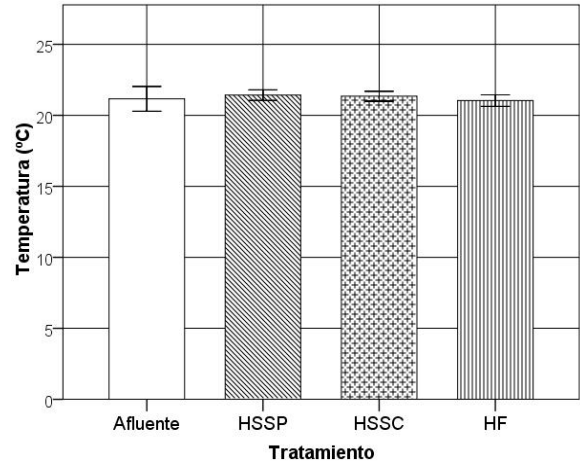


Figura 18. Comportamiento de la temperatura Fase II (Fuente: Elaboración propia)

Al adicionar el hidrocarburo, el humedal flotante después de la 5^a semana de dosificación con diesel mostró toxicidad en las plantas, ya que para ese entonces, las *Phragmites* se encontraban totalmente muertas como respuesta a la alta concentración que se aplicó (figura 19). En respuesta a esto, se suspendió la alimentación del HTP en esta unidad, pero se continuó la alimentación con agua residual doméstica y su monitoreo para verificar el comportamiento del hidrocarburo que se había adicionado hasta la fecha, así como el monitoreo de los otros parámetros.



Figura 19. Evolución de las macrófitas con la adición del hidrocarburo - Fase II (Fuente: Elaboración propia)

De acuerdo a los resultados hallados en el humedal sin matriz de suelo y con plantas (HF), se procedió a realizar la comparación de los datos encontrados en los dos humedales con medio filtrante y de forma individual, el análisis de los datos reportados para el humedal flotante. En este sentido, se concluye que el HF no es una configuración adecuada para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos en alta concentración, como se evaluó en la presente investigación. Sin embargo, se encontraron resultados muy prometedores para el tratamiento de aguas residuales domésticas como se observó durante la fase I, por lo tanto se sugiere más investigación para el empleo de este tipo de sistemas bajo las condiciones de clima tropical como el de la zona cafetera de Colombia.

Durante este periodo de monitoreo, las remociones de materia orgánica (DQO, DBO₅ y SST) para los humedales con matriz de suelo (HSSP y HSSC) lograron alcanzar valores superiores al 90 %, lo que indica que los humedales lograron un estado de maduración que permitió optimizar su funcionamiento de las unidades experimentales durante la segunda fase, así como un mayor desarrollo microbiano que incrementó la remoción de la materia orgánica a pesar de las altas concentraciones de hidrocarburos.

En la tabla 18, se presentan los resultados de reducción de cargas contaminantes en los humedales durante la etapa con adición de HTP. Con relación al parámetro DQO, el HSSP fue el que logró la mejor eficiencia, 95 % equivalentes a una reducción de 81 g/m²d de carga contaminante y una concentración efluente de 58 mg/l; pero no obstante, no mostró diferencias significativas con los resultados logrados por el HSSC (p>0.05). Por otra parte, la remoción de DBO₅ se mostró igual a 97 % en los dos humedales (p>0.05), equivalente a una DBO₅ efluente de 12 mg/l; y para los SST, el HSSC mostró una mayor reducción, 98 % correspondiente a 31 g/m²d, evidenciándose según el análisis de varianza, un efecto significativo en la configuración de los humedales para remover este último parámetro (p<0.05).

Tabla 18. Reducciones de materia orgánica en las unidades experimentales Fase II
(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | | HSSP | | HSSC | | HF* | |
|------------------|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) |
| DQO | Promedio | 95 | 81 | 94 | 79 | 61 | 26 |
| | D. Estándar | 2.44 | 30 | 2.59 | 28 | 28 | 34 |
| DBO ₅ | Promedio | 97 | 34 | 97 | 33 | 84 | 17 |
| | D. Estándar | 1.89 | 19 | 3.38 | 18 | 18 | 21 |
| SST | Promedio | 95 | 30 | 98 | 31 | 97 | 32 |
| | D. Estándar | 13 | 19 | 2.13 | 18 | 3.85 | 20 |

* Análisis de HF teniendo en cuenta suspensión de HTP

A lo largo de la fase II, en el humedal flotante se evidenció un fuerte descenso en la efectividad del sistema de tratamiento en términos de reducción de DQO y DBO₅ (Figuras 20 – 21), lo que demuestra que el HTP al ocasionar la muerte de las plantas, afectó el desempeño del mismo, pues en este caso, se reportaron reducciones de carga de tan solo 26 g/m²d para DQO y 17 g/m²d para DBO₅, que correspondían a concentraciones efluentes promedio de 107 (+/- 57) mg/l y 17 (+/-11) mg/l respectivamente. Las remociones de SST se presentaron relativamente mayores respecto a la fase I, con concentraciones efluentes de 10 mg/l (+/- 6.78).

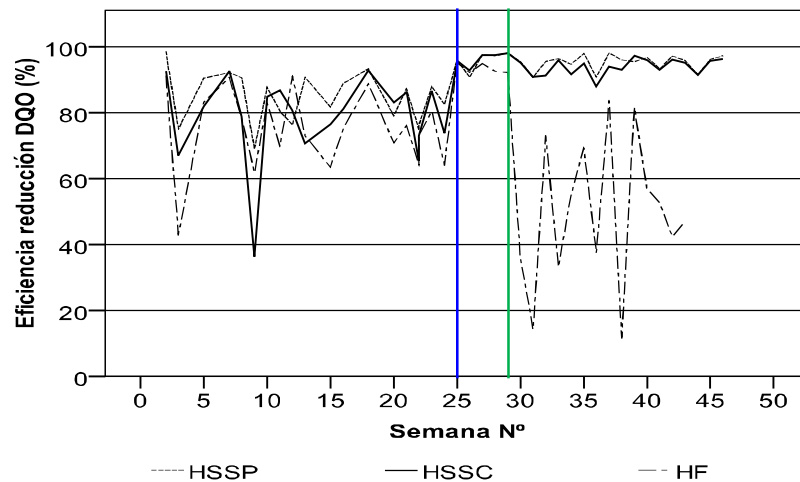


Figura 20. Comportamiento de eficiencias de DQO
(Fuente: Elaboración propia)
* Línea azul: inicio adición de HTP
** Línea verde: Suspensión alimentación con diesel

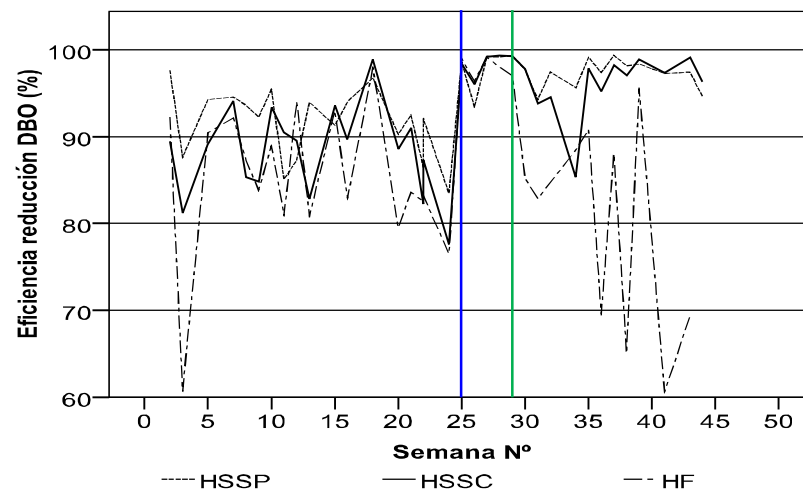


Figura 21. Comportamiento de eficiencias de DBO₅
(Fuente: Elaboración propia)
* Línea azul: inicio adición de HTP
** Línea verde: Suspensión alimentación con diesel

Las figuras 22 – 26 presentan el comportamiento de los humedales con matriz de suelo para la remoción de materia orgánica durante la fase II con adición de HTP; donde se evidencia la estabilidad y efectividad de los sistemas para remover DQO, DBO₅ y SST. Para los dos casos (HSSP y HSSC), se lograron cargas efluentes de DQO menores a 5 g/m²d, las cuales al ser comparadas con una cargas afluente de 83 g/m²d, representa eficiencia en el tratamiento. Para los parámetros DBO₅ y SST, los humedales mostraron estabilidad y eficiencia, ya que en ningún caso las concentraciones efluentes fueron superiores a las afluentes, y se reportaron datos promedio de concentración de DBO₅ tan bajos como 12 (+/- 6.09) mg/l en el HSSP y 6.55 (+/- 4.08) mg/l de SST en el HSSC.

Al realizar un análisis de los resultados hallados en la fase I y II para los parámetros en mención, se encontró que durante la fase II los sistemas lograron remover en promedio hasta 4.7 veces más g/m²d de DBO₅ que en la fase I, mientras que para los SST removieron cerca de 4.4 veces más g/m²d.

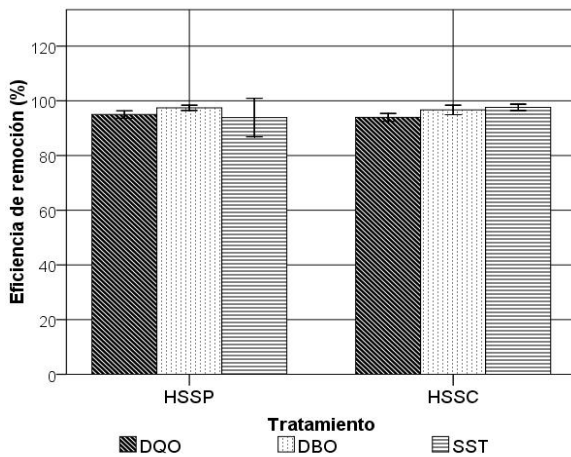


Figura 22. Eficiencias de remoción de materia orgánica Fase II

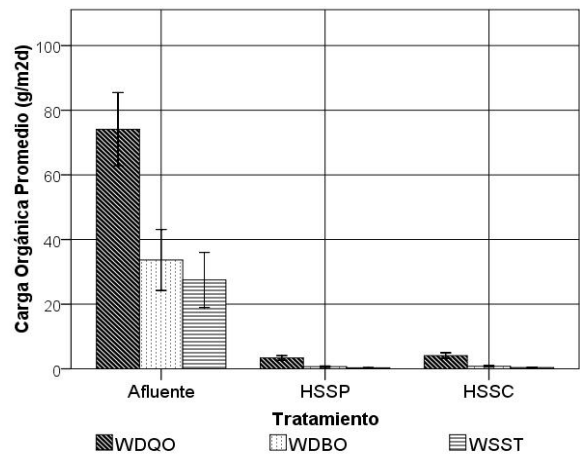


Figura 23. Cargas orgánicas Fase II

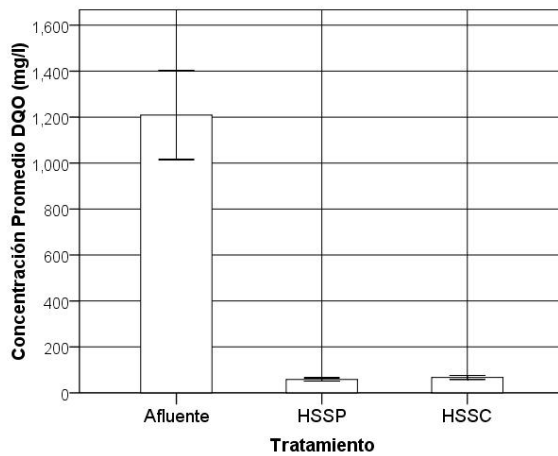


Figura 24. Concentraciones de DQO afluentes y efluentes de los humedales Fase II

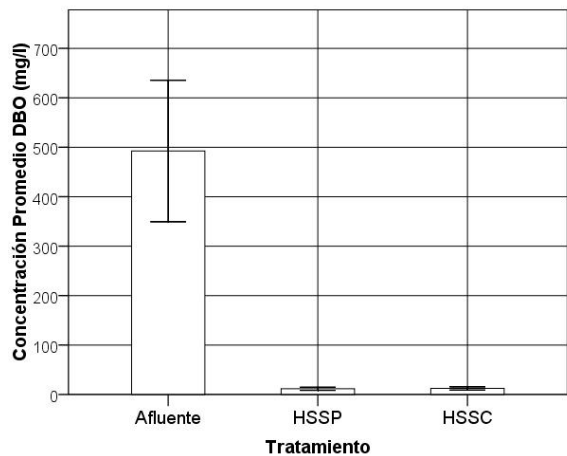


Figura 25. Concentraciones de DBO₅ afluentes y efluentes de los humedales Fase II

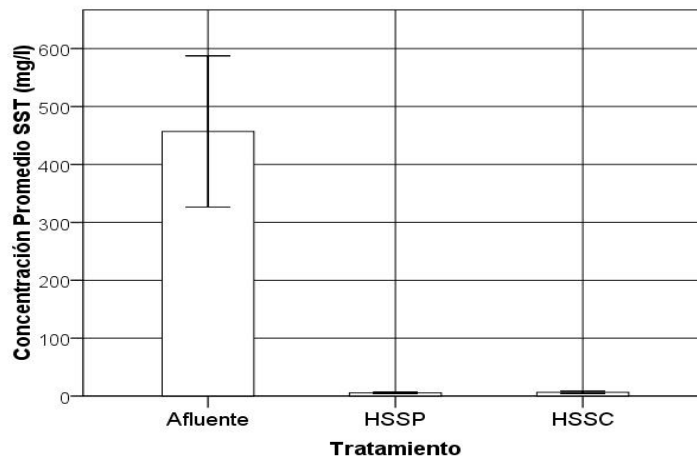


Figura 26. Concentraciones de SST afluentes y efluentes de los humedales Fase II (Fuente: Elaboración propia)

Estos resultados se encontraron superiores a los reportados en la literatura, donde se han empleado sistemas de humedales para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos (PAHs) a bajas concentraciones y las remociones de DQO y SST reportadas fueron menores al 70 % (Terzakis *et al.*, 2008; Fountolaskis *et al.*, 2009).

Las figuras 27 – 29, presenta los resultados de reducción de carga contaminante medida como DQO, DBO₅ y SST para el humedal flotante, una vez se suspendió la alimentación con diesel (semana 29):

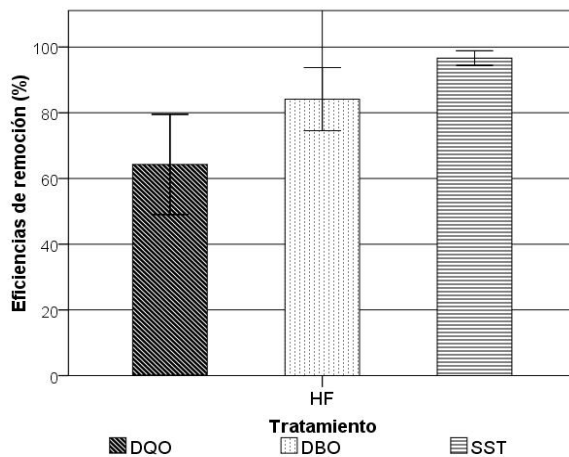


Figura 27. Eficiencias de remoción de materia orgánica – HF Fase II (Fuente: Elaboración propia)

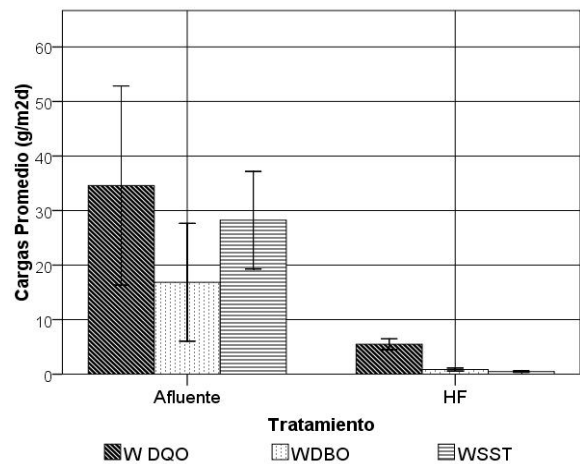


Figura 28. Cargas orgánicas – HF Fase II (Fuente: Elaboración propia)

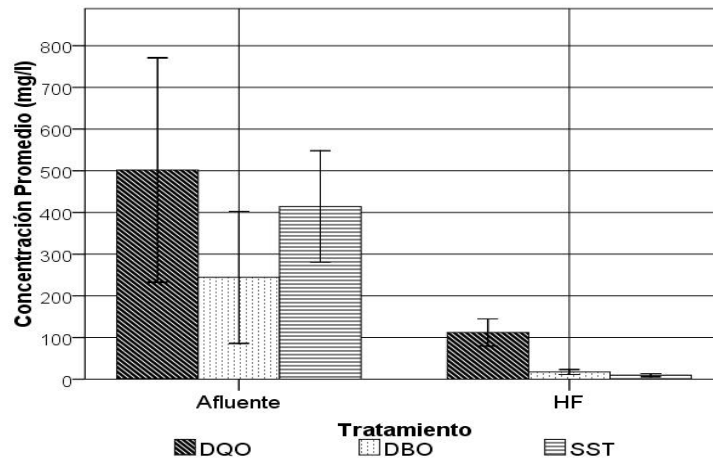


Figura 29. Concentraciones de DQO, DBO₅ y SST afluentes y efluentes de los humedales – HF Fase II
(Fuente: Elaboración propia)

Durante la segunda fase, las remociones de DQO en el humedal flotante se redujeron del 74 al 61 %, mientras que las remociones de DBO₅ y SST se mantuvieron similares a las halladas en la fase I, pero sin embargo es preciso aclarar que durante esta etapa, una vez se suspendió la adición de HTP, el sistema continuó con alimentación de agua residual doméstica y por lo tanto, las eficiencias reportadas son válidas para la remoción de la materia orgánica presente en el agua doméstica y no para aquella aportada por el diesel.

La remoción de nitrógeno total, continuó siendo baja durante el desarrollo de la segunda fase (tabla 19), y los porcentajes de remoción disminuyeron notablemente por lo tanto, se estima que la adición del HTP pudo haber afectado la transformación de las especies del nitrógeno y su reducción, debido a la formación de la película aceitosa generada por el diesel, creando una barrera y reduciendo la transferencia de agua y oxígeno hacia la planta (Adam and Duncan, 2002).

En términos de nitrógeno total, la mayor reducción de carga la realizó el humedal flotante, a pesar de la afectación de las plantas. No obstante, se evidenció que el humedal con matriz de suelo y plantas así como, el humedal con matriz de suelo y sin plantas, redujeron su porcentaje de remoción de NT de 23 % a 14 % y de 23 % a 15 %, respectivamente. Esto permite estimar que las plantas no mostraron evidencias de tener efectos en la remoción de nitrógeno sino que por el contrario, la configuración del humedal o tratamiento planteado (presencia o ausencia de matriz de suelo) realizan un aporte en la remoción de este parámetro, ya que aunque las plantas del HF se encontraban en mal estado, el porcentaje de remoción de NT se mantuvo mayor que en los otros dos humedales (cerca de 31 %). A pesar de esto, al realizar el análisis de varianza en este parámetro las mayores eficiencias logradas por el HF no se mostraron

significativamente diferentes a las reportadas en los otros dos sistemas evaluados ($p > 0.05$).

Li *et al.* (2007), reportan que los humedales flotantes que usan plantas terrestres emergentes, han sido muy eficientes para la remoción de nutrientes y metales en el agua, ya que sus largas raíces proveen una mayor área superficial para el desarrollo de microorganismos, lo cual mejora la toma de nutrientes desde el agua (BioHaven Environmental, n.d.) y revelan eficiencias superiores a los sistemas convencionales reduciendo concentraciones de nitrógeno.

Tabla 19. Reducciones de nitrógeno en las unidades experimentales fase II
(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | | HSSP | | HSSC | | HF * | |
|-----------|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) |
| NT | Promedio | 14 | 2.08 | 15 | 1.98 | 31 | 2.71 |
| | D. Estándar | 55 | 3.78 | 48 | 3.78 | 41 | 3.97 |

* Análisis de HF teniendo en cuenta suspensión de HTP

En el nitrógeno amoniacal (NH₃), se observaron reducciones de carga promedio muy bajas, ya que en diferentes ocasiones, la concentración afluente se encontró por debajo de la concentración efluente de los humedales con matriz de suelo, por lo que se estima que la concentración de hidrocarburo aplicada, alteró la disponibilidad del nitrógeno para las plantas (Xu and Johnson, 1997). Las reducciones de carga y concentraciones efluentes del nitrógeno total para el HSSP fue de 2.08 g/m²d (60 mg/l), para el HSSC fue de 1.98 g/m²d (56 mg/l) y para el HF de 2.71 g/m²d (50 mg/l); en este sentido, las cargas de nitrógeno reducidas en estos humedales, fueron superiores a las reportadas por Paredes (2007). Pero aun así, se considera que las bajas reducciones de nitrógeno se deben a la baja difusión de oxígeno que puede ser causada por el hidrocarburo, ya que el contenido de carbono en este caso no es un limitante para las transformaciones de este compuesto.

Las figuras 30-33 presentan los resultados promedio de las especies de nitrógeno para los tres humedales.

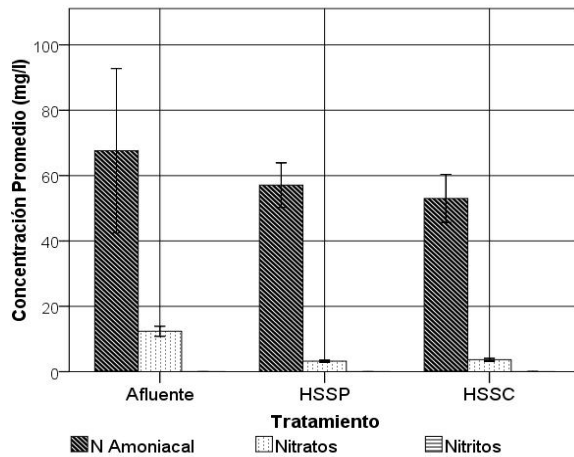


Figura 30. Concentración promedio especies de nitrógeno – HSSP y HSSC Fase II

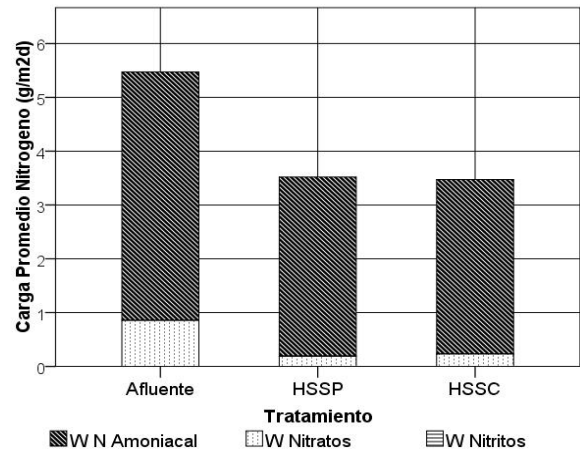


Figura 31. Cargas superficiales de nitrógeno – HSSP y HSSC Fase II

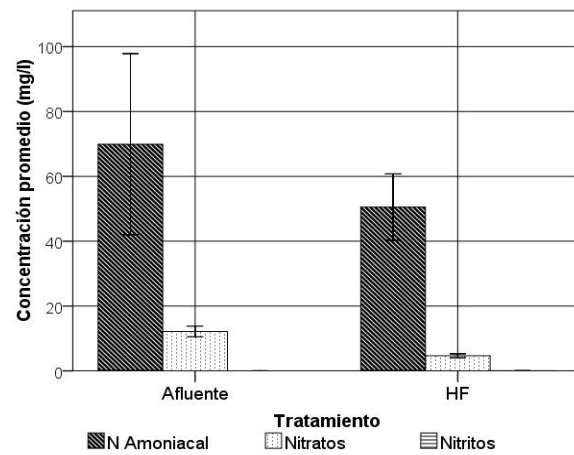


Figura 32. Concentración promedio especies de nitrógeno – HF Fase II
(Fuente: Elaboración propia)

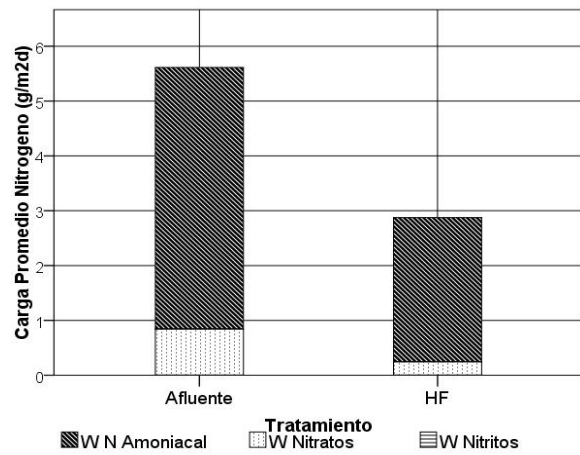


Figura 33. Cargas superficiales de nitrógeno – HF Fase II
(Fuente: Elaboración propia)

Como ocurrió en la fase I, la generación de nitritos durante la transformación del ciclo del nitrógeno dentro del humedal, se presentó en concentraciones tan bajas que fue casi indetectable mediante el método de cuantificación utilizado.

Las transformaciones de nitrógeno en un humedal involucran diversos procesos microbiológicos que pueden transformar los nutrientes más o menos disponibles para las plantas, por lo que es necesario que existan zonas aerobias y reducidas para facilitar la transformación de estos compuestos (Mitsch and Gosselink, 1986). Autores como Reed *et al.* (1995), comentan que las plantas tienen la habilidad de transportar oxígeno y otros gases desde la atmósfera y conducirlos hasta la zona de raíces (*Phragmites* transporta entre 5-12 g O₂/m²d (Weissner *et al.*, 2006)), donde se pueden presentar microzonas aerobias que facilitan la nitrificación, así mismo este autor, especifica que los humedales

de flujo superficial pueden tener un mayor aporte de oxígeno debido a la aireación percibida desde la atmósfera; esta situación permite inferir que, en el caso del humedal flotante existe una mayor transferencia de oxígeno y por tanto se presenta mayor reducción de nitrógeno.

En términos estadísticos, el análisis de varianza realizado a lo largo de la fase II, solo fue posible efectuarlo para los resultados de los dos humedales que presentaban matriz de suelo en su configuración, debido a que las condiciones de alimentación con el hidrocarburo en el humedal sin matriz, fueron suspendidas por la no tolerancia de las plantas al compuesto. Durante esta fase, se aplicó para las variables: remoción de DBO_5 y remoción de NT, un modelo de dos factores para desarrollar el análisis del efecto individual y en conjunto de las variables independientes o factores: Tratamiento y Adición de hidrocarburos (Fase I y Fase II).

Los resultados del análisis de varianza bifactorial para la variable de respuesta dependiente DBO_5 que se presenta en la tabla 20, se expresa una diferencia significativa para la remoción de este parámetro entre las dos configuraciones de humedal (HSSP – HSSC) ($p=0,033<0.05$), sugiriendo que las plantas tuvieron efecto en la remoción de materia orgánica a lo largo de toda la investigación. Así mismo, se evidenció efecto del hidrocarburo en la remoción de este parámetro con un $p=0,000<0.05$ para el factor fase (I: Sin HC y II: Con HC), debido al incremento del porcentaje de remoción durante la segunda fase, el cual también puede atribuirse a la maduración lograda por los sistemas a lo largo del tiempo de operación. La interacción de factores (tratamiento y fase) no presentó diferencias entre estos ($p=0,179>0.05$).

Según los resultados arrojados con la prueba de los efectos inter-sujetos (modelo corregido) se puede precisar que el modelo explica de manera significativa la variación observada en la variable dependiente ($p=0,000<0.05$), lo que se puede corroborar con el valor de R^2 (0.499), que indica que los tres efectos incluidos en el modelo (tratamiento, fase y tratamiento*fase) explican en un 50 % la varianza de la variable dependiente (DBO_5).

Tabla 20. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de DBO₅ (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|--|----------------------------|----|------------------|-----------|---------------|
| Modelo corregido | 989.637 ^a | 3 | 329.879 | 21.951 | 0.000 |
| Intercepto | 611388.076 | 1 | 611388.076 | 40683.038 | 0.000 |
| Tratamiento | 71.648 | 1 | 71.648 | 4.768 | 0.033 |
| Fase | 887.583 | 1 | 887.583 | 59.062 | 0.000 |
| Tratamiento * Fase | 27.775 | 1 | 27.775 | 1.848 | 0.179 |
| Error | 991.853 | 66 | 15.028 | | |
| Total | 612537.561 | 70 | | | |
| Total Corregido | 1981.491 | 69 | | | |
| <i>a. R cuadrado =0,499 (R cuadrado ajustado =0,477)</i> | | | | | |

Se acepta la hipótesis alternativa para el parámetro DBO₅, ya que las eficiencias de remoción de esta variable si presentaron diferencias estadísticas entre las fases de funcionamiento bajo adición de hidrocarburos tanto como, sin adición de este compuesto.

Para la variable dependiente remoción de NT, se exponen los resultados en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de NT (%)

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|---|----------------------------|----|------------------|-------|---------------|
| Modelo corregido | 978.053 ^a | 3 | 326.018 | 0.157 | 0.925 |
| Intercepto | 18545.576 | 1 | 18545.576 | 8.903 | 0.004 |
| Tratamiento | 0.477 | 1 | 0.477 | 0.000 | 0.988 |
| Fase | 973.032 | 1 | 973.032 | 0.467 | 0.497 |
| Tratamiento * Fase | 3.167 | 1 | 3.167 | 0.002 | 0.969 |
| Error | 116654.576 | 56 | 2083.117 | | |
| Total | 135432.037 | 60 | | | |
| Total Corregido | 117632.629 | 59 | | | |
| <i>a. R cuadrado = 0,008 (R cuadrado ajustado = -0,045)</i> | | | | | |

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza para la variable dependiente NT (tabla 21), indica que no hay diferencia estadística para la remoción de este parámetro entre las dos configuraciones de humedal (HSSP – HSSC) ($p=0,988>0.05$), por lo tanto, las plantas no tuvieron efecto en la remoción de nitrógeno total en estas configuraciones de humedal. Igualmente, no se evidenció efecto del hidrocarburo en la remoción de este parámetro con un $p=0,497>0.05$ para el factor fase (I: Sin HC y II: Con HC). La interacción de factores (tratamiento y fase) tampoco presentó diferencias entre ellos ($p=0,969>0.05$).

La prueba de los efectos inter-sujetos (modelo corregido) muestran que el modelo explica de manera significativa la variación observada en la variable dependiente ($p=0,925>0.05$), lo que se puede corroborar con el valor de R^2 (0.008), que indica que los tres efectos incluidos en el modelo (tratamiento, fase y tratamiento*fase) explican en un 0.8 % la varianza de la variable dependiente (NT). En las figuras 34 y 35 se presentan los gráficos de perfiles para las variables dependientes y los factores analizados.

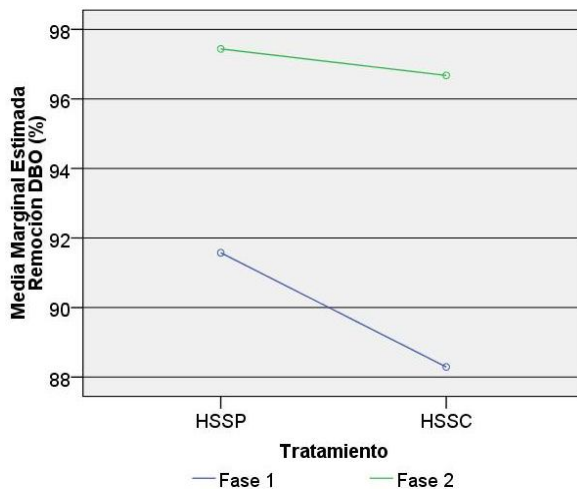


Figura 34. Gráfico de Perfil: Remoción DBO_5
(Fuente: Elaboración propia)

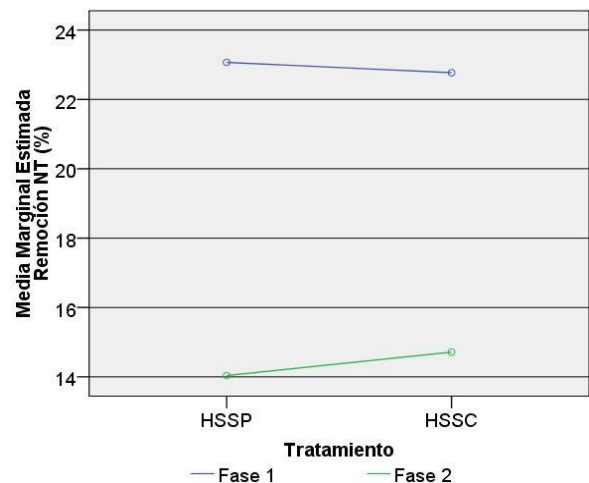


Figura 35. Gráfico de Perfil: Remoción NT
(Fuente: Elaboración propia)

8.3 Remoción de hidrocarburos en los humedales experimentales

Siendo la remoción de hidrocarburos uno de los principales propósitos en esta investigación, para evaluar la eficiencia de reducción del contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en las aguas residuales tratadas por los humedales piloto, se llevó a cabo un muestreo semanal en el afluente y efluente de los sistemas, y se analizaron las muestras según lo especificado en la metodología. De acuerdo con la composición de los hidrocarburos, en este caso el diesel (entre C_{10} y C_{22} – The Service Technician's Guide, 2007), se esperaba su degradación mediante el tratamiento con las unidades experimentales, sin embargo las características de este compuesto, siendo este una mezcla de diferentes componentes de los derivados del petróleo, incluyendo compuestos naftalénicos, aromáticos, olefinas, isoparafínicos y parafínicos; hace que su degradación sea complicada, debida a su poca miscibilidad con el agua (densidad $0.82-0.90 \text{ g/cm}^3$ y solubilidad en agua < 0.020) y presencia de sustancias de fácil volatilización.

La dosificación del diesel se realizó para una concentración promedio aplicada de 1000 mg/l , sin embargo, en el momento de verificar la dosis suministrada, mediante la cuantificación de los HTP por medio del método gravimétrico soxleth (figuras 36-38), se encontró una diferencia en los datos, correspondiente a la pérdida por evaporación en el momento de llevar a cabo el análisis. No obstante, en la tabla 22 se presenta la estadística

descriptiva de las concentraciones afluentes y efluentes medidas, donde se demuestra que la concentración afluente promedio de los HTP fue de 648 (+/- 309) mg/l, sustentando esta desviación estándar lo difícil de la cuantificación de estos compuestos, ya que la técnica de medición estima el valor promedio de la totalidad de los compuestos derivados del petróleo que se encuentran en la muestra (los hidrocarburos de fracción pesada extraíbles con hexano – Norma NMX-AA-134-SCFI-2006) y por tanto aquellos que presentan un punto de ebullición inferior al del hexano que es usado como solvente, 85°C (EPA, 1999), son volatilizados fácilmente.



Figura 36. Muestras con HTP para análisis en laboratorio
(Fuente: Elaboración propia)



Figura 37. Equipo Soxleth -cuantificación de HTP
(Fuente: Elaboración propia)



Figura 38. Residuo de HTP en proceso de cuantificación
(Fuente: Elaboración propia)

Tabla 22. Estadística descriptiva concentraciones y cargas de hidrocarburos
(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | Tratamiento | N | Valor Mínimo | Valor Máximo | Valor Promedio | Desviación estándar |
|---|-------------|----|--------------|--------------|----------------|---------------------|
| Hidrocarburos totales (mg/l) | Afluente | 16 | 280 | 1,151 | 648 | 309 |
| | HSSP | 16 | 0.36 | 39 | 9.33 | 10 |
| | HSSC | 16 | 0.24 | 26 | 8.28 | 7.51 |
| | HF* | 15 | 0.82 | 38 | 11 | 11 |
| Carga HTP efluente (g/m ² d) | Afluente | 16 | 28 | 114 | 64 | 31 |
| | HSSP | 16 | 0.03 | 3.58 | 0.86 | 0.93 |
| | HSSC | 16 | 0.02 | 2.42 | 0.78 | 0.71 |
| | HF* | 15 | 0.07 | 3.03 | 0.89 | 0.85 |

* HF se alimentó con diesel solo durante 5 semanas, sin embargo los efluentes continuaron con monitoreo para verificar que no existiera lavado del HTP adicionado.

Según la tabla 22 y la figura 39, las concentraciones efluentes de HTP son muy bajas, demostrándose que los sistemas son eficientes en la reducción de este compuesto en el agua, ya que las concentraciones efluentes reportadas se encuentran en promedio en 9.33 (+/-10) mg/l para el HSSP, 8.28 (+/-7.51) mg/l para el HSSC y 11 (+/-10.76) mg/l para el HF. A pesar de que no se observan diferencias significativas entre los resultados de los tres sistemas ($p > 0.05$), se evidencia que el humedal con matriz de suelo y sin plantas, reporta la menor concentración efluente, lo que se debe a que en este humedal por no existir plantas, prima la evaporación y no la evapotranspiración y de este modo, es posible que algunos hidrocarburos logren evaporarse en el proceso de tratamiento.

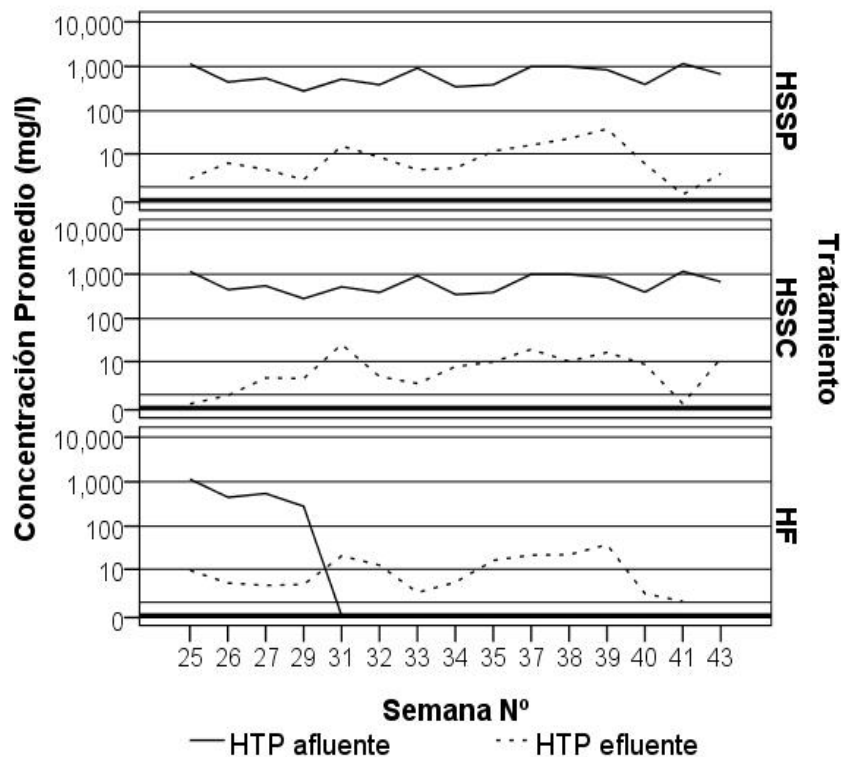


Figura 39. Comportamiento de las concentraciones afluentes y efluentes de hidrocarburos totales de petróleo
(Fuente: Elaboración propia)

Según la figura 39, una vez el HTP fue suspendido en la alimentación del HF se continuó mostrando en el efluente algunas trazas de este compuesto, debido a la acumulación del mismo en el interior del sistema y en la zona radicular de las plantas que allí existían, razón por la cual después de suspender la alimentación con diesel se evidenciaban concentraciones del compuesto en el efluente.

Lo anterior parece indicar que para las condiciones de esta investigación, las macrófitas no aportan beneficio en la remoción del hidrocarburo ($p > 0.05$), aunque si pueden representar un efecto positivo en términos de sostenimiento de microorganismos y

generación de exudados que favorecen el desarrollo de los mismos. Igualmente, las plantas pueden facilitar los procesos de filtración y retención del contaminante dentro del humedal, evitando su salida en el efluente. Sin embargo, es importante resaltar que es necesario realizar mayor investigación en el tema, ya que debido a la naturaleza del contaminante, es posible que la volatilización también juegue un papel importante en la reducción de los HTP.

Las figuras 40 y 41, presentan las cargas aplicadas y eficiencias de remoción promedio en términos de carga lograda por los tres humedales. Del mismo modo, en la tabla 23 se observan los porcentajes de remoción de cada sistema y su correspondiente reducción de carga.

Tabla 23. Remociones de carga de HTP(Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro | | HSSP* | | HSSC* | | HF** | |
|-----------|-------------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) | % reducción | Reducción de carga (g/m ² d) |
| HTP | Promedio | 99 | 63 | 98 | 63 | 99 | 60 |
| | D. Estándar | 1.18 | 30.41 | 1.24 | 31 | 0.26 | 37 |

*Número de muestras para HSSP y HSSC, N=17

**N para HF =4

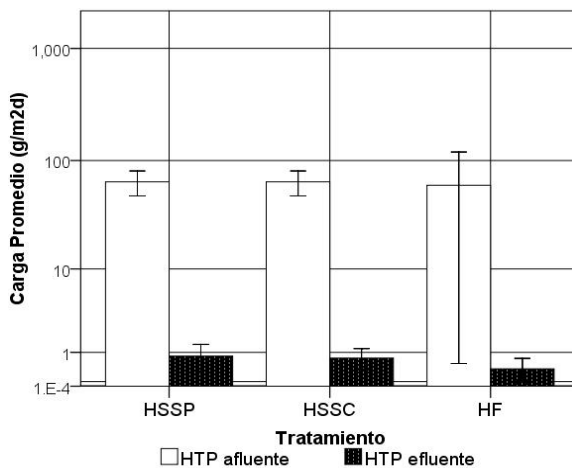


Figura 40. Cargas aplicadas de HTP (Fuente: Elaboración propia)

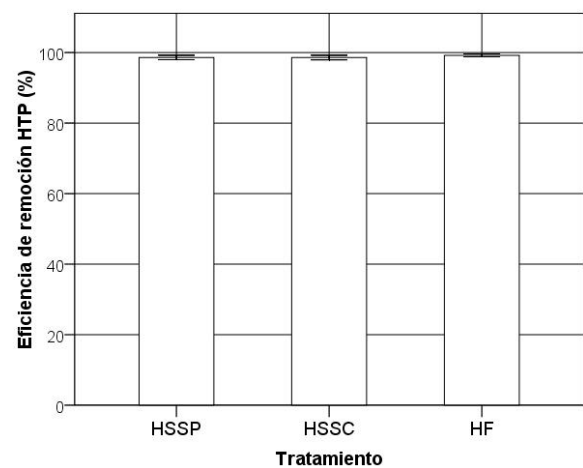


Figura 41. Eficiencias de remoción logradas (Fuente: Elaboración propia)

Estos resultados, demostraron que los humedales experimentales redujeron las concentraciones de los hidrocarburos presentes en el agua residual, logrando eficiencias cercanas al 100 %, lo que concuerda con resultados encontrados por Salmon *et al.*, (1999), quienes evaluaron dos humedales construidos de flujo subsuperficial tratando aguas contaminadas con hidrocarburos, alcanzando eficiencias del 90 % con efluentes menores de 8 mg/l; Omari *et al.* (2003), que hallaron eficiencias de remoción de hidrocarburos de 80 %, 78 % y 72 % en tres profundidades diferentes (0.12m, 0.36m y 0.6m

respectivamente) en un humedal de flujo Subsuperficial; Gessner *et al.* (2005) que reportaron eficiencias de remociones de hidrocarburos aproximadas a 67 %, en humedales de flujo superficial para el tratamiento de aguas contaminadas con hierro, diesel, gasolina y cianuro; y recientemente por Emeka (2008) que evaluó humedales construidos a nivel piloto de flujo vertical, sembrados con *Phragmites australis*, los cuales fueron alimentados con agua cruda con nutrientes y contaminada con benceno a una concentración de 1000 mg/l. Las eficiencias fueron de 97-100 %. El autor encontró una relación directa entre la tasa de remoción de hidrocarburo y la adición de fertilizante y además concluyó que las macrófitas empleadas no mostraron jugar un papel significativo en la remoción de los hidrocarburos, como sucedió en la presente investigación.

Del mismo modo que para las variables de respuesta DBO₅ y NT, el análisis de varianza para la variable HTP, fue realizado solo para los resultados de los dos humedales que presentaban matriz de suelo en su configuración, debido a la suspensión temprana de la alimentación con diesel del HF. Los resultados encontrados son los siguientes (tabla 24):

Tabla 24. Resultados análisis de varianza – ANOVA: Eficiencia de remoción de HTP (%)
(Fuente: Elaboración propia)

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | GI | Media cuadrática | F | Significación |
|--------------|----------------------------|----|------------------|-------|---------------|
| Inter-grupos | 0.002 | 1 | 0.002 | 0.001 | 0.971 |
| Intra-grupos | 43.828 | 30 | 1.461 | | |
| Total | 43.830 | 31 | | | |

De la tabla 24, se puede inferir que en la remoción de hidrocarburos totales no existe una diferencia significativa entre las dos configuraciones de humedales con matriz de suelo, es decir, la presencia o ausencia de plantas, no tuvieron ningún efecto en las remociones de este compuesto, lo que se comprueba mediante el análisis con un nivel de significancia mayor a 0.05 ($p=0.971>0.05$) para la eficiencia de remoción del hidrocarburo. Para este parámetro, se acepta la hipótesis estadística planteada. En la figura 42 se presenta el gráfico de perfiles para los dos sistemas comparados.

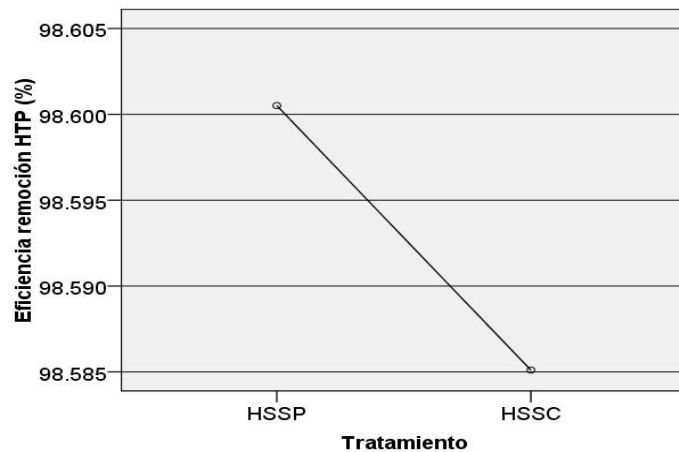


Figura 42. Gráfico de Perfil: Remoción HTP
Fuente: Elaboración propia

Aunque los humedales presentaron altas tasas de remoción de hidrocarburos, se realizó un muestreo en el interior de los sistemas para verificar que el compuesto estuvieran siendo degradados y no retenidos en el interior de estos. Sin embargo, los resultados sustentaron que las unidades se estaban comportando como sumideros de los HTP (tabla 25 y figuras 43 y 44), y estos se estaban acumulando a lo largo del tiempo en el interior de los sistemas.

Tabla 25. Resultados muestreo HTP interior de humedales(Fuente: Elaboración propia)

| Fecha | Hidrocarburos (mg/l) | | | |
|------------|----------------------|-------|-----------------|---|
| | HSSP | HSSC | HF ¹ | |
| 13/10/2010 | 42567 | 12968 | 3078 | Muestra tomada a los 1.5m de distancia horizontal y 15 cm de profundidad |
| 10/12/2010 | 48333 | 40047 | | Muestra tomada a los 0.7 m de distancia horizontal y 15 cm de profundidad |
| | 42710 | 19138 | | Muestra tomada a los 1.4m de distancia horizontal y 15 cm de profundidad |
| | 14470 | 22319 | | Muestra tomada a los 2.1m de distancia horizontal y 15 cm de profundidad |

¹El humedal flotante solo se monitoreo en el interior del humedal en la fecha 13/10/2010, ya que después de esto fue suspendida su alimentación con diesel

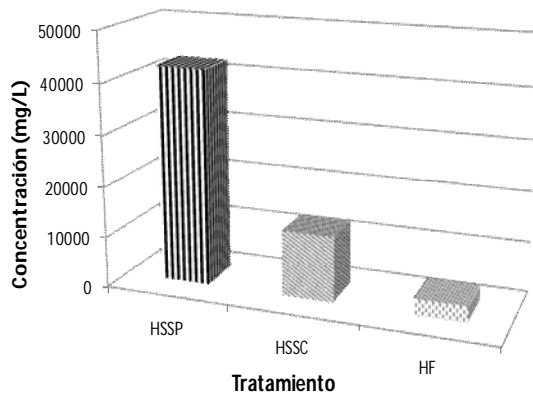


Figura 43. Comportamiento del HTP en los humedales a 1.5m de distancia desde el afluente. (Fuente: Elaboración propia)

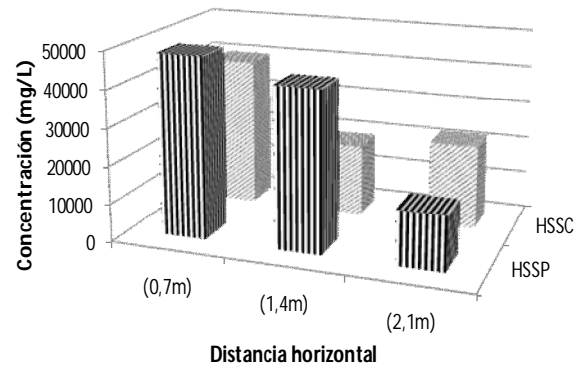


Figura 44. Comportamiento del HTP en los humedales a diferentes distancias desde el afluente. (Fuente: Elaboración propia)

Con lo observado en los anteriores datos, se procedió a realizar un balance de masas respecto a la cantidad de hidrocarburo afluente y efluente en los humedales (tabla 26). Esto sugirió una remoción teórica de 99 % en el HSSP y 98 % en el HSSC, pero dadas las concentraciones obtenidas en el interior de los humedales el día 10 de Diciembre de 2010, se podía establecer que existía una acumulación del compuesto en los sistemas, así que se calculó la carga correspondiente a cada concentración medida, tomando como base que en cada parte del humedal donde se tomó la muestra, se podía contener cerca de 180L de agua y que el tiempo de acumulación del hidrocarburo fue de 150 días correspondientes al periodo de alimentación con el diesel; resultando en una remoción promedio real de 52 % para el HSSP y 63 % para el HSSC, que es atribuida principalmente a la actividad microbiana, procesos de absorción al medio filtrante y procesos de evaporación, ya que no se encontró mayor efecto por parte de las plantas.

Tabla 26. Balance de masas para hidrocarburos (Fuente: Elaboración propia)

| | Afluente | HSSP | % real en el humedal | HSSC | % real en el humedal |
|---|----------|------|----------------------|------|----------------------|
| Promedio (g/d) | 86 | 1.14 | | 1.04 | |
| D. estándar | 41 | 1.24 | | 0.94 | |
| Carga interior humedal (g/d) | | 57 | 66 | 47 | 55 |
| | | 50 | 59 | 22 | 26 |
| | | 17 | 20 | 26 | 31 |
| Carga Promedio interior del humedal (g/d) | | | 48 | | 37 |

Dentro de un humedal, pueden existir diferentes tipos de procesos de reducción del contaminante, entre ellos los procesos no destructivos como absorción y volatilización, y procesos destructivos como la fitodegradación y la degradación microbiana (Imfield *et al.*, 2009), de allí que, la transferencia del contaminante desde una fase acuosa hacia el suelo

o atmósfera debe tenerse en cuenta. En este caso específico, parece ser que un gran porcentaje del contaminante suministrado a los humedales durante el periodo de monitoreo, fue acumulado en el medio filtrante, situación que debe ser evaluada, dado que, la carga contaminante de hidrocarburos fue demasiado alta, y así mismo la alimentación de tipo continuo, no permitió que las plantas tuvieran una adaptación completa al residuo, por esta razón no pudieron realizar un aporte significativo en la degradación, como se mostró en los anteriores resultados.

Otro factor importante en la degradación de compuestos orgánicos, es la solubilidad del compuesto en el agua, ya que si estos no son miscibles, es posible que el hidrocarburo se adhiera a la matriz de suelo, volviéndose menos disponible para las plantas y microorganismos; sin embargo, Imfield *et al.* (2009) dice que, la mayoría de los hidrocarburos del petróleo son considerablemente más solubles que los PAH, PCBs y otros compuestos, por lo que son más fácilmente degradados y mineralizados bajo condiciones aerobias.

De acuerdo con los resultados, se estima que la mayor remoción del HTP se debió a los procesos de volatilización de compuestos, debido a las pérdidas de agua por la EVT de los humedales, así mismo se considera que la adsorción del hidrocarburo en el medio filtrante también presentó una significativa incidencia para evitar su salida en el efluente. Esto concuerda con resultados encontrados en diferentes estudios realizados con humedales para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos, ya que en la mayoría de estos los autores concluyen que la adsorción del compuesto en el medio filtrante es el principal mecanismo de remoción (Omari *et al.*, 2003; Cottin and Merlin, 2008; Fountoulakis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

En conclusión, para las condiciones de esta investigación las plantas no presentaron un efecto significativo en la remoción de hidrocarburos (Emeka, 2008; Zhang *et al.*, 2010), debido a la toxicidad que el compuesto representó en las mismas, ya que los hidrocarburos afectan el crecimiento de las raíces y tallos de las macrófitas, el desarrollo de los pelos radicales, clorosis (falta de clorofila en las hojas) y aparición de manchas, además de los daños a nivel celular que reduce la capacidad de la toma de nutrientes y agua, y la realización de la fotosíntesis (Zhang *et al.*, 2010).

8.4 Análisis Microbiológicos

De acuerdo a los datos de concentración de HTP hallados en el interior de los humedales, se procedió a verificar la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en los HSSP y HSSC. Para esto, se realizó un solo muestreo puntual, tomando muestras en el interior de los sistemas cada 0.7m de distancia horizontal y a 0.15m de profundidad, para realizar un análisis de recuento de microorganismos aerobios, anaerobios y degradadores de hidrocarburos (figuras 45-48). Las muestras fueron analizadas por el laboratorio de

aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira y el método utilizado para ello fue el recuento en placa profunda, la cual se realizó por triplicado para dar veracidad a los resultados encontrados. Los resultados promedio del recuento de microorganismos se presentan en la tabla 27 y en la figura 49.

Tabla 27. Resultados análisis microbiológicos. (Fuente: Elaboración propia)

| Unidad de tratamiento | Recuento microorganismos aerobios | Recuento microorganismos anaerobios | Recuento microorganismos degradadores de HTP |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| | (UFC/ml) | | |
| Humedal Plantado 0.7m | 2.9×10^8 | 1.9×10^7 | 5.6×10^7 |
| Humedal Plantado 1.4m | 1.8×10^8 | 0.8×10^7 | 3.1×10^7 |
| Humedal Plantado 2.1m | 3.2×10^8 | 1.6×10^7 | 8.3×10^7 |
| Humedal Blanco 0.7m | 3.3×10^8 | 0.5×10^7 | 6.3×10^7 |
| Humedal Blanco 1.4m | 8.9×10^8 | 2.8×10^7 | 5.9×10^7 |
| Humedal Blanco 2.1m | 9.3×10^8 | 4.4×10^7 | 12×10^7 |



Figura 45. Toma de muestra para análisis microbiológico HSSP
(Fuente: Elaboración propia)



Figura 46. Toma de muestra HSSC
(Fuente: Elaboración propia)



Figura 47. Siembra de microorganismos degradadores de HTP
(Fuente: Elaboración propia)



Figura 48. Siembra de microorganismos anaerobios
(Fuente: Elaboración propia)

Según los datos obtenidos en el laboratorio sobre los análisis microbiológicos, ambos humedales presentan gran densidad de microorganismos. Del mismo modo, se observó que el humedal con matriz de suelo y sin plantas, fue la unidad con más UFC/ml, lo que sugiere nuevamente, que en este caso de estudio, las plantas no tuvieron un efecto

significativo en la cantidad de microorganismos y que igualmente, el medio filtrante jugó un papel de importancia para el anclaje de los degradadores de HTP, evidenciándose en las remociones logradas de los HTP.

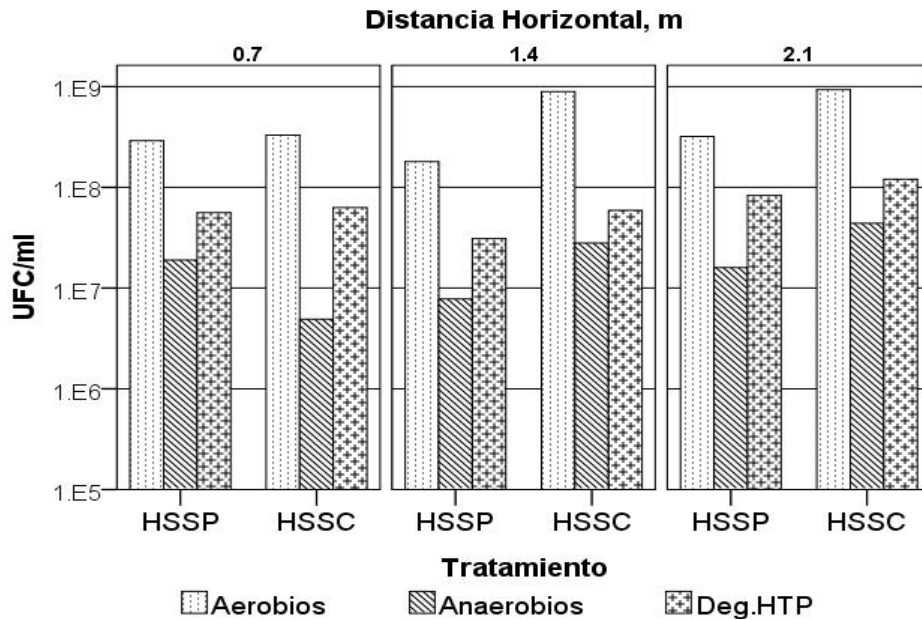


Figura 49. Recuento de microorganismos

(Fuente: Elaboración propia)

Como algunos autores han mencionado en diferentes investigaciones, los microorganismos juegan un papel aún más importante que las plantas para la transformación/mineralización de los contaminantes en los humedales (Kuschik *et al.*, 1999; Stottmeister *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2008; Tanner and Sukias, 2006), ya que estos son ecosistemas biológicamente activos que fomentan el desarrollo de diferentes tipos de bacterias con la habilidad de transformar los contaminantes en subproductos menos nocivos. En este caso, es posible que en los sistemas prevalecieran condiciones aerobias, debido a las condiciones creadas en los humedales con matriz de suelo y por la gran presencia de heterótrofos aerobios pero aun así, la densidad de microorganismos anaerobios no es despreciable, y para llegar a dar conclusiones más precisas sobre la diversidad microbiana es necesario realizar pruebas bioquímicas que permitan la cuantificación e identificación de los microorganismos, así como la relación entre la diversidad de especies y factores ambientales, principalmente en los degradadores de hidrocarburos que son los microorganismos de interés en esta investigación.

Los resultados de la cantidad de bacterias heterótrofas aeróbicas y degradadoras de hidrocarburos obtenidos en esta investigación, muestran la existencia de condiciones apropiadas para la degradación de los contaminantes, ya que al comparar estos datos con la investigación realizada por Salmon *et al.* (1999), quienes encontraron microorganismos

aerobios del orden de 10^6 y degradadores de hidrocarburos del orden de 10^5 bacterias por ml en dos humedales que removían hidrocarburos; los sistemas experimentales aquí evaluados, no presentaron condiciones lejanas a estos resultados (tabla 27), más aun cuando las concentraciones afluentes de HTP fueron casi 17 veces mayores a la empleada Salmon *et al.*

Por otra parte, en las unidades experimentales se llevó a cabo la evaluación de remoción de coliformes totales y fecales (E.Coli), los cuales se midieron mediante análisis de 9 eventos de muestreo de agua a la entrada y salida de cada humedal con el fin de determinar si bajo las condiciones de contaminación con hidrocarburos, los humedales también podían remover coliformes. Las muestras de coliformes se analizaron mediante el método de filtración por membrana (filtros de celulosa de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y 47 mm de diámetro) y conteo de unidades formadoras de colonias – UFC por cada 100 ml de muestra, para ello se empleó el Agar Chromocult Coliform (Merck) e incubación por 24 horas a 37C° . Los resultados encontrados se presentan en las figuras 50 -51, y la tabla 28.

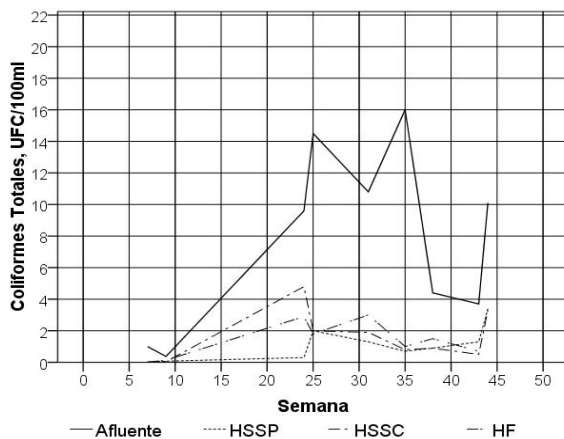


Figura 50. Remoción de Coliformes Totales (expresados como unidades Log) (Fuente: Elaboración propia)

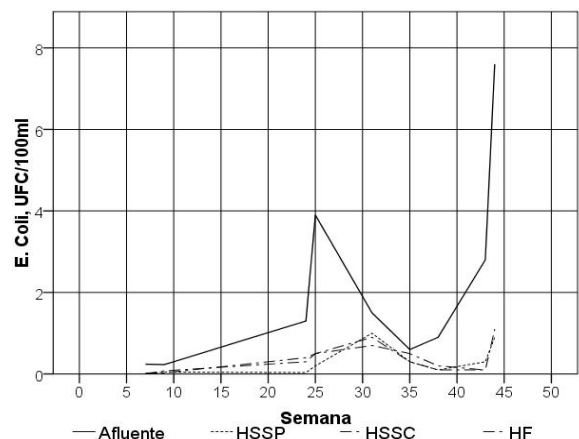


Figura 51. Remoción de E. Coli (expresados como unidades Log) (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 28. Resultados descriptivos Coliformes (expresados como unidades Log) (Fuente: Elaboración propia)

| Parámetro* | Tratamiento | N | Mínimo | Máximo | Promedio | Des. Estándar |
|--|-------------|---|--------|--------|----------|---------------|
| Coliformes Totales, UFC/100ml * 10^5 | Afluyente | 9 | 0.37 | 16 | 7.83 | 5.70 |
| | HSSP | 9 | 0.02 | 3.40 | 1.11 | 1.07 |
| | HSSC | 9 | 0.03 | 4.80 | 1.58 | 1.61 |
| | HF | 8 | 0.02 | 3.00 | 1.38 | 1.14 |
| E. Coli, UFC/100ml * 10^5 | Afluyente | 9 | 0.23 | 7.60 | 2.12 | 2.39 |
| | HSSP | 9 | 0.01 | 1.00 | 0.32 | 0.37 |
| | HSSC | 9 | 0.02 | 1.10 | 0.38 | 0.39 |
| | HF | 8 | 0.01 | 0.70 | 0.30 | 0.25 |

Las remociones de coliformes tanto totales como E. Coli se mostraron más bajas para los efluentes de los tres sistemas, observándose que su comportamiento entre las tres configuraciones fue similar. Los humedales construidos han sido ampliamente evaluados para remoción de bacterias fecales mostrando resultados positivos en la reducción de su concentración en el efluente (Vacca *et al.*, 2005; Sleytr *et al.*, 2007) y generalmente se ha demostrado que su eficiencia depende de factores como tiempo de retención hidráulico, diseño del humedal, cargas orgánicas e hidráulicas, tipo de sustrato y temperatura (Karathanasis *et al.*, 2003).

Para las condiciones de esta investigación la remoción de los coliformes totales no superó la unidad Log y la remoción de E. coli solo alcanzó un Log, pero sin embargo, no es posible afirmar si existió o no, un efecto en la reducción de bacterias debido a los hidrocarburos presentes en los humedales, ya que este comportamiento se evidenció tanto en las muestras analizadas en la fase I como en la fase II. Sin embargo estos resultados, concuerdan con las bajas remociones encontradas en la investigación realizada por Kaseva (2004) quien tampoco halló reducciones de más de una unidad Log en tres humedales de flujo subsuperficial horizontal evaluados a escala piloto para tratar el efluente de un reactor UASB en Tanzania. Igualmente, Hamouri *et al.*, (2007) halló remociones de coliformes menores a una unidad Log en tres humedales de flujo subsuperficial horizontal plantados con *Phragmites australis*, *Arundo donax* y el tercero sin plantas, los cuales también trataban el efluente de un reactor anaerobio.

De otra parte, investigaciones realizadas bajo las mismas condiciones climáticas del presente estudio, han reportado remociones de coliformes del orden de 3 unidades Log para coliformes totales y 4 unidades Log para E. coli en trenes de tratamiento de humedales verticales seguidos de humedales de flujo subsuperficial horizontal (García, 2010).

9 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La fitorremediación y específicamente los humedales construidos una vez más, demuestran su eficiencia para la disminución de componentes contaminantes presentes en el agua residual, situación que favorece el empleo de estos sistemas, dada las ventajas económicas, ecológicas y funcionales que posee. Específicamente en el humedal flotante (HF), se presentaron resultados prometedores para el tratamiento de aguas residuales domésticas como se observó durante la fase I, por lo tanto se sugiere más investigación para el empleo de este tipo de sistemas bajo las condiciones de clima tropical, ya que podría ser empleado para tratar aguas residuales con un valor adicional, como la no existencia de problemas de colmatación y menores costos de instalación debidos a la ausencia del medio filtrante.

Los humedales construidos con matriz de suelo demostraron remover hidrocarburos totales de petróleo, logrando eficiencias superiores al 50 % en aguas contaminadas con altas concentraciones de estos compuestos químicos (durante 150 días de operación). No obstante, la alta concentración de hidrocarburos en el afluente presentó un efecto negativo en las macrófitas, causando problemas de toxicidad revelada por cambios en la coloración de las hojas, así como en su crecimiento. Lo anterior permite evidenciar la necesidad de estudio en el campo de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, tanto para evaluar el tipo de planta más apropiado para cada residuo así como, las concentraciones a las cuales estos sistemas pueden funcionar sin afectar las plantas y lograr los mejores resultados.

El humedal sin matriz de suelo y plantas sembradas, no mostró tolerancia a los hidrocarburos, ya que desde la quinta semana de alimentación con el diesel fue necesario suspender su alimentación, esto se debió a las condiciones de saturación de agua para las plantas y las características del hidrocarburo, lo que impidió el adecuado desarrollo de las macrófitas y así mismo, la asimilación de otros compuestos. Por esta razón se niega la hipótesis de la investigación, donde se plateaba una mayor remoción de hidrocarburos debido a los procesos de evaporación favorecidos por la ausencia de matriz de suelo en los humedales flotantes.

Los principales procesos de remoción que parecieron tener lugar en la reducción del contenido del hidrocarburo, se asociaron a la volatilización de los compuestos, la absorción y retención en el medio filtrante, además a los procesos microbiológicos llevados a cabo dentro de los humedales. El campo microbiológico representa gran importancia en los procesos que ocurren en los sistemas naturales, y dada la variedad de compuestos orgánicos que componen los hidrocarburos totales de petróleo y su complejidad, es necesario explorar más para determinar las rutas exactas de degradación a nivel de planta y microorganismos en estos sistemas, mediante el empleo de pruebas bioquímicas que brinden mayor entendimiento de la cantidad y diversidad de especies

que se encuentran en los humedales y para así poder asociar e interpretar su comportamiento.

En términos de remoción de materia orgánica, medida como DQO y DBO₅, el humedal con matriz de suelo y plantas (HSSP) sugirió ser el más efectivo, ya que en ambas etapas de funcionamiento lograron eficiencias de remoción superiores al 85 %, siendo estos sistemas operados para el tratamiento de aguas residuales domésticas sin pretratamiento previo. Al comparar estos resultados con la normatividad vigente (decreto 1594 de 1984, hoy decreto 3930 de 2010), estos sistemas brindarían efluentes con altas remociones que ayudarían a lograr el cumplimiento normativo en términos de materia orgánica.

Para remoción de SST, humedal flotante (sin matriz de suelo y plantas sembradas), presentó las mejores eficiencias de funcionamiento (>90 %), indicando que para la eliminación de este parámetro en aguas residuales, la ausencia de matriz de suelo favorece la sedimentación de los sólidos; sin embargo, por ser este tipo de humedal de poco uso en Colombia, requiere de mayor investigación bajo diferentes condiciones de operación como tipo de especie sembrada, TRH, cargas hidráulicas y orgánicas, para dar resultados más concluyentes respecto a éste y otros parámetros.

Los humedales con medio filtrante no presentaron diferencias significativas en las tasas de remoción de nitrógeno amoniacal, por tanto que las plantas no mostraron tener efecto alguno en la reducción de este parámetro. Por otra parte, la adición del hidrocarburo no afectó la remoción de este compuesto. Contrariamente, las remociones de nitrógeno logradas por el humedal sin matriz de suelo y plantas si fueron mayores respecto a los otros dos sistemas.

Bajo las condiciones operativas de esta investigación, se concluye que la presencia de plantas en los sistemas de tratamiento evaluados, no tuvo efectos significativos para la reducción del contenido de DBO₅ en el agua residual objeto de estudio durante la fase I. Sin embargo para la remoción de hidrocarburos, las macrófitas no mostraron diferencias estadísticas entre los sistemas que tenían matriz de suelo. Pero en general, se estima que la configuración de humedal que mejores resultados presentó (reducción de materia orgánica, HTP y nitrógeno total) y que más se ajusta para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos fue el humedal con matriz de suelo y plantas sembradas.

Para remover hidrocarburos de los residuos líquidos generados en estaciones de servicio de gasolina, se sugiere el uso de humedales construidos como un sistema de tratamiento secundario, donde las aguas residuales generadas sean objeto de un tratamiento previo para disminuir la carga contaminante y así mismo, el efecto tóxico de los hidrocarburos sobre las plantas. Por esta razón, se estima necesaria la evaluación de estos sistemas como unidades de tratamiento posteriores a trampas de grasas donde gran parte de las grasas sean desechadas del residuo.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adam G. and Duncan H., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental pollution* Vol. 12. Pag. 363-370.
2. American Public Health Association APHA, American Water Works Association AWWA, Water Environment Federation WPCF, 2000. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th ed. United States.
3. Anthonisen A., Loehr R., Prakasam T. and Srinath E., (1976). "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid." *J. WPCF* 48 (5): 835-852.
4. ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 1999. *Resumen de salud pública de hidrocarburos totales del petróleo*. Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU.
5. Bedessem M., Ferro A. and Hiegel T., 2007. Pilot – scale constructed wetlands for petroleum – contaminated groundwater. *Water environment research*. Vol. 79 N° 6. Pag 581 – 586.
6. Benavides J., Quintero G., Guevara A., Jaime D., Gutiérrez S. and Miranda J., 2006. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo*. Nova Publicación científica, Vol.4, N°. 5. ISSN: 1794-2470.
7. BioHaven Environmental, n.d. *Technology and Solutions Overview*. <http://www.biohavenenvironmental.com/documents/BioHaven%20Technology%20Overview.pdf>
8. Bock C., Kolb M., Bokern M., Harms H., Makova M., Chroma M., Macek T., Hughes J., Just C. and Schnoor J., 2002. *Advances in phytoremediation: Phytotransformation. Innovative approaches to the on site assessment of remediation of contaminated sites*. Pag 115 – 140.
9. Brix H., 1994. *Functions of macrophytes in constructed wetlands*. *Water Science and Technology*. Vol. 29 N° 4. Pag 71-78.
10. Brix, H. 1997. *Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?*. *Water, Science and Technology*. 30(5). Pag 11-18
11. Brix H. y Arias C., 2007. *Desarrollos innovativos en humedales construidos*. En: Seminario internacional "Fundamentos y diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales". Pereira Colombia, Febrero 22 – 24 de 2007.
12. CARDER - Corporación Autónoma Regional de Risaralda y UTP - Universidad Tecnológica de Pereira, 2007. *Mejoramiento de la gestión ambiental de las Estaciones de Servicio de Risaralda*. Pereira.
13. Carpena R. y Bernal M. 2007. *Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos*. *Ecosistemas, revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*
(URL:http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=490&Id_Categoria=9&tipo=portada)

14. Caselles A., Puigaguta J., Segú A, Vaelloa N., Granés F., García D. and García J., 2007. Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*. Vol. 21. Pag. 750-757.
15. Celis B., 2009. Contaminación de aguas subterráneas por hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. Departamento de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 215, Ciencia Ahora, N° 22, año 11, septiembre 2008 - marzo 2009.
16. Chaîneau C., Rougeux G., Yéprémian C. and Oudot J., 2005. Effects of nutrients on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil biology and biochemistry*. Vol. 37. Pag. 1490 – 1497.
17. Chow Susana, 1997. *Petroquímica y sociedad*. Segunda edición. ISBN 968-16-5430-7. México.
18. Cottin N. and Merlin G., 2008. Removal of PAHs from laboratory columns simulating the humus upper layer of vertical flow constructed wetlands. *Chemosphere* Vol. 73. Pag. 711-716.
19. Corseuil H. and Moreno F., 2000. Phytoremediation potential of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended Gasoline. *Water Research*. Vol. 35, N° 12, Pag. 3013 – 3017.
20. Crites, R.; Tchobanoglous, G. 1998. *Small and decentralized wastewater Management Systems*. WCB McGraw-Hill. Singapore. 1084 pp.
21. Dialynas G., Nefalakis N., Dialynas M. and Angelakis A., 2002. Performance of an innovative FWS constructed wetland in Crete, Greece. *Water science and technology*. Vol. 46 N° 4 – 5 pp. 355 – 360.
22. Dietz A. and Schnoor J., 2001. *Advances in Phytoremediation*. Environmental Health Perspectives. Department of Civil and Environmental Engineering, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA. Vol. 109.
23. Duncan T., 2009. Floating treatment wetlands – floating biofilter research trial. In: *Stormwater 2009 conference-Australia*.
24. Duran C., Haberl R., Kreiner I., Krishnan R. and Luna V., 1999. Humedales artificiales, una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales en zonas rurales, suburbanas y urbanas que tengan áreas disponibles. Ciudad de México D.C.
25. El-Sheikh M., Saleh H., El-Quosy D. and Mahmoud A., 2010. Improving water quality in polluted drains with free water surface constructed wetlands. *Ecological Engineering*. Vol. 36. Pag. 1478 –1484.
26. Emeka P., 2008. Hydrocarbon removal with constructed wetlands: Design and operation of experimental hybrid constructed wetlands applied for hydrocarbon treatment, and application of an artificial neural network to support constructed wetlands optimization and management. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. University of Edinburgh.

27. EPA, 1999. Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGTHEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. Washington, DC 20460
28. EPA, 2000. Folleto Informativo de Tecnología de Aguas Residuales: Humedales de Flujo Subsuperficial. Office of Water. Washington DC, United States.
29. Faulwetter J., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burr M., Brisson J., Camper A. and Stein O., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*. Vol. 35. Pag. 987-1004.
30. Fountoulakis M., Terzakis S., Kalogerakis N. and Manios T., 2009. Removal polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and gravel filter. *Ecological engineering*. Vol. 35. Pag. 1702-1709.
31. Frick C., Farrell R. and Germida J., 1999. Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Department of Soil Science University of Saskatchewan Saskatoon, SK Canada.
32. García J., 2010. Efecto del uso de plantas y configuración de los sistemas en la remoción de organismos patógenos mediante el uso de humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales domesticas en condiciones tropicales. Tesis de Maestría en Ecotecnología Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales.
33. Gao Y., Sun C., Gao Y. and Chen D., 2008. Selection of wetland plants planted in floating bed in one estuaries of Dianchi Lake. Shanghai, China.
34. Gessner T., Kadlec R. and Reaves R., 2005. Wetland remediation of cyanide and hydrocarbons. *Ecological engineering*. Vol. 25. Pag. 457 – 469.
35. Guendy M., 2008. Pigments and moisture contents in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex steudel, would be engines for monitoring biodegradation of petroleum contaminants in constructed wetlands. *Australian Journal of basic and applies Sciences*. Pag. 1068 – 1075.
36. Haberl R., Grego S., Langergraber G., Kadlec R., Cicalini A., Martins S., Novais J., Aubert S., Gerth A., Thomas H. and Hebner A., 2003. Constructed Wetlands for the Treatment of Organic Pollutants. *Soils & Sediments*. Vol. 3. N° 2. Pag. 109 – 124.
37. Halverson N., 2004. Review of Constructed Subsurface Flow vs. Surface Flow Wetlands. Westinghouse Savannah River Company - WSRC. Savannah River Site Aiken, SC 29808.
38. El Hamouri B., Nazih J., Lahjouj J., 2007. Subsurface-horizontal flow constructed wetland for sewage treatment under Moroccan climate conditions. *Desalination* Vol. 215. Pag. 153–158.
39. Haritash A. and Kaushik C., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 169. Pag. 1–15.
40. Headley T. and Tanner C., 2006. Application of Floating Wetlands for Enhanced Stormwater Treatment: A Review. Auckland Regional Council. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd.

41. Headley T. and Tanner C., 2007. Floating wetlands may help sink algae. *Water & Atmosphere*. Vol. 15.
42. Headley T. and Tanner C., 2007. Floating Wetlands for Stormwater Treatment: Removal of Copper, Zinc and Fine Particulates. Prepared by NIWA for Auckland Regional Council. Auckland Regional Council Technical Report TR2008/030.
43. Hoeger S., 2010. Schwimmkampen Germany's artificial floating islands. *Journal of soil and water conservation*. <http://www.jswnonline.org/content/43/4/304.extract>. 14/01/2010.
44. Huaiquilaf B., 2008. Contaminación de aguas subterráneas por Hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. *Ciencia, Ahora*, N° 22, año 11, septiembre 2008 - marzo 2009.
45. Imfeld G, Braeckevelt M, Kusch P and Richnow H, 2009. Monitoring and assessing processes of organic chemical removal in constructed wetlands. *Chemosphere*. Vol. 74. Pag. 349 – 362.
46. Interstate Technology and Regulatory Cooperation, 2001. Phytotechnology Technical and Regulatory guidelines. Phytotechnologies work team.
47. Jones D., Hodge A. and Kuzyakov Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *Tansley review. New phytologist*. Vol. 163. Pag. 459 – 480.
48. Kadlec R., 2009. Comparison of free water and horizontal subsurface treatment wetlands. *Ecological engineering*. Vol. 35. Pag. 159–174
49. Kadlec R. and Wallace S., 2009. *Treatment wetlands*. Second edition. Taylor and Francis Group, ISBN: 987-1-56670-526-4.
50. Kamath R., Rentz J., Schnoor J. and Alvarez P., n.d. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications Department of Civil and Environmental Engineering, Seamans Center, University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A. – 52242.
51. Karathanasis A., Potter C., Coyne M., 2003. Vegetation effects on fecal bacteria, BOD, and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater. *Ecological Engineering*. Vol. 20. Pag. 157-169.
52. Kaseva M., 2004. Performance of a sub-surface flow constructed wetland in polishing pre-treated wastewater—a tropical case study. *Water Research*. Vol. 38. Pag. 681–687.
53. Kirkpatrick W., White P., Wolf D., Thoma G., and Reynold C., 2006. Selecting plants and nitrogen rates to vegetate crude oil contaminated soil. *International journal of phytoremediation*. Vol. 8. Pag. 285 – 297.
54. Kusch P., Weissner A. and Stottmeister U., 1999. 12 biological processes in wetland systems for wastewater treatment. *Biotechnology*, second edition Volume 11a, Environmental processes I. ISBN 3-527-28321-8.
55. Lara J., 1999. *Depuración de Aguas Residuales Municipales con Humedales Artificiales*. Instituto Catalán de Tecnología, Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona.
56. Li M., Wu Y., Yu Z., Sheng G., Yu H., 2007. Nitrogen removal from eutrophic water by floating-bedgrown water spinach (*Ipomoea aquatic Forsk*) with ion implantation. *Water research*, Vol. 41. Pag. 3152 – 3158.

57. Lianfang Z., Wei Z., Wei T., 2009. Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*. Vol. 21. Pag. 750-757.
58. LIFE- Environmental Funding, 2005. New floating macrophyte filters systems for the Mediterranean region (LIFE02 ENV/E/182). Final report (01/10/2002 – 30/09/2005).
59. Lovley, 1997. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum contaminated aquifers. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. Vol. 87. Pag. 75 – 81.
60. Maehlum T. and Stalnacke P., 1999. Removal efficiency of three cold-climate constructed wetlands treating domestic wastewater: effects of temperature, seasons, loading rates and input concentrations. *Water Science and Technology*. Vol 40, N° 3, pp. 273 – 281.
61. Mentaberry A., 2008. Fitorremediación. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. *Biología Molecular y Celular*.
62. Ministerio de Agricultura, 1984. Decreto 1584 de 1984. Colombia
63. Ministerio de Medio Ambiente, 1999. Guía de manejo ambiental para estaciones de servicio de combustible. Santa Fe de Bogotá, Colombia.
64. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005. Decreto número 4741 de 2005. Colombia
65. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2005. Política ambiental para la gestión integral de residuos o desechos peligrosos. ISBN 958-97785-2-6
66. Ministerio de protección social. Resolución 2115 de 2007, Decreto 1575 de 2007, artículos 2, 4 y 11. Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano.
67. Miranda D., 2005. Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales – impactos, consecuencias y prevención. La experiencia de Colombia. Evaluación del daño de los recursos naturales. International oil spill conference.
68. Mentaberry A., 2008. Fitorremediación. Curso de Agrobiotecnología, Departamento de fisiología, biología molecular y celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
69. Mitsch W. and Gosselink J., 1986. Wetlands. Chapter, Biochemistry of wetlands. Van Nostrand Reinhold. New York. Pag. 89 – 125. ISBN: 0-442-26398-8.
70. Nakamura K. and Mueller G., 2008. Review of the performance of the artificial floating island as a restoration tool for aquatic environments. World Environmental and Water Resources Congress, 2008 Ahupua'a.
71. Naz M., Uyanik S., Yesilnacar M., Sahinkaya E., 2009. Side-by-side comparison of horizontal subsurface flow and free water surface flow constructed wetlands and artificial neural network (ANN) modeling approach. *Ecological Engineering*. Vol. 35. Pag. 1255–1263
72. Newman L. and Reynolds C., 2004. Phytoremediation of organic compounds. *Biotechnology* Vol. 15. Pag 225–230.

73. Nope J., 2007. Diseño técnico-ambiental de los procedimientos de biorremediación en derrames de hidrocarburos como soporte operacional en campos petroleros. Tesis de grado Universidad de la Salle, Facultad de ingeniería ambiental y sanitaria. Bogotá, D.C.
74. Norma NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelos – Hidrocarburos fracción pesada por Extracción Y Gravimetría – Método de Prueba. México.
75. Omari K., Revitt M., Shutes B. and Garelick H., 2003. Hydrocarbon removal in an experimental gravel bed constructed wetland. *Water Science and Technology*. Vol. 48. N° 5. Pag. 275 – 281.
76. Pan J., Sun H., Nduwimana A., Wang Y., Zhou G., Ying Y., Zhang R., 2007. Hydroponic plate/fabric/grass system for treatment of aquacultural wastewater. *Aquacultural Engineering*. Vol. 37. Pag. 266-273
77. Pardo J., Perdomo M., y Benavides J, 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. NOVA - publicación científica Vol.2 no. 2. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de la Salle, Bogotá D.C.
78. Paredes D., 2009. Investigations on nitrogen transformation processes and stimulation of anaerobic ammonium oxidation activity in an experimental laboratory-scale wetland system. Tesis de doctorado. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germany.
79. Paredes, D., Kusch, P., Mbwette, T., Stange, F., Müller, R. A. and Köser, H., 2007. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review. *Eng. Life Sci.* Vol. 7 N° 1. Pag. 13-25.
80. Phelps and Young, 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* N° 10. Pag 15–25.
81. Ramírez M., Zapién B., Zegarra H., Rojas N., and Fernández L., 2009. Assessment of hydrocarbons biodegradability in clayed and weathered polluted soils. *International biodeterioration and biodegradation*. Vol. 63. Pag 347 – 353.
82. Reed S., Crites R., and Middle brooks E., 1995. *Natural systems for waste management and treatment*. McGraw Hill second edition.
83. Salmon C., Crabos J., Sambuco J., Bessiere J., Basseres A., Caumette P., and Baccou J., 1998. Artificial wetland performance in the purification efficiency of hydrocarbons wastewater. *Water air and soil pollution*. Vol. 104. Pag. 313 – 329.
84. Schnoor J., 1997. *Phytoremediation. Technology evaluation report*. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. University of Iowa.
85. Schröter M., 2008. Testing a ground-matrix-free rush mat to waste water purification. Practice of university cooperative education, national study academy Saxonia. Course of studies: Environmental technology. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ, Leipzig.
86. Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberl R., 2007. Investigation of bacterial removal during the filtration process in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*. Vol. 380. Pag. 173–180.

87. Sousa T., Haandel and Guimaraes, 2001. Post treatment of anaerobic effluents in constructed wetland systems. Dep. of chemistry and civil engineering University of Paraiba, Brazil. Water Science and Technology. Vol. 44, No 4, pp 213 - 219.
88. Stottmeister U., Wiessner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R. and Moormann H., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. Biotechnology Advances, N° 22. Pag. 93 – 117.
89. Sun T., Canga L., Wanga Q., Zhoua D., Cheng J., Xua H., 2010. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. Journal of Hazardous Materials. Vol. 176. Pag. 919–925.
90. Susarla S., Medina V. and McCutcheon S., 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. Ecological Engineering N° 18. Pag. 647 – 658.
91. Sverdrup L., Henning P., Nielsen T., Kjær C., Stenersen J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). Chemosphere. Vol. 53. Pag. 993–1003
92. Tanner C. y Sukias J., 1995. Accumulation of organic solids in gravel-bed constructed wetland. Water Science and Technology. Vol. 32, N° 3. Pag. 229-239.
93. Tanner C. and Headley T., 2001. Components of floating emergent macrophytes treatment wetlands influencing removal of stormwater pollutants. Ecological Engineering. Vol. 37. Pag. 474 – 486.
94. Terzakis S., Fountoulakis M., Georgaki I. Albantakis D., Sabathianakis I., Karathanasis A., Kalogerakis N. and Manios T., 2008. Constructed wetlands treating highway runoff in the central Mediterranean region. Chemosphere Vol. 72. Pag. 141 – 149.
95. The Service Technician's Guide to Compression Ignition Fuel Quality (STGCIFQ), 2007. Changes in Diesel Fuel. Changes in Gasoline.
96. Todd J., Brown E. and Wells E., 2003. Ecological design applied. Ecological engineering. Vol. 20. Pag. 421-440.
97. Turon C., Comas J., Poch M., 2009. Constructed wetland clogging: A proposal for the integration and reuse of existing knowledge. Ecological Engineering. Vol. 35. Pag. 1710-1718
98. UFZ - Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, 2005. Constructed Wetlands – Treating Wastewater with Cenoses of Plants and Microorganisms.
99. United States Department of Health and Human Services, 1999. Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH). Division of Toxicology, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: 9-38.
100. United States Environmental Protection Agency - EPA, 1994. Symposium on Natural attenuation of Ground Water. Office of research and development Washington, DC. September 1994.
101. United States Environmental Protection Agency, 1998. A Citizen's guide to Phytoremediation. Office of solid waste and emergency response.

102. United States Environmental Protection Agency - EPA, 1999. Phytoremediation resource guide. Solid waste and emergency response. June 1999.
103. United States Environmental Protection Agency, 2000. Introduction to Phytoremediation. Office of Research and Development. National Risk Management Research Laboratory Cincinnati, Ohio 45268.
104. United States Environmental Protection Agency, 2001. A Citizen's guide to bioremediation. Office of solid waste and emergency response.
105. United States Environmental Protection Agency, 2003. Constructed wetland and wildlife habitat.
106. United States Environmental Protection Agency, n.d. Hazardous waste identification. Chapter III: RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) Subtitle C - Managing Hazardous Waste.
107. Universidad de Antofagasta, Centro Regional de Estudios y Educación Ambiental, 2005. Contaminación por hidrocarburos en la zona costera de la ciudad de Antofagasta.
108. Vacca G., Wand H., Nikolausz M., Kusch P., Kastner M., 2005. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research* Vol. 39. Pag. 1361–1373.
109. Vallejo V., Salgado L. y Roldan F., 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Colombia Biotecnología*. Vol. 7. Pag 67-78.
110. Van Deepes A., 2006. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Solid Waste and Emergency Response and Office of Superfund Remediation and Technology Innovation. Washington, DC.
111. Van de Moortel A., 2008. Use of macrophytes mats for treatment of CSOs. Laboratory of analytical chemistry and applied ecochemistry. Ghent University Coupure, Belgium. In: 11th international conference on urban drainage, Edingurgh, Scotland, UK.
112. Vanier S. and Dahab M., 2001. Start up performance of a subsurface-flow constructed wetland for domestic wastewater treatment. *Environmental Technology*. Vol. 22. N° 5. Pag. 587 – 596.
113. Vargas V., 2000. Curso taller: Diseño de experimentos. Universidad del Valle, CINARA. Universidad Tecnológica de Pereira. Marzo 6 – 10.
114. Vélez M. y Paredes D., 2007. Remoción de metales en humedales artificiales. En: Seminario internacional "Fundamentos y diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales". Pereira Colombia, Febrero 22 – 24 de 2007.
115. Verhoeven J. and Meuleman A., 1999. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological engineering*, 12.p.p. 5 – 12.
116. Vieira P., Vieira R., Franc F., and Cardoso V., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials* Vol. 140. Pag. 52–59.

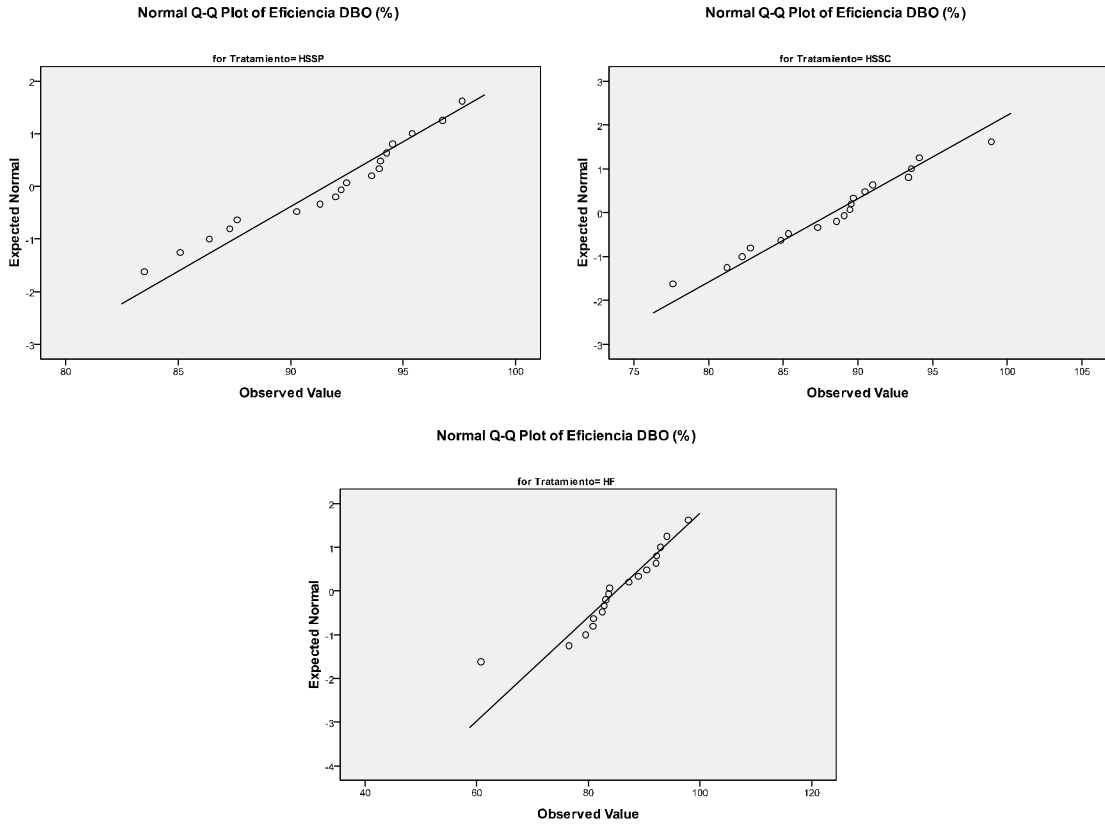
117. Vymazal J., 2005. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering*. Vol. 25. Pag 478–490.
118. Vymazal J., 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*. Vol. 380. Pag. 48–65.
119. Vymazal J. and Kröpfelová L., 2008. *Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow*. Springer Science. ISBN. 978-1-4020-8579-6.
120. Vymazal J., 2009. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological engineering*. Vol. 35. Pag 1–17.
121. Wallace S. and Kadlec R., 2005. BTEX degradation in a cold-climate wetland system. Selected Proceedings from the 9th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 24-29 September 2004, Avignon, France. *Water Science & Technology*. Vol. 51. N ° 9. Pag.165-171.
122. Weissner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Bederki O., Müller R. and Kästner M., 2006. Influence of helophytes on redox reactions in their rhizosphere. *Phytoremediation, Rhizoremediation. Focus on biotechnology*. Vol 9A. Pag 69-82.
123. White S., Seda B., Cousins M., Klaine S. and Whitwell T., 2009. Nutrient Remediation Using Vegetated Floating Mats. *Water Management Section 1*. In: SNA Research Conference Vol. 54.
124. Widdel F. and Rabus R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Environmental biotechnology*. Vol.12. Pag. 259–276
125. Xu J. and Johnson R., 1997. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian journal of soil science*, Vol 77. Pag. 453-458.
126. Ye F. y Li Y., 2009. Enhancement of Nitrogen Removal in Tower Hybrid Constructed Wetland to Treat Domestic Wastewater for Small Rural Communities. *Ecological Engineering by Elsevier*. Vol. 35. China. Pag 1043 – 1050.
127. Zhang A., Rengel Z. and Meney K., 2010. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetlands species. *Journal of hazardous materials*. Vol. 182. Pag. 689-695.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase I

| Parámetro | Tratamiento | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------|--------------|--------------------|-------|
| | | Estadístico | Grados de libertad | Sig. | Estadístico | Grados de libertad | Sig. |
| Eficiencia DBO (%) | HSSP | 0.153 | 18 | 0.200 | 0.942 | 18 | 0.311 |
| | HSSC | 0.132 | 18 | 0.200 | 0.981 | 18 | 0.956 |
| | HF | 0.146 | 18 | 0.200 | 0.905 | 18 | 0.069 |

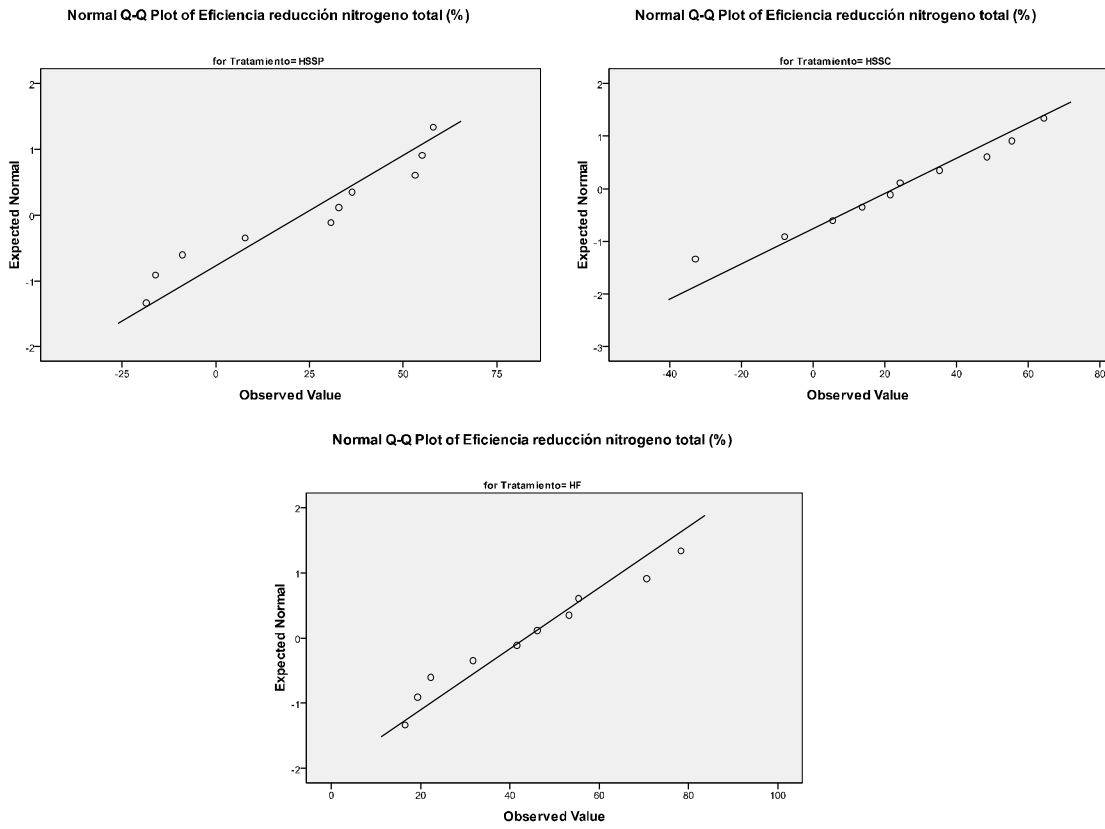
Resultado: poblaciones normales, para valores de sig>0.05.



Anexo 2. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase I

| Parámetro | Tratamiento | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|--|-------------|--------------------|--------------------|-------|--------------|--------------------|-------|
| | | Estadístico | Grados de libertad | Sig. | Estadístico | Grados de libertad | Sig. |
| Eficiencia reducción nitrógeno total (%) | HSSP | 0.202 | 10 | 0.200 | 0.887 | 10 | 0.155 |
| | HSSC | 0.105 | 10 | 0.200 | 0.977 | 10 | 0.946 |
| | HF | 0.140 | 10 | 0.200 | 0.946 | 10 | 0.625 |

Resultado: poblaciones normales, para valores de sig>0.05.



Anexo 3. Prueba de homogeneidad de varianzas
Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase I

| Levene Estadístico | Grados de libertad 1 | Grados de libertad 2 | Sig. |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 2.692 | 2 | 51 | 0.077 |

Resultado: homogeneidad de varianzas, para valores de sig > 0.05.

Anexo 4. Prueba de homogeneidad de varianzas
Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase I

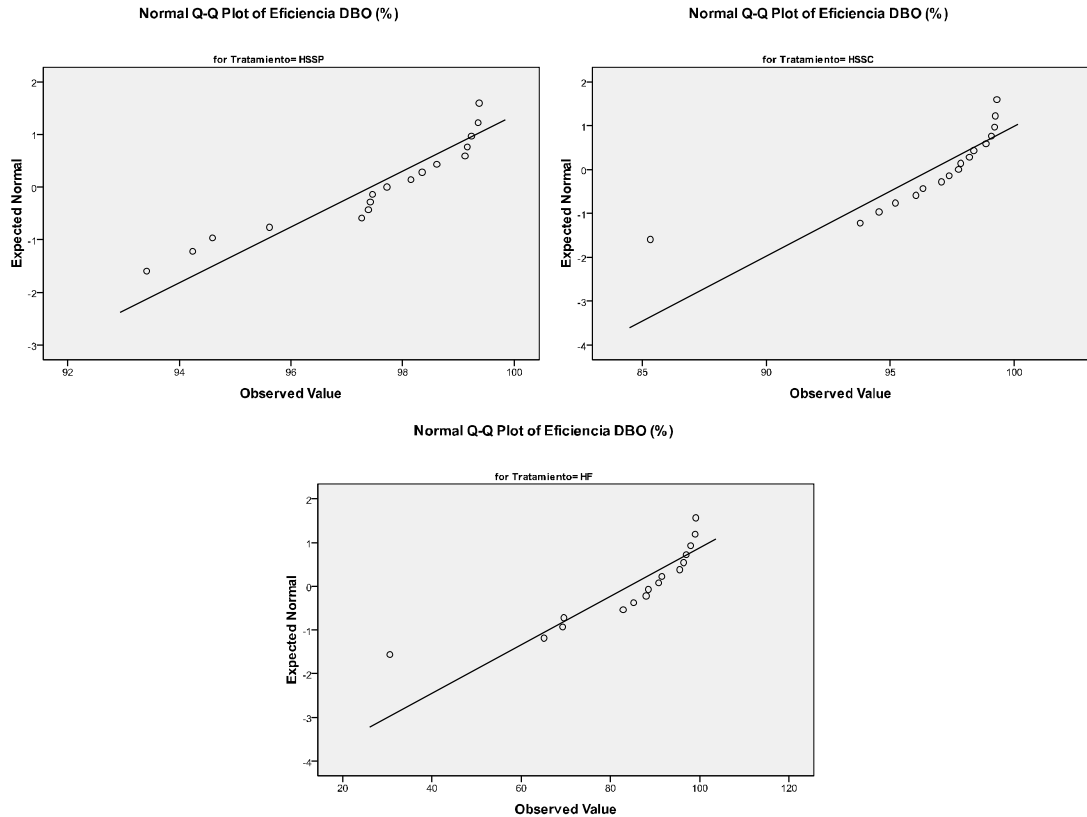
| Levene Estadístico | Grados de libertad 1 | Grados de libertad 2 | Sig. |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 0.901 | 2 | 27 | 0.418 |

Resultado: homogeneidad de varianzas, para valores de sig > 0.05

Anexo 5. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase II

| Parámetro | Tratamiento | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------|--------------|--------------------|-------|
| | | Estadístico | Grados de libertad | Sig. | Estadístico | Grados de libertad | Sig. |
| Eficiencia DBO (%) | HSSP | 0.228 | 17 | 0.190 | 0.865 | 17 | 0.180 |
| | HSSC | 0.219 | 17 | 0.290 | 0.714 | 17 | 0.600 |
| | HF | 0.221 | 16 | 0.350 | 0.778 | 16 | 0.061 |

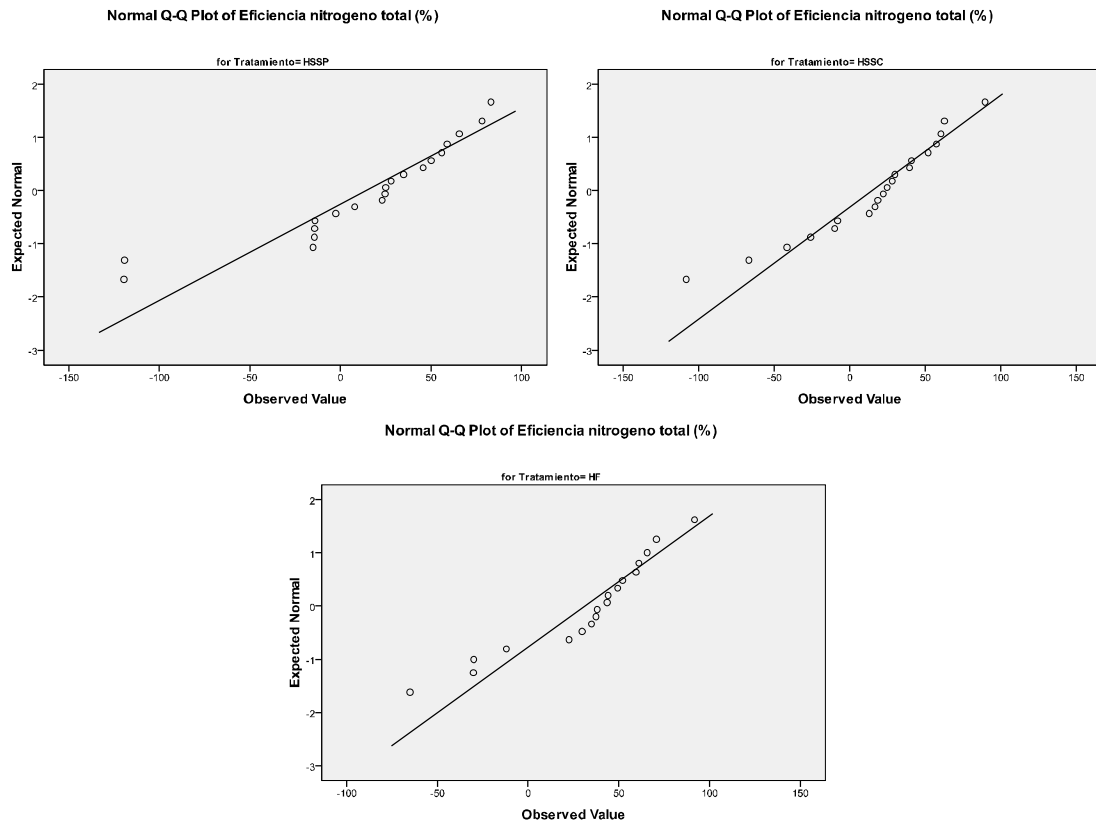
Resultado: poblaciones normales, para valores de sig>0.05.



Anexo 6. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase II

| Parámetro | Tratamiento | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------|--------------|--------------------|-------|
| | | Estadístico | Grados de libertad | Sig. | Estadístico | Grados de libertad | Sig. |
| Eficiencia nitrógeno total (%) | HSSP | 0.198 | 20 | 0.380 | 0.860 | 20 | 0.080 |
| | HSSC | 0.184 | 20 | 0.570 | 0.933 | 20 | 0.174 |
| | HF | 0.207 | 18 | 0.410 | 0.900 | 18 | 0.058 |

Resultado: poblaciones normales, para valores de sig>0.05.



Anexo 7. Prueba de homogeneidad de varianzas
Variable de respuesta Eficiencia de remoción de DBO. Fase II

| Levene Estadístico | Grados de libertad 1 | Grados de libertad 2 | Sig. |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 13.553 | 2 | 47 | 0.055 |

Resultado: homogeneidad de varianzas, para valores de sig > 0.05

Anexo 8. Prueba de homogeneidad de varianzas
Variable de respuesta Eficiencia de remoción de NT. Fase II

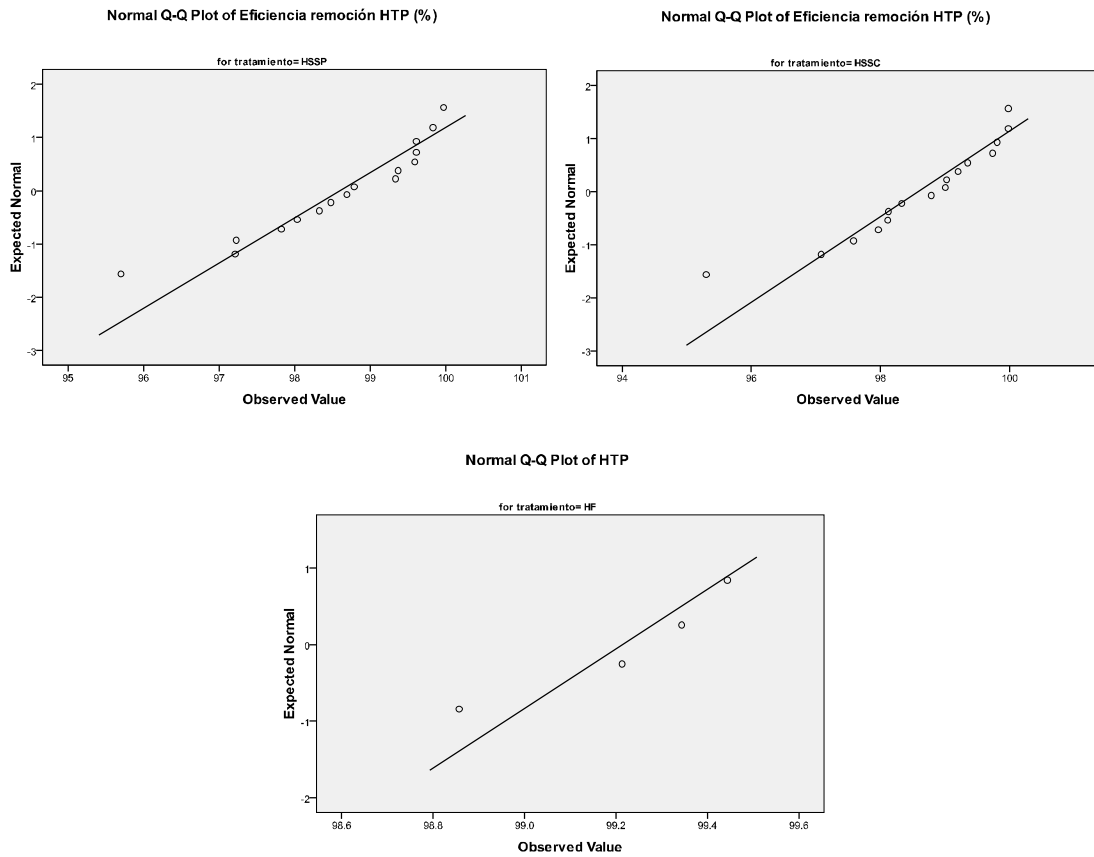
| Levene Estadístico | Grados de libertad 1 | Grados de libertad 2 | Sig. |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 0.489 | 2 | 55 | 0.616 |

Resultado: homogeneidad de varianzas, para valores de sig > 0.05

Anexo 9. Prueba de normalidad Variable de respuesta Eficiencia de remoción de HTP. Fase II

| Parámetro | Tratamiento | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------|--------------|--------------------|-------|
| | | Estadístico | Grados de libertad | Sig. | Estadístico | Grados de libertad | Sig. |
| Eficiencia HTP (%) | HSSP | 0.171 | 16 | 0.200 | 0.909 | 16 | 0.112 |
| | HSSC | 0.133 | 16 | 0.200 | 0.902 | 16 | 0.086 |
| | HF | 0.248 | 4 | | 0.916 | 4 | 0.517 |

Resultado: poblaciones normales, para valores de sig>0.05.



Anexo 10. Prueba de homogeneidad de varianzas
Variable de respuesta Eficiencia de remoción de HTP. Fase II

| Levene Estadístico | Grados de libertad 1 | Grados de libertad 1 | Sig. |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 0.010 | 1 | 30 | 0.920 |

Resultado: homogeneidad de varianzas, para valores de sig>0.05