



Lic. Hugo Daniel Di Giorgi  
2025



Tesis para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Naturales

**Efectos de la vegetación y la  
composición de relleno sobre la  
remoción de nitrógeno y fósforo en  
humedales de tratamiento de aguas  
residuales**

**Directores**

Dr. Alejandro Mariñelarena

Dr. Joaquín Cochero

## AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos campesinos María y Genaro, quienes me hicieron conocer las luciérnagas que habitaban su quinta.

A mis viejos, hermano, tíos, primos, que me acompañaron amorosamente en mi carrera a pesar de la incertidumbre que, a ellos y a mí, nos generaba a futuro.

A Gladys, mi compañera. A ella y a mis hijos Julián y Mariel les debo, entre muchas otras cosas, la oportunidad de completar mi carrera mientras nos hacíamos familia.

A Gustavo y Robert, queridos compañeros de estudio. A Robert, además, por su ayuda durante el inicio de los experimentos.

A Horacio, siempre dispuesto a acompañar y aconsejar.

A Alejandro, jefe del laboratorio y director de tesis, quién me dio la oportunidad de iniciarme en mi profesión y a Jorge (El Flaco), quienes me enseñaron a trabajar con compromiso, respeto y amistad.

A Jimena y Ramiro, que vinieron después, compañeros con los que compartimos el trabajo con el mismo entusiasmo y compromiso.

A Christian, por sus silencios terapéuticos.

A Joaquín, director de la tesis, sin cuyo aporte lúcido, entusiasta y generoso, no habría llegado hasta aquí.

A los integrantes del Jurado, Doctores Alejandra Volpedo (UBA – CONICET), Carlos Bonetto (CONICET – UNLP) y Hernan Hadad (IQAL, CONICET-UNL), por su disposición y sus valiosos aportes realizados a la tesis.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP, gratuita y de calidad, por la oportunidad de formarme.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la PBA, por la oportunidad de desarrollar mi profesión.

Al Instituto de Limnología “Dr Raúl A. Ringuelet” (ILPLA) con el que pude contar siempre, y a mis compañeros que me llenaron de ánimo para llevar adelante esta tesis.

A Néstor y, en especial, a Cristina, egresados de la UNLP que ejercieron el cargo de presidente de la Nación Argentina. Ellos fueron distinguidos con el título de doctor “Honoris Causa” de nuestra Universidad, reconocidos por sus respectivas gestiones, destacadas por la renovación de la Corte Suprema de Justicia, la política de Derechos Humanos, el desendeudamiento externo, la recuperación del empleo, el salario y el sistema previsional, el fortalecimiento de la inversión en educación, ciencia y tecnología (el edificio del instituto en el que trabajo así lo atestiguan), la Asignación Universal por Hijo, la integración regional, la ampliación de derechos, etc. Ellos inspiraron mi convicción y compromiso en el ejercicio de esta profesión.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
El desafío del tratamiento de las aguas residuales.....	5
Los humedales naturales .....	7
Los humedales construidos.....	9
Humedales de flujo superficial libre .....	11
Humedales de flujo subsuperficial horizontal.....	13
Humedales verticales.....	15
La remoción de nitrógeno y fósforo en humedales construidos .....	17
Objetivos de la tesis .....	22
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
Recolección, procesamiento y conservación de las muestras.....	24
Técnicas y métodos analíticos .....	25
Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	25
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) .....	26
Amoníaco .....	27
Nitrito .....	28
Nitrato .....	29
Fosfato .....	31
Nitrógeno total y fósforo total.....	32
Sólidos Suspendidos Totales (SST).....	33
Bacterias indicadoras de contaminación fecal .....	34
<b>CAPÍTULO 3: REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN MESOCOSMOS MADUROS DE HUMEDALES DE FLUJO ASCENDENTE .....</b>	<b>35</b>
Introducción y objetivos.....	35
Materiales y métodos .....	38
Configuración de los mesocosmos y diseño experimental.....	38
Parámetros fisicoquímicos .....	42
Análisis de datos.....	44
Resultados.....	45
Condiciones experimentales.....	45
Concentraciones de nutrientes y DBO5 .....	46
Perfiles en profundidad de los mesocosmos.....	47
Tasas de Carga y remoción de nutrientes y DBO5.....	51

Remoción de nutrientes a lo largo del tiempo.....	54
Relaciones entre la remoción de nutrientes y las variables físico-químicas.....	57
Discusión.....	59
Material Suplementario .....	63
<b>CAPÍTULO 4: SISTEMA DE HUMEDALES HÍBRIDO EN UNA ESCUELA RURAL .....</b>	<b>68</b>
Introducción y objetivos.....	68
Materiales y métodos .....	69
Diseño de la planta y diseño experimental .....	69
Mediciones de caudal .....	72
Parámetros físico-químicos y bacteriológicos.....	72
Análisis de datos.....	73
Resultados.....	75
Caudal .....	75
Concentraciones de materia orgánica y nutrientes .....	75
Remoción de materia orgánica y nutrientes .....	78
Bacterias coliformes fecales .....	83
Relaciones entre la remoción de contaminantes y las variables fisicoquímicas.....	84
Discusión.....	86
Conclusiones y recomendaciones .....	88
Material Suplementario .....	90
<b>CAPÍTULO 5: REMOCIÓN DE FÓSFORO Y NITRÓGENO EN MESOCOSMOS DE HUMEDALES MADUROS CON <i>EQUISETUM GIGANTEUM</i> PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES .....</b>	<b>96</b>
Introducción y objetivos.....	96
Materiales y métodos .....	97
Configuración y maduración de los mesocosmos .....	97
Diseño experimental y aguas residuales .....	98
Muestreo y análisis fisicoquímico .....	99
Diseño experimental y análisis de datos .....	100
Resultados.....	101
Caudal y condiciones fisicoquímicas.....	101
Remoción de DQO .....	102
Remoción de fósforo.....	102
Remoción de nitrógeno .....	103
Relaciones entre los nutrientes y los parámetros fisicoquímicos .....	110
Discusión.....	112

Material suplementario .....	118
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>128</b>
Recomendaciones prácticas para la optimización de humedales construidos .....	130
Líneas futuras de investigación .....	131
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>133</b>

## RESUMEN

Los humedales construidos han surgido como soluciones basadas en la Naturaleza (NBS, “Nature Based Solution”) en diversas prácticas de gestión de los recursos hídricos, como la regulación del ciclo hidrológico y la mejora de la calidad del agua. La creación de humedales implica la conversión de tierras altas o sistemas de aguas abiertas poco profundas en humedales con vegetación. Los humedales construidos (CW, “Constructed Wetland”), también llamados humedales de tratamiento, se han desarrollado con el propósito principal de eliminar contaminantes de las aguas residuales (fuente puntual) o de escorrentía (fuente difusa), y poseen múltiples funciones ecológicas y beneficios socioeconómicos, siendo una alternativa confiable y sostenible para el tratamiento secundario y terciario de aguas residuales. Factores como las especies de plantas, la selección del sustrato, y las condiciones ambientales e hidráulicas afectan el rendimiento, con variaciones relacionadas principalmente con la temperatura, el tiempo de residencia hidráulica y las tasas de carga de contaminantes.

Los procesos de remoción de nutrientes que ocurren en humedales de tratamiento son complejos, diversos y específicos, de modo que se requieren condiciones particulares para cada uno. La remoción de N, por ejemplo, involucra una serie de transformaciones, en su mayoría mediadas por microbios, que permiten exportarlo en forma gaseosa desde el agua hacia la atmósfera. Esta compleja serie de transformaciones constituye una parte importante del ciclo del N en la naturaleza y su ocurrencia e intensidad dependen de condiciones ambientales tales como el estado redox, la alcalinidad, la disponibilidad de materia orgánica, el pH y la temperatura.

Con relación al fósforo, los procesos de remoción pueden ser tanto transitorios como sostenibles que, con períodos iniciales de adaptación, pueden extenderse por varios años. A medida que aumentan las concentraciones de entrada, también lo hace la eliminación de la carga de fósforo. La adsorción al sustrato proporciona una eliminación inicial de fósforo; sin embargo, este almacenamiento, aunque parcialmente reversible, termina por saturarse con el tiempo. La absorción por organismos, como bacterias, algas y macrófitos, también desempeña un papel crucial en las etapas iniciales de eliminación. No obstante, el ciclo natural de crecimiento, muerte y descomposición devuelve la mayor parte del fósforo absorbido al sistema, aunque una fracción significativa se incorpora a los sedimentos y suelos recién formados, contribuyendo así a la acumulación a largo plazo.

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral es investigar el efecto de materiales de relleno accesibles y de especies vegetales locales sobre la remoción conjunta de nitrógeno y fósforo en humedales de tratamiento. Para ello se buscó evaluar la eficiencia de distintos sistemas de humedales construidos para la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y materia orgánica en aguas residuales bajo diversas condiciones experimentales, tanto en experimentos controlados (mesocosmos) como en sistemas aplicados a escala real.

Para este propósito se realizaron investigaciones en mesocosmos maduros de humedales de flujo vertical ascendente y descendente, y en una prueba piloto en una escuela rural.

La investigación llevada a cabo en mesocosmos maduros de humedales de flujo ascendente sometidos a alta carga hidráulica y moderada carga orgánica (Capítulo 3), reveló que el tratamiento con especies vegetales y, en menor medida, el sustrato y la interacción entre ambos, afectaron significativamente la remoción de fósforo. En sustrato de conchilla, los tratamientos rindieron mejores resultados y se alcanzaron las máximas eficiencias con *Scirpus giganteus* y *Schoenoplectus californicus*. Este estudio puso de manifiesto la interacción compleja entre sustratos y vegetales, evidenciando que ciertas combinaciones potencian la remoción de nutrientes de manera más eficaz.

En los mesocosmos de flujo vertical descendente rellenos de arena, un material más accesible pero menos reactivo para la remoción de fósforo, se ensayaron cargas hidráulica y orgánica moderadas, consistentes con el objetivo de evaluar el rendimiento de remoción de nutrientes sobre un efluente con tratamiento secundario (Capítulo 5). Bajo este régimen de cargas más bajas que en el experimento anterior, la especie *Equisetum giganteum* demostró ser la más eficiente en términos de remoción de nutrientes, superando a otras helófitas comúnmente utilizadas, como *Phragmites australis* y *Typha latifolia*. Incluso con respecto al fósforo, la investigación reveló una remoción con *E. giganteum* tres veces mayor que la obtenida con *P. australis*.

El sistema de tratamiento a escala real implementado en una escuela rural también demostró ser eficaz en la remoción de materia orgánica, alcanzando valores promedio de remoción superiores al 80% en su última etapa. Sin embargo, la remoción de nutrientes fue más variable, con una eficiencia promedio del 25,4% de nitrógeno amoniacal, 36,6% de nitrógeno total y 31,8 % de fósforo total. Estos resultados reflejan tanto las limitaciones del diseño de los humedales saturados como las condiciones operativas subóptimas, especialmente en lo que

respecta a las cargas hidráulicas y orgánicas aplicadas, que superaron los valores recomendados en la literatura para sistemas de humedales horizontales y verticales.

Finalmente, se plantean en las conclusiones recomendaciones para la optimización de humedales construidos, y formulan consideraciones sobre futuras líneas de investigación que pueden continuar con el estudio de la remoción de nutrientes en humedales construidos.

## CAPÍTULO 1

# INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### El desafío del tratamiento de las aguas residuales

La meta 6.3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de Naciones Unidas (ODS) persigue: “De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial”.

Para registrar el progreso hacia esa meta, el indicador 6.3.1 de los ODS monitorea la proporción de flujos de aguas residuales totales, industriales y domésticas, tratados de manera adecuada según las normas nacionales. De acuerdo con la información del portal de datos de la ONU<sup>1</sup>, para el 2022 el 58% de las aguas residuales domésticas mundiales se trataba de manera adecuada. Esto considera la proporción de flujos de aguas residuales domésticas que se tratan y vierten de acuerdo con las normas nacionales o locales (o en ausencia tales datos, que se tratan mediante procesos secundarios o superiores) e incluye las aguas residuales domésticas transferidas a una planta de tratamiento a través del alcantarillado (“aguas residuales tratadas”), vertidas a un sistema de tratamiento in situ (“tratadas in situ”) y vertidas a un sistema in situ en el que se vacían lodos fecales y se transportan a una planta de tratamiento (“no tratadas in situ”). Esta estimación no incluye las aguas residuales industriales ni la escorrentía agrícola.

Si nos enfocamos en la situación de nuestra región y, en particular de nuestro país, este indicador se reduce a 46 % (América Latina y el Caribe) y 36 % (Argentina). Por otra parte, la categoría de “tratamiento adecuado” no define calidad de vertido. Al respecto, en Argentina se llevó a cabo un valioso Relevamiento Nacional de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (RNPTAR) donde se informa que casi un tercio de las plantas cloacales relevadas cumple con un tratamiento adecuado mientras que los dos tercios restantes se encuentra en un estado regular o malo. De las aguas residuales no colectadas (37% del total), rurales o periurbanas, poco más

---

<sup>1</sup> <https://www.sdg6data.org>

de la mitad recibe “tratamiento in situ” que consiste normalmente de cámara séptica y pozo ciego (Katopodis et al., 2023).

Otro indicador de progreso (6.3.2), complementario del anterior, monitorea la proporción de cuerpos de agua con buena calidad de agua ambiental, según estándares nacionales y/o subnacionales de calidad basados en mediciones de cinco parámetros que informan sobre las presiones más comunes que impactan en la calidad del agua a nivel global. A 2023, el 56% de los cuerpos de agua monitoreados del mundo tienen buena calidad de agua ambiental. A nivel regional, para América Latina y el Caribe se registra el 57% y para Argentina el 62%. Nuestro país reportó con buena calidad al 62% de sus ríos ambiental y al 22% de sus masas de agua subterránea. No reportó información para la categoría cuerpos de agua abiertos.

Más allá del desafío que hoy representa el cumplimiento de la meta 6.3, la integridad de los ecosistemas acuáticos depende no sólo de la disminución de la proporción de vertidos de aguas residuales sin tratar sino también del avance en el control de las descargas de nutrientes a esos ambientes. Nitrógeno y fósforo son los nutrientes principales que limitan el crecimiento no solo de las plantas terrestres, sino también de las algas y plantas vasculares en los ecosistemas marinos y de agua dulce. De hecho, los ecosistemas pueden describirse en términos que hacen referencia a la disponibilidad de nutrientes que limitan ese crecimiento. Según su estado trófico, la concentración promedio de nitrógeno total y fósforo total puede variar, respectivamente, desde menos de 260 y 10  $\text{mg m}^{-3}$  en el mar y en lagos oligotróficos hasta más de 1200 y 100  $\text{mg m}^{-3}$  en ríos y lagos hiper-eutróficos (Smith et al., 1999). El desarrollo adicional de criterios de nutrientes debe basarse en las relaciones entre el estado ecológico y las concentraciones de nutrientes, teniendo en cuenta la necesidad de comparabilidad entre las diferentes categorías de agua, los tipos de cuerpos de agua dentro de estas categorías y los países (Poikane et al., 2019; Xu et al., 2015).

Los cambios en la carga de nutrientes en los sistemas acuáticos pueden dar lugar a cambios drásticos en la estructura y función de las comunidades (Dodds & Welch, 2000), y su entrada desde fuentes antropogénicas puede provocar efectos ecológicos importantes incluso cuando las concentraciones ambientales de nutrientes son naturalmente altas (Artigas et al., 2013). Este proceso, llamado eutrofización, consiste en la producción excesiva de materia orgánica por parte de fitoplancton, plantas bentónicas y algas, y ha llevado a la carencia de oxígeno (zonas anóxicas e hipóxicas, a veces llamadas "zonas muertas") en aguas de muchas áreas, así como a la degradación del hábitat, la pérdida de diversidad biótica y un aumento en la incidencia y extensión de floraciones algales nocivas. Una de las zonas muertas más grandes

del mundo ocurre cada verano en el norte del Golfo de México, causada por el gran flujo de nitrógeno a través del río Mississippi (Howarth, 2022).

En general, aunque los procesos convencionales aplicados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs, “wastewater treatment plants”), como el proceso anaeróbico-anóxico-oxígeno (A2O) y los reactores secuenciales por lotes (SBR), pueden reducir las concentraciones de nitrógeno total (TN) y fósforo total (TP) a menos de 10 y 2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, las concentraciones de TN y TP en los vertidos de aguas residuales aún superan con creces estos umbrales, lo que provoca eutrofización. Por lo tanto, se puede concluir que la capacidad de tratamiento para TN y TP en las WWTPs a nivel mundial es insuficiente, lo que sugiere la necesidad de un tratamiento avanzado de los efluentes secundarios de las WWTPs. Se han elegido dos métodos principales para la modernización de las WWTPs: (1) construir nuevos tanques como pasos adicionales de tratamiento; (2) modificar las WWTPs introduciendo nuevas tecnologías. Sin embargo, estas tecnologías presentan algunas limitaciones, como altos costos de tratamiento y dificultades para eliminar simultáneamente nitrógeno y fósforo (Zhou et al., 2022).

Los nutrientes ingresan a los ecosistemas acuáticos tanto desde fuentes puntuales como difusas. Las primeras, vertidos de aguas residuales o plantas industriales, pueden controlarse mediante tecnologías de tratamiento que impliquen la eliminación de nutrientes. Para las segundas, se necesitan estrategias de mitigación más complejas, incluyendo el uso de herramientas de modelado (Xue et al., 2022). Basándose en las tecnologías actuales, se consideran efectivos los esquemas integrados que involucran dos o más métodos. Las tecnologías de control en la fuente pueden reducir tanto el volumen de agua como la carga de contaminación mediante la gestión de labranza, la gestión de fertilización y la irrigación de ahorro de agua. Las tecnologías de control de procesos, como zanjas ecológicas, franjas de amortiguamiento y humedales construidos, pueden complementar las tecnologías de control en la fuente (Xia et al., 2020).

## Los humedales naturales

Los humedales son difíciles de definir porque presentan una gama considerable de condiciones hidrológicas, porque se encuentran a lo largo de un gradiente entre los márgenes de tierras altas y de sistemas de aguas profundas bien definidos, y por su gran variación en tamaño, ubicación e influencia humana. Debido a que los humedales combinan atributos de los ecosistemas acuáticos y terrestres, pero no son ninguno de ellos, han caído en la grieta que separa las disciplinas científicas de la ecología terrestre y acuática. Sirven como fuentes,

sumideros y transformadores de nutrientes; los sistemas acuáticos de aguas profundas (al menos los lagos y océanos) son casi siempre sumideros, y los sistemas terrestres suelen ser fuentes. Los humedales se cuentan entre los ecosistemas más productivos del planeta en comparación con los sistemas terrestres y acuáticos de aguas profundas adyacentes, pero no es correcto decir que todos los humedales son altamente productivos. Las turberas y los pantanos de cipreses son ejemplos de humedales de baja productividad. Las definiciones de humedales suelen incluir tres componentes principales (Mitsch & Gosselink, 2015):

1. Se distinguen por la presencia de agua, ya sea en la superficie o en la zona de raíces.
2. A menudo tienen condiciones de suelo únicas que difieren de las tierras altas adyacentes.
3. Soportan biota adaptada a condiciones húmedas, como la vegetación hidrófita y, por el contrario, se caracterizan por la ausencia de biota intolerante.

La Convención sobre los Humedales de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas, más conocida como la Convención de Ramsar, adoptó en 1971 la siguiente definición de humedales (Artículo 1.1): *A los efectos de la presente Convención, los humedales son zonas de marismas, pantanos, turberas o aguas, naturales o artificiales, permanentes o temporales, estáticas o fluyentes, dulces, salobres o saladas, incluidas las zonas de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros.*

Propuso, además, un Sistema Ramsar de Clasificación con 42 Tipos de Humedales, agrupados en tres categorías: humedales marinos y costeros, humedales continentales y humedales artificiales. Y declaró que los humedales reportan beneficios económicos enormes, como por ejemplo: abastecimiento de agua (cantidad y calidad); pesca (más de dos tercios de las capturas mundiales de peces están vinculadas a la salud de las zonas de humedales costeras y continentales); agricultura, gracias al mantenimiento de las capas freáticas y a la retención de nutrientes en las llanuras aluviales; producción de madera; recursos energéticos, como turba y materia vegetal; recursos de vida silvestre; transporte; y posibilidades de recreación y turismo. Poseen, además, atributos especiales como parte del patrimonio cultural de la humanidad: están asociados a creencias religiosas y cosmológicas, constituyen una fuente de inspiración estética, sirven de refugio de vida silvestre y dan sustento a importantes tradiciones locales (Convención de Ramsar, 1971). Lamentablemente, los humedales naturales de todo el mundo siguen estando amenazados por factores antropogénicos y climáticos, a pesar de las crecientes preocupaciones por la conservación y de los esfuerzos de restauración y rehabilitación.

## Los humedales construidos

La creación de humedales implica la conversión de tierras altas o sistemas de aguas abiertas poco profundas en humedales con vegetación. Los humedales construidos (CW, “Constructed Wetland”), también llamados humedales de tratamiento, se han desarrollado con el propósito principal de eliminar contaminantes de las aguas residuales (fuente puntual) o de escorrentía (fuente difusa). El tratamiento en humedales de aguas residuales y contaminadas es un concepto interesante que implica la creación de una asociación entre la humanidad (nuestros desechos) y un ecosistema (los humedales). Por lo tanto, es un buen ejemplo de ingeniería ecológica (Mitsch, 2012). Su diseño requiere especial atención a la hidrología, la carga contaminante, la física y química del sustrato y la selección de la vegetación. Incluye asuntos de gestión tales como la atracción y control de la vida silvestre, el control de mosquitos y patógenos, y la gestión de los gases de efecto invernadero y del nivel del agua. Los humedales de tratamiento no son baratos de construir y operar, pero por lo general cuestan mucho menos que los sistemas de tratamiento convencionales (Mitsch & Gosselink, 2015).

Los humedales construidos han surgido como soluciones basadas en Naturaleza (NBS, “Nature Based Solution”) en diversas prácticas de gestión de los recursos hídricos, como la regulación del ciclo hidrológico y la mejora de la calidad del agua. La efectividad de los humedales en la regulación del caudal durante eventos climáticos extremos (inundaciones y sequías) y en la purificación del agua depende de su tamaño, ubicación y condiciones locales. Además, para una gestión óptima del agua se requiere un cambio de escala que pase de centrarse en humedales individuales a considerar paisajes húmedos. Por ejemplo, la captura de sedimentos puede maximizarse si se colocan humedales pequeños cerca de las zonas de origen de los sedimentos, mientras que, si el objetivo es la retención de las cargas difusas agrícolas dentro del paisaje o el control de inundaciones, deben colocarse humedales grandes en la parte baja de la cuenca para retener más escorrentías de las zonas altas. La dependencia de las funciones de los humedales en relación con la escala y sus interacciones agregadas con el paisaje deben tenerse en cuenta en los enfoques de ingeniería ecológica. Esto requiere la integración de mediciones terrestres, modelos analíticos, enfoques estadísticos y técnicas de teledetección. El desarrollo de paisajes húmedos multifuncionales para la gestión del agua y la maximización de otros servicios ecosistémicos, como la biodiversidad, también requiere enfoques de gobernanza colaborativa que identifiquen los beneficios y las prioridades entre partes interesadas. Además, deberían considerarse instrumentos de política para apoyar la financiación y la ejecución de los humedales y/o su restauración, a fin de respaldar planes eficaces de gestión de los recursos hídricos (Ferreira et al., 2023).

Un ejemplo de ello es el concepto de “Ciudad esponja”, una iniciativa que el gobierno chino desarrolló en 2013 en respuesta a extensas inundaciones pluviales acaecidas en numerosas ciudades. Las ciudades esponjas acumulan, filtran y purifican el agua de lluvia de forma natural. La iniciativa tiene como objetivo retener el 70% del agua de lluvia a nivel local, alineada con los principios de mejorar la infiltración, promover el almacenamiento y explorar el aprovechamiento del agua de lluvia. Fuertemente subvencionada por el gobierno central, la iniciativa se ha desarrollado desde 2015 en 30 ciudades de todo el país. Los resultados de una investigación sobre su implementación en la ciudad de Yangzhou muestran que los CWs podrían proporcionar un espacio valioso para almacenar el exceso de agua de la escorrentía superficial y la descarga de alcantarillado pluvial, pero generalmente solo para los eventos menos extremos. Con un diseño apropiado, podrían funcionar como llanuras aluviales sin dejar de ser compatibles con otros fines, como el desarrollo turístico. Los CWs pueden ser prometedores para atenuar las inundaciones, pero existen importantes advertencias sobre su aplicación que surgieron tanto de entrevistas como de los resultados de una modelización (Zhou & Penning-Rowsell, 2021).

El agua ingresa a los humedales a través del caudal de los arroyos, la escorrentía, la descarga de aguas subterráneas y la precipitación. Estos flujos son extremadamente variables en la mayoría de los casos, y las variaciones son de carácter estocástico. Los humedales de tratamiento de aguas pluviales generalmente poseen este mismo conjunto de afluentes. Los que tratan aguas residuales de fuentes continuas pueden tener estos mismos insumos, aunque los aportes de arroyos y agua subterránea suelen estar ausentes. En cambio, el flujo de entrada constante representa una característica distintiva importante. Un flujo dominante que impulsa al ecosistema hacia una condición ecológica algo diferente de un sistema impulsado estocásticamente.

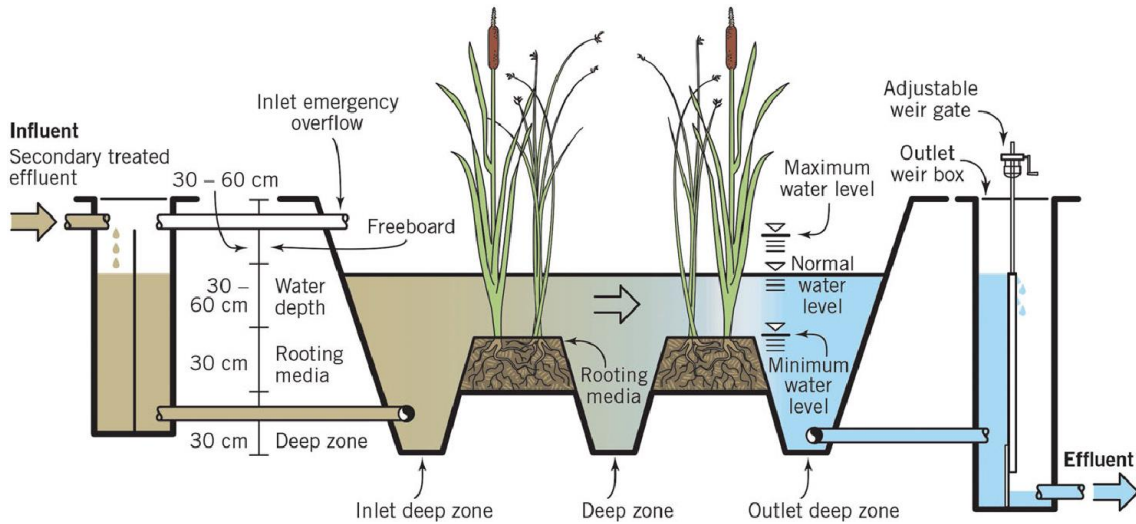
Por ello, el flujo de agua determina la siguiente clasificación de los humedales de tratamiento (Kadlec & Wallace, 2009):

- **Flujo superficial libre** (FWS, “free water surface”), similares en apariencia a humedales naturales, tienen áreas de aguas abiertas, el agua fluye libre hacia el punto de salida
- **Flujo subsuperficial horizontal** (HF, “horizontal flow”), generalmente emplean un lecho de grava plantado con vegetación de humedal. El agua, mantenida por debajo de la superficie del lecho, fluye horizontalmente hacia la salida.
- **Flujo vertical** (VF, “vertical flow”), el agua se distribuye en un lecho de arena o grava plantado con vegetación de humedal y se trata a medida que atraviesa verticalmente el lecho y la rizosfera.

La capacidad de controlar la profundidad del agua es fundamental para el funcionamiento de los humedales de tratamiento. Esta flexibilidad operacional es necesaria para mantener el régimen hidráulico dentro de las necesidades hidrológicas de las especies de plantas deseadas y, también, para evitar consecuencias operacionales indeseables, como la inundación de la zona de entrada de los humedales de HF. Por lo tanto, es necesario comprender los factores hidráulicos que relacionan la profundidad y el caudal, incluyendo la densidad de vegetación y la relación de aspecto. En los humedales de FWS, esto requiere una comprensión de los efectos de la fricción hidráulica de los tallos sobre perfiles del agua superficial. En el caso de los humedales de HF y VF, existen problemas adicionales relacionados con el tamaño del medio del lecho, la conductividad hidráulica y la obstrucción. Las características importantes de la hidrología de los humedales, desde el punto de vista de la eficiencia del tratamiento, son las que determinan la duración de las interacciones entre el agua y la biota y la proximidad a los sitios de actividad biológica y física de las sustancias transportadas por el agua (Kadlec & Wallace, 2009).

### Humedales de flujo superficial libre

Los humedales de FWS contienen áreas de aguas abiertas, vegetación flotante y plantas emergentes, ya sea por diseño o como una consecuencia inevitable de su configuración. A medida que las aguas residuales fluyen a través del humedal, son tratadas mediante procesos tales como sedimentación, filtración, oxidación, reducción, adsorción, precipitación, biodegradación y foto-oxidación. Los componentes de un humedal típico de FWS se muestran en la **Figura 1.1**. La semejanza con los humedales naturales determina que atraigan a una amplia variedad de vida silvestre. Por otra parte, la posibilidad de exposición humana a patógenos hace que rara vez se utilicen para tratamiento secundario. Debido a un costo relativamente bajo por unidad de área, generalmente encuentran su mayor aplicación en situaciones de elevado volumen de flujo y baja concentración de contaminantes. Se utilizan habitualmente para tratar fuentes no puntuales, como las aguas pluviales urbanas y la escorrentía agrícola y, en las aplicaciones de tratamiento de aguas residuales domésticas y municipales, cumpliendo una etapa de tratamiento terciario o pulido. Otras aplicaciones incluyen humedales con vegetación flotante, bio-zanjas permanentemente inundadas y humedales que emplean vegetación sumergida. Los valores estéticos y del hábitat suelen ser tan importantes para el diseño como la mejora de la calidad del agua.



**Figura 1.1.** Esquema general de un humedal de FWS (Dotro et al., 2017)

La estructura física de un humedal de FWS es tan diversa como su posible aplicación. Pueden ser revestidas o no, de profundidad constante o variable, total o parcialmente vegetadas, la vegetación puede ser emergente, sumergida o flotante y pueden variar en tamaño desde unos pocos metros hasta varios kilómetros cuadrados. Sin embargo, hay varias características definitorias esenciales. El nivel del agua se mantiene por encima de una matriz de raíces que, en suelo, arena o grava, soporta el crecimiento de plantas que pueden sobrevivir en condiciones de inundación continua. El flujo es horizontal, pero a una velocidad muy baja puede tomar una trayectoria tortuosa desde la entrada hasta la salida.

La capa de enraizamiento mayormente anaeróbica, en especial una vez que el sistema madura y se establece sobre ella una capa de detritos que consiste de vegetación muerta y sedimentos atrapados. Los niveles inferiores de la columna de agua pueden variar de anaeróbicos a aeróbicos dependiendo de las tasas de carga de contaminantes, la profundidad de la columna de agua y la distancia desde el punto de entrada del flujo. El humedal debe diseñarse de manera que las capas superiores de la columna de agua sean siempre aeróbicas para promover la eliminación de organismos patógenos y prevenir la liberación de olores. Prácticamente todas las reacciones dependientes de redox, incluyendo la nitrificación y la desnitrificación, son posibles en el humedal FWS debido a la amplia variedad de condiciones redox (**Figura 1.2**). Las áreas de aguas abiertas permiten que la luz solar penetre y mejore la fotodegradación (Dotro et al., 2017)

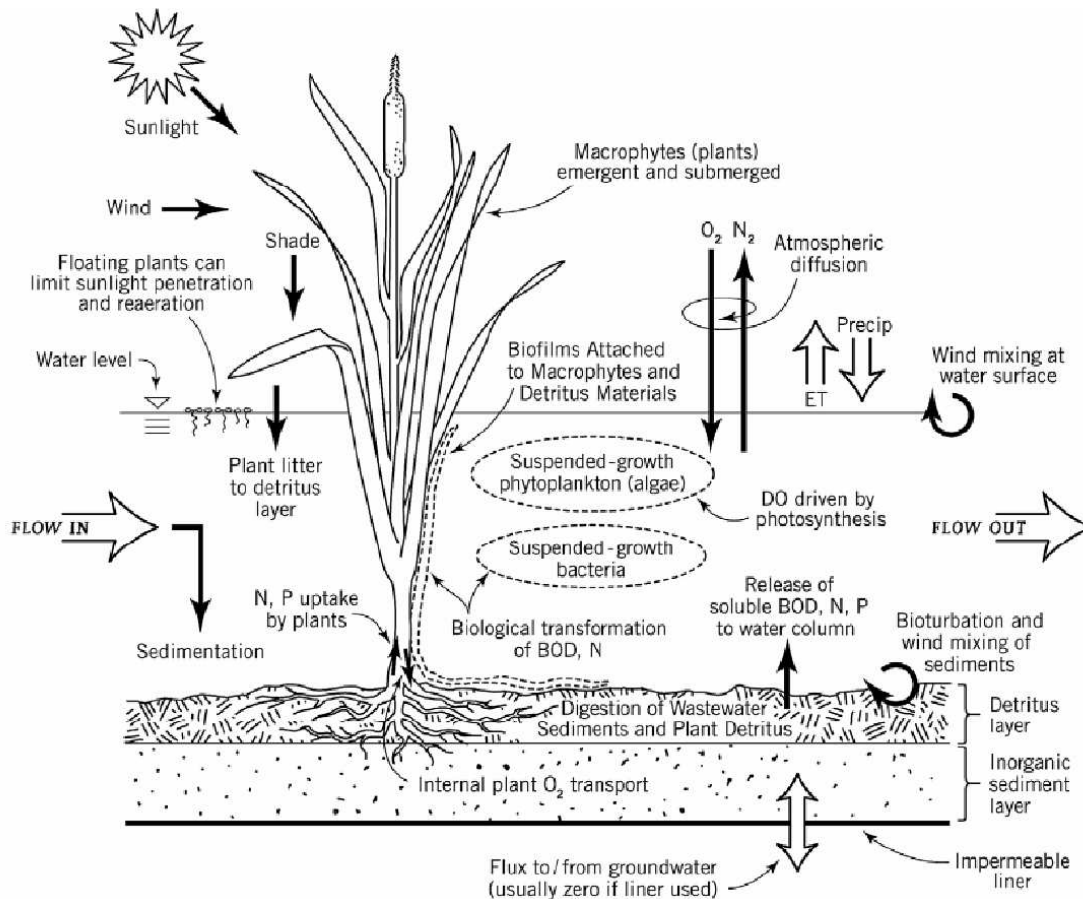


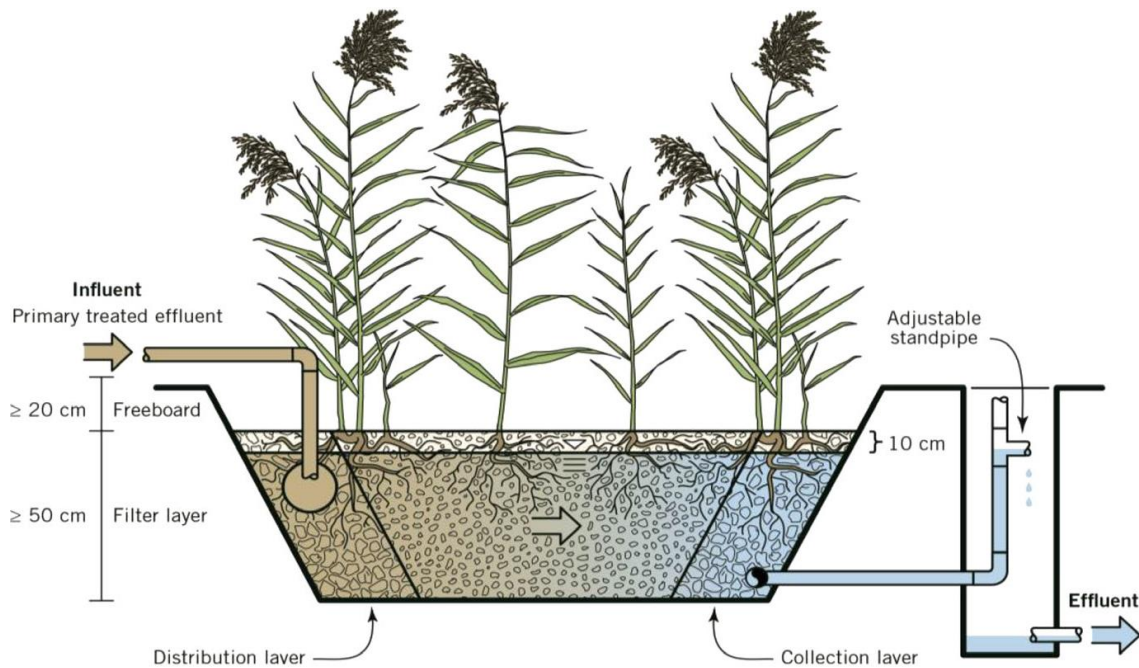
Figura 1.2. Procesos ecológicos principales en un humedal de FWS (Wallace & Knight, 2006)

## Humedales de flujo subsuperficial horizontal

En un humedal típico de flujo horizontal (HF, “*Horizontal Flow*”), el lecho de grava está saturado y plantado con plantas emergentes de humedal (helófitas). El agua ingresa al sistema de tratamiento por un extremo, fluye a través de la grava y las raíces, y se recoge en el extremo opuesto antes de ser descargada. Una tubería vertical ubicada fuera del lecho del humedal permite controlar el nivel del agua. Todo el lecho está aislado del terreno circundante mediante una combinación de revestimiento de plástico y membrana geotextil. Para el tratamiento secundario de aguas residuales domésticas, la profundidad de la grava es generalmente de 0,5 a 0,7 m y el nivel del agua se mantiene de 5 a 10 cm por debajo de la superficie (**Figura 1.3**). Debido a que el agua no está expuesta durante el proceso de tratamiento, se minimiza el riesgo asociado con la exposición humana o silvestre a organismos patógenos. Los humedales de HF operados correctamente no proporcionan un hábitat adecuado para los mosquitos.

Los humedales de HF se utilizan para el tratamiento secundario y terciario de aguas residuales domésticas, así como para una variedad de efluentes industriales. En el caso de los humedales de HF que tratan aguas residuales domésticas, el tratamiento primario se realiza

generalmente a través de una fosa séptica o un tanque Imhoff. Cuando se utilizan como tratamiento terciario, el tratamiento secundario a menudo se logra utilizando unidades de tratamiento biológico, como contactores biológicos giratorios o filtros percoladores. Además, se han utilizado combinaciones de HF con otros tipos de humedales (VF, FWS) en una variedad de sistemas híbridos.

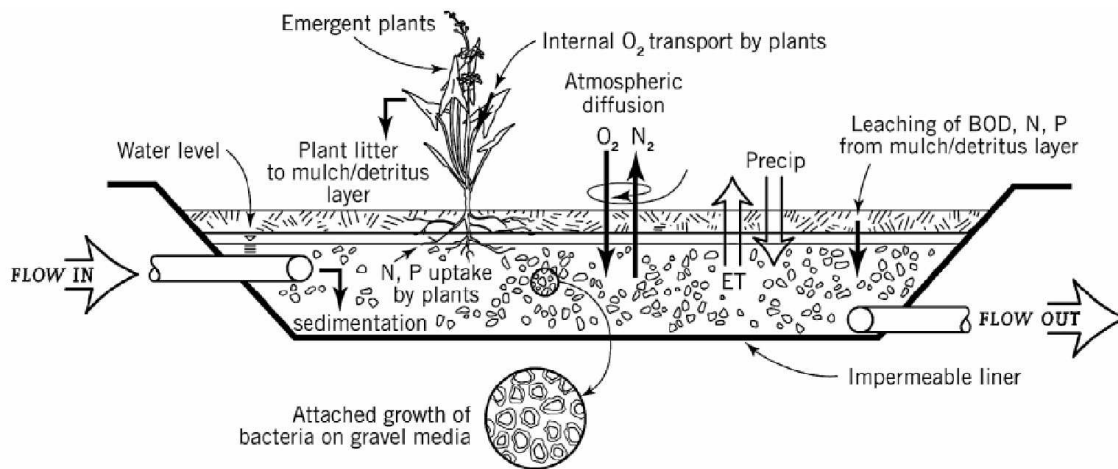


**Figura 1.3.** Esquema típico de un humedal de HF (Dotro et al., 2017)

Las vías de remoción microbiológica predominantes en los humedales de HF son anaeróbicas. Cuando se utilizan para el tratamiento secundario de aguas residuales domésticas, los HF son generalmente capaces de eliminar DBO y SST en una medida razonable. La eliminación de TN en los sistemas de HF está algo restringida debido a limitadas condiciones aeróbicas para la nitrificación. Sin embargo, los humedales HF pueden ser muy eficaces en la desnitrificación siempre que haya suficiente nitrato y carbono presentes en el agua. A largo plazo, el fósforo no se elimina de manera sostenible en los humedales de HF, a menos que se utilicen medios reactivos (Dotro et al., 2017)

El papel de las plantas en los humedales HF se relaciona principalmente con los procesos físicos, como proporcionar una mayor superficie para el crecimiento microbiano adherido a las raíces y para una mejor filtración de SST (**Figura 1.4**). En climas templados y fríos, la capa de hojarasca puede proporcionar un aislamiento térmico adicional durante el invierno. En el caso de los humedales HF que proporcionan tratamiento secundario de aguas residuales domésticas, la contribución de la absorción de las plantas a la eliminación de nutrientes es mínima. La transferencia de oxígeno mediada por las plantas ocurre, pero es mínima en

comparación con la demanda de oxígeno ejercida por la carga de aguas residuales (Dotro et al., 2017).



**Figura 1.4.** Procesos ecológicos principales en humedales de HF (Wallace & Knigth, 2006)

## Humedales verticales

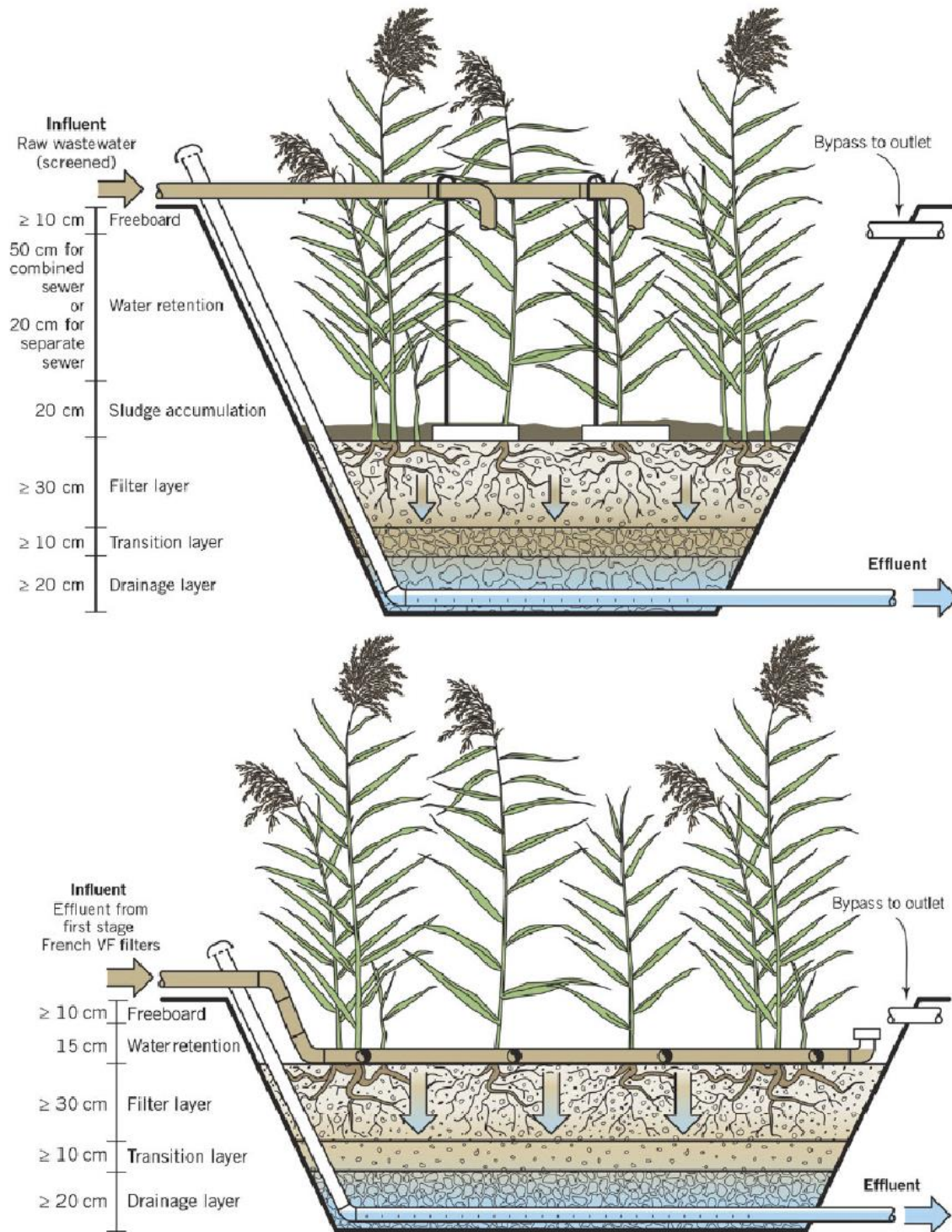
Los humedales de flujo vertical (VF, “*Vertical Flow*”) adquirieron un fuerte desarrollo en Europa en los años 90 en busca de alcanzar niveles más altos de transferencia de oxígeno, como respuesta a limitación de los humedales de HF para oxidar amoníaco. La **Figura 1.5** muestra un esquema de un humedal de VF de diseño francés. El lecho de arena y/o grava está plantado con helófitas y las aguas residuales se cargan de forma intermitente provocando una inundación momentánea que asegura la distribución homogénea sobre la superficie del filtro. En países con regulaciones legales que prohíben la dispersión de aguas residuales en superficie debido al contacto potencial con humanos (por ejemplo, EE. UU.), y en regiones con climas muy fríos, los sistemas de distribución de afluentes están aislados con una capa de grava o mantillo. El agua infiltra a través del sustrato y es colectada por una red de drenaje en la base. Entre cargas, el aire ingresa al sustrato poroso, transportando al lecho del filtro el oxígeno que sostiene los procesos microbianos aeróbicos. Todo el lecho está aislado del terreno circundante mediante una combinación de revestimiento de plástico y membrana geotextil.

En los humedales de VF también mejora el contacto de los contaminantes con la rizosfera. El sistema radicular de las plantas ocupa volumen de poro dentro del lecho del humedal y desarrolla un enraizamiento preferencial en la región superior del lecho granular. En humedales de HF, esta limitación de la pluma de raíces puede crear trayectorias preferenciales de flujo a través de la sección inferior del lecho de grava (Breen & Chick, 1995).

Debido a las condiciones aeróbicas en el lecho del filtro, los humedales VF con carga intermitente son extremadamente eficientes para el tratamiento secundario y terciario de las aguas residuales domésticas. Se utilizan también para tratar lixiviados de vertederos y aguas residuales de procesamiento de alimentos, que a menudo contienen altos niveles de nitrógeno amoniacal y/o carbono orgánico, así como otros productos agrícolas, etc.

Existe gran cantidad de variantes de diseño dentro de este tipo. Los humedales de diseño francés (**Figura 1.5**) cuentan con dos etapas de tratamiento que les permite tratar efluentes crudos sin tratamiento primario. Los diseñados para deshidratación de biosólidos se pueden considerar como un tipo de sistema de humedales de VF. También se pueden diseñar sistemas saturados, tanto con flujo descendente como ascendente. En estos últimos se establece un gradiente redox con condiciones anaeróbicas en profundidad y aeróbicas en superficie.

En este punto, resulta relevante señalar que, tanto la aplicación de helófitas como el desarrollo de humedales de HF y VF para el tratamiento de aguas contaminadas, fueron propuestas desarrolladas desde mediados de los años 50 por la Dra. Käthe Seidel. Investigadora de la estación limnológica del Bajo Rin en Krefeld (Limnologische Station Niederrhein), del Instituto Max Planck de Limnología con sede en Plön, desarrolló el denominado “Krefeld System”, un sistema híbrido que combinaba una etapa de humedal de VF (percolation Flow) con otra de HF (traslation Flow). Su trabajo pionero se difundió a varios países y fue base para desarrollos posteriores como el sistema francés (Boutin, 1987).



**Figura 1.5.** Esquema de humedal de VF de diseño francés de dos etapas, primera arriba, segunda abajo (Dotro et al., 2017)

## La remoción de nitrógeno y fósforo en humedales construidos

Los humedales construidos son una solución rentable basada en la naturaleza para el control de la contaminación del agua, con múltiples funciones ecológicas y beneficios

socioeconómicos, y pueden ser una alternativa confiable y sostenible para el tratamiento secundario y terciario de aguas residuales. Basado en datos de 335 CWs a escala de campo, los CWs híbridos (que utilizan dos o más tipos de humedales durante el tratamiento del agua) son los más efectivos para mejorar la calidad del agua y mitigar los gases de efecto invernadero, con medianas promedio del 76%, 63% y 72% para la remoción materia orgánica, nitrógeno y fósforo, respectivamente. Factores como las especies de plantas, la selección del sustrato, y las condiciones ambientales e hidráulicas afectan el rendimiento, con variaciones relacionadas principalmente con la temperatura, el tiempo de residencia hidráulica y las tasas de carga de contaminantes (Wu et al., 2023).

Los procesos de remoción de nutrientes que ocurren en humedales de tratamiento son complejos, diversos y específicos, de modo que se requieren condiciones particulares para cada uno. La remoción de N, por ejemplo, involucra una serie de transformaciones, en su mayoría mediadas por microbios, que permiten exportarlo en forma gaseosa desde el agua hacia la atmósfera, principalmente como gas dinitrógeno ( $N_2$ ). También las plantas absorben N del agua y lo incorporan a su biomasa, pudiendo ser exportado de este modo mediante cosecha de biomasa vegetal, aunque en menor proporción y con mayor esfuerzo que a través de las mencionadas rutas microbianas.

El nitrógeno en aguas residuales suele encontrarse en forma reducida (estado de oxidación  $-3$ ) formando parte de compuestos orgánicos y/o en forma de amoníaco. La degradación microbiana de compuestos orgánicos nitrogenados libera N amoniacal. Este proceso se denomina amonificación y puede ocurrir con o sin oxígeno disponible. Por su parte, el N amoniacal es oxidado a nitrito por bacterias y/o arqueas oxidadoras de amoníaco (AOB: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*; AOA: *Nitrososphaera*) proceso que requiere oxígeno y consume alcalinidad. El nitrito producido puede oxidarse a nitrato mediante acción de bacterias oxidadoras de nitrito (NOB: *Nitrobacter*, *Nitrosospira*), si hay oxígeno disponible. Caso contrario, nitrato y/o nitrito pueden reducirse a  $N_2O$  y  $N_2$  gaseosos, en presencia de materia orgánica biodegradable, o de iones reducidos del hierro o el azufre, mediante la acción de bacterias desnitrificantes que los oxidan utilizando el N oxidado como aceptor electrónico, en reemplazo de oxígeno.

Rutas microbianas alternativas fueron descubiertas posteriormente como “anammox”, oxidación anaeróbica de amoníaco que permite oxidar N amoniacal en ausencia de oxígeno, reduciendo nitrito y produciendo  $N_2$  (Strous et al., 1999), la oxidación anaeróbica desnitrificante de metano (DAMO) que produce nitrógeno y oxígeno molecular oxidando metano con este último (Ettwig et al., 2010), “feammox”, oxidación de amonio con Fe III como aceptor electrónico en

ausencia de oxígeno (Yang et al., 2012), y “commamox”, oxidación conjunta de amoníaco y nitrito por un solo microorganismo (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015).

Esta compleja serie de transformaciones constituye una parte importante del ciclo del N en la naturaleza y su ocurrencia e intensidad dependen de condiciones ambientales tales como el estado redox, la alcalinidad, la disponibilidad de materia orgánica, el pH y la temperatura. Las chances de remover N de manera eficiente en humedales de tratamiento dependerán entonces de la capacidad de establecer en ellos las condiciones ambientales que promuevan las transformaciones requeridas. Las especies de plantas helófitas utilizadas en estos sistemas están adaptadas a vivir en suelo inundado suministrando oxígeno a sus raíces mediante sistemas especializados de bombeo. Ello afecta el entorno radicular (rizósfera) elevando el potencial redox y favoreciendo, en consecuencia, los procesos oxidativos del ciclo. En tal sentido, distintas especies de helófitas podrían estimular con distinta intensidad tales procesos (Allen et al., 2002; Brix, 1997; Tanner, 2001). El pH y la reserva alcalina, por otra parte, afectan el mismo proceso al determinar la tasa de oxidación, que resulta máxima a pH ligeramente alcalino (Strauss et al., 2002).

Se ha documentado la remoción de fósforo en más de 250 humedales de flujo subsuperficial (FWS), con concentraciones de afluencia que varían ampliamente, desde menos de 20 µg/L hasta más de 100 mg/L. A medida que aumentan las concentraciones de entrada, también lo hace la eliminación de la carga de fósforo, que puede oscilar entre menos de 0,1 y más de 100 g/m<sup>2</sup>·año. Los procesos de remoción pueden ser tanto transitorios como sostenibles que, con períodos iniciales de adaptación, pueden extenderse por varios años.

La adsorción al sustrato proporciona una eliminación inicial de fósforo; sin embargo, este almacenamiento, aunque parcialmente reversible, termina por saturarse con el tiempo. La absorción por organismos, como bacterias, algas y macrófitos, también desempeña un papel crucial en las etapas iniciales de eliminación. No obstante, el ciclo natural de crecimiento, muerte y descomposición devuelve la mayor parte del fósforo absorbido al sistema, aunque una fracción significativa se incorpora a los sedimentos y suelos recién formados, contribuyendo así a la acumulación a largo plazo.

La estacionalidad tiene efectos limitados sobre la eficiencia de remoción, aunque en algunos casos el rendimiento disminuye en invierno en comparación con las estaciones más cálidas, por razones que aún no se comprenden del todo. La ausencia de vegetación reduce considerablemente la capacidad de eliminación, y el tipo de comunidad vegetal en los humedales FWS (emergente o sumergida) influye de manera significativa, aunque no en todos

los rangos de concentración. Estos humedales pueden mejorar la calidad del agua en los efluentes secundarios y terciarios, y tienen un potencial aún mayor para controlar los nutrientes provenientes de la escorrentía urbana y agrícola. Sin embargo, este beneficio debe contrastarse con la gran cantidad de tierra requerida para que un humedal FWS inmovilice eficazmente el fósforo. Aunque el fósforo no representa una amenaza tóxica directa en estos sistemas de tratamiento, su acumulación puede causar eutrofización, lo que podría limitar el cumplimiento de ciertos objetivos de biodiversidad en esos humedales (Kadlec & Wallace, 2009).

<b>Medio</b>	<b>Retención de P g P/kg de medio</b>	<b>pH del efluente</b>	<b>Comentarios</b>
<b><i>Natural</i></b>			
Arena	0,1	7,4	Humedal HF, escala completa
Apatita	14	7,0	Experimento en columna de 550 días
Conchilla de ostras (caliente)	120	8,3	Test en batch
Conchilla de ostras (quemadas)	830	12,6	Test en columna
Arena de conchillas	335	8,6	Humedal HF, 1 año
<b><i>Subproductos industriales</i></b>			
Ceniza de esquisto bituminoso	25-60	>12	Escala piloto y batch
Escorias de alto horno	1-2	>10	Experimento en batch a escala completo
Ceniza volante	100-400	9-11	Experimento en batch a escala completo
<b><i>Productos manufacturados</i></b>			
Filtralite P®	0,5-5	>10	Experimento en batch a escala completo
Ferrosop®	<14	7-8	Experimento en batch a escala completo
LECA®	<12	10-12	Experimento en batch a escala completo
Phosclean®	<14	8,5-11	

**Tabla 1.1.** Ejemplos de medios reactivos utilizados en humedales de tratamiento para la remoción de fósforo (Adaptada de Dotro et al., 2017)

Los medios reactivos se pueden utilizar en humedales de flujo subsuperficial en lugar de arena y/o grava para mejorar la eliminación de fósforo o proporcionar un secuestro temporal de amoníaco. La eliminación de fósforo en los humedales HF y VF para el tratamiento secundario de aguas residuales domésticas se basa principalmente en la adsorción, la precipitación y la cristalización en materiales ricos en Ca, Fe y Al. Los medios reactivos para mejorar la eliminación de fósforo incluyen productos naturales, subproductos industriales y productos

manufacturados. La **Tabla 1.1** muestra algunos de los medios reactivos utilizados para la retención de fósforo (Vohla et al., 2011). Una de las principales desventajas del uso de medios reactivos es que la mayoría aumenta significativamente el pH del efluente como contrapartida a la eliminación de fósforo. Si bien hay productos disponibles comercialmente para mejorar la eliminación de fósforo que se han utilizado en humedales, se recomiendan los materiales disponibles localmente sobre otros materiales siempre que sea posible.

En general, los materiales a base de calcio se utilizan ampliamente porque los iones de calcio pueden formar productos estables e insolubles con fosfato. A bajas concentraciones de fósforo, la adsorción es el proceso de remoción dominante mientras que, a altas concentraciones de fósforo, se produce precipitación. Los precipitados reducen el volumen de poros del filtro y, a largo plazo, pueden provocar una reducción del rendimiento hidráulico y fallas debidas a la obstrucción. Una vez que se alcanza la capacidad finita de adsorción del material del filtro, las concentraciones de fósforo en el efluente comienzan a aumentar y se debe cambiar el material.

Dado que el fósforo es un recurso limitado, se prefieren materiales filtrantes a partir de los cuales el fósforo pueda utilizarse como fertilizante en la agricultura. Sin embargo, la elevada capacidad de remoción asociada a alta adsorción podría resultar contradictoria con la alta disponibilidad de fósforo que se demanda de un fertilizante de modo que es un aspecto que aún debe ser investigado (Dotro et al., 2017).

## Objetivos de la tesis

El **objetivo general** del presente trabajo de tesis doctoral es investigar el efecto de materiales de relleno accesibles y de especies vegetales nativas sobre la remoción simultánea de nitrógeno y fósforo en humedales de tratamiento.

En particular, los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar la **eficiencia de distintos sistemas de humedales construidos en la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo)** y materia orgánica de aguas residuales bajo diversas condiciones experimentales, tanto en escenarios controlados (**mesocosmos**) como en sistemas aplicados a **escala real**.
2. Investigar el **efecto combinado de diferentes sustratos y especies vegetales sobre la remoción de nutrientes**, considerando las posibles interacciones entre las condiciones fisicoquímicas del sistema, la estructura y composición del sustrato y los rasgos funcionales de las plantas.
3. Comparar la eficiencia de tratamiento de un **sistema real de pequeña escala** diseñado para contextos rurales con modelos experimentales en condiciones controladas, para identificar oportunidades de mejora y escalabilidad de los resultados.

Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos a escala de mesocosmos y un monitoreo de rendimiento de un sistema de pequeña escala. Los mesocosmos se dejaron madurar con el objeto de experimentar bajo condiciones representativas de desarrollo de la rizósfera, de los procesos de adsorción y precipitación de fósforo y de la interacción entre esos factores.

A partir de los objetivos enunciados se proponen las siguientes hipótesis:

- **Los humedales construidos son sistemas eficaces para la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo), materia orgánica y coliformes fecales presentes aguas residuales, tanto en condiciones controladas como en contextos reales de aplicación.**

Se espera que estos sistemas logren eficiencias significativas en la eliminación de contaminantes.

- **La eficiencia de remoción de nutrientes depende de la interacción entre el tipo de sustrato y la especie vegetal utilizada, existiendo combinaciones específicas que maximizan los procesos de adsorción, nitrificación y desnitrificación.**

Se espera que, en ciertos sustratos como conchilla, en combinación con especies vegetales específicas, se potencien los procesos de transformación de nutrientes en comparación con otras combinaciones.

- **Ciertas condiciones fisicoquímicas del sistema, tales como pH, potencial de oxidación-reducción (ORP) y materia orgánica disuelta, influyen significativamente en la eficiencia de remoción de nutrientes en los humedales construidos.**

Estos factores afectarían tanto la actividad microbiana como los procesos de adsorción y precipitación de fósforo, siendo determinantes en la efectividad general del sistema.

- **Los sistemas de tratamiento a escala real alcanzan eficiencias comparables a las observadas en condiciones controladas cuando se construyen siguiendo las recomendaciones de diseño de carga hidráulica y orgánica.**

Se espera que los sistemas de tratamiento a escala real sean capaces de cumplir con las normativas de descarga de efluentes en cuerpos de agua superficial.

## CAPÍTULO 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallarán las metodologías comunes a todos los experimentos expuestos en los capítulos siguientes.

Los diseños particulares y otras técnicas propias de cada experimento se detallarán en sus capítulos correspondientes.

### RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La toma de muestras y su conservación para la determinación de los parámetros analizados se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del apartado 1060 Toma de Muestras y Conservación del Standard Methods (APHA, 2017).

Las especificaciones de toma de muestras, preservación y almacenamiento para las distintas variables físicas y químicas se muestran en la **Tabla 2.1**.

Determinación	Recipiente	mL de muestra	Preservación	Almacenamiento máximo
Alcalinidad	Plástico	200	Frío, <6 °C	24 h
DBO5	Plástico	1000	frío, <6 °C	48 h
DQO	Plástico	100	frío, <6 °C / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH <2	24 h / 7 d
Color	Plástico	500	Frío, <6 °C	24 h
Conductividad	Plástico	500	Frío, <6 °C	28 d
Amoníaco	Plástico	500	filtrar; frío, <6 °C/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH <2	24h / 7 d
Nitrato	Plástico	100	filtrar; Frío, <6 °C	48 hs
Nitrito	Plástico	100	filtrar; frío, <6 °C	24 hs
Fosfato	Vidrio*	100	filtrar de inmediato; frío, <6 °C	48 h
Fósforo total	Plástico	100	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH <2; frío, <6 °C	28 d
Turbidez	Plástico	100	A oscuras, frío, <6 °C	24 hs

\* Enjuagado con 1+1 HNO<sub>3</sub>

**Tabla 2.1.** Recipientes utilizados para la colecta de muestras de las distintas variables físicas y químicas durante la tesis, incluyendo su volumen, preservación y tiempo de almacenamiento máximo.

## TÉCNICAS Y MÉTODOS ANALÍTICOS

Para las mediciones realizadas con equipamiento electrónico portátil se siguieron estrictamente las recomendaciones del fabricante de cada instrumento. A continuación, se detallan los equipos utilizados y las referencias bibliográficas de las técnicas que refieren los fabricantes:

- **Temperatura:** Termómetro digital SMWW 2550. Temperature (APHA, 2017).
- **pH:** EC10 Portable pH/mV/Temperature Meter, Model 50050. SMWW 4500-H<sup>+</sup>pH Value (APHA, 2017).
- **Conductividad eléctrica / Sólidos disueltos totales (TDS):** M90 Portable Microprocessor. SMWW 2510 Conductivity (APHA, 2017)
- **Potencial de Oxidación-Reducción:** pH-207 pH Meter. Electrodo ORP Ag/AgCl Sealed #5739602 utilizado para muestras de agua. Redox Potencial Probes Paleo Terra, utilizado para mediciones en el relleno de los mesocosmos. SMWW 2580 Oxidation-Reduction Potential (ORP) (APHA, 2017)
- **Oxígeno Disuelto:** YSI Model 52, Dissolved Oxygen Meter, Probe Model 5905 utilizada para muestras de agua. Classic BOD Probe, utilizada para la prueba de DBO. SMWW 4500-O Oxygen (Dissolved) (APHA, 2017)
- **Turbidez:** Turbidity Portable Meter HI98703-02. Adaptación del Método 180.1 de USEPA y del Método Nefelométrico SMWW 2130 B (APHA, 2017)
- **Color:** Color of water HI727 Checker<sup>®</sup>HC. Adaptación del Método Colorimétrico de Platino Cobalto SMWW 2120 B (APHA, 2017)

## DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

La prueba de DQO consiste en medir la cantidad de un oxidante fuerte que se consume en medio ácido a 150 °C para oxidar las sustancias oxidables que contiene un volumen conocido de muestra. El consumo de oxidante es proporcional a la oxidación de materia orgánica de la muestra. El resultado de la prueba es un indicador aproximado del contenido de materia orgánica de la muestra.

Se utilizó la técnica colorimétrica de reflujo cerrado SMWW 5220 D (APHA, 2017) que utiliza dicromato de potasio y ácido sulfúrico en presencia de sulfato de plata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) como catalizador y añadiendo sulfato mercuríco ( $\text{HgSO}_4$ ) para eliminar las interferencias de los cloruros.

### *Equipamiento*

- ECO-10 Thermoreactor VELP COD Analysis
- Filter Photometer Nanocolor 500 D Macherey & Nagel

### *Reactivos*

- Nanocolor Tube Test DQO 160 (Test 0-26) y DQO 1500 (test 0-29) de Macherey & Nagel.

### *Procedimiento*

Las muestras se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La digestión se llevó a cabo en el termorreactor a 148 °C y los tubos se leyeron directamente en el fotómetro MN.

## DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO)

SMWW 5210 B, APHA, 2017

La prueba de DBO consiste en medir el oxígeno que consume una comunidad bacteriana al digerir enzimáticamente los compuestos biodegradables contenidos en un volumen conocido de una muestra de agua. En el proceso, los microorganismos oxidan compuestos de carbono (DBO carbonácea) y de nitrógeno, básicamente amonio (DBO nitrogenada). Para que el resultado de la prueba sea un indicador del contenido de materia orgánica biodegradable de la muestra, se agrega al ensayo un inhibidor de la nitrificación.

Para medir la DBO se utilizaron botellas llenas con agua de dilución saturada de oxígeno, se hicieron diluciones de la muestra y se midió el oxígeno disuelto inicial. Luego se incubaron a 20 °C, en oscuridad, durante 5 días y se midió la concentración final de oxígeno. A partir del consumo de oxígeno (diferencia entre la concentración oxígeno final e inicial) y de la dilución de la muestra se estimó la DBO<sub>5</sub>.

### *Equipamiento*

- Incubadora frío-calor capaz de regular a 20 °C ±0,5. Ingelab I-316D
- Botellas de DBO de 300 mL con cuello y tapón de vidrio esmerilado.
- Medidor de oxígeno disuelto: YSI Model 52 Dissolved Oxygen Meter con sonda para DBO Model 5905 Classic BOD Probe

### Reactivos

- El agua de dilución se preparó con agua de grado reactivo, con alícuotas de soluciones de buffer de fosfato (fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ).
- Como semilla se utilizó efluente del clarificador de un proceso de lodos activados, previo a la cloración.
- Como inhibidor de la nitrificación se utilizó una solución de N-Aliltiurea ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$ ) 0,2%.

## AMONÍACO

### MÉTODO AZUL DE INDOFENOL (IPB)

(Solórzano, 1969; rev Pai et al., 2001)

El amoníaco reacciona con el hipoclorito de sodio y el fenol para formar un compuesto de color azul intenso, el indofenol. La reacción es catalizada por nitroprusiato de sodio. La presencia de citrato de sodio compleja los iones de calcio y magnesio que, al pH de la reacción, pueden producir precipitados que interfieran la lectura.

Con el objeto de minimizar la generación de residuos se redujo el volumen de muestra y estándares a 5 mL y los volúmenes de reactivos en forma proporcional. Las soluciones de reactivos se prepararon de forma que agregando 0,2 mL de cada uno se obtuviera la concentración final adecuada en el tubo de reacción.

### Equipamiento

- Filter Photometer Nanocolor 500 D Macherey & Nagel o
- Espectrofotómetro UV-VIS Metrolab modelo M-1700.

### Reactivos

- *Solución estándar de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 100 mg N L<sup>-1</sup>.*
- *Solución de trabajo de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 3,5 mg N L<sup>-1</sup> (250 uM)*

La preparación de los reactivos R1 y R3 se realiza a partir de los reactivos A y B del kit UREA 1810058 de Wiener Lab.

- *Fenol (R1)*: Se disolvió el contenido del reactivo A del kit UREA con 225 mL de agua grado reactivo libre de amoníaco. La solución resultante alcanzó entonces una composición de fenol 100 g/L (1,064 M) y sodio nitroprusiato 0,51 g/L (1,70 mM)
- *Citrato (R2)*: Se disolvieron 50 g de citrato trisódico en 100 ml de agua calidad reactivo libre de amoníaco (1,70 M).
- *Sodio Hipoclorito alcalino (R3)*: Se mezclaron el reactivo B del kit UREA y solución de hipoclorito en partes iguales.
  - *Reactivo B*: Se diluyó el contenido del reactivo B concentrado del kit UREA en 74 mL de agua calidad reactivo libre de amoníaco.
  - *Solución hipoclorito*: Se mezclaron 21 mL de una solución comercial de  $25 \text{ g Cl}^-$  con 4 mL de agua calidad reactivo libre de amoníaco. Concentración resultante  $21 \text{ g Cl}^-$  (0,59 M)
- *Reactivo de sodio nitroprusiato (R4)*: 0,46 g de sodio nitroprusiato en 100 ml de agua calidad reactivo libre de amoníaco.

#### *Procedimiento*

A 5 mL de muestras, blancos y patrones se agregaron 0,2 mL de R1, 0,4 mL de los reactivos R2 y R3 mezclados previamente en partes iguales y 0,2 mL de R5. Bajo tales condiciones, se alcanzan las concentraciones finales prescriptas para el sistema de reacción (Fenol: 36 mM; Hipoclorito 12 mM; Nitroprusiato 0,57 mM) y se ajustan las concentraciones modificadas (Pai, et al 2001) de citrato (57 mM) e hidróxido (31mM). El pH final de la reacción debe ser  $10,5 \pm 0,1$ .

Luego de 2 hs a temperatura ambiente se completa la reacción y el color permanece estable por 24 h. Se leyó la absorbancia en celda de 1 cm a 640 nm en espectrofotómetro.

## NITRITO

### **DETERMINACIÓN POR DIAZOTACIÓN CON SULFANILAMIDA**

(Bendschneider and Robinson, 1952)

El nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) reacciona con sulfanilamida diazotizada y dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED) a pH 2.0 a 2.5, para formar un colorante azoico de color púrpura rojizo. La reacción de color es lineal hasta 180  $\mu\text{g N/L}$  con una trayectoria de luz de 1 cm a 543 nm. Concentraciones más altas de  $\text{NO}_2^-$  pueden determinarse diluyendo la muestra (APHA et al., 2017).

### *Equipamiento*

- Filter Photometer Nanocolor 500 D Macherey & Nagel o
- Espectrofotómetro UV-VIS Metrolab modelo M-1700.

### *Reactivos*

- Solución madre de nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ):  $100 \text{ mg N L}^{-1}$ .
- Solución intermedia:  $10 \text{ mg N L}^{-1}$ .
- Solución de trabajo:  $700 \text{ ug N L}^{-1}$  ( $50 \text{ uM}$ ).
- R1: Se disolvió 1 gramo de Sulfanilamida en 100 ml de ácido clorhídrico 1,2 N.
- R2: Se disolvió 0,1 gramo de N-(1-naftil) etilendiamina dihidrocloridrato en 100 ml de agua calidad reactivo.

### *Procedimiento*

Con el objeto de minimizar la generación de residuos se redujo el volumen de muestra y estándares a 5 mL y los volúmenes de reactivos en forma proporcional.

A 5 mL de muestras, blancos y patrones se agregaron 0,1 mL de R1 y 0,1 mL de R2, mezclando bien cada vez.

Luego de 10 minutos a temperatura ambiente se completa la reacción y el color permanece estable por 2 h. Se leyó la absorbancia en celda de 1 cm dentro de ese lapso a 543 nm en espectrofotómetro.

## NITRATO

### **MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE NITRATO Y NITRITO CON V(III)**

(Doane and Horwáth, 2003; Miranda et al., 2001; Pai et al., 2001)

El nitrato se puede determinar por la misma reacción que el nitrito, previa reducción de nitrato a nitrito. El procedimiento de reducción más ampliamente adoptado consiste en permitir que la muestra pase a través de una columna de cadmio recubierta de cobre. Además de las preocupaciones sobre su toxicidad, la preparación y optimización de una columna de reducción Cd-Cu lleva mucho tiempo y la eficiencia de reducción pueden sufrir de inconsistencia por varias razones. El reacondicionamiento frecuente de la columna de Cd-Cu es inevitable y tedioso.

Se ha desarrollado un método espectrofotométrico exacto, preciso, simple y eficiente para la determinación de concentraciones de nitrato en aguas naturales mediante el uso de reactivos premezclados de vanadio y Griess. Las muestras a las que se añaden los reactivos premezclados se calientan gradualmente en un baño de agua a 50 °C durante 25 a 30 minutos, seguido de un paso de enfriamiento rápido para fijar el rendimiento final.

#### *Equipamiento*

- Filter Photometer Nanocolor 500 D Macherey & Nagel o
- Espectrofotómetro UV-VIS Metrolab modelo M-1700.

#### *Reactivos*

- *Solución SUL [6% (p/v)]:* Compuesta de 6 g de sulfanilamida disueltos en 100 mL de HCl 1,2 N,
- *Solución NED [0,3% (p/v)]:* Compuesta de 0,15 g de diclorhidrato de naftiletilenediamina N-1 disuelto en 50 mL de agua destilada, y
- *Solución VCl<sub>3</sub> [3,2% (p/v)]:* Compuesta de 0,8 g de cloruro de vanadio (Merck, 1.12393) disuelto en 25 mL de HCl 1,2 N.

#### *Procedimiento*

Se prepararon 100 mL de reactivo premezclado mezclando alícuotas de 50 mL de la solución SUL, 25 mL de la solución NED y 25 mL de la solución VCl<sub>3</sub>.

Para muestras con concentraciones de nitratos entre 0 y 50 µM: En un tubo de ensayo seco se añadieron 1 mL de muestras, blancos y patrones, 1 mL de reactivo de premezcla y 3 mL de agua grado reactivo. El líquido en el tubo de ensayo fue homogeneizado con un vortex. Todos los tubos de muestra se colocaron luego en una gradilla y se sumergieron en un baño de agua termostatizada a 50 °C durante 25-30 min. A continuación, la grilla se transfirió a un baño de enfriamiento durante unos minutos (o a una suspensión helada durante 1 min) para disminuir la temperatura a <30 °C. Inmediatamente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 543 nm con una cubeta de 1 cm.

## MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAVIOLETA DE SEGUNDA DERIVACIÓN

SMWW 4500-NO<sub>3</sub>- C, (APHA, 2017)

El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorbe fuertemente la luz ultravioleta. La materia orgánica natural (MON) y otros solutos también absorben la luz ultravioleta. Los espectros de la MON de diferentes fuentes de agua suelen ser diferentes, por lo que, si el agua a analizar contiene MON, el procedimiento de detección de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> UV 4500- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. B, APHA 2017 no dará resultados fiables. El espectro UV del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> es bastante diferente al del NOM.

El cálculo de la segunda derivada de un espectro de muestra elimina efectivamente la contribución NOM de fondo.

### *Equipamiento*

- Shimadzu UV-1280 Multipurpose UV-Visible Spectrophotometer.
- Cubeta de cuarzo de 1 cm.

### *Reactivos utilizados*

- Solución de stock de nitrato: 100 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>.
- Solución de trabajo: 14 mg N L<sup>-1</sup> (200 µM).

### *Procedimiento*

Primero se llenó la cubeta con agua grado reactivo para establecer la línea de base del espectro. Luego se llenó la cubeta con muestras o patrones. Se diluyó la muestra cuando fue necesario para mantener las lecturas dentro del rango de los patrones. Se leyó la absorbancia entre 250 y 200 nm y se procesó el espectro resultante para calcular la segunda derivada. Finalmente se registró el valor del pico de absorbancia máxima entre de 230 y 220 nm.

## FOSFATO

### DETERMINACIÓN POR EL MÉTODO DEL AZUL DE MOLIBDENO (MB)

(Murphy and Riley, 1962; Nagul et al., 2015)

El fosfato soluble u ortofosfato reacciona con el molibdato de amonio y el tartrato de potasio y antimonio en medio ácido para formar ácido fosfomolibdico, que se reduce a azul de molibdeno de color tenso por ácido ascórbico.

### *Equipamiento*

- Espectrofotómetro UV-VIS Metrolab modelo M-1700 o
- Shimadzu UV-1280 Multipurpose UV-Visible Spectrophotometer.

### *Reactivos utilizados*

- Solución stock de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 100.0 mg P L<sup>-1</sup>.
- Solución de trabajo: 6,2 mg P L<sup>-1</sup> (200 uM).
- Reactivo A: 5 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado + 0,030 g de tartrato de potasio y antimonio  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  + 0,750 g de molibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se llevó a 100 mL con agua calidad reactivo.
- Reactivo B: 5,40 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua grado reactivo.
- Reactivo combinado: Se mezclaron 4 partes de reactivo A con 1 partes de reactivo B. El reactivo es estable por 4 h

### *Procedimiento*

Si el pH de la muestra es >8,0 se neutraliza con una solución 5N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gota a gota.

Con el objeto de minimizar la generación de residuos se redujo el volumen de muestra y estándares a 5 mL y los volúmenes de reactivos en forma proporcional de forma que agregando 0,8 mL de reactivo combinado se obtiene la concentración final adecuada en el tubo de reacción.

Luego de 10 minutos la reacción se completa a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 880 nm en celda de 1 cm, antes de los 30 minutos.

## NITRÓGENO TOTAL Y FÓSFORO TOTAL

### **MÉTODO PERSULFATO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE NITRÓGENO TOTAL Y FÓSFORO TOTAL**

(APHA, 2017; Crumpton et al., 1992)

La oxidación de los compuestos nitrogenados para determinar el nitrógeno total debe producirse en un medio alcalino. Por el contrario, la oxidación de los compuestos de fósforo para determinar el fósforo total debe producirse en condiciones ácidas.

En el método del persulfato, durante la etapa inicial de la digestión, la muestra es alcalina (pH>12). En la etapa final se consume el hidróxido de sodio lo que hace que el pH de la

muestra se vuelva ácido ( $\text{pH} < 2$ ). Por esta razón el método permite la oxidación de todos los compuestos de nitrógeno que pasan a nitratos y los de fósforo que pasan a ortofosfato. En la muestra así digerida se analiza nitrato y ortofosfato, que se interpretan como nitrógeno total y fósforo total.

#### *Equipamiento*

- ECO-10 Thermoreactor VELD COD Analysis
- Tubos de vidrio de 13 mm de diámetro y 100 mm-largos con tapas herméticas.

#### *Reactivos*

- Agua grado reactivo de alta calidad, libre de compuestos de fósforo y nitrógeno.
- Solución patrón de nitrógeno y fósforo ( $14,0 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  y  $3,1 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ ; 1000 y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente).
- Solución de hidróxido de sodio, 3N: 120 g de NaOH en 1000 mL de agua grado reactivo.
- Reactivo oxidante: 64 g de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), en 500 ml de agua desionizada + 80 mL de solución de NaOH 3N, diluir a 1000 mL.

#### *Procedimiento*

Cuando fue necesario, las muestras se diluyeron con agua grado reactivo antes de la digestión para que las concentraciones esperadas de nitrógeno y fósforo se encuentren dentro del rango de la curva de calibración.

Digestión: A 6,0 mL de muestras, blancos y estándares se añadieron 1,25 ml de reactivo oxidante. Los tubos se cerraron herméticamente y se colocaron en la placa calefactora para su digestión durante 60 min a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Al finalizar se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente.

Luego se determinó nitrógeno como nitrato mediante el método espectrofotométrico de segunda derivada y fosfato mediante el método de azul de molibdeno.

## SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES

### **SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES SECADOS A $103 - 105 \text{ }^\circ\text{C}$ SMWW 2540 D (APHA et al., 2017)**

Se filtran muestras bien mezcladas a través de un filtro de fibra de vidrio estándar pesado previamente y, a continuación, se secan los filtros con el residuo retenido en él en un horno a  $103 - 105 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante.

#### *Equipamiento*

- Shimatzu Analytical Balance AUW220D

Horno con termostato 30 a 150 °C

- Filtros de fibra de vidrio tipo Whatman grado 934 AH diámetro 47 mm
- Aparato de filtración para filtros de diámetro 47 mm
- Bomba de vacío

Se pesaron filtros previamente secados. Se colocaron en el aparato de filtración y se filtraron las muestras. Se ajustó el volumen de muestra para que dejara un residuo de 2,5 a 200 mg. Luego se colocaron en placas y se secaron a 105 °C hasta peso constante. Se calculó el residuo restando el peso del filtro al peso total y se expresó como mg de SST por litro.

## BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN FECAL

### **TÉCNICA DE FERMENTACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES ESTÁNDAR PARA COLIFORMES TOTALES Y FECALES, SMWW 9221 B, C y E (APHA et al., 2017)**

La técnica consta de tres fases: presuntiva, confirmada y completa. Para la fase presuntiva se utilizó caldo Lauryl Triptosa en tubos provistos de viales invertidos (tubos Durham). Se sembró con 1 mL de diluciones decimales seriadas de las muestras, seleccionadas de manera tal que se observe extinción de crecimiento por dilución, es decir, que todos los tubos resulten positivos en las diluciones más bajas y se incrementen progresivamente los tubos negativos hacia las diluciones más altas. La producción de gas en los viales dentro de las 48 hs de incubación a 35 °C constituye una reacción positiva presunta. Para determinar la densidad de bacterias por 100 mL de muestra, se sembraron tres réplicas de 3 o 5 diluciones. Los tubos presuntivos positivos fueron entonces inoculados, en tubos con viales invertidos y caldo EC o caldo lactosa bilis verde brillante (BGLB), en ese orden. Este último es la prueba confirmatoria para bacterias coliformes y se interpreta positivo por la presencia de gas en el vial dentro de las 48 hs de incubación a 35 °C. El caldo EC confirma la presencia de coliformes termotolerantes (fecales) y se considera prueba completa para coliformes. Luego de una incubación a  $44,5 \pm 0,2$  °C por 24 hs se consideraron positivos los tubos con crecimiento y presencia de gas en el vial.

## CAPÍTULO 3

# REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN MESOCOSMOS MADUROS DE HUMEDALES DE FLUJO ASCENDENTE

### Introducción y objetivos

En el diseño de los humedales construidos, una de las variables más importantes es el patrón de flujo de agua. Los humedales más sencillos son de flujo superficial, esto es, con agua circulando libre entre la vegetación. En cambio, en los humedales de flujo subsuperficial con plantas arraigadas a un relleno poroso, el agua debe circular a través de una matriz colonizada por raíces. Los primeros diseños de este tipo tuvieron un patrón de flujo horizontal. En los últimos años se desarrollaron experiencias con flujo vertical, principalmente descendente. La eficacia de estos sistemas ha resultado muy variable, en particular, en lo que a remoción de nutrientes se refiere (Verhoeven y Meuleman, 1999). La composición del material de relleno y las especies vegetales utilizadas son variables importantes que afectan el rendimiento.

En los humedales construidos, como en otros ecosistemas, la remoción de nitrógeno ocurre mayoritariamente a través de dos procesos microbianos, la oxidación aeróbica del amoníaco a nitrito y nitrato (nitrificación) y la reducción anaeróbica de éstos a nitrógeno molecular (desnitrificación). La incorporación de nitrógeno por parte de las plantas sólo puede explicar bajas tasas de remoción (Brix, 1997; Wetzel, 2001). La remoción de fósforo, por otra parte, depende principalmente de procesos de adsorción, precipitación y acreción, y no tanto de los procesos metabólicos.

La primera etapa de la remoción de nitrógeno, la oxidación de amoníaco, normalmente se encuentra limitada por déficit de oxígeno en humedales construidos que funcionan con sustrato saturado. La principal vía de suministro del oxígeno bajo tales condiciones es el aporte que las especies vegetales hacen mediante la pérdida radial de oxígeno (ROL, Radial Oxygen Loss) de sus raíces. Ese oxígeno liberado es un bien escaso sometido a diversas demandas además de la nitrificación. La posterior reducción de los nitritos y nitratos no encuentra

dificultades en ese ambiente que mayormente es anaerobio y con suficiente carbono orgánico para impulsar la desnitrificación.

Entre los materiales porosos con capacidad para la retención de fósforo (ver **Tabla 1.1**) se utilizan *LECA* (“*Lightweight Expanded Clay Aggregate*”, Arlita o Ripiolita en el mercado local) (Brix et al., 2001; Johansson, 1997; Mlih et al., 2020; Nocetti et al., 2020) y “Shellsands”, esto es, material de depósitos de conchillas de moluscos de origen marino (Ádám et al., 2007; Johansson Westholm, 2006; Roseth, 2000; Søvik y Kløve, 2005).

El **objetivo general** de este capítulo fue investigar la remoción de nutrientes (N y P) de un agua residual sintética de baja carga orgánica que simula un efluente secundario, en mesocosmos de flujo vertical ascendente. Particularmente, se evaluó el rendimiento de las diferentes combinaciones entre dos sustratos, conchilla y LECA, y cinco plantas helófitas: dos especies endémicas, *Zizaniopsis bonariensis* (Balansa & Poitr.) Speg. (Espadaña) y *Scirpus giganteus* Kunth (Paja brava), actualmente sinónimo de *Cyperus byssaceus* Pereira-Silva, una especie americana, *Schoenoplectus californicus* (C.A.Mey.) Soják (Junco), y dos especies cosmopolitas, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (Carrizo) y *Typha latifolia* L. (Totora)

Complementariamente, se investigaron las variaciones de algunos parámetros fisicoquímicos con el objeto de establecer relaciones entre las condiciones ambientales y la remoción de los nutrientes.

Se estableció como hipótesis que las helófitas incrementarán la remoción de nutrientes y de materia orgánica en comparación con los mesocosmos sin plantas, y que ese efecto será mayor en los mesocosmos con sustrato de conchilla.

Esta hipótesis se fundamenta en que:

- La tasa de oxidación de amoníaco estará determinada por el suministro de oxígeno a través de la ROL en tratamientos con distintas especies vegetales mientras que estará ausente en mesocosmos sin plantas.
- La tasa de remoción de nitrógeno mediante procesos de reducción de nitrito y/o nitrato estará determinada por las condiciones reductoras establecidas por las distintas especies vegetales.
- La tasa de oxidación de amoníaco puede verse limitada en condiciones ácidas. En tal caso, los materiales de relleno utilizados pueden ofrecer distinta capacidad de neutralización.

- La capacidad diferencial de LECA y Conchilla para adsorber y/o favorecer la precipitación química de fósforo determinará diferencias en su tasa de remoción.

## Materiales y métodos

### Configuración de los mesocosmos y diseño experimental

El diagrama del diseño experimental se muestra en la **Figura 3.1**, y fotografías de este en la **Figura 3.2**. Se emplearon 36 mesocosmos contruidos con caños y tapas de PVC de 20 cm de diámetro, la mitad de los cuales fueron rellenos con conchilla lavada (explotación de cordones conchiles holocenos Domingo Gonzalez y Cía SA, Castelli, PBA), y el resto con LECA 4 – 10 mm. Ambos materiales fueron clasificados a través de dos tamices metálicos: el primero con malla soldada de 10 x 10 mm de paso, el siguiente con malla mosquitero 14 x 14 (retícula de 1,8 x 1,8 mm aproximadamente).

Los caños se cortaron en tramos de 70 cm de longitud y luego se tapó un extremo con una tapa de PVC que oficiaría de fondo del mesocosmos. Antes de pegarlas, las tapas fueron perforadas en su centro, para colocar una pieza tanque de ½ pulgada de diámetro y, del lado interno, conectada una pieza T con dos codos con las aberturas orientadas hacia el fondo. En el otro extremo del caño, a 10 cm del borde (60 cm del fondo) se realizó otra perforación sobre la pared del caño, en la cual se ajustaron dos piezas, una rosca con tuerca y una doble espiga con rosca hembra, ambas de ½ pulgada de diámetro. Sobre el lado opuesto del caño se realizaron 3 perforaciones más, en línea y del mismo diámetro, a 40, 30 y 15 cm del fondo, en los que se ajustaron sendos tapones de goma atravesados por un tramo de manguera rígida de PEBD de ¼ pulgada de diámetro, con 10 cm de largo hacia el lado interno del caño y 5 cm del lado externo. A este extremo se conectó un tramo de 5 cm de manguera de silicona que funcionó como tapón al mantenerse plegada ajustada por broche metálico. Finalmente, en el lado externo de la pieza tanque del fondo, se conectó un codo seguido por un niple de 15 cm y una pieza T. En la derivación a 90 ° de esta última, orientada hacia arriba, se enroscó un caño de PP de ½ pulgada de diámetro y de 1 m de longitud que quedó paralelo al caño de PVC. El orificio restante de la T se selló con un tapón. Por último, los mesocosmos fueron envueltos con papel aluminio para impedir la filtración de luz a través de la pared del caño.

Los mesocosmos fueron dispuestos en posición vertical, en estructuras “tipo gradilla” contruidas con madera. En cada una se colocaron 5 mesocosmos separados entre sí unos 30 cm y se llenaron con conchilla o LECA hasta 50 cm. En ocho de estas gradillas se ubicaron los 36 mesocosmos dentro de un invernáculo de 6 x 4 m.

Mesocosmos de ambos sustratos fueron plantados, de modo monoespecífico y por triplicado, con las siguientes especies vegetales: *P. australis*, *S. californicus*, *S. giganteus*, *T. latifolia* y *Z. bonariensis*. Se dejaron tres unidades de cada sustrato sin plantas, como control.

Los mesocosmos fueron alimentados a través de un sistema de conducción ramificado construido con caños de PEBD de ½ pulgada de diámetro al que se conectaron mangueras de alimentación de PEBD de ¼ pulgada de diámetro.

En cada mesocosmos el agua residual se dosificaba en la parte superior del caño lateral paralelo, ingresaba por el fondo, atravesaba el relleno con un flujo vertical ascendente, y salía por la superficie del relleno dejando una capa de 10 cm de agua libre hasta alcanzar la salida a 60 cm del fondo.

En un tanque de alimentación de 200 L de HDPE se colocó una bomba sumergible (Kushiro Gs400 ½ HP China), controlada por un ciclador (PYSEL® Productos Eléctricos, Berazategui, Argentina) programado para enviar 12 pulsos por hora de 0,5 minutos cada uno, separados por intervalos de 4,5 minutos. Los caudales de ingreso a cada mesocosmos se equipararon variando la altura de descarga de las mangueras de alimentación. La salida de cada mesocosmos se conectó a una red de drenaje que descargaba el agua tratada fuera del invernáculo.

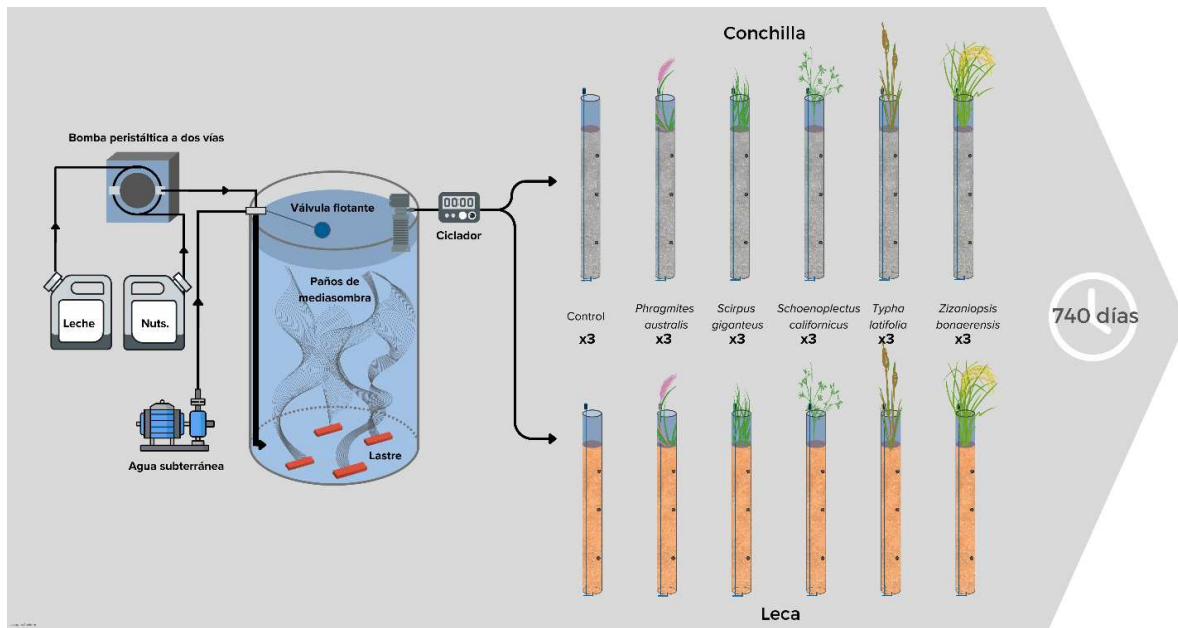
El tanque de alimentación fue operado a nivel constante (180 L) mediante el ingreso de agua (subterránea) través de una válvula flotante. El mismo fue alimentado mediante una dosificación independiente de leche y de una solución de 114 g de  $\text{NH}_3\text{Cl}$  y 54 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  por litro, utilizando una bomba peristáltica de dos vías (APEMA PC25-0,1-F-D, Avellaneda, Argentina) calibrada a unos 120 mL d<sup>-1</sup>. El tanque fue diseñado como filtro anaeróbico, con el objetivo de agotar el nitrato presente en la provisión de agua subterránea (unos 12 – 15 mg N L<sup>-1</sup>). La bomba de alimentación de los mesocosmos se ubicó cerca de la superficie mientras que el ingreso de agua, leche y solución de nutrientes fue dirigido hacia el fondo del tanque a través de un caño colector. Este filtro anaeróbico fue operado bajo un caudal promedio de 74 L/d, equivalente a una tasa de residencia hidráulica promedio de 2,4 días.

Los mesocosmos fueron alimentados con agua durante un año y medio (período de maduración) hasta que comenzaron a recibir agua residual sintética, dos meses antes del primer muestreo. La misma consistió en una dilución de leche en agua, luego reforzada a partir del segundo muestreo con la solución concentrada de nutrientes disueltos, buscando elevar las concentraciones de Fósforo Total (PT) y Nitrógeno Total (NT). Los mesocosmos fueron

muestreados en 41 fechas durante los 740 días de la etapa de experimentación, entre el 21/12/2007 y el 30/12/2009.

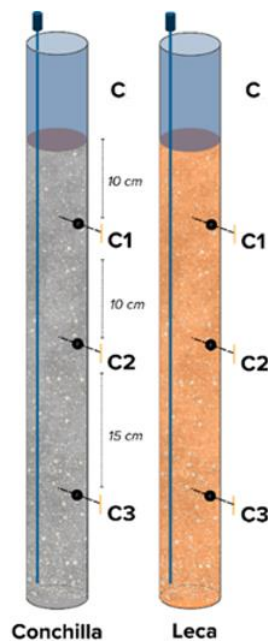
Se tomaron muestras de agua de alimentación de los mesocosmos ( $C_i$ ), agua de salida, a 10 cm por encima de la superficie del sustrato (superficial,  $C_0$ ), y agua intersticial a tres profundidades, 10 ( $C_1$ ), 20 ( $C_2$ ) y 35 cm ( $C_3$ ) bajo la superficie del sustrato. Durante los muestreos se utilizó una celda de flujo equipada con electrodos para medir in situ temperatura, pH, oxígeno disuelto y potencial redox. También se colectaron muestras en frascos de vidrio para, posteriormente, determinar el resto de los parámetros en el laboratorio.

Todos los muestreos se realizaron por la tarde, cumpliendo con la condición de ausencia de precipitaciones durante, al menos, 72 hs previas. Las muestras fueron colectadas en el siguiente orden: primero el agua de salida (caudal continuo) y luego las de agua intersticial. Las primeras fueron colectadas durante 1 hora, interceptando la manguera de descarga al drenaje.



**Figura 3.1.** Resumen del diseño experimental usado (arriba), con el detalle de los mesocosmos con Conchilla y LECA, y los puntos de toma de muestras (abajo).

El volumen colectado fue expresado como caudal ( $L h^{-1}$ ). Las segundas, comenzando por la de menor profundidad, se tomaron conectando una celda de flujo a la manguera de silicona, luego de soltar el broche metálico. Con los electrodos de pH, OD y ORP en la celda, se dejó fluir el agua intersticial hasta reemplazar aproximadamente un volumen completo de la celda. A partir de entonces, se colectó el agua y se registraron los valores de los parámetros medidos. Se repitió el mismo procedimiento en las dos profundidades siguientes. Los caudales de entrada se midieron el día previo a cada muestreo, colectando el flujo durante 1 hora, expresando el volumen colectado como caudal ( $L h^{-1}$ ).



Durante el desarrollo del experimento se registraron las siguientes observaciones consideradas relevantes. Mientras que en los controles se mantuvo el nivel del sustrato con 10 cm de agua libre sobrenadante, en los mesocosmos vegetados maduros el espacio de agua libre fue colonizado por una profusa biomasa aérea vegetal. Además, la biomasa subterránea provocó la expansión del sustrato, en grado variable, con la consecuente reducción del espacio de agua libre.

También se observó acumulación de gases dentro del sustrato; al liberar el broche metálico que sellaba las mangueras de silicona salía gas a presión antes que el agua intersticial. Esto puede representar un problema para la circulación y el contacto del agua con las raíces. Y,

finalmente, dos de las tres réplicas de *Z. bonariensis* en conchilla, murieron antes de finalizar el experimento.

#### Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* incluyeron temperatura y pH, oxígeno disuelto, sólidos disueltos totales y potencial redox. En el laboratorio se determinó la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5) (SMWW 5210 B, APHA, 2017). Una alícuota de las muestras fue digerida según el método de persulfato para la determinación simultánea de nitrógeno total y fósforo total (APHA et al., 2017).

Otra alícuota de las muestras fue filtrada por membrana de diámetro de poro 0,45 µm para realizar las siguientes determinaciones: fósforo reactivo soluble mediante la reacción de azul de molibdeno (Murphy and Riley, 1962; Nagul et al., 2015); nitrógeno amoniacal mediante la reacción de azul de indofenol (Pai et al., 2001; Solórzano, 1969); nitritos por reacción de diazotación (Bendschneider and Robinson, 1952) y nitratos por reducción con Vanadio y reacción de diazotación (Doane and Horwath, 2003; Miranda et al., 2001; Pai et al., 2021). Los detalles de las metodologías y equipos utilizados se encuentran en el **Capítulo 2**.



**Figura 3.2.** Fotografías de los mesocosmos plantas (arriba) y detalle de las tomas de muestra a distintas profundidades (abajo).

## Análisis de datos

Las tasas de carga y de remoción de NT, PT, DBO<sub>5</sub> y N-NH<sub>3</sub> fueron calculados (Kadlec and Wallace, 2009):

$$\text{Tasa de carga } (g \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = \frac{Q_i C_i}{A}$$
$$\text{Tasa de remoción } (g \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = \frac{(Q_i C_i - Q_o C_o)}{A}$$

Donde  $C_i$  es la concentración de entrada,  $C_o$  la concentración de salida,  $Q_i$  el caudal de entrada,  $Q_o$  el caudal de salida y  $A$  el área del mesocosmos. Dado que las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{N-NO}_2^-$  no pueden considerarse parte de la entrada debido a su remoción previa al ingreso a los mesocosmos y que, además, se producen en procesos que ocurren dentro de los mesocosmos, las tasas de carga y remoción de estos compuestos no se incluyen en los resultados.

Se compararon las diferencias en el porcentaje de remoción de nutrientes entre sustratos, especies y tiempo de experimentación mediante Análisis de la Varianza con medidas repetidas, considerando los siguientes factores y niveles:

- **Factor Especie**, con seis niveles: Control, *P. australis*, *T. latifolia*, *S. californicus*, *S. giganteus*, *Z. bonariensis*.
- **Factor Sustrato**, con dos niveles: Conchilla, LECA.
- **Factor Tiempo**. Los mesocosmos fueron muestreados en 8 muestreos, cada uno a lo largo de un promedio de 17 días.

Además, se estudió la variación en profundidad de nutrientes y parámetros físicoquímicos, en cuatro profundidades: en el agua sobre la superficie (+10 cm), a 10 cm, a 20 cm, y a 35 cm de profundidad.

Previamente a cada análisis, se revisaron los principios de normalidad mediante el test de Cochran, y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene.

La relación entre las distintas variables ambientales y las concentraciones de nutrientes se analizaron mediante modelos generalizados lineales, para tratar de establecer las condiciones ambientales que modulan las variaciones en el porcentaje de remoción de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub>.

Finalmente, se analizó la relación entre las concentraciones de nutrientes y las variables ambientales (SDT, ORP, pH, DO, Temperatura) a distintas profundidades mediante análisis de correlación.

## Resultados

### Condiciones experimentales

La tasa de carga hidráulica (HLR) promedio en los mesocosmos fue de 193,5 ( $\pm 98,0$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. En los Controles fue de 153,81 ( $\pm 52,47$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, en *T. latifolia* de 177,81 ( $\pm 67,11$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, en *S. californicus* de 206,49 ( $\pm 99,9$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, en *P. australis* de 208,27 ( $\pm 115,78$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, en *S. giganteus* de 208,83 ( $\pm 108,6$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y en *Z. bonariensis* de 212,98 ( $\pm 114,68$ ) L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>.

Las concentraciones medias de nutrientes en el ingreso a los mesocosmos durante todo el experimento (digestor anaeróbico ( $C_i$ )) fue de 23,37 ( $\pm 14,82$ ) mg L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>3</sub>, 3,63 ( $\pm 4,71$ ) mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+ N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 33,41 ( $\pm 14,21$ ) mg L<sup>-1</sup> de NT, 5,22 ( $\pm 3,0$ ) mg L<sup>-1</sup> de PRS, 6,24 ( $\pm 3,34$ ) mg L<sup>-1</sup> de PT y 70,17 ( $\pm 55,09$ ) mg L<sup>-1</sup> de DBO<sub>5</sub>.

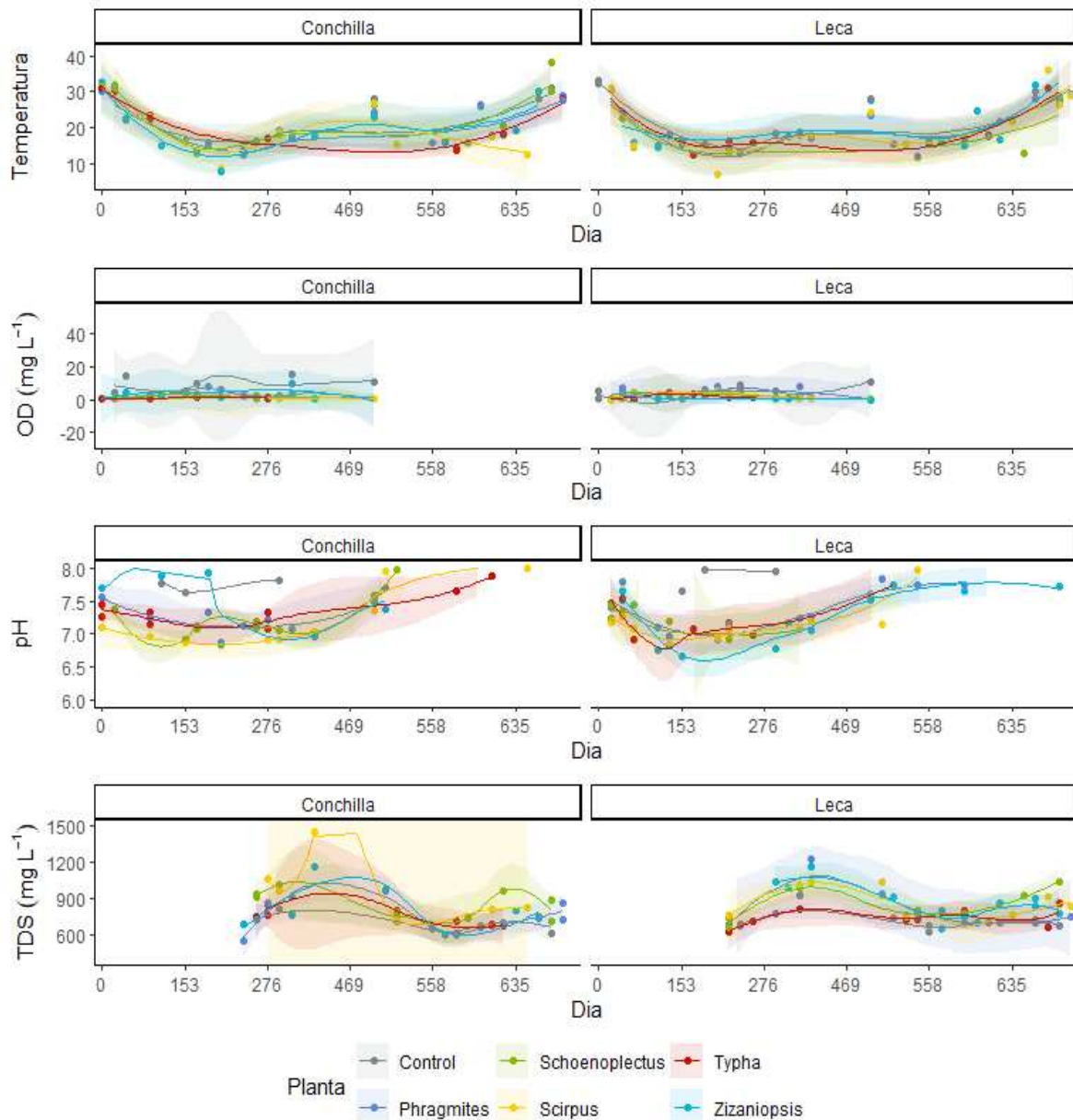
En la **Figura 3.3** se pueden observar las variaciones de la temperatura, el pH, el OD y SDT en los mesocosmos con plantas con ambos tipos de sustrato durante el experimento, y en la **Tabla Suplementaria 3.2** se muestran los resultados del análisis estadístico comparando los sustratos, plantas y fechas de muestreo. Puede observarse que tanto la temperatura, el pH, la concentración de SDT y el oxígeno disuelto fueron significativamente distintos entre las fechas de muestreo, y que además los últimos tres parámetros mencionados también fueron distintos entre plantas.

La temperatura varió de manera similar en todos los mesocosmos, entre un mínimo de 6,7 en invierno y un máximo de 18,3°C en verano.

El pH promedio disminuyó desde el verano hacia el otoño, para aumentar en primavera. Varió de manera similar en todos los mesocosmos entre un mínimo de 6,6 y un máximo de 7,7.

El oxígeno disuelto varió entre la anoxia y un máximo de 14,9 mg L<sup>-1</sup>, en los controles, mientras que en el resto de los mesocosmos fue similar, alcanzando un máximo de 9,9 mg L<sup>-1</sup>.

Los SDT variaron entre 552 y 1450 mg L<sup>-1</sup>, siendo mayores en otoño para disminuir en primavera y similares en todos los mesocosmos.



**Figura 3.3.** Variaciones promedio ( $\pm$ DS) de temperatura, OD, pH y SDT en los distintos tratamientos a lo largo del experimento.

### Concentraciones de nutrientes y DBO5

Las concentraciones promedio de nutrientes en los mesocosmos con plantas fueron menores que en los controles. Los valores promedio y desvíos de las concentraciones de nutrientes en los tratamientos se pueden ver en la **Tabla Suplementaria 1**, y las variaciones de las mismas en el tiempo, en las **Figuras Suplementarias 2 y 3**. Las concentraciones de NT fueron menores en los mesocosmos con plantas independientemente del tipo de planta o de sustrato. La disminución del resto de los nutrientes dependió del tipo de planta y del tipo de sustrato (**Figura 3.4 y Tabla suplementaria 3.1**).

Las concentraciones promedio de PRS y PT se redujeron significativamente en los mesocosmos de conchilla plantados con *S. giganteus* y algo menos en los plantados con *T. latifolia*. En los mesocosmos de LECA, en cambio, los plantados con *Z. bonariensis* alcanzaron la reducción más significativa, seguidos por los de *S. giganteus*.

Para el N-NH<sub>3</sub> y el NT las reducciones más significativas se alcanzaron con *S. giganteus* y con *S. californicus* en conchilla, y con *Z. bonariensis*, seguidas por *S. giganteus*, *P. australis* y *S. californicus* en LECA.

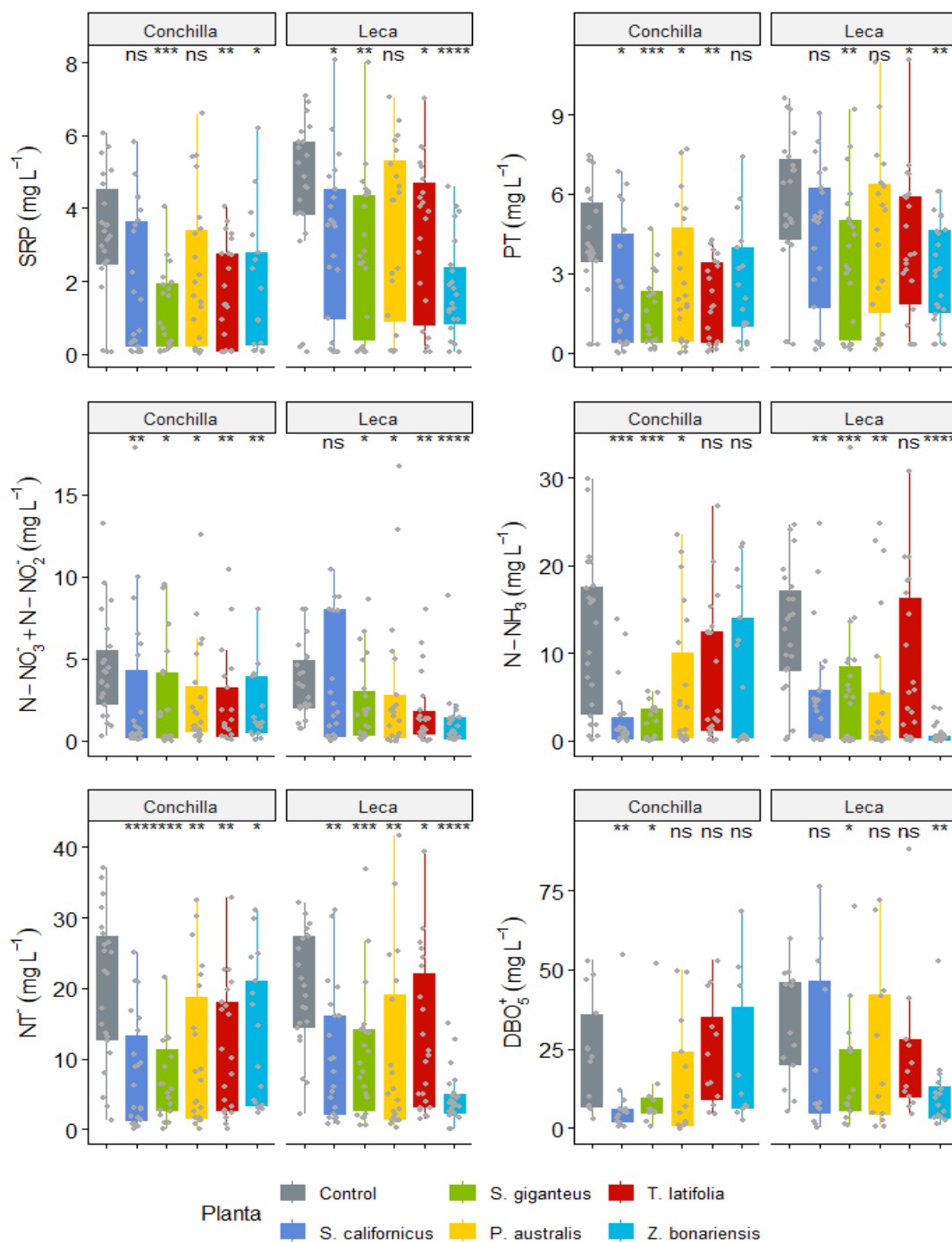
Las concentraciones de DBO<sub>5</sub> fueron reducidas significativamente por *S. californicus* en conchilla y por *Z. bonariensis* en LECA, seguidas en ambos casos por *S. giganteus*.

Enfocando la comparación en los sustratos, los mesocosmos de conchilla con *S. giganteus* alcanzaron las concentraciones promedio más bajas de PRS (1,24 mg P L<sup>-1</sup>) y PT (1,56 mg P L<sup>-1</sup>), mientras que con *S. californicus* se alcanzaron los valores promedio más bajos de DBO<sub>5</sub> (8,54 mg L<sup>-1</sup>). En los mesocosmos de LECA, en cambio, se obtuvieron las concentraciones más bajas de N-NH<sub>3</sub> (0,75 mg N L<sup>-1</sup>) y NT (4,57 mg N L<sup>-1</sup>) con *Z. bonariensis*.

#### Perfiles en profundidad de los mesocosmos

En el recorrido ascendente a través de los mesocosmos, el agua aumentó su temperatura, concentración de OD, pH y ORP en ambos sustratos y con todos los tratamientos (**Figura 3.5**).

Los mayores cambios de temperatura, pH y OD se observaron en el segmento más superficial de los mesocosmos (entre profundidades 0 y 10 cm), mientras que el ORP aumentó gradualmente entre todos los segmentos.



**Figura 3.4.** Diagramas de cajas (box plots) de las concentraciones de nutrientes (PRS, PT, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>, NT) y DBO<sub>5</sub> en las distintas combinaciones de plantas y sustratos (Conchilla, LECA) durante todo el experimento.

En los perfiles de temperatura representados en la **Figura 3.5** se observa un aumento abrupto de temperatura en el agua libre entre la superficie del sustrato hasta el orificio de salida. El agua intersticial mantuvo un perfil más frío y constante, aunque con diferencias entre especies que no se repitieron entre sustratos.

Algo similar se observa en los perfiles de oxígeno disuelto, con un aumento abrupto en el agua superficial cuyos máximos fueron obtenidos en los mesocosmos control de ambos sustratos. En ellos se observó el máximo crecimiento de algas que no se produjo en los mesocosmos vegetados con un grado variable de sombreado. Dentro del sustrato, tanto en conchilla como en LECA, el oxígeno disuelto aumenta ligeramente desde el fondo hacia la superficie.

También el pH exhibe un aumento abrupto en el agua libre superficial con valores más altos en los controles de ambos sustratos, del mismo modo que el oxígeno disuelto. Dentro del sustrato, en cambio, el pH disminuye desde el fondo hacia la superficie en todos los mesocosmos vegetados, a diferencia de los controles. Este efecto es más pronunciado con *S. giganteus* en conchilla y, más aún, con *Z. bonariensis* en LECA.

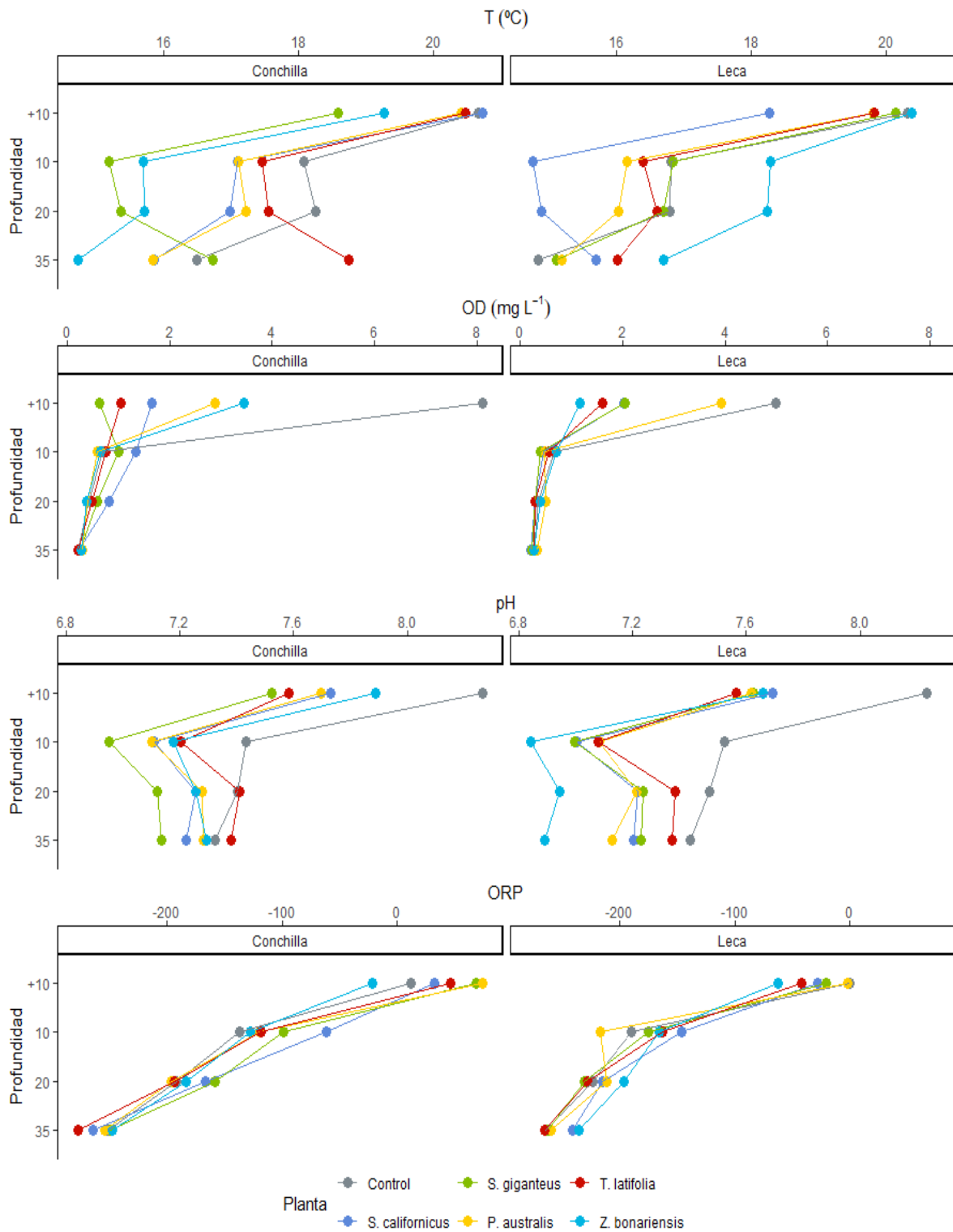
Por último, los perfiles de ORP exhiben valores crecientes desde el fondo hasta el agua superficial en todos los mesocosmos. La pendiente es más pronunciada con conchilla, alcanzando valores más altos en el agua superficial. Con LECA, los valores se mantienen más bajos en el relleno y en el agua superficial.

De manera similar, las formas oxidadas de nitrógeno ( $N-NO_2^- + N-NO_3^-$ ) aumentaron desde el fondo hacia la superficie, mientras que el amonio disminuyó (**Figura 3.6**). Los cambios más evidentes de las formas nitrogenadas oxidadas se registraron en el segmento más superficial (0-10 cm), mientras que tanto el amonio como el PRS disminuyeron gradualmente a lo largo del recorrido por el mesocosmos.

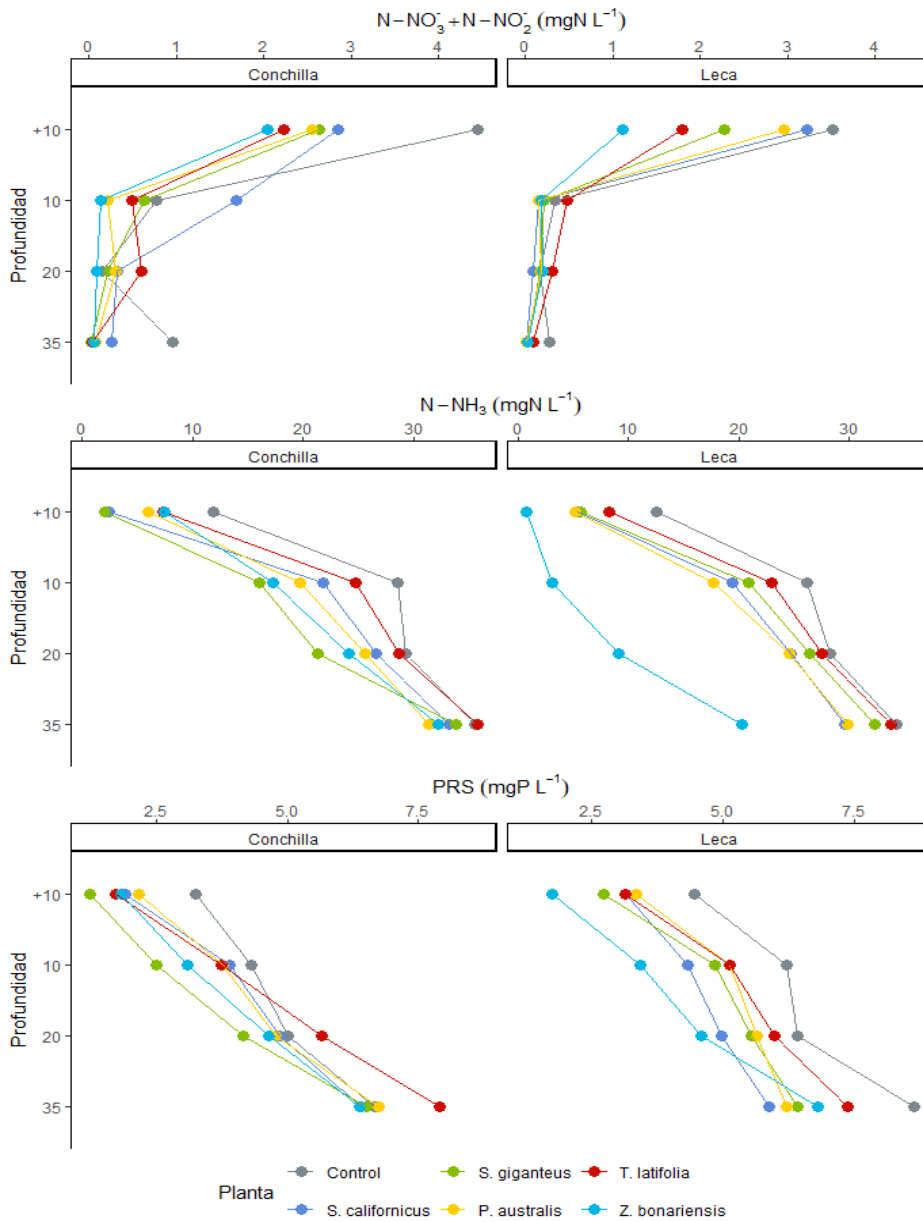
En la **Figura 3.6** se observan los perfiles de nitrógeno y fósforo. Para el nitrógeno amoniacal, se observa en todos los tratamientos una disminución progresiva de la concentración desde el fondo hacia la superficie, que se hace más pronunciada en el agua superficial. En mesocosmos de LECA con *Z. bonariensis* la disminución es notable en todo el perfil. También es notable que el efecto no se verifique con la misma especie en conchilla.

Las concentraciones promedio de nitritos más nitratos se mantuvieron bajas dentro del sustrato y exhibieron un aumento abrupto en el agua superficial en todos los tratamientos, con los valores más altos en los controles y con *S. californicus* en conchilla.

Para el fósforo reactivo soluble los perfiles resultaron decrecientes desde el fondo hacia la superficie. Los mesocosmos vegetados exhibieron concentraciones promedio ligeramente más bajas que los controles, con un efecto más pronunciado en conchilla con *S. giganteus* y en LECA con *Z. bonariensis*.



**Figura 3.5.** Temperatura, OD, pH y ORP en los mesocosmos con relación a su profundidad, valores promedio durante todo el experimento.



**Figura 3.6.** Nutrientes ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_3$ , PRS) en los mesocosmos con relación a su profundidad, valores promedio durante todo el experimento.

### Tasas de Carga y remoción de nutrientes y DBO5

Las tasas de remoción de  $\text{DBO}_5$ ,  $\text{N-NH}_3$ , NT y PT fueron más altas en todos los tratamientos con plantas que en los controles. Además, por tratamiento, las tasas fueron mayores en conchilla que en LECA, con la notable excepción de *Z. bonariensis* cuyo rendimiento siempre fue superior en LECA (**Tabla 3.1**).

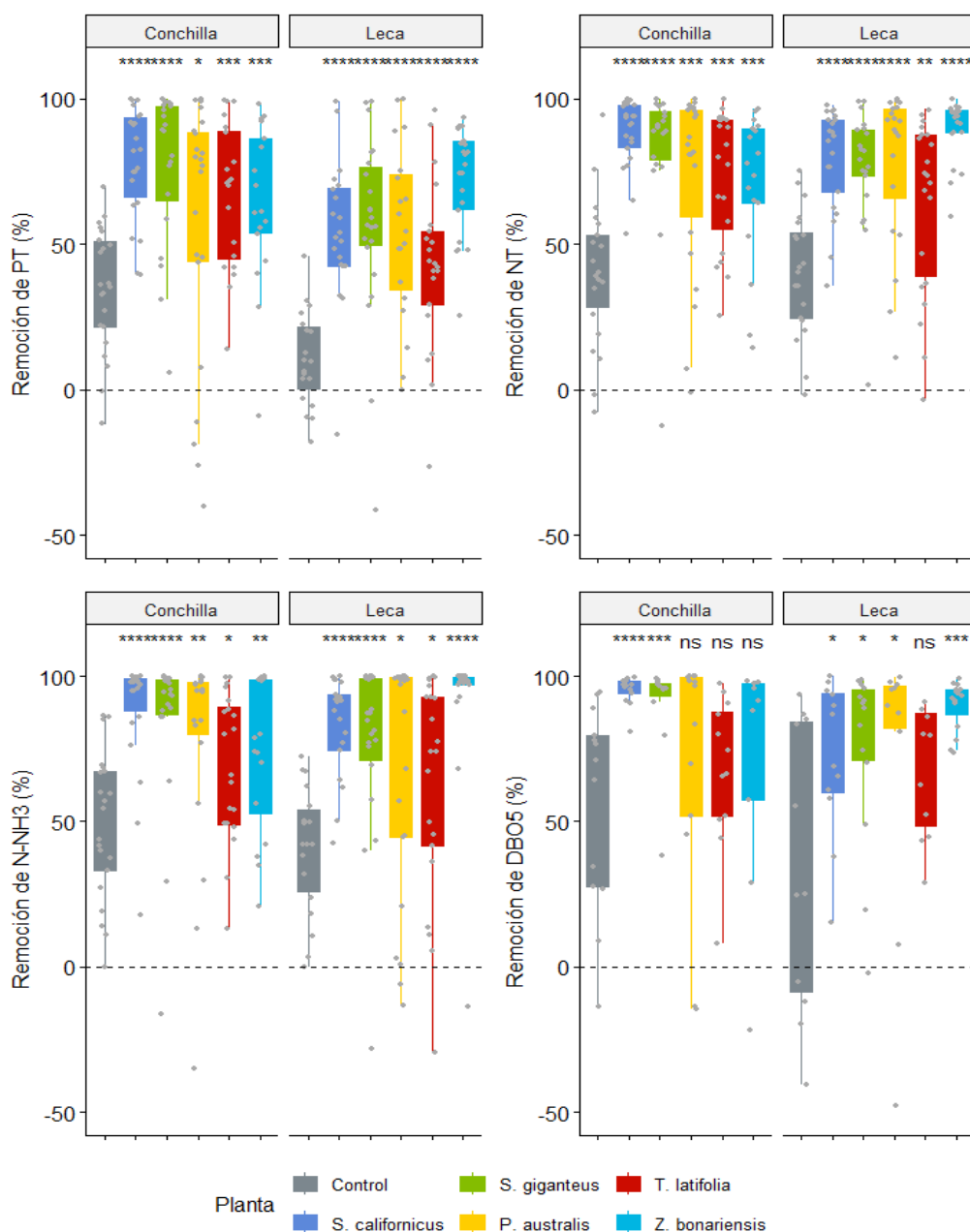
Las tasas más altas de remoción de PT y  $\text{DBO}_5$  se alcanzaron con *S. giganteus* y *S. californicus* en conchilla mientras que las mayores tasas de remoción de  $\text{N-NH}_3$  y NT se obtuvieron con *Z. bonariensis* en LECA. Expresadas como porcentaje de la carga de ingreso, esas

tasas de remoción representan para PT el 85,8 % (*S. giganteus*) y 85,3 % (*S. californicus*), para DBO<sub>5</sub> el 96,0 % (*S. californicus*) y 93,1 % (*S. giganteus*), y para el N-NH<sub>3</sub> y NT, 98,2 % y 92,6 %, respectivamente (*Z. bonariensis*). Aunque un poco más bajos, los porcentajes de remoción en conchilla con *S. californicus* y *S. giganteus* se mantuvieron elevados, con valores de 94,8 % y 93,1 % para N-NH<sub>3</sub> y de 89,5 % y 88,8 % para NT, respectivamente (**Figura 3.7**).

		Control	<i>P. australis</i>	<i>S. californicus</i>	<i>S. giganteus</i>	<i>T. latifolia</i>	<i>Z. bonariensis</i>	
CONCHILLA	PT	TC	0,91 (±0,56)	1,04 (±0,71)	1,22 (±0,62)	1,13 (±0,71)	1,05 (±0,65)	1,15 (±0,72)
		TR	0,33 (±0,36)	0,75 (±0,74)	1,04 (±0,61)	0,97 (±0,65)	0,73 (±0,59)	0,81 (±0,61)
		%	36,3	72,1	85,2	85,8	69,5	70,4
	DBO <sub>5</sub>	TC	10,59 (±8,96)	10,82 (±7,27)	11,05 (±8,07)	13,32 (±11,39)	13,24 (±8,52)	11,49 (±8,13)
		TR	6,87 (±8,4)	9,2 (±8,15)	10,61 (±7,9)	12,4 (±10,64)	9,65 (±6,73)	8,49 (±10,28)
		%	64,9	85,0	96,0	93,1	72,9	73,9
	N-NH <sub>3</sub>	TC	3,56 (±2,51)	3,95 (±2,73)	4,62 (±2,74)	4,17 (±2,81)	3,98 (±2,57)	4,47 (±3,11)
		TR	1,82 (±1,63)	3,38 (±2,96)	4,38 (±2,63)	3,88 (±2,58)	2,87 (±2,15)	3,45 (±2,87)
		%	51,1	85,6	94,8	93,0	72,1	77,2
	NT	TC	4,89 (±2,77)	5,63 (±3,35)	6,38 (±3,18)	6,05 (±3,44)	5,84 (±2,9)	6,27 (±3,67)
		TR	1,95 (±1,65)	4,58 (±3,71)	5,71 (±3,02)	5,37 (±3,09)	4,15 (±2,64)	4,45 (±3,2)
		%	39,9	81,3	89,5	88,8	71,1	71,0
LECA	PT	TC	0,86 (±0,5)	1,07 (±0,66)	1,04 (±0,57)	1,04 (±0,63)	0,98 (±0,54)	1,15 (±0,66)
		TR	-0,01 (±0,26)	0,5 (±0,68)	0,53 (±0,46)	0,63 (±0,54)	0,38 (±0,52)	0,85 (±0,66)
		%	-1,2	46,7	51,0	60,6	38,8	73,9
	DBO <sub>5</sub>	TC	8,79 (±7,79)	10,65 (±9,07)	7,72 (±5,75)	10,1 (±7,82)	9,15 (±5,78)	11,28 (±9,66)
		TR	3,63 (±8,78)	7,87 (±11,04)	5,3 (±4,11)	8,14 (±8,17)	4,91 (±5,75)	10,31 (±9,13)
		%	41,3	73,9	68,7	80,6	53,7	91,4
	N-NH <sub>3</sub>	TC	3,12 (±1,95)	4,23 (±2,9)	4,08 (±2,51)	4,1 (±2,6)	3,82 (±2,35)	4,49 (±2,8)
		TR	1,16 (±1,66)	3,61 (±3,2)	3,36 (±2,06)	3,47 (±2,45)	2,45 (±2,03)	4,41 (±2,77)
		%	37,2	85,3	82,4	84,6	64,1	98,2
	NT	TC	4,54 (±1,99)	5,89 (±3,46)	6,03 (±3,21)	5,6 (±3,13)	5,3 (±2,57)	6,19 (±3,38)
		TR	1,48 (±1,76)	4,76 (±3,91)	4,66 (±2,56)	4,34 (±2,72)	3,23 (±2,16)	5,73 (±3,35)
		%	32,6	80,8	77,3	77,5	60,9	92,6

**Tabla 3.1.** Promedio (±DS) de las tasas de carga (TC) y de retención (TR) por tratamiento, de DBO<sub>5</sub>, N-NH<sub>3</sub>, PT y NT, y el porcentaje de remoción (%) en función de la carga.

La interacción significativa entre Sustrato y Planta ( $F=3,671$ ,  $p=0,02$ ,  $\eta^2=0,05$ ) indica que la remoción de PT depende del tipo de planta utilizada en combinación con el tipo de sustrato utilizado. El factor Planta tuvo la mayor influencia ( $F=9,860$ ,  $p<0,01$ ,  $\eta^2=0,46$ ) que el sustrato ( $F=17,299$ ,  $p<0,01$ ,  $\eta^2=0,16$ ), sugiriendo que las especies vegetales utilizadas desempeñan un rol crucial en los procesos de retención y eliminación de fósforo, mientras que el sustrato mostró una contribución más moderada.



**Figura 3.7.** Porcentajes de remoción de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub> con las distintas plantas (*P. australis*, *S. californicus*, *S. giganteus*, *T. latifolia*, *Z. bonariensis*) en comparación contra los Controles en los dos tipos de sustrato usados (Conchilla, LECA). La línea punteada gris separa la remoción (>0%) y liberación (<0%) de nutrientes, y por encima de cada tratamiento se indican las diferencias contra los controles (ns= no significativo; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ).

Similar es el caso de la remoción de NT, donde también hay una interacción significativa entre ambos factores ( $F=3,083$ ,  $p=0,04$ ,  $\eta^2=0,04$ ), con el factor Planta generando un efecto grande ( $F=19,097$ ,  $p < 0,01$ ,  $\eta^2=0,70$ ), mientras que el sustrato no tuvo un efecto significativo.

Para la remoción de amoníaco, el factor Planta tuvo un efecto significativo, aunque con un tamaño del efecto moderado ( $F=2,843$ ,  $p=0,04$ ,  $\eta^2=0,34$ ), mientras que para la remoción de DBO<sub>5</sub>, tanto el tipo de sustrato como el de planta tuvieron un efecto bajo pero significativo.

		Sustrato	Planta	Sustrato:Planta	Muestreo
% Remoción PT	F	<b>17,299</b>	<b>9,860</b>	<b>3,671</b>	13,77
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,02</b>	0,40
	$\eta^2$	0,16	<b>0,46</b>	0,05	0,99
% Remoción NT	F	0,256	<b>19,097</b>	<b>3,083</b>	1,346
	p	0,61	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,04</b>	0,28
	$\eta^2$	0,00	<b>0,70</b>	0,04	0,92
% Remoción N-NH <sub>3</sub>	F	0,019	<b>2,843</b>	0,513	0,970
	p	0,89	<b>0,04</b>	0,72	0,66
	$\eta^2$	0,00	<b>0,34</b>	0,11	0,91
% Remoción DBO <sub>5</sub>	F	3,604	2,494	1,332	<b>4,701</b>
	p	0,07	0,06	0,87	<b>&lt;0,01</b>
	$\eta^2$	0,08	0,28	0,15	<b>0,94</b>

**Tabla 3.2.** Resultados del ANOVA-MR (F, p-valor y  $\eta^2$ ) para las remociones de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub> con relación al sustrato, planta y día.

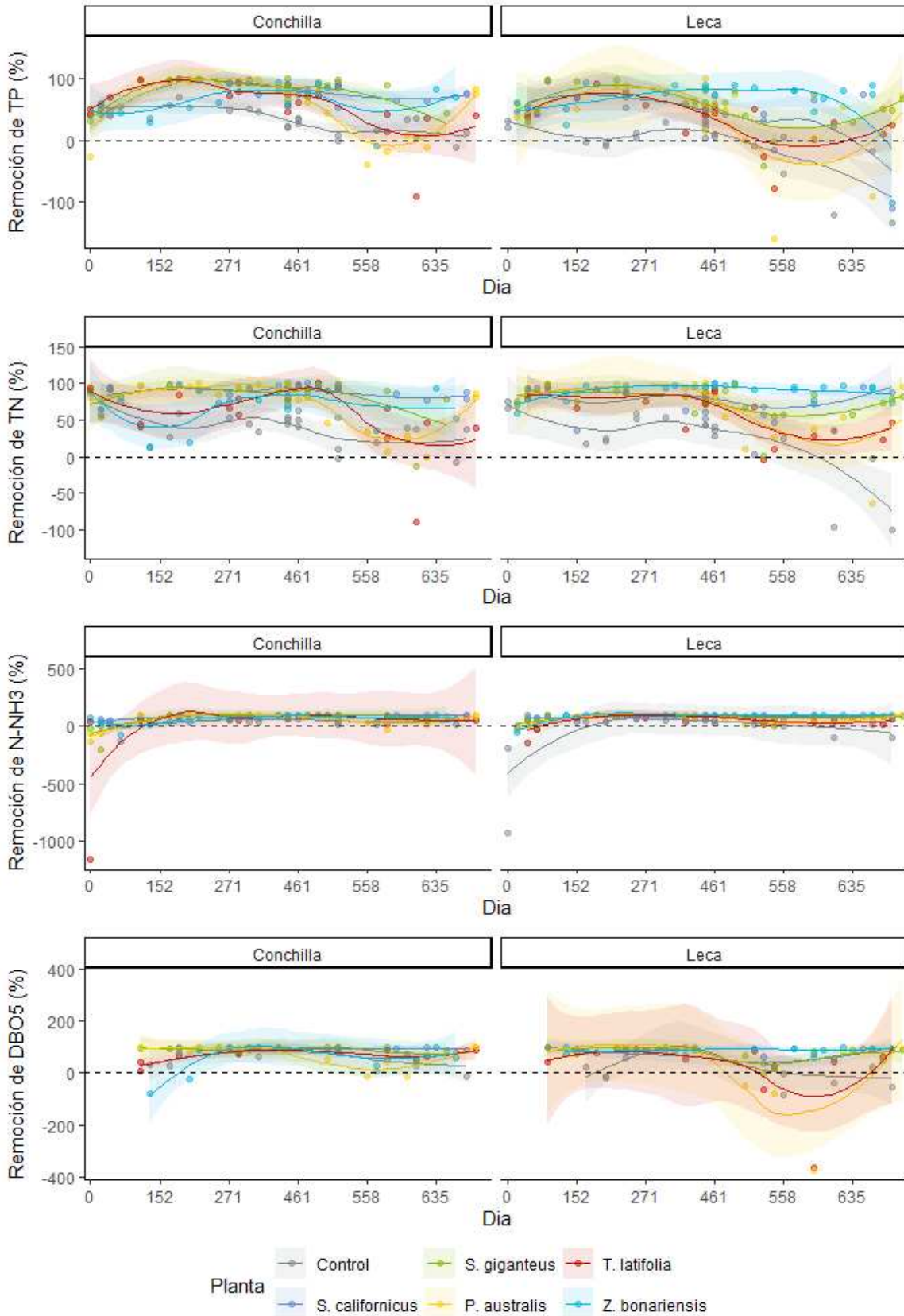
### Remoción de nutrientes a lo largo del tiempo

A lo largo del experimento, el promedio de remoción de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y de DBO<sub>5</sub> varió dependiendo del tipo de sustrato y de planta (**Figura 3.8**).

En sustrato de LECA el porcentaje de remoción de PT decayó aproximadamente a partir del día 558 (invierno) en todos los mesocosmos, para luego volver a aumentar hacia el final del experimento en *S. giganteus*, *P. australis* y *T. latifolia*. Las remociones de NT y N-NH<sub>3</sub> se

mantuvieron relativamente constantes en los mesocosmos con plantas y superiores a los controles, los cuales decayeron en su efectividad desde el día 558 en adelante. La remoción de  $DBO_5$  en *LECA* también fue superior en los mesocosmos con plantas en comparación con los controles durante todo el experimento, sufriendo una disminución desde el día 558 para luego recuperar su efectividad.

En sustrato de conchilla el porcentaje de remoción promedio de todos los nutrientes, por más que osciló en algunos casos, fue más alto en los mesocosmos con plantas en comparación con los controles y se mantuvo positivo ( $>0\%$ ) por todo el experimento.



**Figura 3.8.** Porcentaje de remoción promedio (líneas) de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub> en los mesocosmos con Conchilla (izquierda) y con LECA (derecha) a lo largo del tiempo de experimentación. La línea punteada gris separa la remoción (>0%) y liberación (<0%).

### Relaciones entre la remoción de nutrientes y las variables físico-químicas

Los modelos lineales generalizados generados para vincular la remoción de los distintos nutrientes (PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub>) con las variables fisicoquímicas promedio de los mesocosmos (pH, OD, Temperatura, SDT, ORP), muestran que el vínculo entre las variables ambientales y los nutrientes depende del tipo de nutriente y de planta utilizada (**Tabla 3.3**).

Las variables vinculadas a la remoción de PT en *S. giganteus* fueron el OD y el ORP, en *P. australis* el pH y el ORP, y en los controles el pH y el ORP, mientras que en resto de los mesocosmos no hubo relaciones significativas entre los nutrientes y las variables ambientales. Las variables vinculadas a la remoción de NT en *P. australis* fueron el pH y el ORP, en *Z. bonariensis* el pH, y en *S. californicus*, el OD. En el resto de los mesocosmos no hubo relaciones significativas entre los nutrientes y las variables ambientales. La remoción de N-NH<sub>3</sub>, en *S. giganteus* se la vinculó al OD, en *P. australis* al pH y la temperatura, y en *Z. bonariensis* al pH, mientras que en resto de los mesocosmos no hubo relaciones significativas entre los nutrientes y las variables ambientales. Finalmente, el porcentaje de remoción de DBO<sub>5</sub> en los controles se lo vinculó a las variaciones de pH y SDT, en *S. giganteus* a las variaciones de OD y en *P. australis* a las de ORP.

En relación a la profundidad, en los controles se encontraron mayores relaciones entre las concentraciones de nutrientes y las variables ambientales (**Figura Suplementaria 3.1**). Principalmente el amonio, el NT y el PRS estuvieron vinculados de manera significativa y positiva a los SDT, mientras que en general factores como el pH, la temperatura y el OD se vincularon de manera inversa a la concentración de nutrientes.

En los mesocosmos con plantas, las correlaciones entre las variables ambientales y los nutrientes en las distintas profundidades fueron más escasas, aunque en general el pH tuvo una relación directa y positiva con N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NT, PT (en *P. australis*), y el ORP una relación inversa con el PRS (en *P. australis*, *S. giganteus*, *T. latifolia* y *Z. bonariensis*).

Variable dependiente	Planta	R <sup>2</sup>	Variables significativas
% Remoción PT	Control	0,37	pH + ORP
	<i>S. californicus</i>	0,20	---
	<i>S. giganteus</i>	0,48	OD+ ORP
	<i>P. australis</i>	0,66	pH + ORP
	<i>T. latifolia</i>	0,30	---
	<i>Z. bonariensis</i>	0,24	---
% Remoción NT	Control	0,35	---
	<i>S. californicus</i>	0,34	OD
	<i>S. giganteus</i>	0,24	---
	<i>P. australis</i>	0,71	pH + ORP
	<i>T. latifolia</i>	0,18	---
	<i>Z. bonariensis</i>	0,31	pH
% Remoción N-NH <sub>3</sub>	Control	0,25	---
	<i>S. californicus</i>	0,13	---
	<i>S. giganteus</i>	0,33	OD
	<i>P. australis</i>	0,71	T + pH
	<i>T. latifolia</i>	0,33	---
	<i>Z. bonariensis</i>	0,38	pH
% Remoción DBO <sub>5</sub>	Control	0,49	pH + SDT
	<i>S. californicus</i>	0,36	---
	<i>S. giganteus</i>	0,40	OD
	<i>P. australis</i>	0,41	ORP
	<i>T. latifolia</i>	0,20	---
	<i>Z. bonariensis</i>	0,17	---

**Tabla 3.3.** Resumen de los resultados obtenidos para los modelos lineales generalizados vinculando los porcentajes de remoción de los distintos nutrientes (PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub>) con las variables fisicoquímicas promedio de los mesocosmos (pH, OD, Temperatura, SDT, ORP).

## Discusión

La carga hidráulica promedio aplicada a los tratamientos ( $193,5 \pm 98,0 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) superó los  $80 \text{ L d}^{-1}$  recomendados (hasta  $120 \text{ L d}^{-1}$  para el tratamiento terciario) por la norma alemana DWA-A-262, y se registró cierta variación dentro y entre tratamientos. La carga orgánica aplicada ( $10,6 \text{ g DBO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), otro parámetro clave en el diseño de humedales verticales, se mantuvo un poco por debajo (la mitad aprox.) del límite máximo de  $20 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , recomendado para tratamiento secundario (Austrian Standards International, 2009; Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall, 2017). Si se compara con la carga orgánica remanente que se espera en un efluente secundario (aprox. un quinto) la carga orgánica aplicada resultó mayor que la prevista con el objetivo de evaluar la capacidad de eliminación de nutrientes en una etapa de tratamiento terciario.

Los resultados estadísticos indicaron que la remoción de fósforo fue afectada por las plantas, luego por el sustrato y, finalmente, por una moderada interacción entre ambos factores. En un trabajo de revisión sobre la importancia de la elección de la especie vegetal en humedales construidos, se concluye que cuando existen diferencias en la eliminación de nutrientes entre las especies de plantas, estas diferencias parecen involucrar más a menudo la eliminación de nitrógeno (especialmente el nitrato), menos a los sólidos y a la materia orgánica, y sin tendencias claras para el fósforo (Brisson and Chazarenc, 2009). Otro trabajo que revisó los factores que afectan la remoción de P en humedales verticales, comparó el rendimiento de remoción entre distintas especies de plantas y tampoco encontró diferencias concluyentes (Verma et al., 2022). Nuestros resultados evidencian no solo el efecto de las plantas en la remoción de P sino también las diferencias de rendimiento entre especies y su interacción con el sustrato utilizado.

El efecto del sustrato, por su parte, indica una ventaja de conchilla sobre LECA en la remoción de fósforo, aún en los controles sin plantas. Sin embargo, los modelos lineales generalizados no permitieron vincular el rendimiento de las especies más eficientes con alguna variable fisicoquímica específica.

Los perfiles de pH exhibieron una clara disminución en profundidad, aumentando luego hacia la superficie en todos los mesocosmos plantados, pero más intensamente con *S. giganteus* en conchilla como con *Z. bonariensis* en LECA. Esa acidificación podría favorecer la movilización de iones (Ca, Mg, Fe) que luego precipiten al cambiar las condiciones en el tramo más superficial del gradiente.

En los perfiles de ORP, aunque de modo más tenue, las mismas especies se ubican algo desplazadas del resto, en este caso hacia valores más altos.

Es interesante advertir que el agua dentro del sustrato atraviesa estos gradientes rizosféricos que están determinados por rasgos funcionales de las especies vegetales.

Respecto del nitrógeno, los resultados revelaron una incidencia significativa del factor tratamiento sobre la remoción  $N-NH_3$ , más fuerte aún sobre la remoción de NT con moderado efecto de interacción, y sin efecto de sustrato. Tanto la provisión del oxígeno necesario para oxidar el nitrógeno amoniacal como la materia orgánica necesaria para reducir el nitrógeno de las formas oxidadas dependen en buena medida de la participación de las plantas y el efecto de las distintas especies se evidencia variable.

El rol de las plantas en el suministro de oxígeno referido a la eliminación de amoníaco es motivo de discusión en la literatura. Un lado de esta disputa está representado por la idea de que la transferencia física de oxígeno es insignificante y que la oxigenación de la planta es responsable de la totalidad de la oxidación del amoníaco. La extensión lógica de este punto de vista es que cuantas más raíces, más transferencia de oxígeno (Kadlec and Wallace, 2009). En un trabajo de revisión se compararon las contribuciones de los tres canales de suministro de oxígeno, esto es, el ingreso con el agua a tratar (influyente), el que liberan las plantas mediante la pérdida radial de oxígeno (ROL) de las raíces y el que se transfiere desde la atmósfera (AR, “*atmospheric reaeration*”). Los resultados indicaron que la AR desempeñó un papel importante en el suministro de oxígeno. Por otro lado, la tasa máxima de contribución de oxígeno por AR en humedales construidos con flujo vertical subsuperficial también fue significativamente mayor que la del oxígeno influyente y la de ROL, mientras que las tasas máximas de ROL fueron más altas que las tasas de AR en humedales construidos con flujo superficial y con flujo horizontal subsuperficial. Concluyeron que el oxígeno aportado por ROL debe enfatizarse en estas circunstancias (Liu et al., 2016). En la **Figura 3.6** se observa una reducción gradual de la concentración de  $N-NH_3$  en todo el perfil, aún en los controles. En estos últimos, el suministro de oxígeno por ROL está ausente, por lo que la reducción en la concentración podría explicarse por el aporte de AR o por adsorción al sustrato. El evidente desplazamiento de los perfiles de todas las especies vegetales en ambos sustratos hacia concentraciones más bajas refleja el aporte de ROL, cuyo efecto más notable se observa con *Z. bonariensis* en LECA. La disminución abrupta de la concentración de  $N-NH_3$  a nivel superficial en todos los mesocosmos incluyendo a los controles, coincide con el aumento de oxígeno disuelto disponible y de las concentraciones de nitrógeno oxidado y representa el aporte de la nitrificación en esa capa de agua libre y,

probablemente, de oxígeno disuelto hacia el sustrato. La acidificación observada en su perfil de pH y en el perfil de *S. giganteum* en conchilla podrían considerarse otro indicio de nitrificación sostenida por ROL.

La fuerte incidencia del tratamiento con plantas sobre la remoción de NT implica el acoplamiento de la oxidación de nitrógeno con posterior reducción a nitrógeno molecular. Los exudados de raíz son potencialmente importantes como fuente de C orgánico para la desnitrificación en humedales de flujo subsuperficial, particularmente en sistemas que reciben agua rica en nitrato con bajo contenido de DBO<sub>5</sub>. Los exudados y los microorganismos varían significativamente entre las especies de plantas y las estaciones (Wu et al., 2017; Zhai et al., 2013). Los resultados revelaron que la eficiencia de remoción de NT estuvo asociada a la remoción de amoníaco sin acumulación de productos de la nitrificación. Si bien los perfiles de ORP mostraron un claro gradiente en profundidad estos no representan necesariamente lo que sucede a escalas menores. La difusión de oxígeno por ROL a un entorno reductor produce microgradientes que favorecen los procesos microbianos de oxidación (de amoníaco) acoplada a la reducción (desnitrificación, anammox, etc).

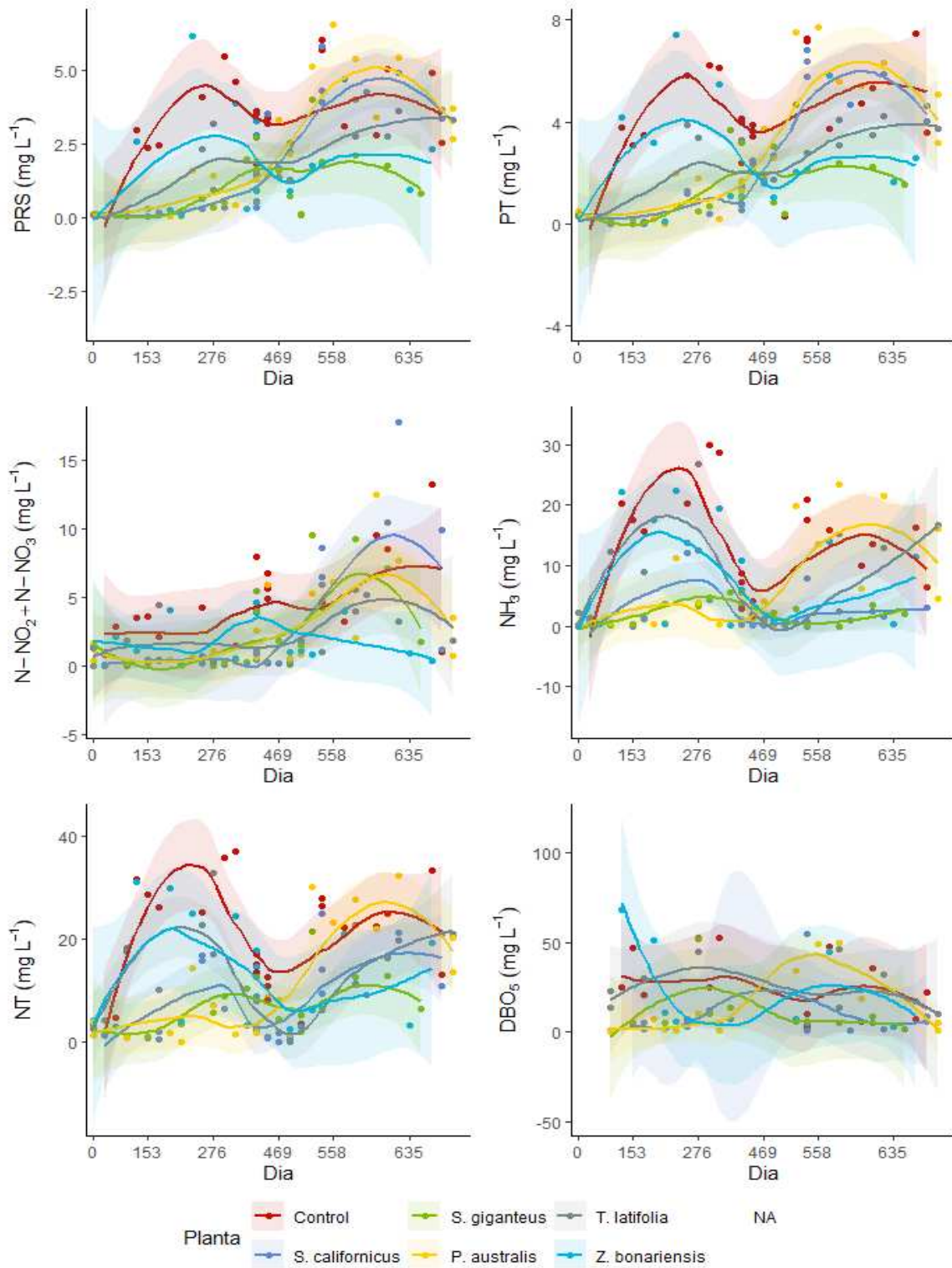
En la remoción de DBO<sub>5</sub> no se observó efecto significativo de sustrato ni planta, pero sí del factor tiempo (**Tabla 3.2**). Este efecto podría reflejar la variación de temperatura a lo largo de período experimental. Sin embargo, no se observó esta relación en el análisis de modelos lineales generalizados utilizados para detectar vínculos entre rendimientos y variables experimentales (**Tabla 3.3**). A pesar de ello, las tasas de remoción en mesocosmos de conchilla, tanto con controles como con vegetación, fueron más altas que sus contrapartes de LECA, con la notable excepción de *Z. bonariensis* cuyo rendimiento en LECA superó a los de conchilla. No se han encontrado trabajos que den cuenta de esto. La investigación enfocada en el rendimiento de diferentes sustratos se ha centrado en la eliminación de fósforo y, más recientemente, de nitrógeno. En general, el tamaño y no la composición del sustrato es reconocida como variable relevante para la remoción de materia orgánica. El efecto de las plantas y, mucho menos, de la variación específica, no se encuentran suficientemente probados (Brisson and Chazarenc, 2009; Kadlec and Wallace, 2009; Saeed and Sun, 2012; Yang et al., 2018).

Los resultados revelaron que en mesocosmos maduros sometidos a alta carga hidráulica y moderada carga orgánica, el tratamiento y, en menor medida el sustrato y la interacción entre ambos, afectaron la remoción de fósforo. En sustrato de conchilla, los tratamientos rindieron mejores resultados y se alcanzaron las máximas eficiencias con *S. giganteus* y *S. californicus*. La excepción fue el tratamiento con *Z. bonariensis*, que alcanzó un

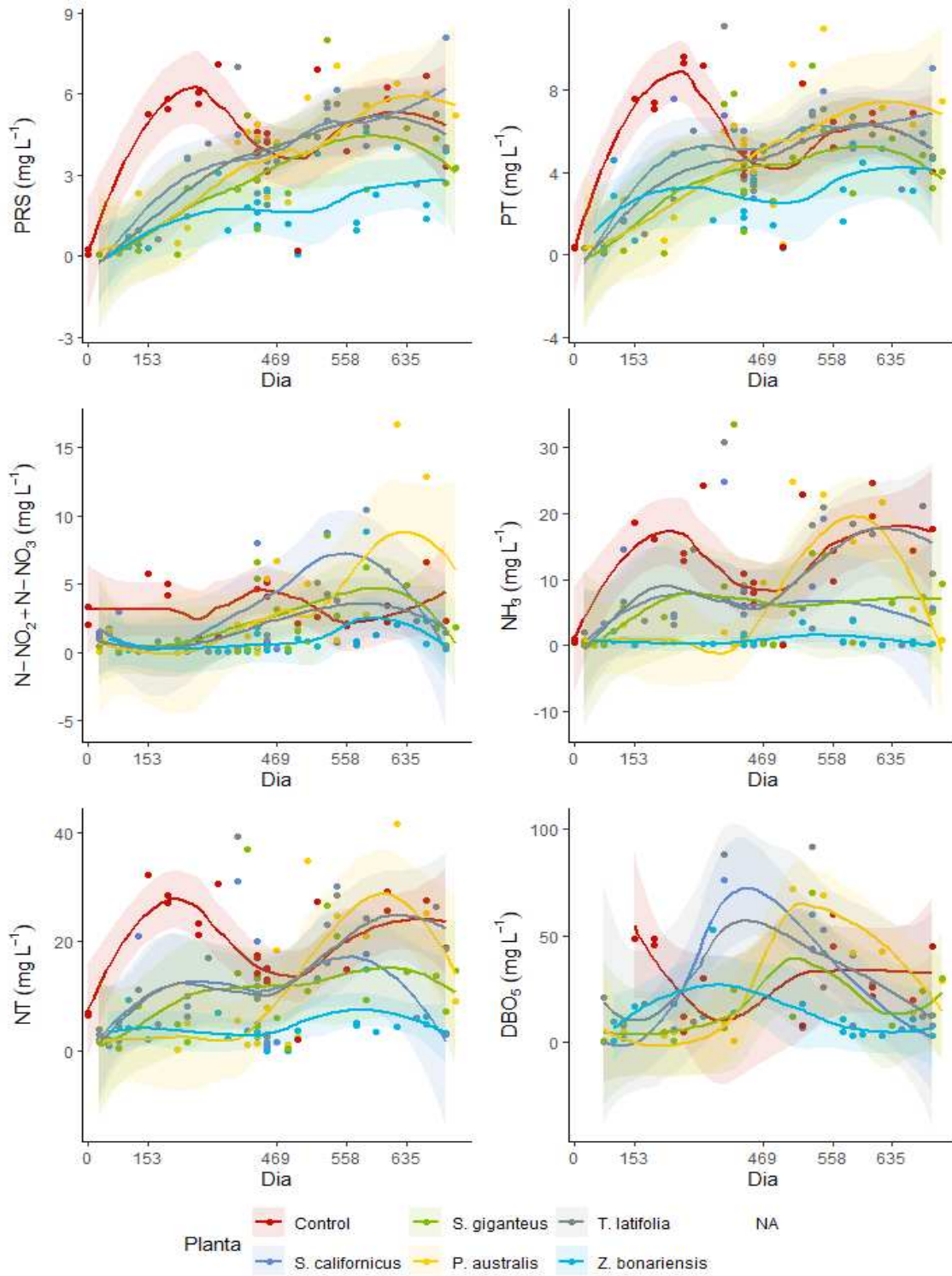
rendimiento mayor en LECA. No se encontraron trabajos previos que demuestren el efecto de la vegetación, la variación específica y su interacción con el sustrato sobre la eficiencia de remoción de fósforo. La remoción de amoníaco, en cambio, se vio afectada solo por el tratamiento y las máximas eficiencias se alcanzaron con las mismas combinaciones de tratamientos y sustratos que para el fósforo. Se encontraron fuertes indicios de que las diferencias de rendimiento en la oxidación de amoníaco se pueden explicar por la provisión diferencial de oxígeno por ROL. La remoción de NT estuvo ligada a la oxidación microbológica de amoníaco que, bajo condiciones microaeróbicas, encuentra facilitado el acoplamiento con procesos de reducción del nitrógeno oxidado con eliminación final de nitrógeno gaseoso. Finalmente, la remoción de DBO<sub>5</sub>, afectada más por el factor tiempo que por sustrato y tratamiento, alcanzó las máximas eficiencias con las mismas combinaciones de sustrato y tratamiento y tampoco se encontraron en trabajos previos evidencia de ello.

Las especies endémicas *S. giganteus* y *Z. bonariensis*, junto a *S. californicus* de distribución americana, superaron a las especies cosmopolitas *T. latifolia* y *P. australis*, ampliamente utilizadas en humedales construidos de todo el mundo, en los rendimientos de remoción de DBO<sub>5</sub>, nitrógeno y fósforo.





**Figura suplementaria 3.2.** Variaciones en las concentraciones de nutrientes (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>+N-NO<sub>3</sub>, NT, PT, PRRS) y DBO<sub>5</sub> durante el experimento en los mesocosmos con sustrato de conchilla. Los valores son del punto de muestreo de salida (superficie).



**Figura suplementaria 3.3.** Variaciones en las concentraciones de nutrientes ( $\text{N-NH}_3$ ,  $\text{N-NO}_2 + \text{N-NO}_3$ , NT, PT, PRRS) y  $\text{DBO}_5$  durante el experimento en los mesocosmos con sustrato de LECA. Los valores son del punto de muestreo de salida (superficie).

	Variable	Control	<i>P. australis</i>	<i>S. californicus</i>	<i>S. giganteus</i>	<i>T. latifolia</i>	<i>Z. bonariensis</i>
<b>CONCHILLA</b>	<b>PRS</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	3,26 (±1,73)	2,16 (±2,05)	1,91 (±1,94)	1,24 (±1,13)	1,72 (±1,39)	1,84 (±1,85)
	<b>PT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	4,1 (±2,1)	2,7 (±2,51)	2,35 (±2,35)	1,56 (±1,37)	2 (±1,53)	2,59 (±2,19)
	<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	11,88 (±9,13)	5,96 (±7,85)	2,5 (±3,87)	2,1 (±2,03)	7,38 (±7,9)	7,48 (±8,74)
	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	4,44 (±3,19)	2,55 (±3,16)	2,85 (±4,51)	2,62 (±3,14)	2,22 (±2,82)	2,04 (±2,16)
	<b>NT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	20,03 (±10,71)	10,36 (±10,72)	7,9 (±7,86)	6,95 (±5,62)	11,41 (±9,35)	12,94 (±10,41)
	<b>DBO<sub>5</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	23,77 (±17,51)	15,62 (±18,27)	8,54 (±14,32)	10,45 (±14,25)	23,67 (±17,25)	22 (±23,54)
<b>LECA</b>	<b>PRS</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	4,44 (±2,07)	3,35 (±2,42)	3,13 (±2,26)	2,72 (±2,14)	3,13 (±2,18)	1,73 (±1,36)
	<b>PT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	5,6 (±2,73)	4,42 (±3,2)	4,24 (±2,84)	3,49 (±2,71)	3,94 (±2,79)	3,05 (±1,93)
	<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	12,5 (±7,24)	5,21 (±8,43)	5,4 (±6,72)	5,66 (±7,71)	8,27 (±9,11)	0,75 (±1,07)
	<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	3,52 (±2,19)	2,95 (±4,41)	3,22 (±3,68)	2,28 (±2,48)	1,8 (±2,14)	1,11 (±1,82)
	<b>NT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	19,65 (±8,4)	10,58 (±12,52)	10,52 (±9,41)	10,3 (±9,07)	12,79 (±10,93)	4,57 (±3,62)
	<b>DBO<sub>5</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	32,08 (±17,99)	24,5 (±26,2)	23,5 (±27,01)	17,57 (±19,41)	28,38 (±29,14)	11,47 (±12,68)

**Tabla suplementaria 3.1.** Concentraciones de nutrientes (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+ N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NT, PT, PRS) y DBO<sub>5</sub> promedio (±DS) en los tratamientos. Los valores son del punto de muestreo de salida (superficie).

		Tiempo (T)	Planta (P)	Sustrato (S)	T*P	T*S	P*S	T*P*S
<b>PRS</b>	F	14.50	4.20	7.33	0.53	0.95	0.52	0.18
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.98	0.52	0.76	0.99
	$\eta^2$	0.57	0.04	0.01	0.10	0.04	0.00	0.00
<b>PT</b>	F	41.03	24.19	60.94	3.88	3.92	4.81	1.78
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.06
	$\eta^2$	0.96	0.67	0.51	0.86	0.59	0.29	0.34
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	F	4.19	2.15	0.10	0.75	0.59	2.36	0.97
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	0.06	0.74	0.95	0.93	<b>0.04*</b>	0.49
	$\eta^2$	0.27	0.02	0.00	0.14	0.02	0.02	0.03
<b>N-NH<sub>3</sub></b>	F	12.56	9.20	2.94	0.77	0.74	1.38	0.42
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.08	0.93	0.79	0.23	0.97
	$\eta^2$	0.53	0.09	0.00	0.14	0.03	0.01	0.01
<b>NT</b>	F	30.25	47.03	0.69	6.01	3.39	5.87	1.52
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.41	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.01
	$\eta^2$	0.95	0.80	0.01	0.90	0.56	0.33	0.30
<b>Temperatura</b>	F	394.55	0.60	0.16	0.60	0.47	0.81	1.20
°C	p	<b>&lt;0.01*</b>	0.69	0.68	0.99	0.96	0.53	0.30
	$\eta^2$	0.97	0.00	0.00	0.10	0.02	0.01	0.01
<b>pH</b>	F	6.12	6.93	3.65	0.49	0.46	0.13	0.21
	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.06	1.00	0.97	0.98	0.95
	$\eta^2$	0.35	0.01	0.00	0.09	0.02	0.00	0.00
<b>SDT</b>	F	22.95	7.34	2.77	0.88	1.30	1.90	0.04
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.09	0.68	0.22	0.11	0.83
	$\eta^2$	0.66	0.11	0.01	0.12	0.04	0.02	0.00
<b>OD</b>	F	1.99	2.89	0.18	1.32	0.32	0.01	0.05
<i>mg L<sup>-1</sup></i>	p	<b>&lt;0.01*</b>	<b>&lt;0.01*</b>	0.66	0.05	0.99	1.00	0.99
	$\eta^2$	0.18	0.04	0.00	0.24	0.01	0.00	0.00

**Tabla suplementaria 3.2.** Resultados para el RM-ANOVA de cada variable durante el experimento, indicando el F de Fisher, los valores de p corregidos por Bonferroni y los valores de  $\eta^2$  generalizados. Los resultados significativos ( $p < 0.05$ ) se muestran en negrita con un asterisco (\*).

## CAPÍTULO 4

# SISTEMA DE HUMEDALES HÍBRIDO EN UNA ESCUELA RURAL

### Introducción y objetivos

Las tecnologías de tratamiento de aguas residuales con humedales construidos se desarrollaron y expandieron en numerosos países durante las últimas décadas y se inscriben en la categoría de los llamados tratamientos extensivos. Estos ocupan, por definición, más superficie que las tecnologías convencionales clásicas desarrolladas para grandes conglomerados urbanos. No obstante, un reciente estudio de caso en Beijing encontró, más allá de la creencia convencional, que el uso total de tierra (incluyendo el uso indirecto) requerido para el tratamiento por unidad de aguas residuales es menor para un CW que para un sistema convencional centralizado (Fan et al. 2021). Además, los costos de inversión de los procesos extensivos son generalmente inferiores y las tareas de operación y mantenimiento son más sencillas, más flexibles y más económicas en cuanto a consumo de energía, insumos y reparaciones de equipamiento. Estas técnicas necesitan menos personal con menor capacitación que las técnicas intensivas. Son recomendados para núcleos urbanos que no superen algunos miles de habitantes (Comisión Europea et al. 2001). Su utilización permite alcanzar una solución descentralizada y sustentable para diversas situaciones como viviendas individuales o establecimientos de ocupación temporaria o de baja población como campings, escuelas y hosterías, ubicados en zonas rurales o periféricas a los centros urbanos. También son aplicables en pequeños pueblos y barrios periféricos de las ciudades, aislados de las redes cloacales por distancia o cuestiones topográficas, donde la cantidad de personas servidas no es suficiente para justificar o afrontar los costos de instalación de servicios de tratamiento convencionales que se puedan financiar o solventar con el abono de una tasa por servicio. En estos lugares, suele utilizarse el pozo absorbente como sistema de tratamiento y disposición del agua servida, o también el pozo negro, esto es, su versión sin el tratamiento previo en una cámara séptica. Esta opción no representa en realidad un sistema de tratamiento y su uso resulta a menudo en costos periódicos para el vaciado del pozo y en la contaminación de las aguas subterráneas, que en muchos casos es la fuente de provisión de agua del lugar.

El **objetivo** de este trabajo fue evaluar el rendimiento de un sistema de humedales construido diseñado para el tratamiento secundario de las aguas residuales, con énfasis en la remoción de fósforo y nitrógeno, en una situación real de pequeña escala, la escuela rural EGB N° 11 de la localidad de Hudson (Berazategui).

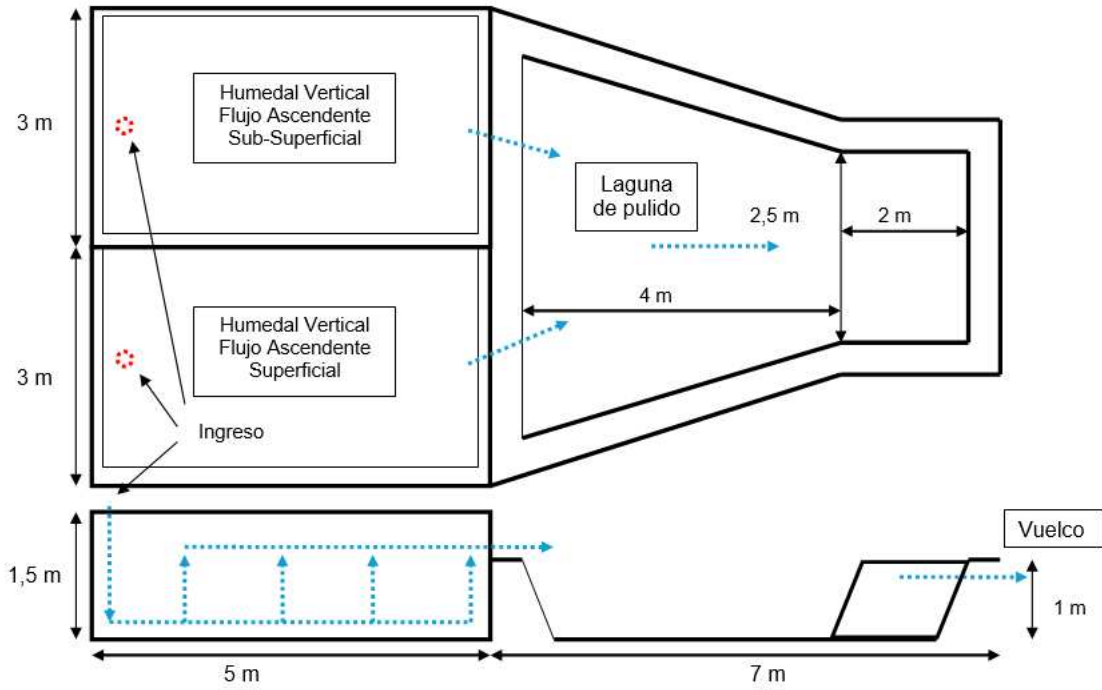
## Materiales y métodos

### Diseño de la planta y diseño experimental

La escuela EGB N°11 (-34.805837, -58.128885) contó con una población aproximada de 70 alumnos y 10 docentes y personal auxiliar, con un régimen de jornada extendida que contemplaba la provisión del almuerzo a docentes y alumnos.

Para el diseño de la planta se utilizaron los criterios bibliográficos disponibles junto a innovaciones derivadas de los resultados obtenidos de trabajos experimentales previos (Di Giorgi, Rep, y Mariñelarena 2009).

El diseño de la planta incluyó (**Figura 4.1**) una cámara séptica de 12 m<sup>3</sup> de capacidad y 4 días de tiempo de residencia hidráulica que recibía todas las corrientes de aguas servidas (baños, cocina, lavado de pisos, etc.). Su efluente se repartía en dos cubetas de humedales de 3 m x 5 m (área 15 m<sup>2</sup>) y 1,5 m de profundidad, impermeabilizadas con doble lámina de polietileno de 500 µm, rellenas con conchilla lavada. Para asegurar un reparto equitativo se instaló, en el extremo del caño de entrada a cada humedal, un codo a 90° cuyo giro permitió regular el caudal. Los humedales se diseñaron con un esquema de flujo vertical ascendente. El ingreso del agua fue por un caño vertical que la conducía a otro caño cribado apoyado en el fondo, en sentido longitudinal, por donde el agua a tratar difundía a través del medio poroso. En una cubeta (**HAL**) con 70 cm de espesor de sustrato, el agua atravesaba el sustrato para luego fluir en una capa de 40 cm de agua libre hasta alcanzar la salida a 110 cm sobre el fondo. En la otra (**HSS**), con 120 cm de espesor de sustrato, el agua hacía el mismo recorrido, pero no afloraba porque antes salía por un caño cribado incluido en los 10 cm superficiales del sustrato. En ambas cubetas se plantaron ejemplares de espadaña (*Zizaniopsis bonariensis*). La salida del agua de los humedales descargaba en una laguna de pulido (área 18 m<sup>2</sup>; profundidad 1 m), donde atravesaba un lecho de conchilla vegetado para descargar finalmente en el cauce del arroyo Baldovinos.



**Figura 4.1.** Esquema de la planta ecotecnológica de la EGB11 en vista de planta (arriba) y corte longitudinal (abajo). Las muestras fueron colectadas a la salida de los humedales de flujo ascendente subsuperficial (HSS) y superficial (HAL) y en el vuelco de la laguna de pulido (LP).



**Figura 4.2.** Fotografías de los humedales verticales ascendentes superficial (derecha) y sub-superficial (izquierda) y de la laguna de pulido (abajo)

Entre el 2/10/2009 y el 15/11/2011 se tomaron muestras de agua en 18 oportunidades, en cuatro puntos del sistema de tratamiento: salida de la cámara séptica (**CS**), salida del humedal subsuperficial (**HSS**), salida del humedal con agua libre (**HAL**) y salida de la laguna de pulido (**LP**).

### Mediciones de caudal

La escuela contaba con una provisión de agua subterránea a través de una perforación al acuífero Puelche. Una bomba sumergible elevaba el agua hasta un tanque que abastecía a toda la escuela. El caudal diario de aguas residuales que recibía el sistema de tratamiento se estimó a partir de: a) la medición *in situ* del caudal de envío de la bomba; b) el registro del tiempo de funcionamiento de la bomba mediante instalación de un horómetro, y c) la medición del caudal de vertido en cada muestreo.

Con el caudal de envío de la bomba y el registro del tiempo de funcionamiento diario se calculó el consumo de agua diario de la escuela, para luego calcular las tasas de retención de nutrientes. Las mediciones del caudal de vertido al final de la planta fueron tomadas después del mediodía, dentro de la franja horaria de mayor caudal debido al aporte de la cocina, para representar el caudal punta.

### Parámetros físico-químicos y bacteriológicos

Durante el período de experimentación, (2/10/2009 - 15/11/2011), se tomaron muestras de agua en 18 oportunidades, en cuatro puntos del sistema de tratamiento: salida de la cámara séptica (CS), salida del humedal subsuperficial (HSS), salida del humedal con agua libre (HAL) y salida de la laguna de pulido (LP).

En cada fecha de muestreo se midieron *in situ* la temperatura, el pH, la conductividad eléctrica y el oxígeno disuelto utilizando los materiales y siguiendo los métodos descritos en el capítulo 2. Se colectaron muestras para análisis de carga orgánica, nutrientes y bacterias indicadoras de contaminación fecal.

En el laboratorio se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST) por filtración por filtro de fibra de vidrio y gravimetría (SMWW 2540 D). Se estimó la carga orgánica como Demanda Química de Oxígeno (DQO) por la técnica colorimétrica de reflujos cerrados (SMWW 5220 D), y mediante el ensayo de Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en 5 días (SMWW 5210 B)

Del mismo modo se determinaron las concentraciones de amoníaco ( $\text{N-NH}_3$ ) por el método de azul de indofenol (Solórzano, 1969; Pai et al., 2001), de nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ ) por el método espectrofotométrico ultravioleta de segunda derivación (SMWW 4500-NO<sub>3</sub>-C), de nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ) por diazotación con sulfanilamida y de fósforo reactivo soluble (PRS) por el método del azul de molibdeno (Murphy y Riley 1962; Nagul et al. 2015). Para cuantificar el nitrógeno total (NT) y el fósforo total (PT) se utilizó el método de oxidación simultánea con persulfato (APHA, 2017; Crumpton et al., 1992) y determinación posterior del NT como nitrato y el PT como fosfato.

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal, se cuantificaron mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples estándar para coliformes totales y fecales (SMWW 9221 B, C y E).

#### Análisis de datos

Se compararon las diferencias de concentraciones de materia orgánica y nutrientes entre las salidas de los HSS, HAL y la LP en relación a la entrada al sistema mediante Análisis de la Varianza considerando los siguientes factores y niveles:

- Factor **Sitio**, con tres niveles llamados: HSS, HAL y LP.
- Factor **Tiempo**, con 16 niveles indicando los días desde que comenzó el experimento: 0, 42, 84, 112, 144, 165, 200, 228, 340, 354, 389, 417, 442, 502, 529, 571 días.

Para analizar la diferencia en la abundancia bacteriana entre la entrada a los humedales y los sitios de muestreo, en el ANOVA se agregó el nivel ST. Los datos de abundancia bacteriana fueron convertidos a logaritmo, y para ser coherente con la bibliografía comúnmente utilizada respecto a esta variable, se expresan los datos por su media geométrica y coeficiente geométrico de variación (CGV) en vez de promedio y desvío estándar, respectivamente.

Previamente a cada análisis, se revisaron los principios de normalidad mediante el test de Cochran, y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Además, se calculó  $\eta^2$  generalizado para medir el tamaño del efecto de los factores.

Adicionalmente, se utilizaron modelos lineales generalizados para estudiar las relaciones entre los porcentajes de retención de NT, PT, DQO y  $\text{N-NH}_3$  con las variables físico-químicas (pH, conductividad y temperatura) para tratar de explicar las variaciones durante el año en la remoción de nutrientes. La normalidad de la distribución de frecuencia de las variables fue comprobada por el test de Shapiro-Wilks, y los modelos óptimos fueron seleccionados mediante el criterio de información de Akaike (AIC).

Las tasas de carga y de remoción de NT, PT, DBO<sub>5</sub> y N-NH<sub>3</sub> fueron calculados (Kadlec y Wallace 2009)

$$Tasa\ de\ carga\ (g\ m^{-2}\ d^{-1}) = \frac{Q_i C_i}{A}$$

$$Tasa\ de\ remoción\ (g\ m^{-2}\ d^{-1}) = \frac{(Q_i C_i - Q_o C_o)}{A}$$

Donde  $C_i$  es la concentración de entrada,  $C_o$  la concentración de salida,  $Q_i$  el caudal de entrada,  $Q_o$  el caudal de salida y  $A$  el área del mesocosmos. Para LC,  $C_i$  se calculó como el promedio de las salidas de HAL y HSS

Dado que las concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no pueden considerarse parte de la entrada debido a su eliminación previa al ingreso del agua a los mesocosmos, y que resultan de procesos que ocurren dentro de los sistemas, las tasas de carga y remoción de estos compuestos no se incluyen en los resultados

## Resultados

### Caudal

En base al registro del horómetro de la bomba se calculó un consumo promedio de agua de  $3,8 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ . Para una población de 80 personas, equivale a unos 47 L por persona y por día, muy cercano al valor promedio de 42 L propuesto para escuelas en la bibliografía. El caudal instantáneo de aguas residuales registrado durante el monitoreo fue muy variable, desde  $0,06$  hasta  $2,70 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , con un valor promedio de  $0,18 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ .

La **Tabla Suplementaria 4.1** reúne los datos que permiten controlar si la estimación de caudal resulta razonable. Se comparan las concentraciones promedio de  $\text{DBO}_5$ , TN y TP medidas en la salida de la cámara séptica con las concentraciones esperadas para el agua residual cruda a partir del caudal, las cargas y una remoción implícita en la cámara séptica (Tchobanoglous et al. 2014). Concluimos que adoptar el valor de  $42 \text{ L p}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $3,36 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ) para los cálculos de remoción era razonable, lo que se traduce en una tasa de carga hidráulica de  $0,112 \text{ m}^3 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  para los humedales (HSS y HAL) y  $0,187 \text{ m}^3 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  para la laguna (LP).

### Concentraciones de materia orgánica y nutrientes

En la **Figura 4.3** y en la **Tabla Suplementaria 4.3** se pueden ver las concentraciones promedio de DQO y de los distintos compuestos de nitrógeno y fósforo en cada punto de muestreo durante todo el monitoreo, y en la **Figura Suplementaria 4.1** sus variaciones a lo largo del tiempo de experimentación. En CS, el promedio de DQO fue de  $344,06 (\pm 156,08) \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en HSS se registró un valor de  $82,06 (\pm 27,81) \text{ mg L}^{-1}$  y en HAL, el promedio alcanzó  $63,94 (\pm 25,09) \text{ mg L}^{-1}$ . En LP, se registró el valor más bajo, con  $42,81 (\pm 12,38) \text{ mg L}^{-1}$ . La concentración de DQO fue menor en la salida de LP que en la entrada ( $F=63,05$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta^2=0,79$ , **Tabla Suplementaria 4.4**).

Los valores más elevados de  $\text{N-NH}_3$  se encontraron en CS, con un promedio de  $41,22 (\pm 14,40) \text{ mg L}^{-1}$ . En HSS, el valor medio fue de  $36,45 (\pm 11,00) \text{ mg L}^{-1}$ , seguido por HAL con  $30,35 (\pm 10,53) \text{ mg L}^{-1}$ . Finalmente, en LP, el promedio fue de  $28,35 (\pm 8,41) \text{ mg L}^{-1}$ . La concentración de  $\text{N-NH}_3$  varió significativamente entre sitios de muestreo y en el tiempo (**Tabla Suplementaria 4.4**), siendo menores en HAL y LP que en los otros dos sitios.

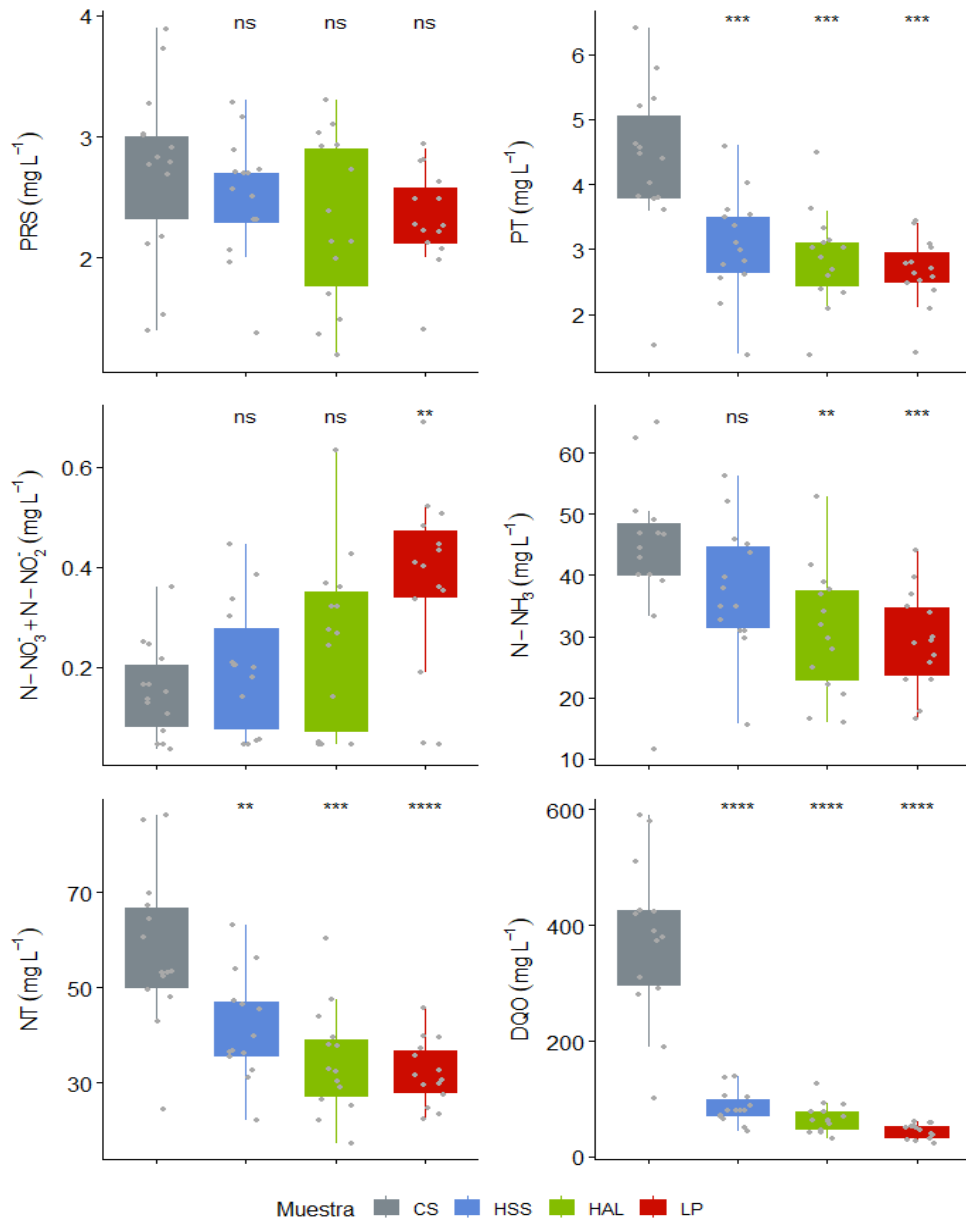
El contenido de  $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$  varió entre los puntos de muestreo, siendo mayor en LP con un promedio de  $0,36 (\pm 0,18) \text{ mg L}^{-1}$ . En HAL, se obtuvo un valor medio de  $0,23 (\pm 0,17) \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en HSS fue de  $0,19 (\pm 0,13) \text{ mg L}^{-1}$ . El menor promedio se registró en CS con

0,14 ( $\pm$  0,09) mg L<sup>-1</sup>. La concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fue significativamente mayor en LP con respecto a los puntos de muestreo dentro del humedal y de CS (**Tabla Suplementaria 4.4**).

Los valores más elevados de NT se determinaron en CS, con un promedio de 54,06 ( $\pm$  21,63) mg L<sup>-1</sup>, HSS y HAL mostraron valores de 40,13 ( $\pm$  10,26) mg L<sup>-1</sup> y 33,93 ( $\pm$  13,53) mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En LP, el promedio fue el menor, alcanzando 29,80 ( $\pm$  8,87) mg L<sup>-1</sup>. La concentración de NT fue significativamente menor en los puntos dentro del humedal y en LP comparados con CS (**Tabla Suplementaria 4.4**), y variaron a lo largo del tiempo.

El punto de muestreo con la mayor concentración de PT fue CS, con un promedio de 4,06 ( $\pm$  1,42) mg L<sup>-1</sup>. En HSS y HAL, los valores medios fueron de 3,05 ( $\pm$  0,73) mg L<sup>-1</sup> y 2,83 ( $\pm$  0,92) mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En LP, el promedio más bajo fue de 2,52 ( $\pm$  0,67) mg L<sup>-1</sup>. La concentración de PT fue significativamente menor en los puntos dentro del humedal y en LP comparados con CS (**Tabla Suplementaria 4.4**).

Las concentraciones de PRS mostraron la menor variabilidad entre los puntos de muestreo. En CS, se obtuvo el mayor promedio con 2,61 ( $\pm$  0,72) mg L<sup>-1</sup>, seguido de HSS con 2,41 ( $\pm$  0,55) mg L<sup>-1</sup>. En HAL, el valor medio fue de 2,23 ( $\pm$  0,69) mg L<sup>-1</sup>, mientras que, en LP, se registró 2,28 ( $\pm$  0,43) mg L<sup>-1</sup>. La concentración de PRS no fue significativamente distinta entre los puntos de muestreo y fue homogénea en el tiempo (**Figura Suplementaria 4.1**).



**Figura 4.3.** Diagrama de cajas de las concentraciones de nutrientes (SRP, PT, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>, NT) y DQO en los distintos puntos de muestreo del humedal artificial durante todo el experimento.

## Remoción de materia orgánica y nutrientes

En la **Figura 4.4** se muestran las tasas de remoción de DQO, N-NH<sub>3</sub>, NT y PT (promedio y SD) en los humedales (HSS y HAL) y en la laguna de pulido (LP) a lo largo del monitoreo.

La remoción de PT presentó la mayor tasa en HAL con 0,14 ( $\pm 0,11$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, seguida por HSS con 0,12 ( $\pm 0,1$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, mientras que LP mostró el menor valor con 0,06 ( $\pm 0,07$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Los porcentajes de remoción de PT fueron significativamente distintos entre los tres sitios muestreados (F=18,83; p<0,01;  $\eta^2=0,51$ ), siendo mayores en HAL con 32,7 %, seguido de HSS con 28,7 %, mientras que LP registró el menor valor con 9,2 % (**Tabla 4.1**)

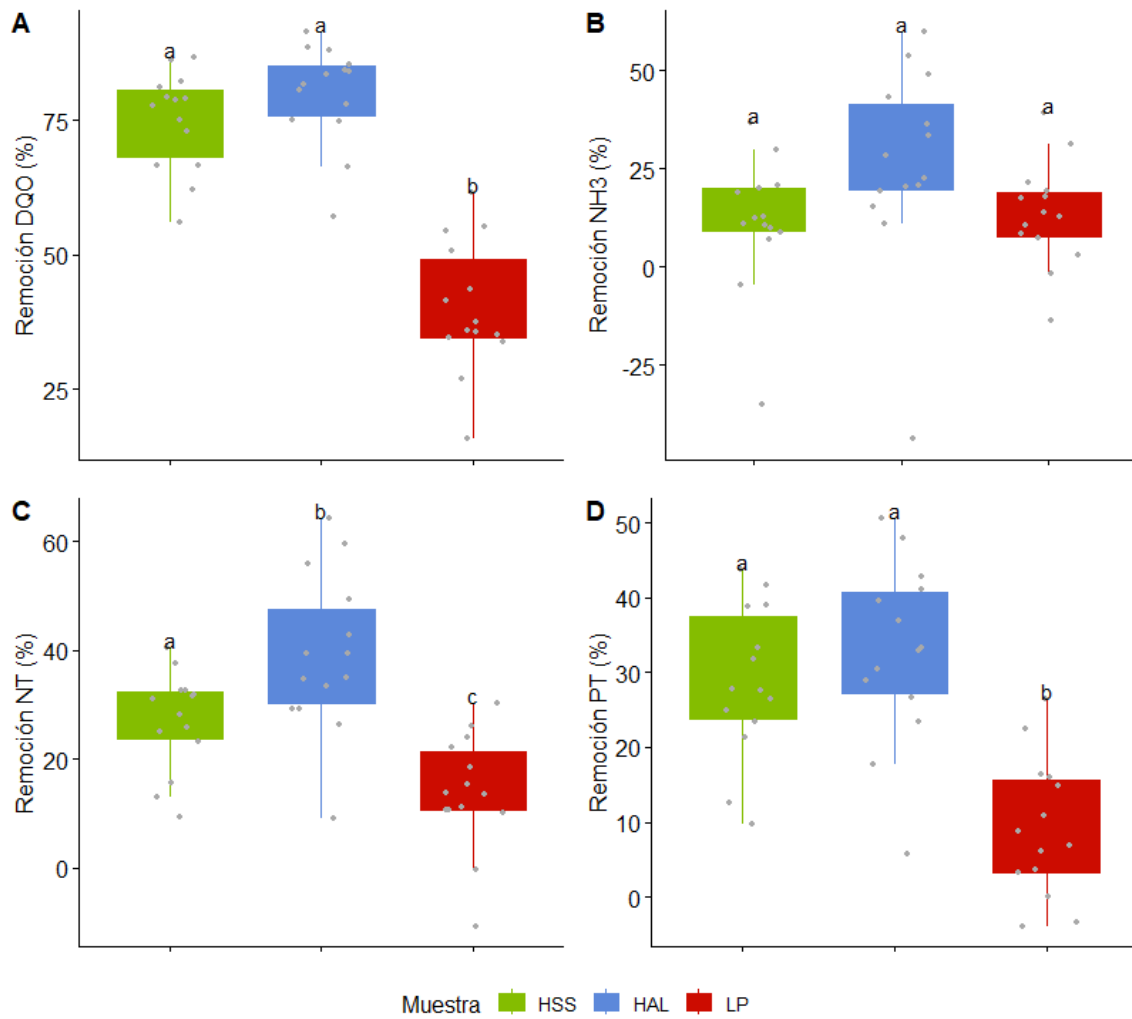
HAL presentó la mayor tasa de remoción de DBO<sub>5</sub> con 24,27 ( $\pm 12,59$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, superando a HSS, que registró un valor de 22,19 ( $\pm 12,82$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, mientras que LP mostró la menor tasa con 7,9 ( $\pm 3,72$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Los porcentajes de remoción de DBO<sub>5</sub> fueron significativamente distintos entre los tres sitios muestreados (F=58,23; p<0,01;  $\eta^2=0,76$ ), siendo mayores en HAL con 80,0 %, seguido de HSS con 75,1 %, mientras que LP registró 40,2 %. Para la DQO, la Figura 4.4 revela un rendimiento similar en HAL y HSS (81,4 % y 76,1% respectivamente) y significativamente menor para LP (41,4 %).

La mayor tasa de remoción de N-NH<sub>3</sub>, se observó en HAL con 1,22 ( $\pm 1,25$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, seguida de LP con 0,94 ( $\pm 0,84$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y HSS con 0,53 ( $\pm 0,83$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Los porcentajes de remoción de amonio no mostraron diferencias significativas (F=2,65; p=0,08;  $\eta^2=0,12$ ), siendo mayores en HAL con un promedio de 26,4 %, seguido de LP con 13,4 %, mientras que HSS mostró la menor eficiencia con 11,3 %.

HAL también registró la mayor tasa de remoción de NT con 2,22 ( $\pm 1,66$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, seguido de HSS con 1,49 ( $\pm 1,22$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, mientras que LP presentó el menor valor con 1,1 ( $\pm 0,88$ ) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Al igual que los otros nutrientes, los porcentajes de remoción de NT fueron mayores en HAL con 39,1 %, seguido de HSS con 27,0 %, mientras que LP alcanzó el menor valor con 13,9 %. Los porcentajes de remoción fueron significativamente distintos entre los tres sitios muestreados (F=15,62; p=0,01;  $\eta^2=0,46$ )

		HSS	HAL	LP
<b>PT</b> <i>g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	TC	0,46 (±0,15)	0,46 (±0,15)	0,55 (±0,13)
	TR	0,12 (±0,1)	0,14 (±0,11)	0,06 (±0,07)
	%	28,7	32,7	9,2
<b>DBO<sub>5</sub></b> <i>g DBO<sub>5</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	TC	29,74 (±14,46)	29,74 (±14,46)	10,86 (±4,46)
	TR	22,19 (±12,82)	24,27 (±12,59)	7,9 (±3,72)
	%	75,1	80,0	40,2
<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>g N-NH<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	TC	4,62 (±1,61)	4,62 (±1,61)	6,23 (±1,91)
	TR	0,53 (±0,83)	1,22 (±1,25)	0,94 (±0,84)
	%	11,3	26,4	13,4
<b>NT</b> <i>g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	TC	6,01 (±2,11)	6,01 (±2,11)	6,93 (±1,93)
	TR	1,49 (±1,22)	2,22 (±1,66)	1,1 (±0,88)
	%	27,0	39,1	13,9

**Tabla 4.1.** Tasas de carga y de remoción en los tratamientos con respecto a CS de DBO<sub>5</sub>, N-NH<sub>3</sub>, NT y PT, y el porcentaje de remoción (%) en función de la carga.

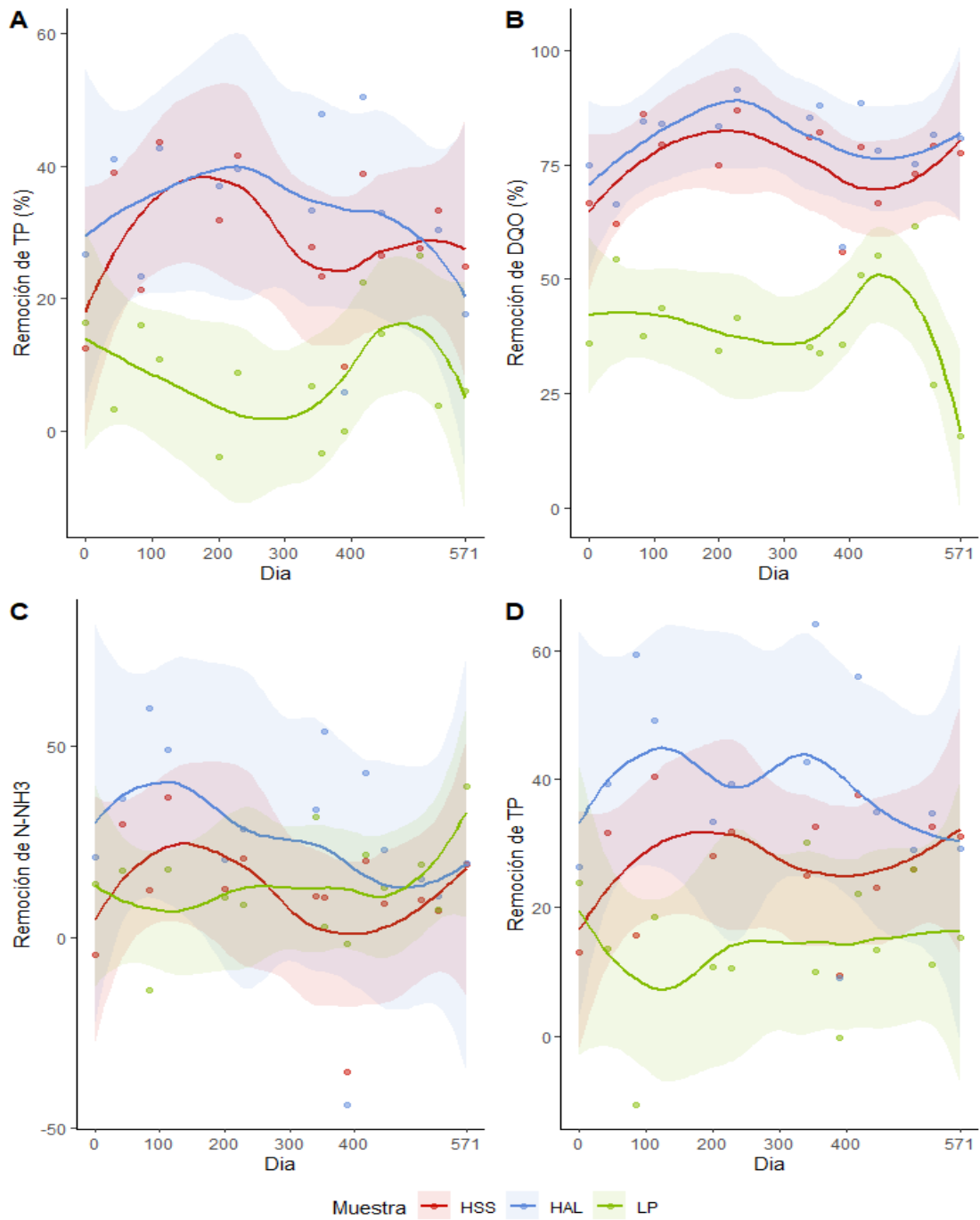


**Figura 4.4.** Porcentaje de remoción de DQO, N-NH<sub>3</sub>, NT y PT en los tres sitios de muestreo en el humedal (HSS, HAL y LP), calculado en referencia a lo que ingresa al humedal (CS).

A pesar de las variaciones de los porcentajes de remoción de PT, DQO, N-NH<sub>3</sub> y NT durante el experimento (**Figura 4.5**), no hubo diferencias en el tiempo dentro de cada sitio de muestreo (**Tabla 4.2**), indicando que la remoción fue homogénea durante el año.

		Sitio	Tiempo	Sitio* Tiempo
% Remoción PT	F	18,83	0,25	0,23
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,68	0,79
	η <sup>2</sup>	0,51	0,00	0,01
% Remoción NT	F	15,62	0,00	0,68
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,95	0,51
	η <sup>2</sup>	0,46	0,00	0,03
% Remoción N-NH <sub>3</sub>	F	2,65	0,83	1,73
	p	0,08	0,36	0,19
	η <sup>2</sup>	0,12	0,02	0,08
% Remoción DBO <sub>5</sub>	F	58,23	0,04	0,23
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,83	0,79
	η <sup>2</sup>	0,76	0,00	0,01

**Tabla 4.2.** Resultados del ANOVA-MR (F, p-valor y η<sup>2</sup>) para las remociones de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub> con relación al sitio de muestreo (HSS, HAL, LP) y el tiempo (día) de muestreo.

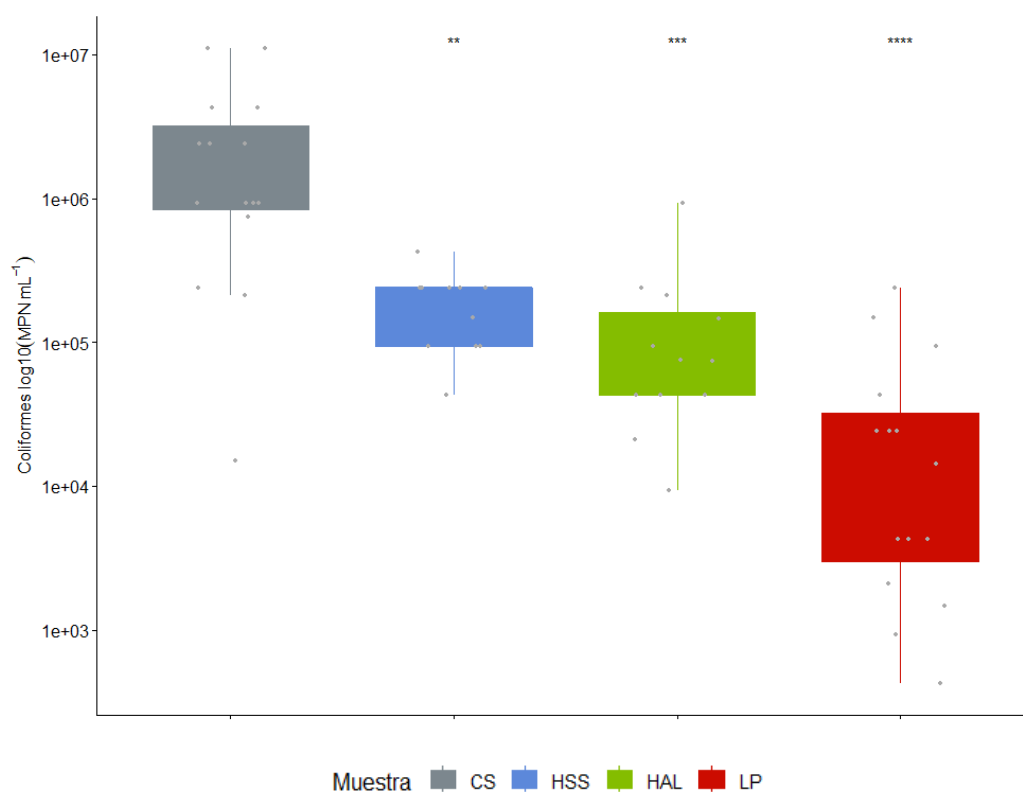


**Figura 4.5.** Variaciones en la remoción de DQO, N-NH<sub>3</sub>, NT y TP en los tres sitios de muestreo en el humedal (HSS, HAL y LP) durante los 571 días del período de estudio.

## Bacterias coliformes fecales

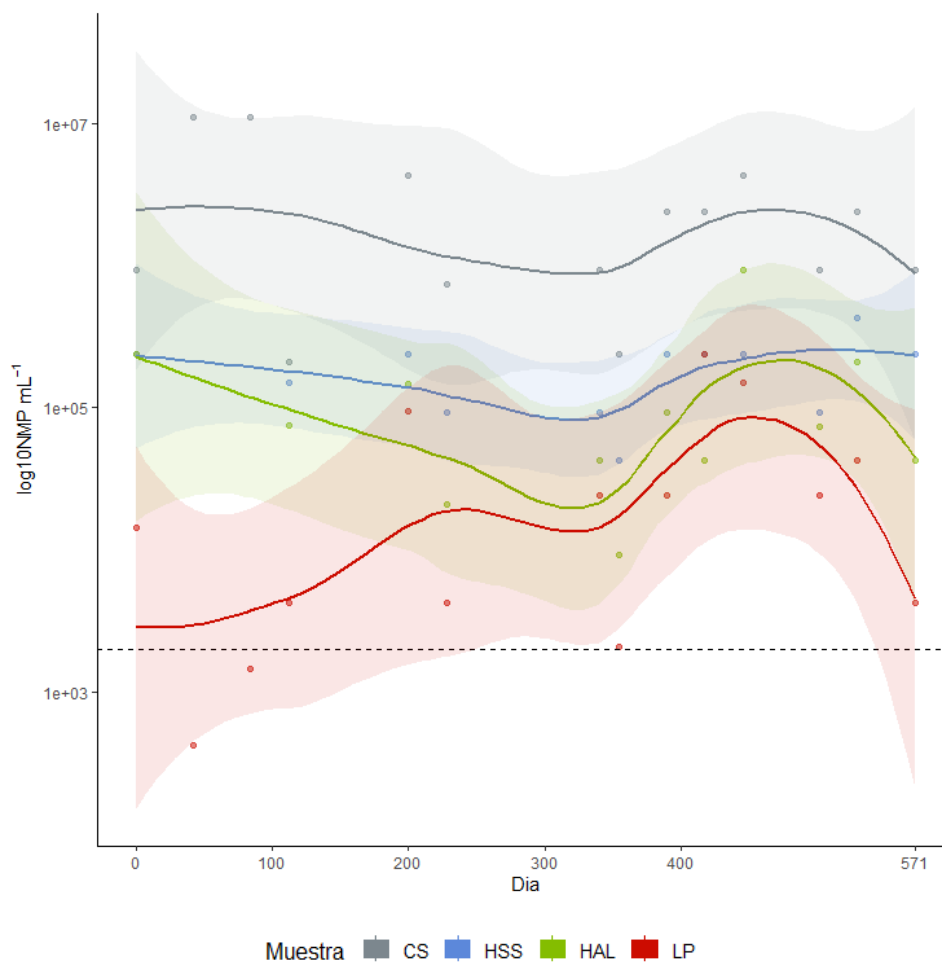
La media geométrica de la densidad de coliformes fecales en CS fue de  $1,33 \times 10^6$  MPN  $100 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 431\%$  CGV), en HSS de  $2,16 \times 10^5$  MPN  $100 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 191\%$  CGV), en HAL de  $1,06 \times 10^5$  MPN  $100 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 374\%$  CGV) y finalmente en LP de  $1,27 \times 10^4$  MPN  $100 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 533\%$  CGV).

Los resultados estadísticos muestran disminución significativa de coliformes fecales (**Figura 4.6**) en los puntos de muestreo HAL y LP con respecto a ASV, y entre los tres puntos de muestreo con respecto al ingreso (CS).



**Figura 4.6.** Densidad de bacterias coliformes fecales (NMP  $100 \text{ mL}^{-1}$ ) en los tres sitios de muestreo en el humedal (HSS, HAL y LP) con respecto a la entrada (CS). La escala del eje Y se muestra en log10.

Durante todo el experimento, y a pesar de la disminución de la densidad de coliformes fecales a través del tratamiento, los valores en el efluente final se mantuvieron por encima del valor límite de vuelco de  $2000 \text{ NMP mL}^{-1}$  (**Figura 4.7**).



**Figura 4.7.** Densidad de bacterias coliformes fecales (NMP mL<sup>-1</sup>) en los tres sitios de muestreo en el humedal (HSS, HAL y LP) con respecto a la entrada (CS) a lo largo del experimento. La línea punteada indica el límite legal para los vuelcos.

#### Relaciones entre la remoción de contaminantes y las variables fisicoquímicas

Los valores promedio de las variables fisicoquímicas medidas *in situ* y sus desvíos estándar se muestran en la **Tabla Suplementaria 4.3** y sus variaciones en el tiempo de experimentación en la **Figura Suplementaria 4.2**.

Los resultados de los modelos lineales generalizados mostraron que el pH estuvo relacionado con las variaciones en el porcentaje de remoción de NT, PT y DQO, mientras que el PT y el PRS se relacionaron con el porcentaje de remoción de DQO y de N-NH<sub>3</sub> (**Tabla 4.3**). El ajuste de los mejores modelos para las cuatro variables fue moderado ( $0,4 > R^2 < 0,7$ ).

<b>Variable</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Variables significativas (p&lt;0.05)</b>
% remoción DQO	0,68	pH + COND + PRS + PT
% remoción N-NH <sub>3</sub>	0,51	PRS + PT
% remoción NT	0,47	pH
% remoción PT	0,45	pH

**Tabla 4.3.** Resumen de resultados de los GLM vinculando los % de remoción global de N, PT y DQO con las variables físico-químicas medidas en el agua (Temperatura, pH, Conductividad, Turbidez) y su variación en el tiempo (Fecha).

## Discusión

Los resultados demuestran que el sistema de tratamiento es capaz de remover los contaminantes presentes en el agua residual con elevada eficacia respecto de la carga orgánica y con una eficacia moderada para nitrógeno y fósforo. La remoción de coliformes fecales, aunque significativa a lo largo del sistema de humedales, resultó insuficiente para alcanzar el valor límite impuesto por la normativa local para descargas en aguas superficiales.

Las cargas hidráulicas aplicadas a humedales ( $112 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) resultaron elevadas, por encima de los  $20$  a  $40 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  recomendados para humedales horizontales y los  $80 \text{ L d}^{-1}$  para humedales verticales (Dotro et al. 2017). Asimismo, la carga orgánica aplicada a los humedales ( $29,7 \pm 14,4 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ;  $38,5 \pm 17,4 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), otro parámetro clave de diseño, resultó más alta que el límite máximo ( $4$  a  $8 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) recomendado para tratamiento secundario con humedales horizontales (Wallace y Knigh 2006) y ( $20 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) verticales (Austrian Standards International 2009; Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall 2017). Además, la carga promedio aplicada a la laguna de pulido ( $10,8 \pm 4,4 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ;  $13,6 \pm 4,7 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) en realidad alcanzó el rango de tasa de carga superficial ( $10$  a  $35 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) correspondiente a una laguna facultativa (Von Sperling 2007).

No obstante, la concentración de DQO disminuyó drásticamente, con el valor promedio del vertido (LP) muy por debajo del límite de descarga de la normativa local (**Tabla Suplementaria 4.2**). La concentración promedio de  $\text{DBO}_5$  del efluente tratado también se ubicó por debajo del límite de descarga, a partir de un elevado rendimiento de remoción sostenido principalmente por las etapas HAL y HSS (**Figura 4.4** y **Tabla 4.1**).

La comparación con el ensayo de mesocosmos correspondiente al mismo sustrato y a la misma especie de helófitas, presentado en el capítulo anterior, revela que la tasa de remoción alcanzada (HAL = 80,0%) superó a la obtenida en el ensayo (73,9%), a pesar de que la carga fue tres veces mayor ( $29,74 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) que la del ensayo ( $8,49 \text{ g DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

En cambio, la remoción de nutrientes resultó más limitada. La concentración promedio de  $\text{N-NH}_3$  en LP ( $28,4 \text{ mg N L}^{-1}$ ), el efluente tratado, superó el valor límite de  $25 \text{ mg N L}^{-1}$  establecido por la normativa local. En la **Figura 4.3** se observa que la concentración promedio de  $\text{N-NH}_3$  se redujo significativamente en HAL y LP, no en HSS. Por otra parte, la tasa de remoción ( $1,22 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) y la eficiencia (26.4%) máximas, alcanzadas en HAL, resultaron más bajas que las obtenidas en el ensayo de mesocosmos con la misma configuración ( $3,45 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  y 77,2%, respectivamente). Estas diferencias podrían explicarse por el suministro adicional de oxígeno

disuelto provisto por fotosíntesis en la capa de agua iluminada de HAL y LP, ausente en HSS, y por la fuerte limitación de oxígeno impuesta por la alta carga orgánica aplicada, respectivamente.

La concentración promedio de NT se redujo significativamente en todas las etapas de tratamiento (**Figura 4.3** y **Tabla 4.2**). Su concentración promedio en LP fue ligeramente menor que el límite para el vertido (**Tabla Suplementaria 4.2**). La tasa de remoción fue mayor en HAL que en HSS, y más baja aún en LP, y sus diferencias significativas (**Tabla 4.2**). De modo similar al N-NH<sub>3</sub>, la tasa de remoción (2,22 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) y la eficiencia (39,1%) máximas resultaron más bajas que las obtenidas en el ensayo de mesocosmos con el mismo sustrato y la misma especie de helófitas, 4,45 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 71,0 %, respectivamente.

Respecto del P, la concentración promedio de PT se redujo significativamente durante el tratamiento (**Figura 4.3** y **Tabla 4.2**) pero no alcanzó para cumplir con el límite para descarga (**Tabla Suplementaria 4.2**). Las tasas alcanzadas, al igual que para el N, resultaron sensiblemente menores (0,14 g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 32,7 %) que las obtenidas en el ensayo de mesocosmos (0,81 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 70,4 %). Para el PRS, en cambio, no se registraron diferencias significativas en las concentraciones promedio de cada etapa (**Figura 3**). La diferencia de rendimiento respecto del PT podría deberse a la remoción (acreción) de fósforo orgánico particulado. En la **Tabla Suplementaria 4.3** se registran las concentraciones promedio de sólidos suspendidos totales (SST) en cada etapa. La CS alcanzó un valor de 59,42 mg L<sup>-1</sup> que se redujo 69,3 % en HAL, y 63,4 % en HSS.

La reducción de coliformes fecales a lo largo del sistema también fue significativa, alcanzando un 99.0% en el efluente tratado. Sin embargo, la media geométrica de la densidad superó el límite permitido para el vertido (**Tabla Suplementaria 4.2**). La alta carga aplicada a LP hizo que algunos de los mecanismos que explican la elevada remoción de patógenos en lagunas de maduración no estuvieran presentes, entre ellos, el pH elevado (debido a la alta actividad fotosintética) y alta concentración de OD (ver Tabla suplementaria 4.3), que favorece a la comunidad aeróbica, más eficiente en la eliminación de coliformes, además de aumentar la tasa de remoción debido a otros mecanismos, como la fotooxidación. Los estanques de maduración deben alcanzar altas eficiencias de remoción de coliformes (E >99,9 o 99,99%), para que el efluente pueda cumplir con la mayoría de los usos (Von Sperling 2007). No obstante, de acuerdo a la normativa local, en descarga superficial, absorción por el suelo o vuelco a mar abierto, el líquido residual tratado debe tener satisfecha la demanda de cloro (Autoridad del Agua PBA 2003). De tal modo, es de esperar que la reducción de la carga orgánica y la disminución de la

densidad microbiana faciliten el cumplimiento de estos requerimientos en una etapa posterior de cloración, con un costo adicional.

Los resultados de los modelos lineales generalizados identificaron al pH como la variable más influyente sobre la remoción de fósforo y nitrógeno. Además, las concentraciones de PRS y TP-PRS fueron predictoras clave de la remoción de materia orgánica y nutrientes. La temperatura tuvo un efecto menor, restringido al desempeño en la remoción de materia orgánica (DQO). Estos hallazgos son consistentes con la literatura, que subraya el rol del pH y las interacciones químicas en la eficiencia de retención de fósforo en sistemas de humedales. Por otro lado, la variabilidad en el caudal no mostró un impacto estadísticamente significativo, lo que indica que el sistema mantiene un desempeño estable y no es sensible a los cambios abruptos de caudal.

Finalmente, queremos comentar algunos inconvenientes que encontramos y que determinaron la finalización del monitoreo del sistema. Por un lado, las plantas fueron fumigadas con glifosato por personal del municipio durante trabajos de desmalezamiento antes del inicio del ciclo lectivo. Si bien la planta se encontraba cercada con alambrado y cerrada con candado, no contaba con cartelera que advirtiera que se trataba de un sistema de tratamiento de aguas residuales. Además, las cubetas fueron colonizadas por álamo plateado (*Populus alba*), a partir de estolones provenientes de ejemplares cercanos a la planta. No sabemos si los mismos perforaron la lámina de polietileno o si esta se encontraba deteriorada. Por último, la ejecución de obras de expansión edilicia hizo que la planta quedara muy próxima a aulas nuevas y eso representó un problema porque la planta emitía olores, quizás por falta de previsión en la conducción de gases de la cámara séptica.

## Conclusiones y recomendaciones

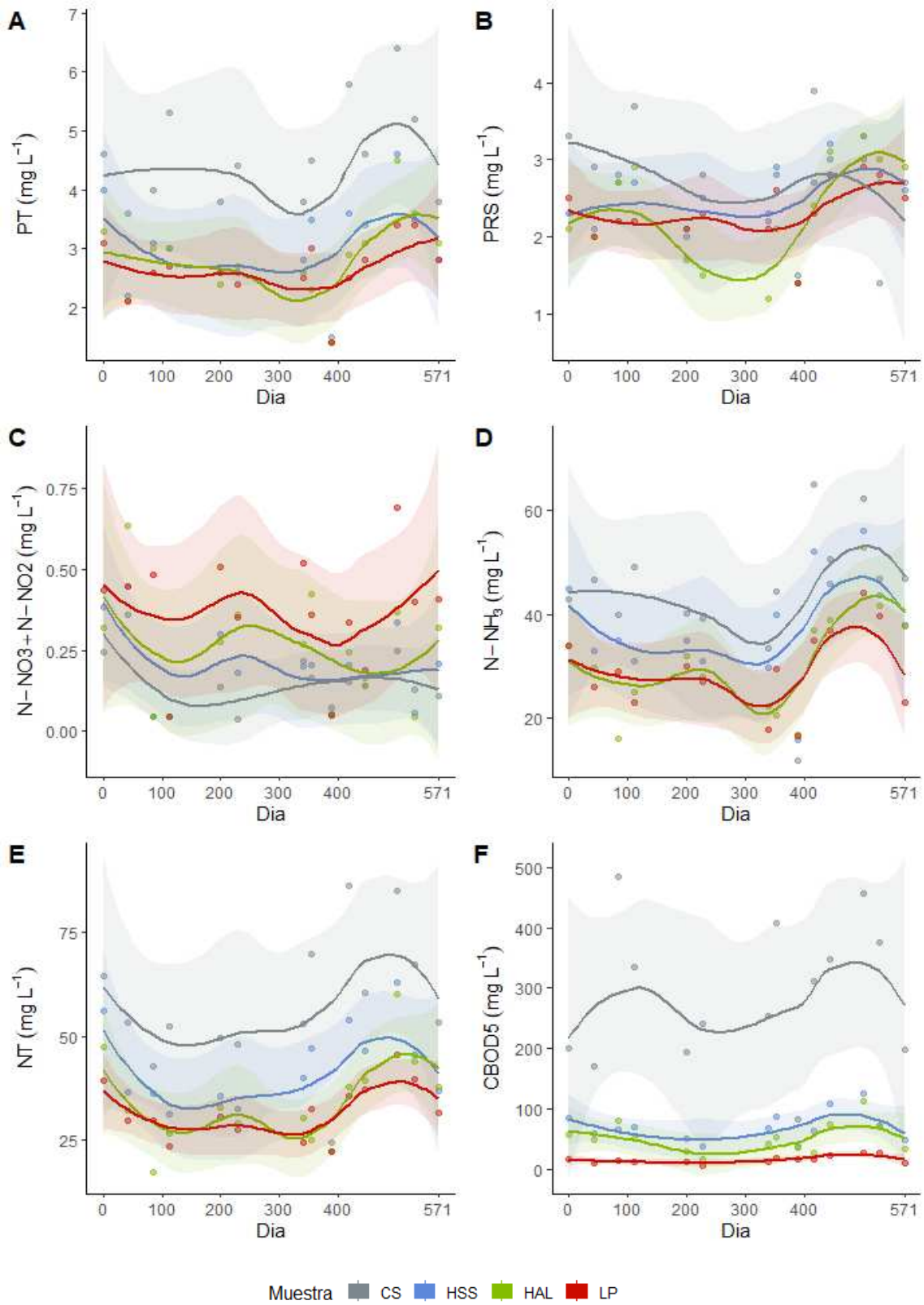
De acuerdo con los resultados de la experiencia realizada en la EGB N°11, se han puesto a disposición las siguientes recomendaciones para otros diseños de plantas de tratamiento basadas en humedales.

A pesar de haber recibido tasas de carga hidráulica y orgánica muy superiores a lo recomendado, la remoción de materia orgánica se mantuvo muy alta. La calidad del efluente de HAL y HSS permitiría diseñar una etapa siguiente de humedales, preferentemente de flujo vertical descendente, para asegurar la oxidación de  $N-NH_3$ . Así, es posible que se alcancen los rendimientos de remoción de N y P obtenidos en el ensayo con mesocosmos, tal como ocurrió con la carga orgánica.

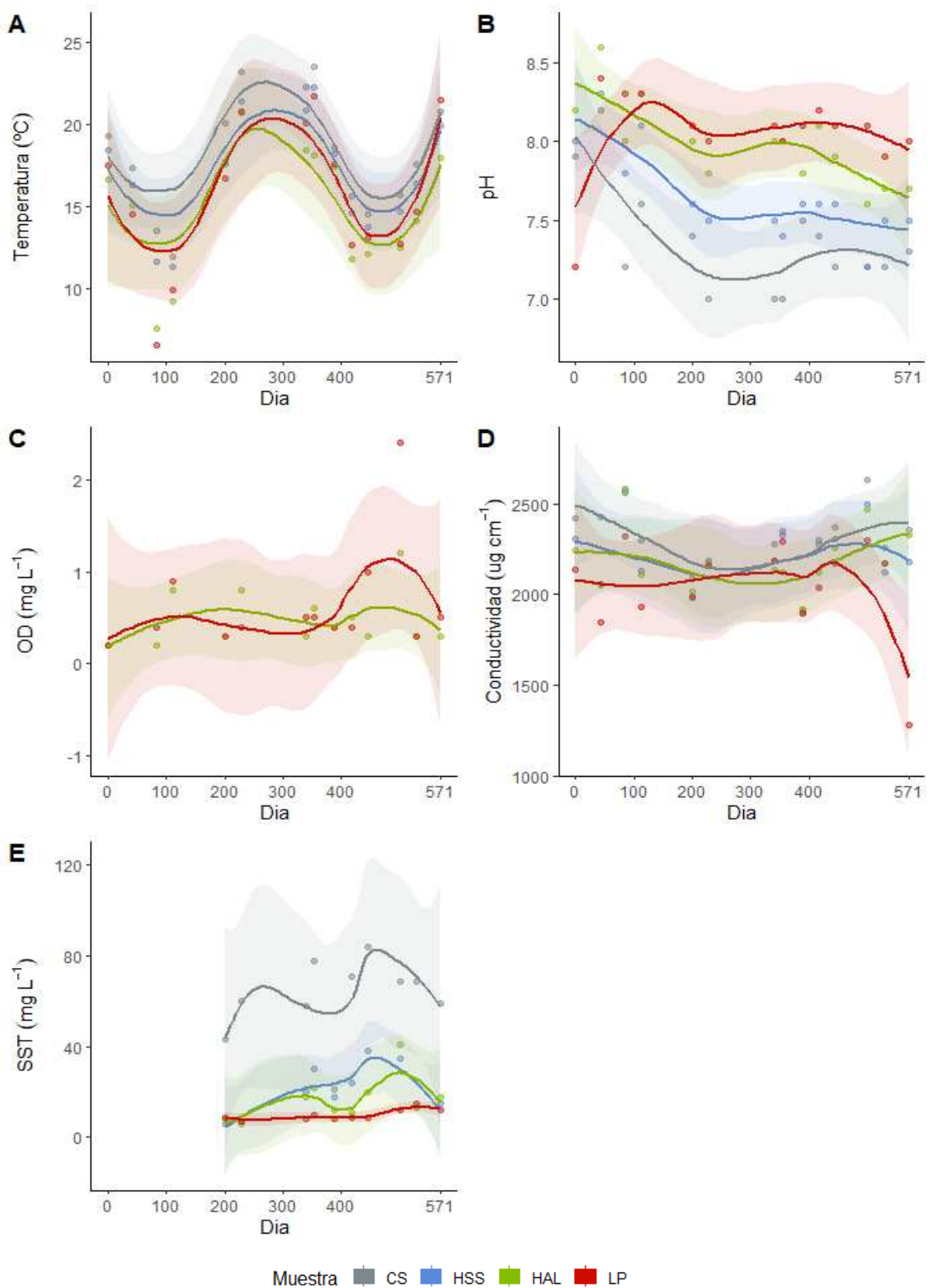
Respecto de la primera etapa, la posibilidad de taponamiento (“*clogging*”) por acumulación de SST impone una revisión. La figura suplementaria 4.2.E ilustra la retención en los humedales HSS y HAL que implica la disminución de su concentración. Si bien es de esperar la degradación anaeróbica de la fracción biodegradable de esa material consideramos muy conveniente interponer a los humedales de flujo ascendente algún sistema mejorado de retención de SST en la etapa de tratamiento primario y/o en los puntos de ingreso del agua a tratar, que puedan vaciarse y/o reemplazarse en la medida en que se colmate su capacidad.

La remoción de patógenos en una laguna de maduración sería factible a partir del efluente de la segunda etapa, aplicando los criterios de diseño que favorecen el establecimiento de los procesos responsables de esa remoción.

Material Suplementario



**Figura Suplementaria 4.1.** Variaciones en las concentraciones de nutrientes ( $\text{N-NH}_3$ ,  $\text{N-NO}_2 + \text{N-NO}_3$ , NT, PT, PRS) y CDBO5 durante el experimento en los mesocosmos en los tres sitios muestreados del sistema de humedales construidos (HSS, HAL, LP) y en la cámara séptica de entrada (CS).



**Figura Suplementaria 4.2.** Variaciones en los parámetros fisicoquímicos (Temperatura, Conductividad, OD, SST y pH) durante el experimento en los mesocosmos en los tres sitios muestreados del sistema de humedales construidos (HSS, HAL, LP) y en la cámara séptica de entrada (CS).

	<b>DBO<sub>5</sub></b>	<b>TN</b>	<b>TP</b>
<b>Concentración medida (CS)</b>	306	60	4,6
mg L <sup>-1</sup>			
<b>Caudal*</b>	3,36	3,36	3,36
m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> pe <sup>-1</sup>			
<b>Carga*</b>	60	9	0,6
g.pe <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>			
<b>Proporción**</b>	0,33	0,33	0,33
<b>Carga aplicada</b>	1584	238	16
g d <sup>-1</sup>			
<b>Concentración esperada</b>	471	71	4,7
mg L <sup>-1</sup>			
<b>Remoción implícita (CS)</b>	35	15	2
%			

**Tabla Suplementaria 4.1.** Comparación de concentraciones medidas y estimadas en base a caudales, cargas y remociones esperadas (Tchobanoglous et al. 2014). \*pe = persona-equivalente; \*\* proporción de la carga diaria aplicada a la escuela

Parámetro	Unidades	Límite para descargar a conductos pluviales o cuerpo de agua superficial	Monitoreo Promedio (SD), n=16
Coliformes fecales (*)	NMP 100 mL <sup>-1</sup>	2000	1,27 x 10 <sup>4</sup>
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	50	26,84 (±25,27)
DQO	mg L <sup>-1</sup>	250	42,8 (± 12,4)
Nitrógeno total (**)	mg L <sup>-1</sup>	35	29,8 (± 8,9)
Nitrógeno amoniacal (**)	mg L <sup>-1</sup>	25	28,4 (± 8,4)
Fósforo total (**)	mg L <sup>-1</sup>	1	2,52 (± 0,67)

**Tabla Suplementaria 4.2.** Parámetros de calidad de las descargas límite admisibles (ADA Res. 336/93) (\*) Este parámetro será controlado en descargas próximas a una zona de balneario. El valor indicado constituye el nivel máximo admisible a una distancia de por lo menos de 500 metros de una playa o área destinada a deportes acuáticos. (\*\*) Estos límites son exigidos en las descargas a lagos, lagunas o ambientes favorables a procesos de eutroficación.

	CS	HSS	HAL	LP
<b>Temperatura (°C)</b>	18,66 (±3,87)	17,01 (±3,2)	15,92 (±4,05)	16,63 (±4,69)
<b>pH</b>	7,4 (±0,34)	7,69 (±0,38)	8 (±0,3)	8,08 (±0,31)
<b>Conductividad (µs cm<sup>-1</sup>)</b>	2208,78 (±376,93)	2164,59 (±252,06)	2048 (±409,68)	1958,39 (±420,23)
<b>OD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	NA	NA	0,61 (±0,64)	0,93 (±1,14)
<b>SST (mg L<sup>-1</sup>)</b>	59,42 (±17,1)	21,75 (±10,48)	18,25 (±9,77)	10,75 (±4,52)
<b>DQO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	344,06 (±156,08)	82,06 (±27,81)	63,94 (±25,09)	42,81 (±12,38)
<b>DBO<sub>5</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	NA	NA	NA	26,84 (±25,27)
<b>CDBO<sub>5</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	265,56 (±129,07)	67,44 (±24,27)	48,88 (±25,32)	15,81 (±5,97)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,14 (±0,09)	0,19 (±0,13)	0,23 (±0,17)	0,36 (±0,18)
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	41,22 (±14,4)	36,45 (±11)	30,35 (±10,53)	28,35 (±8,41)
<b>NT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	54,06 (±21,63)	40,13 (±10,26)	33,93 (±13,53)	29,8 (±8,87)
<b>PRS (mg L<sup>-1</sup>)</b>	2,61 (±0,72)	2,41 (±0,55)	2,23 (±0,69)	2,28 (±0,43)
<b>PT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	4,06 (±1,42)	3,05 (±0,73)	2,83 (±0,92)	2,52 (±0,67)

**Tabla Suplementaria 4.3.** Parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* (Temperatura, pH, Conductividad, OD), concentraciones de nutrientes (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NT, PT, PRS) y carga orgánica (DQO, DBO<sub>5</sub>, CDBO<sub>5</sub>) promedio (±DS) en los humedales (HSS y HAL), en la laguna de pulido (LP) y en la salida de la cámara séptica (ST).

		Sitio	Tiempo	Sitio*Tiempo
<b>PRS</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	1,54	0,97	0,168
	p	0,21	0,32	0,18
	$\eta^2$	0,08	0,02	0,09
<b>PT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	11,57	1,88	0,03
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,17	0,99
	$\eta^2$	0,42	0,04	0,00
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	5,53	0,76	0,21
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,38	0,89
	$\eta^2$	0,26	0,01	0,01
<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	6,09	4,43	0,23
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,04</b>	0,87
	$\eta^2$	0,27	0,08	0,01
<b>NT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	13,86	4,48	0,18
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,90
	$\eta^2$	0,46	0,08	0,01
<b>DQO</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	63,05	0,48	0,10
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,48	0,95
	$\eta^2$	0,79	0,01	0,06
<b>Temperatura</b> °C	F	1,74	1,77	0,09
	p	0,17	0,19	0,96
	$\eta^2$	0,09	0,03	0,00
<b>pH</b>	F	23,60	20,72	3,03
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
	$\eta^2$	0,60	0,30	0,16
<b>Conductividad</b> <i>μs cm<sup>-1</sup></i>	F	3,65	0,21	0,23
	p	<b>0,01</b>	<b>0,64</b>	<b>0,87</b>
	$\eta^2$	0,18	0,00	0,01
<b>SST</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	40,12	5,12	0,02
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
	$\eta^2$	0,79	0,14	0,02
<b>OD</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	0,73	1,63	0,59
	p	0,40	0,21	0,45
	$\eta^2$	0,03	0,07	0,03

**Tabla Suplementaria 4.4.** Resultados de los RM-ANOVA para las variables físicoquímicas in situ (Temperatura, pH, Conductividad, OD), concentraciones de nutrientes (N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NT, PT, PRS) DQO promedio (±DS) en los humedales (HSS y HAL), en la laguna de pulido (LP) y en la salida de la cámara séptica (CS).

## CAPÍTULO 5

# REMOCIÓN DE FÓSFORO Y NITRÓGENO EN MESOCOSMOS DE HUMEDALES MADUROS CON *EQUISETUM GIGANTEUM* PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

### Introducción y objetivos

Las especies de *Equisetum* han demostrado desempeñar un papel desproporcionado en el mantenimiento de la productividad primaria neta en humedales arbustivos fríos. En estos entornos, las concentraciones de nutrientes en la biomasa y los brotes de *Equisetum* se correlacionan con las características edáficas del horizonte C (Marsh et al., 2000), lo que sugiere que *Equisetum* puede actuar como una "bomba de nutrientes" en la comunidad, absorbiendo nutrientes principalmente del horizonte C y secuestrándolos temporalmente en tejidos tanto subterráneos como aéreos. Su efectividad como acumulador de nutrientes también se evidencia en su alto contenido de nutrientes en comparación con su biomasa dentro de la comunidad. Particularmente, la especie *Equisetum giganteum* L. ("cola de caballo gigante del sur") ha mostrado alta tolerancia a la salinidad, capacidad para absorber metales pesados y tolerancia a la limitación de nitrógeno (Husby, 2013). Sus raíces profundas pueden alcanzar hasta 2,5 m por debajo de la superficie (Kutschera & Lichtenegger, 1960), y su biomasa tiene un alto potencial de crecimiento gracias a sus meristemas intercalares.

A pesar de sus beneficios potenciales en el tratamiento de aguas residuales, la investigación sobre el uso de especies de este género para la eliminación de contaminantes es limitada, y los experimentos existentes se han realizado principalmente en mesocosmos por lotes durante períodos cortos de maduración y operación. Por ejemplo, se estudió la eliminación de contaminantes de aguas residuales de lavandería en pruebas por lotes de corta duración con mesocosmos plantados con *E. hyemale*, considerando los efectos de la dilución, el tiempo de residencia y la composición del sustrato, así como la cinética de eliminación de fosfatos (F.

Wahyudianto et al., 2019; F. E. Wahyudianto et al., 2020). Otros dos estudios (Apritama et al., 2019; Sijimol MR et al., 2021) analizaron la eficiencia en la eliminación de cargas orgánicas en lixiviados de residuos sólidos urbanos y aguas grises, respectivamente.

El **objetivo** de este capítulo fue medir la eficiencia en la eliminación de nutrientes (N y P) de aguas residuales secundarias, comparando dos helófitas comúnmente utilizadas (*Phragmites australis* y *Typha latifolia*) con *Equisetum giganteum*. Para ello, se emplearon mesocosmos alimentados con aguas residuales en un experimento al aire libre que se extendió por dos años. Se hipotetizó que: a) las helófitas aumentarán la eliminación de nutrientes, particularmente N y P, en comparación con los controles sin plantas; b) *Equisetum giganteum* superará a las otras helófitas en eficiencia de eliminación de nutrientes debido a su capacidad de extraer nutrientes del sedimento (Marsh et al., 2000); y c) la eficiencia en la eliminación de nutrientes de las helófitas disminuirá con el tiempo.

Adicionalmente, se estudió la relación entre las concentraciones de nutrientes y otras variables fisicoquímicas en los mesocosmos, discutiendo su influencia junto con posibles variaciones estacionales.

## Materiales y métodos

### Configuración y maduración de los mesocosmos

Se utilizaron 12 mesocosmos contruidos con tambores de HDPE de 50 litros de volumen, de sección rectangular (32 por 36 cm) y de 60 cm de altura. Los mismos fueron cortados a 50 cm de altura, descartándose la tapa y los 10 cm superiores. Se realizaron dos agujeros (diámetro 2 cm), uno a 5 cm del fondo sobre una cara y otro a 40 cm sobre la cara opuesta. Tanto en el primero agujero (inferior) como en el segundo (superior), se ajustaron caños de PP de diámetro ½ pulgada para la salida e ingreso, respectivamente, del caudal aplicado. Este diseño permitió la operación de los mesocosmos bajo un régimen de flujo vertical descendente. Se utilizó arena como sustrato principal de los mesocosmos de acuerdo a las normas europeas para la construcción de humedales verticales (Brix and Arias 2005; Austrian Standards International 2009; Deutsche Vereeniging für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall 2017). Los tambores se rellenaron con 10 cm de piedra partida (10 - 20 mm), 5 cm de grava fina (3 - 6 mm), 25 cm de arena (D10 0,48 mm, D60 0,99 mm) y 5 cm de grava fina, en ese orden.

Los mesocosmos se ubicaron a la intemperie (34°46' 50,60" S, 58°10' 53,10" O) separados unos 30 cm entre sí. Los mismos fueron alimentados a través un sistema de conducción en forma de anillo construido con caños de PEBD de diámetro ½ pulgada al que se

conectaron mangueras de alimentación de PEBD de diámetro ¼ pulgadas. El anillo se conectó a una bomba sumergible (Kushiro Gs400 ½ HP China), ubicada en un tanque de alimentación de 200 L de HDPE, controlada por un ciclador (PYSEL® Productos Eléctricos, Berazategui, Argentina) capaz de establecer de forma independiente la duración de un pulso activo (timer) y de un tiempo de espera (retardo). El ciclador fue seteado para establecer una carga intermitente cada media hora, enviando un pulso de bombeo de 2 minutos con un retardo de 28 minutos. Para limitar el caudal a las condiciones experimentales requeridas se instaló una placa orificio en el envío de la bomba, con una derivación previa provista de una válvula, para regular el retorno del caudal excedente hacia el tanque. La distribución equitativa de caudal se alcanzó variando la altura de la conexión de las mangueras de alimentación al caño vertical de ingreso de los mesocosmos.

En la primavera de 2018 los mesocosmos fueron plantados con tres especies de helófitas: Carrizo (*Phragmites australis*), Totorá (*Typha latifolia*) y Cola de caballo (*Equisetum giganteum*). Las plantas arraigaron, crecieron y colonizaron los mesocosmos durante más de un año. Durante ese período se puso a punto el funcionamiento del sistema de alimentación y se aumentó en forma progresiva la carga aplicada. Si bien las tres especies colonizaron satisfactoriamente los mesocosmos, la cobertura de *T. latifolia* resultó ser más baja que la de las otras especies, declinando hasta el final del experimento. Además, *T. latifolia* y *P. australis* exhibieron un período de senescencia invernal a diferencia de *E. giganteum* que se mantuvo siempre verde. A partir del verano 2020 se dio por finalizado el período de maduración de los mesocosmos y se dio inicio al período de monitoreo.

### Diseño experimental y aguas residuales

El diseño experimental se resume en la **Figura 5.1**. Un tanque de alimentación fue operado a nivel constante (180 L) mediante el ingreso de agua subterránea de pozo a través de una válvula flotante. El mismo fue alimentado mediante dosificación independiente de orina humana y suero ácido lácteo, diluído con agua a 1/3 de su concentración, utilizando una bomba peristáltica de dos vías (APEMA PC25-0,1-F-D, Avellaneda, Argentina) calibrada a 600 mL d<sup>-1</sup>. La orina colectada cumplió con la condición de provenir de personas que no estuvieran bajo tratamiento farmacológico.

El tanque fue diseñado como un **filtro anaeróbico de flujo ascendente (FA)** con el objetivo de agotar el nitrato presente en el agua subterránea utilizada (concentración media de N de 15,0 ± 1,8 mg N L<sup>-1</sup>). Para ello, se sumergieron 4 paños de media sombra de 1 m<sup>2</sup> atados por

su centro a un lastre (ladrillo), con el objeto de ofrecer sustrato para el desarrollo de biofilm. La bomba de alimentación de los mesocosmos se ubicó cerca de la superficie mientras que el ingreso de agua, suero y orina fue derivado a través de un caño colector hacia el fondo del tanque. La composición del agua residual utilizada queda entonces determinada por la relación entre dosificación, caudal de bombeo aplicado a los mesocosmos y actividad microbiana soportada por el biofilm.

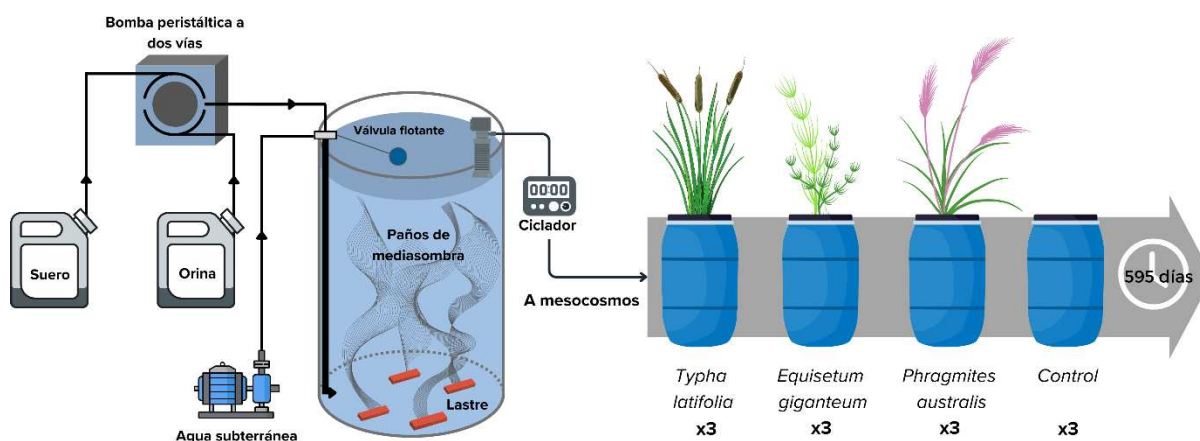


Figura 5.1. Esquema del diseño experimental de mesocosmos.

### Muestreo y análisis fisicoquímico

Durante la etapa de maduración (marzo 2019 a enero 2020) se realizaron 4 muestreos preliminares. Durante la etapa de experimentación (febrero 2020 a septiembre 2021) se realizaron 14 muestreos. Todos los muestreos se realizaron por la mañana, cumpliendo con la condición de ausencia de precipitaciones durante, al menos, 72 hs previas. Las muestras fueron colectadas durante una hora, primero las de salida (caudal continuo) y luego las de ingreso (dos pulsos) a los mesocosmos. Los volúmenes medidos fueron expresados como caudales ( $L h^{-1}$ ) en todos los casos.

Se midieron *in situ* la temperatura, el pH, la conductividad, la turbidez, el color, y el Potencial Oxidación-Reducción. Las muestras fueron digeridas según el método de persulfato para la determinación simultánea de nitrógeno total y fósforo total (4500-P J), y colorimétrico de reflujo cerrado (5220 D) para la determinación de la demanda química de oxígeno (APHA, 2017). Una alícuota de las muestras fue filtrada por membrana de diámetro de poro 0,45  $\mu m$  para realizar las siguientes determinaciones: fósforo reactivo soluble mediante la reacción de azul de molibdeno (Murphy & Riley, 1962; Nagul et al., 2015), y nitrógeno como amonio mediante la

reacción de azul de indofenol (APHA et al., 2017), como nitrito por reacción de diazotación y como nitrato por el método espectrofotométrico ultravioleta de segunda derivada (4500-NO<sub>3</sub>-C) (APHA, 2017; Ferree & Shannon, 2001). Adicionalmente, se realizó un muestreo de relleno para la determinación del porcentaje de humedad y materia orgánica (2540 G, APHA, 2017; Ferree & Shannon, 2001). El detalle de las metodologías y los equipos utilizados se encuentra en el Capítulo 2.

### Diseño experimental y análisis de datos

Para el ensayo se establecieron cuatro tipos de mesocosmos con tres réplicas cada uno: mesocosmos sólo con arena y sin plantas (**Control**) y mesocosmos plantados con **tres plantas de distintas especies** (*P. australis*, *T. latifolia*, *E. giganteum*).

Se compararon las diferencias en las concentraciones de nutrientes entre los tratamientos (plantas) y los controles mediante Análisis de la Varianza con Medidas Repetidas (RM-ANOVA), con los mesocosmos como factor de medida repetida, y considerando los siguientes factores y niveles:

- **Factor Tratamiento**, con cinco niveles llamados: **Control** (mesocosmos sólo con arena), *P. australis*, *T. latifolia*, *E. giganteum*, correspondientes a las tres especies vegetales, y **FA**, correspondiente al filtro anaeróbico de agua de entrada.
- **Factor Tiempo**, con 14 niveles indicando los días desde que comenzó el experimento: 0, 70, 121, 166, 190, 258, 325, 393, 425, 470, 50, 530, 559 y 595. En los análisis estadísticos no se incluyeron los resultados de la etapa de maduración de las plantas (días -346 hasta día 0).

Previamente a cada análisis, se revisaron los principios de normalidad mediante el test de Cochran, y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Además, se calculó  $\eta^2$  generalizado para medir el tamaño del efecto de los factores.

Adicionalmente, se utilizaron modelos lineales generalizados para estudiar las relaciones entre los porcentajes de retención de PT, NT, DQO y N-NH<sub>3</sub> con las variables físico-químicas pH, conductividad, turbidez y temperatura. La normalidad de la distribución de frecuencia de las variables fue comprobada por el test de Shapiro-Wilks, y los modelos óptimos fueron seleccionados mediante el criterio de información de Akaike (AIC).

Las tasas de carga y eliminación de TP, TN, DQO y N-NH<sub>3</sub> se calcularon siguiendo a (Kadlec & Wallace, 2008):

$$\text{Tasa de carga } (g \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = \frac{Q_i C_i}{A}$$

$$\text{Tasa de remoción } (g \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = \frac{(Q_i C_i - Q_o C_o)}{A}$$

Donde  $C_i$  es la concentración de entrada,  $C_o$  la concentración de salida,  $Q_i$  el caudal de entrada,  $Q_o$  el caudal de salida y  $A$  el área del mesocosmos. Dado que  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$  no pueden considerarse parte de la entrada debido a su agotamiento antes de que el agua ingrese a los mesocosmos, y ya que resultan de procesos que ocurren dentro de los sistemas, las tasas de carga y eliminación de estos compuestos no se incluyen en los resultados.

## Resultados

### Caudal y condiciones fisicoquímicas

Durante la etapa de experimentación no hubo diferencias significativas en el caudal de ingreso a los mesocosmos ( $F=2,5$ ;  $p=0,16$ ;  $\eta^2=0,13$ ), con valores promedio de  $8,17 \text{ L d}^{-1}$  ( $\pm 1,26 \text{ L d}^{-1}$ ) en Control,  $8,65 \text{ L d}^{-1}$  ( $\pm 1,15 \text{ L d}^{-1}$ ) en *E. giganteum*,  $8,47 \text{ L d}^{-1}$  ( $\pm 1,19 \text{ L d}^{-1}$ ) en *P. australis* y  $8,42 \text{ L d}^{-1}$  ( $\pm 1,11 \text{ L d}^{-1}$ ) en *T. latifolia*. El flujo de salida disminuyó en *P. australis* y aún más en *E. giganteum*, lo que, combinado con el aumento en la conductividad, sugeriría una mayor evapotranspiración en esos tratamientos (**Tabla Suplementaria 5.1**).

El agua residual de entrada tuvo concentraciones medias de  $2,6 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) de  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $37,6 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 9,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) de  $\text{N-NH}_3$ ,  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) de  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $40,1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 8,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) de NT,  $3,7 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 2,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) de PRS y  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) de PT, con valores medios de DQO de  $78,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\pm 37,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (**Tabla Suplementaria 5.1**).

En el FA el tiempo de residencia hidráulica (HRT) promedio fue de  $1,7$  ( $\pm 0,3$ ) días. En los mesocosmos, las tasas de carga hidráulica (HLR) fueron de  $71,0 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 10,9$ ) en control,  $75,3 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 9,9$ ) en *E. giganteum*,  $73,6 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 10,4$ ) en *P. australis* y  $73,2 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ( $\pm 9,6$ ) en *T. latifolia*. La Tabla 1 muestra las tasas de carga resultantes de DQO,  $\text{N-NH}_3$ , NT y PT, y no hubo diferencias significativas en las tasas de carga sobre los distintos tratamientos ( $p>0,05$ ).

Los principales parámetros fisicoquímicos, resumidos en la **Tabla Suplementaria 5.1**, exhibieron variaciones significativas entre tratamientos durante el tiempo del experimento (**Figura Suplementaria 5.2 y Tabla 5.2**). Las variaciones en temperatura, pH y conductividad

fueron mayores en el tiempo que entre tratamientos, mientras que las diferencias en turbidez y color fueron más importantes entre los tratamientos ( $\eta^2$ ).

A su vez, se evidenció un aumento de casi 15 veces en la coloración del agua (**Figura 5.3**) en los mesocosmos con *E. giganteum* ( $37,5 \text{ PCU} \pm 35,9 \text{ PCU}$ ) en comparación con los Controles ( $2,5 \text{ PCU} \pm 5,8 \text{ PCU}$ ). Tanto en *P. australis* ( $10,0 \text{ PCU} \pm 9,9 \text{ PCU}$ ) como en *T. latifolia* ( $4,2 \text{ PCU} \pm 5,3 \text{ PCU}$ ) se observaron aumentos significativos en la coloración en comparación con los controles durante el experimento (Tabla 2;  $F=5,23$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta^2=0,54$ ), aunque no tan evidentes como en *E. giganteum*.

La **Figura Suplementaria 5.3** muestra los resultados de una medición de ORP a 5, 10, 15 y 20 cm de profundidad en un mesocosmos de cada tratamiento. En el mesocosmos control y con *T. latifolia* los valores fueron más altos, aumentando ligeramente en profundidad. En los mesocosmos con *P. australis* se registraron valores más bajos entre 10 y 15 cm de profundidad. En los mesocosmos con *E. giganteum*, la disminución de ORP fue más pronunciada entre los 5 cm hasta 15 cm de profundidad, donde se observó acumulación de materia orgánica oscura, ausente en el resto de los tratamientos. Además, en *E. giganteum* los porcentajes de sólidos totales fueron menores y los sólidos volátiles un orden de magnitud mayores en comparación con los otros tratamientos (**Tabla Suplementaria 5.3**).

### Remoción de DQO

En la **Tabla 5.1** se registran las tasas de remoción de DQO en los distintos tratamientos a lo largo del experimento. Expresada como porcentaje de la carga aplicada, la remoción alcanzó el 63,0 % ( $\pm 19,2\%$ ) en el control, 54,2% ( $\pm 61,6\%$ ) con *E. giganteum*, 64,4% ( $\pm 15,5\%$ ) con *P. australis* y 61,8% ( $\pm 16,9\%$ ) con *T. latifolia*. La **Figura 5.3-G** y la **Tabla Suplementaria 5.1** muestran que la concentración de DQO fue mayor en mesocosmos con *E. giganteum* ( $36,4 \text{ mg L}^{-1} \pm 22,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), *P. australis* ( $34,2 \text{ mg L}^{-1} \pm 23,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) y *T. latifolia* ( $29,2 \text{ mg L}^{-1} \pm 20,6 \text{ mg L}^{-1}$ ), que en los controles ( $26,9 \text{ mg L}^{-1} \pm 18,35 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esta diferencia fue significativa con *P. australis* y *E. giganteum* (**Tabla suplementaria 5.2**) y se mantuvo a lo largo del experimento (**Figura Suplementaria 5.1**; Tabla 2,  $F=6,46$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta^2=0,71$ ).

### Remoción de fósforo

Las concentraciones promedio de PRS y PT (**Figura 5.3, A y B; Tablas 5.2 y 5.3**) fueron significativamente más bajas en *E. giganteum* que en FA y el resto de los tratamientos (**Tablas**

**5.2 y 3**), y esta diferencia se mantuvo a lo largo de todo el experimento (**Figura Suplementaria 5.1**).

La tasa diaria de remoción de TP (**Tabla 5.1**) a lo largo del experimento fue un orden de magnitud mayor con *E. giganteum* ( $0,27 \pm 0,21 \text{ g P m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) en comparación con los controles ( $0,03 \pm 0,10 \text{ g P m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), con un promedio total del 78,4% de la carga aplicada. Esta tasa fue significativamente mayor ( $F = 25,77$ ;  $p < 0,01$ ;  $\eta^2 = 0,59$ ) que los porcentajes de eliminación de la carga aplicada logrados con *P. australis* (24,7%), Control (6,2%) y *T. latifolia* (2,1%).

La remoción de PRS en los mesocosmos en comparación con FA indicó liberación de fósforo en los Controles ( $-17,42\% \pm 27,87\%$ ) y en *T. latifolia* ( $-18,89\% \pm 30,44\%$ ), y remoción en *E. giganteum* ( $76,88\% \pm 17,85\%$ ) y en *P. australis* ( $1,93\% \pm 42,70\%$ ). De manera similar, los porcentajes de remoción de TP (**Figura 5.4B**) relativos a FA indicaron liberación de TP tanto en los Controles ( $-2,77\% \pm 26,10\%$ ) como en *T. latifolia* ( $-6,00\% \pm 36,81\%$ ), y remoción de TP tanto en *P. australis* ( $14,24\% \pm 36,12\%$ ) como en *E. giganteum* ( $74,18\% \pm 16,56\%$ ).

De manera similar, los porcentajes de remoción de PT (**Figura 4B**) en relación con FA indicaron liberación de TP tanto en los Controles ( $-2,77\% \pm 26,10\%$ ) como en *T. latifolia* ( $-6,00\% \pm 36,81\%$ ), y retención de TP tanto en *P. australis* ( $14,24\% \pm 36,12\%$ ) como en *E. giganteum* ( $74,18\% \pm 16,56\%$ ). Las tasas de remoción de PT también fueron mayores en *E. giganteum* ( $0,27 \pm 0,21 \text{ g P m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) en comparación con el mesocosmos control ( $0,03 \pm 0,1 \text{ g P m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) alcanzando el 77,1% de la carga aplicada, y siendo significativamente mayor que los porcentajes alcanzados con *P. australis* (26,5%), control (9,1%) y *T. latifolia* (5,9%) ( $F=25,77$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta^2 = 0,59$ ).

A lo largo del tiempo de experimentación, las concentraciones de PRS y TP (**Figura Suplementaria 5.1**) y los porcentajes de remoción variaron (**Figura 5.4, A y B**) en los mesocosmos Control, *P. australis*, y *T. latifolia*, disminuyendo junto a la concentración en FA hacia el día 500, para luego estabilizarse hacia el final del experimento, sin diferencias significativas entre ellos. En *E. giganteum*, en cambio, el fósforo fue retenido desde la etapa de crecimiento de las plantas, manteniéndose estable y significativamente menor al FA y el resto de los tratamientos, hasta el último día de experimentación (**Tabla 5.2**, PRS  $F=6,46$ ;  $p<0,01$ ,  $\eta^2 = 0,71$  y TP  $F=4,87$ ;  $p<0,01$ ,  $\eta^2 = 0,64$ ), alcanzando valores tan bajos como 0,1 mg P/L.

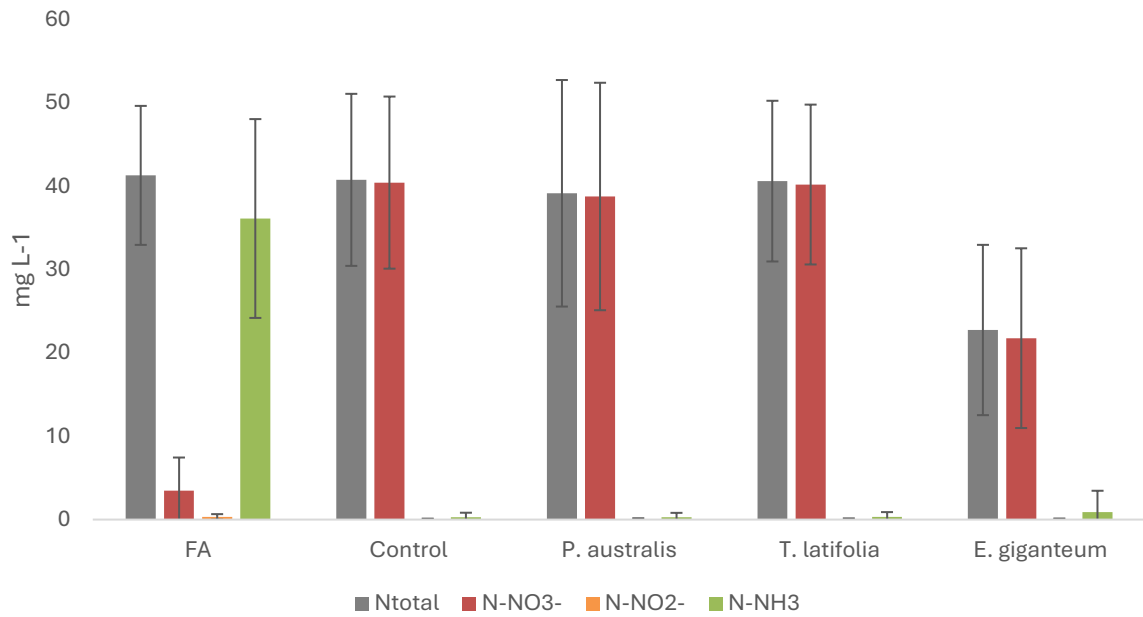
## Remoción de nitrógeno

Las concentraciones promedio de salida  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NH}_3$  y NT en los tratamientos (**Figura 5.3, C-F**) y sus variaciones a lo largo del experimento (**Figura Suplementaria 5.1**)

muestran que hubo una liberación de formas oxidadas en los mesocosmos con plantas (**Figura 5.2**) en comparación con su entrada (FA), mientras que el amonio fue removido.

Las tasas de remoción de  $\text{N-NH}_3$  fueron consistentemente altas durante todo el tratamiento, oscilando entre  $2,63 (\pm 0,8) \text{ g N-NH}_3 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  en el control y  $2,8 (\pm 0,84) \text{ g N-NH}_3 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$  con *E. giganteum* (**Tabla 5.1; Figura 5.4C**).

Las tasas de remoción de NT promediaron  $1,91 (\pm 1,15) \text{ g N m}^2 \text{ d}^{-1}$  con *E. giganteum*, superando al control sin plantas ( $0,14 \pm 0,74 \text{ g N m}^2 \text{ d}^{-1}$ ) en más de un orden de magnitud (**Tabla 5.1**). En los mesocosmos con *E. giganteum*, la remoción de NT fue casi trece veces mayor que en el control ( $F=14,56$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta^2 = 0,45$ ). Como porcentaje de la carga aplicada, las eliminaciones promediaron un 61,0% en los mesocosmos con *E. giganteum*, un 33,6% en los mesocosmos con *P. australis*, un 8,9% con *T. latifolia* y un 4,6% en los Controles (**Figura 5 D**). La concentración promedio de NT en la salida también fue menor en *E. giganteum* ( $20,07 \text{ mg L}^{-1} \pm 10,29 \text{ mg L}^{-1}$ ) en comparación con otros tratamientos y el control ( $37,79 \text{ mg L}^{-1} \pm 7,17 \text{ mg L}^{-1}$ ) (**Figura 5.3**). El rendimiento con *E. giganteum* mostró una disminución entre 300 y 500 días, correspondiente al otoño y al invierno, pero se recuperó hacia el final del experimento, mientras que *P. australis* siguió un patrón similar sin recuperación. Esta pérdida de eficiencia coincidió con un aumento en la concentración de nitratos y una disminución en la concentración de NT en FA (**Figura Suplementaria 5.1**).



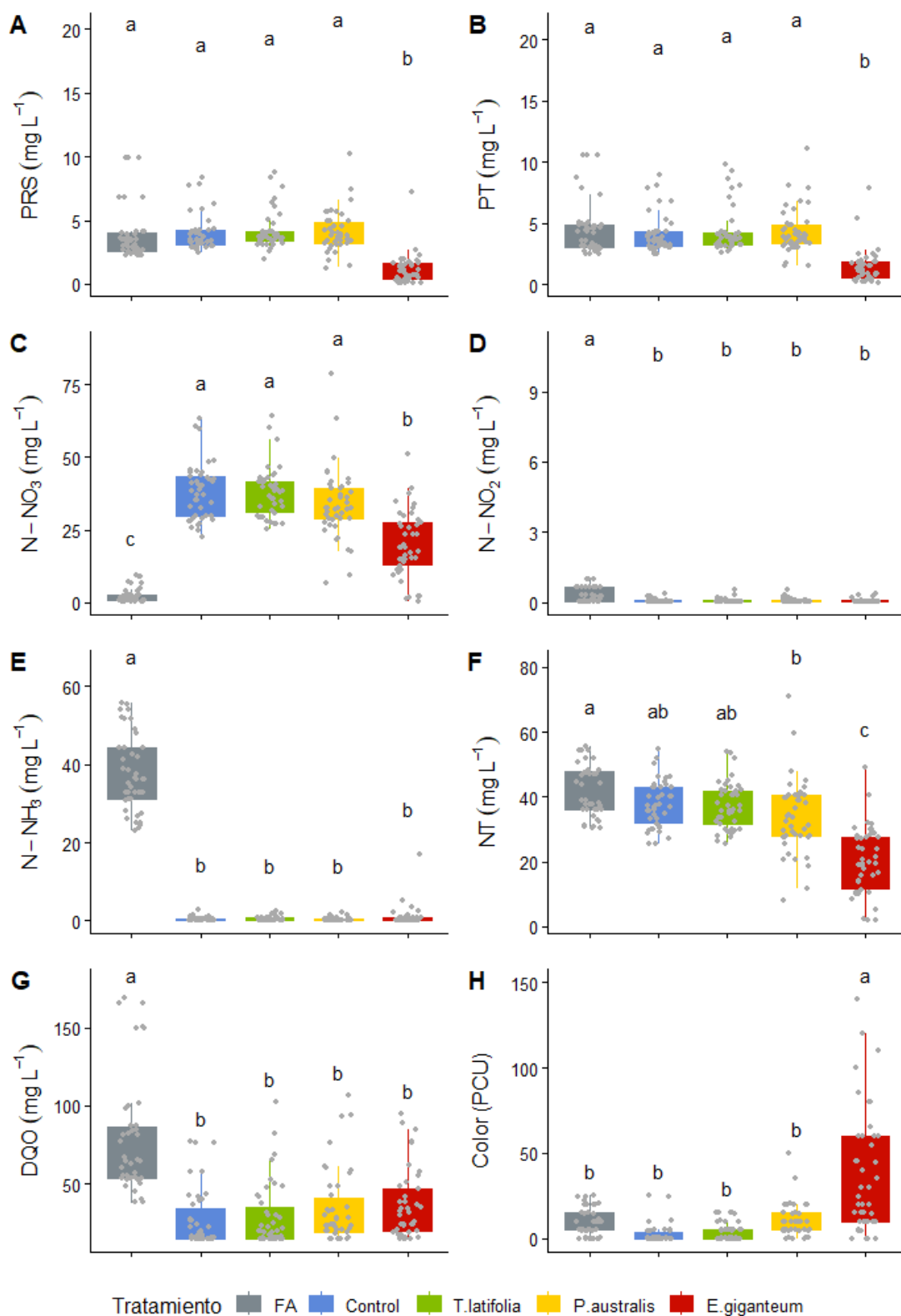
**Figura 5.2.** Concentraciones promedio ( $\pm$ DS) de las formas de nitrógeno (NT, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>) en el FA y en los mesocosmos control y con plantas.

		<b>Control</b>	<b><i>E. giganteum</i></b>	<b><i>P. australis</i></b>	<b><i>T. latifolia</i></b>
<b>HLR</b> <i>L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>		71,0 (±10,9)	75,3 (±9,9)	73,0 (±10,4)	73,2 (±9,7)
<b>DQO</b> <i>gCOD m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	Tasa de carga	5,59 (±2,96)	5,90 (±3,02)	5,78 (±2,94)	5,73 (±2,9)
	Tasa de remoción	3,51 (±1,97)	3,46 (±3,74)	3,67 (±1,78)	3,52 (±1,91)
	%	62,79	58,64	63,49	61,43
<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>g N-NH<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	Tasa de carga	2,66 (±0,79)	2,85 (±0,88)	2,78 (±0,88)	2,77 (±0,88)
	Tasa de remoción	2,63 (±0,80)	2,8 (±0,84)	2,76 (±0,87)	2,74 (±0,88)
	%	98,87	98,25	99,28	98,92
<b>NT</b> <i>g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	Tasa de carga	2,97 (±0,63)	3,15 (±0,69)	3,08 (±0,69)	3,07 (±0,71)
	Tasa de remoción	0,14 (±0,74)	1,91 (±1,15)	1,06 (±0,98)	0,27 (±0,74)
	%	4,71	60,63	34,42	8,79
<b>PRS</b> <i>g PRS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	Tasa de carga	0,28 (±0,17)	0,29 (±0,17)	0,29 (±0,17)	0,28 (±0,15)
	Tasa de remoción	-0,02 (±0,09)	0,24 (±0,18)	0,05 (±0,16)	-0,03 (±0,07)
	%	-7,14	82,76	17,24	-10,71
<b>PT</b> <i>g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup></i>	Tasa de carga	0,33 (±0,18)	0,35 (±0,18)	0,34 (±0,19)	0,34 (±0,17)
	Tasa de remoción	0,03 (±0,10)	0,27 (±0,21)	0,09 (±0,17)	0,02 (±0,11)
	%	9,09	77,14	26,47	5,88

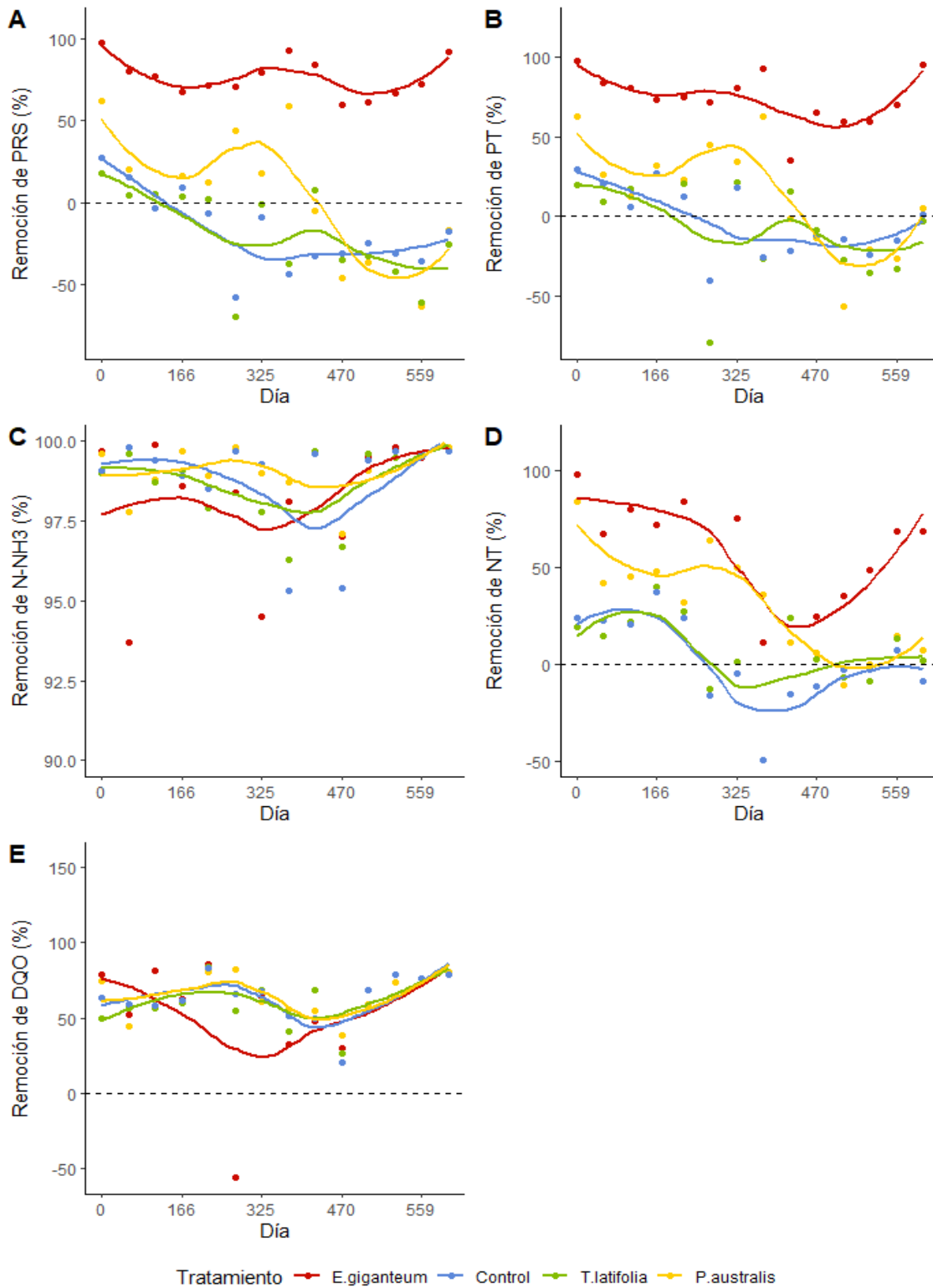
**Tabla 5.1.** Tasas de carga y de remoción en los tratamientos con respecto a FA de DQO, N-NH<sub>3</sub>, NT, PRS, y PT, y el porcentaje de remoción (%) en función de la carga. Los valores negativos en las tasas de eliminación indican una liberación de ese compuesto desde los mesocosmos hacia el agua de salida.

		Tratamiento	Tiempo	Tratamiento: Tiempo
<b>PRS</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	358,77	60,72	6,46
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,84	0,87	0,71
<b>PT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	75,58	43,35	4,87
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,80	0,75	0,64
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	15,61	114,32	4,65
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,63	0,90	0,59
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	10,05	133,83	18,36
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,57	0,74	0,86
<b>N-NH<sub>3</sub></b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	92,62	17042,23	35,88
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,90	1,00	0,97
<b>NT</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	40,32	37,15	6,84
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,75	0,81	0,67
<b>DQO</b> <i>mg L<sup>-1</sup></i>	F	358,77	60,72	6,46
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,84	0,87	0,71
<b>Temperatura</b> <i>°C</i>	F	18,43	688,14	8,26
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,60	0,99	0,65
<b>pH</b>	F	13,32	17,17	5,82
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,54	0,64	0,63
<b>Conductividad</b> <i><math>\mu\text{s cm}^{-1}</math></i>	F	22,72	53,83	6,26
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,59	0,88	0,66
<b>Turbidez</b> <i>NTU</i>	F	35,57	26,81	7,25
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,72	0,66	0,71
<b>Color</b> <i>PCU</i>	F	8,45	7,89	5,23
	p	<b>0,01*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
	$\eta^2$	0,60	0,35	0,54

**Tabla 5.2.** Resultados para el RM-ANOVA de cada variable durante el experimento, indicando el F de Fisher, los valores de p corregidos por Bonferroni y los valores de  $\eta^2$  generalizados. Los resultados significativos ( $p < 0.05$ ) se muestran en negrita con un asterisco (\*).



**Figura 5.3.** Diagrama de cajas de las concentraciones de A) PRS (mg L<sup>-1</sup>); B) PT (mg L<sup>-1</sup>); C) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>); D) N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>); E) N-NH<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>); F) NT (mg L<sup>-1</sup>); G) DQO (mg L<sup>-1</sup>) y H) Color (PCU) entre los distintos tratamientos durante la etapa experimental. Las letras (a,b,c) indican los grupos del análisis a posteriori de Tukey cuando hay diferencias significativas (p<0,05).



**Figura 5.4.** Porcentaje de remoción promedio de A) PRS; B) PT; C) N-NH<sub>3</sub>; D) NT; E) DQO entre los tratamientos en comparación con la entrada. Valores superiores a cero indican remoción (concentraciones más bajas a la salida que a la entrada) y valores inferiores a cero indican liberación (concentraciones más altas a la salida que a la entrada).

### Relaciones entre los nutrientes y los parámetros fisicoquímicos

Los resultados de los modelos lineales generalizados vinculados a la remoción de PT, NT, N-NH<sub>3</sub> y DQO se exhiben en la **Tabla 5.3**. En el caso de PT, el tratamiento con *P. australis* estuvo vinculado a la temperatura, conductividad y el pH, con el R<sup>2</sup> más alto (0,59). Los controles y los tratamientos con *T. latifolia* presentaron R<sup>2</sup> bajos (0,18 y 0,19, respectivamente), con la conductividad como predictor principal, mientras que *E. giganteum* tuvo un R<sup>2</sup> de 0,07, asociado exclusivamente a temperatura.

Para la remoción de NT, el modelo más robusto se observó también en el tratamiento con *P. australis* (R<sup>2</sup>=0,62), siendo las variables temperatura, conductividad y pH las mejores predictoras. Mientras que el pH fue el único predictor asociado a la variabilidad en *E. giganteum* (R<sup>2</sup> = 0,19), los controles y los tratamientos con *T. latifolia* no mostraron relaciones significativas.

En cuanto a la remoción de N-NH<sub>3</sub>, los controles y los tratamientos con *E. giganteum* obtuvieron R<sup>2</sup> moderados (0,21 y 0,11, respectivamente), relacionados con combinaciones de pH, conductividad y temperatura, mientras que los tratamientos con *P. australis* y *T. latifolia* no presentaron relaciones significativas con ninguna variable físicoquímica analizada.

Por último, con respecto a la remoción de DQO, el tratamiento con *E. giganteum* presentó el R<sup>2</sup> más alto (0,68), siendo pH y turbidez los principales predictores. *P. australis* alcanzó un R<sup>2</sup> de 0,2, mientras que los tratamientos con Control y *T. latifolia* tuvieron valores bajos o no significativos.

Variable dependiente	Tratamiento	R <sup>2</sup>	Mejor modelo (p<0.05)
% remoción de PT	Control	0,18	Conductividad
	<i>E. giganteum</i>	0,07	Temperatura
	<i>P. australis</i>	0,59	Temperatura + Conductividad + pH
	<i>T. latifolia</i>	0,19	Conductividad
% remoción de NT	Control	0	Modelo nulo
	<i>E. giganteum</i>	0,19	pH
	<i>P. australis</i>	0,62	Temperatura + Conductividad + pH
	<i>T. latifolia</i>	0	Modelo nulo
% remoción de N-NH <sub>3</sub>	Control	0,21	pH + Conductividad
	<i>E. giganteum</i>	0,11	Temperatura
	<i>P. australis</i>	0	Modelo nulo
	<i>T. latifolia</i>	0	Modelo nulo
% remoción de DQO	Control	0	Modelo nulo
	<i>E. giganteum</i>	0,68	pH + Turbidez
	<i>P. australis</i>	0,20	pH
	<i>T. latifolia</i>	0,07	Temperatura

**Tabla 5.3.** Resumen de resultados de los GLM vinculando los % de remoción de NT, PT, N-NH<sub>3</sub> y DQO con las variables fisicoquímicas medidas en el agua (Temperatura, pH, Conductividad, Turbidez), indicando el R2 del modelo con el mejor ajuste (AIC más bajo) y aquellas variables de dicho modelo que fueron significativas (p<0.05)

## Discusión

En este capítulo se investigó la capacidad de remoción de nutrientes en una etapa de tratamiento terciario bajo condiciones controladas durante un período prolongado (dos años). La carga hidráulica aplicada entre los tratamientos fue homogénea, y se mantuvo apenas por debajo de los 80 L d<sup>-1</sup> recomendados (hasta 120 L d<sup>-1</sup> para el tratamiento terciario) por la norma alemana DWA-A-262. Asimismo, la carga orgánica aplicada, otro parámetro clave en el diseño de humedales verticales, se mantuvo por debajo (poco más de un cuarto) del límite máximo de 20 g DQO m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, recomendado para tratamiento secundario (Austrian Standards International, 2009; Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall, 2017) resultando así coherente con el objetivo de evaluar la capacidad de eliminación de nutrientes en una etapa de tratamiento terciario.

La mayor eliminación de fósforo total se logró en los mesocosmos plantados con *E. giganteum*, medida como tasa promedio (0,27 g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) y como porcentaje de la carga aplicada (77,1 %). Si los comparamos con una revisión sistemática de 215 estudios seleccionados (Wu et al., 2023), estos resultados superan la mediana de las tasas (0,12 g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) y los porcentajes promedio de remoción (49,7%) registrados para los diseños más eficientes. Además, una tasa de eliminación de 0,34 g P m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, ligeramente superior a la obtenida en nuestro estudio, determinó en ese análisis el percentil 75 por encima del cual se ubicaron las tasas más altas registradas.

Para contextualizar mejor estos resultados, la **Tabla Suplementaria 5.4** proporciona los resultados obtenidos en estos y otros estudios similares que compartieron el criterio de tener al menos un año de maduración y/o monitoreo. Los tratamientos que lograron las tasas de eliminación más altas lo hicieron partiendo de tasas de carga elevadas, debido a altas concentraciones de fósforo y/o altas tasas de carga hidráulica. Bajo tales condiciones, sin embargo, se observaron altas concentraciones de fósforo en el efluente, bajos porcentajes de eliminación o ambos (Barbagallo et al., 2011; Bateganya et al., 2016; Cooper et al., 2020; Gunes et al., 2012; Licata et al., 2021; Mantovi et al., 2003; Shen et al., 2018; Terzakis et al., 2008; Zhai et al., 2016).

Los resultados con *E. giganteum* aquí muestran un alto rendimiento con una tasa de carga más moderada y una baja concentración de fósforo en el efluente (1,4 mg L<sup>-1</sup> ± 1,4 mg L<sup>-1</sup>), a diferencia de los otros tratamientos que probamos. Resultados similares se lograron en otro estudio (Ennabili & Radoux, 2021) utilizando el mismo tipo de humedal (flujo subsuperficial vertical, o “VSSF”), arena gruesa como material de relleno, y especies de plantas como las

leñosas de bosques ribereños *Salix purpurea*, *Populus euphratica* y *Tamarix gallica*, y la caña invasora *Arundo donax*. En una revisión que recopiló publicaciones sobre humedales construidos de flujo subsuperficial vertical, (Verma et al., 2022) también estableció se una relación lineal positiva entre las tasas de eliminación y las tasas de carga de fósforo, así como mejores resultados con sustratos de grava y arena en comparación con grava gruesa, dada la mayor superficie disponible para adsorción.

Del mismo modo, el rendimiento de remoción de nitrógeno obtenido en este ensayo con *E. giganteum* (1,91 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 60,6 %), se ubicó por encima de la mediana (1,30 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 50,1 %) correspondiente al tipo de humedal más eficiente en estudios previos (Wu et al., 2023). La concentración de NT en el efluente (20,07 mg L<sup>-1</sup> ± 10,29 mg L<sup>-1</sup>), mayoritariamente en forma de nitrato, resultó ser la más baja entre los tratamientos ensayados. Los estudios de la **Tabla Suplementaria 5.4** que superaron este rendimiento lo hicieron partiendo de tasas de carga más altas (Barbagallo et al., 2011; Bateganya et al., 2016; Cooper et al., 2020; Gunes et al., 2012; Licata et al., 2021; Shen et al., 2018; Zhai et al., 2016), a excepción del trabajo de Ennabili & Radoux (2021) quienes obtuvieron rendimientos superiores con concentraciones de NT en el efluente más bajas por efecto de las especies *S. purpurea* y, aún más pronunciado, *A. donax*.

El conocimiento de que las plantas mejoran el rendimiento de los humedales construidos está respaldado por numerosos estudios realizados en humedales con y sin vegetación, y su papel ha sido descrito y analizado en importantes artículos de revisión. A menos que las cargas de nutrientes sean muy bajas, la eliminación neta por absorción directa de las plantas suele representar una proporción relativamente pequeña de la eliminación total.

Las plantas influyen principalmente en el rendimiento del tratamiento a través de la ingeniería ecosistémica, al potenciar los procesos clave de transformación de nutrientes (por ejemplo, nitrificación y desnitrificación) mediante la liberación de oxígeno en la zona radicular y el suministro de materia orgánica. El ciclo y la acumulación de materia orgánica derivada de las plantas proporcionan un suministro sostenido de carbono orgánico para los microorganismos, secuestran nutrientes ligados orgánicamente y amortiguan la liberación de nutrientes. Además, el metabolismo de las plantas afecta los procesos de tratamiento en distintos grados según el diseño del sistema (Brix, 1997; Tanner, 2001). Incluso cuando se utilizan macrófitas sanas y maduras con formas de crecimiento similares, las diferencias en la eficiencia de eliminación entre especies vegetales son frecuentes. Estas diferencias están más relacionadas con la eliminación de nitrógeno (especialmente nitrato), la reducción de sólidos suspendidos y la eliminación de materia orgánica, mientras que para el fósforo no se han observado tendencias

claras. A medida que el diseño de los humedales construidos continúa mejorando, la selección de especies vegetales podría ser la mejor estrategia para maximizar aún más la eliminación de contaminantes (Brisson & Chazarenc, 2009).

La retención de fósforo en humedales construidos de flujo subsuperficial se ha centrado en el uso de materiales de lecho (agregados ligeros, subproductos industriales) con altas capacidades de adsorción. Debido a que el lecho tiene una capacidad finita, los humedales diseñados bajo este enfoque son inherentemente sacrificiales y requerirán excavación y reemplazo periódico del material del lecho como resultado. Una vez que los reservorios de retención de fósforo a corto plazo se saturan, la remoción de fósforo continúa, aunque a un ritmo mucho más lento, a través de mecanismos sostenibles como la precipitación química, la acumulación y la sedimentación de partículas (Kadlec & Wallace, 2008).

En este estudio se realizó un muestreo de sustrato conjuntamente con una medición de ORP en profundidad en una sola unidad experimental por tratamiento (**Figura Suplementaria 5.3**). En el mesocosmos con *E. giganteum* se encontraron características distintivas respecto de los otros tratamientos, con sedimentos más oscuros y cohesionados debido a un mayor contenido de materia orgánica, probablemente producida por las raíces. Adicionalmente a lo reportado, realizamos una estimación de materia orgánica por pérdida por ignición cuyos resultados se presentan en la **Tabla Suplementaria 5.3**. En general, se observa que la concentración de materia orgánica es mayor en los mesocosmos plantados y que los valores decrecen en profundidad en todos los casos. Pero con *E. giganteum*, los valores resultaron entre 5 y casi 10 veces más altos que con *P. australis*. Este patrón se replica en los perfiles de ORP, donde *E. giganteum* alcanza en los primeros 10 cm de profundidad valores más bajos que el resto de los tratamientos. Estos hallazgos plantean el interrogante de si las mejoras en el rendimiento con *E. giganteum* podrían estar relacionadas con esta singular condición rizosférica, dando lugar a distintas hipótesis que pueden ser revisadas en futuros estudios.

Dos mecanismos de remoción de P podrían tener lugar bajo tales condiciones. Por un lado, se encuentra bien documentada en humedales arbustivos templado-frío de Alaska la capacidad de las especies del género *Equisetum* de transportar P y otros nutrientes desde el horizonte C del suelo hacia la superficie, alcanzando hasta el 55% del total de P aportado por descomposición de hojarasca (Marsh et al., 2000). Respecto de estos hallazgos, Lambert et al. (2022) postularon que muchas especies que acumulan sílice, que es co-movilizado por carboxilatos movilizadores de P, probablemente liberen carboxilatos. La capacidad de

*Equisetum* para actuar como una bomba de nutrientes y su acumulación de sílice podría explicarse entonces por la liberación de carboxilato.

Por otra parte, la disponibilidad de materia orgánica y la presencia de gradientes de ORP podrían haber facilitado la remoción de N y P mediante nitrificación, desnitrificación endógena y eliminación de simultánea fósforo (“SNEDPR”), un proceso que está jugando un papel importante en muchos sistemas de remoción simultánea de N y P (“SNPR”) y que se espera sea tendencia de desarrollo en futuros humedales construidos (Wu et al., 2023). Wang et al. (2021) establecieron con éxito un proceso de SNEDPR en un humedal construido con aireación intermitente, y tras 22 semanas de operación demostraron que se puede lograr una alta eficiencia de eliminación de TN (96,21%) y P-PO<sub>3</sub><sup>3-</sup> (92,68%) integrando una etapa anaeróbica previa, aireación intermitente y estrategias de liberación periódica de P-PO<sub>3</sub><sup>3-</sup>. También postularon que el rendimiento de eliminación de P-PO<sub>3</sub><sup>3-</sup> y TN fue probablemente el resultado de la coordinación de microorganismos funcionales, es decir, nitrificadores, organismos aeróbicos acumuladores de P (APAO), organismos desnitrificadores acumuladores de P (DPAO) y organismos aeróbicos acumuladores de glicógeno (DGAO). Brevemente, el proceso implica que durante la etapa anaeróbica la mayor parte del carbono en el influente se convierte directamente en polímeros de almacenamiento carbonosos intracelulares mediante PAO y GAO, que proporcionan suficiente carbono para la asimilación posterior de P-PO<sub>3</sub><sup>3-</sup> y la desnitrificación endógena. Durante la etapa aeróbica posterior, la nitrificación completa convierte la mayor parte del amonio entrante en nitrato en la capa de biofilm aeróbica. Mientras tanto, la estratificación redox en el biofilm favorece el desarrollo de DGAO y DPAO, permitiendo que el sistema mantenga un proceso eficiente de nitrificación-denitrificación simultánea (Wang et al., 2021).

El notable enriquecimiento con materia orgánica observado en los mesocosmos con *E. giganteum* plantea interrogantes respecto a su impacto potencial en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Las sustancias húmicas exhiben capacidades de transferencia de electrones debido a los residuos redox activos presentes en esta materia orgánica natural. Además, microorganismos filogenéticamente diversos (arqueas y bacterias) capaces de reducir y oxidar estos grupos funcionales redox activos (por ejemplo, quinonas e hidroquinonas) están ampliamente distribuidos. Ya sea suprimiendo su producción, promoviendo su agotamiento o catalizando el ciclo biogeoquímico de elementos, las sustancias húmicas y sus análogos estructurales tienen el potencial inherente de desempeñar un papel clave en la prevención de la liberación de gases de efecto invernadero en entornos naturales y diseñados (Valenzuela & Cervantes, 2021).

Finalmente, el estudio reveló un aumento en la coloración del agua en los mesocosmos vegetados, con un efecto particularmente pronunciado en *E. giganteum*, presumiblemente debido a la liberación de carbono orgánico disuelto (DOC). El término "*browning*" ("amarronamiento") se refiere a un aumento significativo en la coloración del agua reportado en numerosos sistemas de agua dulce del hemisferio norte en las últimas décadas. Este oscurecimiento se ha atribuido principalmente al aumento de las concentraciones de DOC de origen terrestre, aunque las concentraciones crecientes de hierro también contribuyen a la intensificación de la coloración del agua (Kritzberg et al., 2020). Sin embargo, esta tendencia no es consistente en todas las regiones, ya que algunas aguas continentales experimentan una disminución en las concentraciones de DOC o no muestran una tendencia significativa (Imtiaz et al., 2025). Se han identificado múltiples factores como impulsores del aumento de las concentraciones de DOC en aguas superficiales, incluidos el declive de la lluvia ácida en las últimas décadas (Monteith et al., 2007), el aumento de temperaturas y precipitaciones asociado al cambio climático (de Wit et al., 2016) y los cambios en el uso del suelo y/o la cobertura terrestre (Kritzberg, 2017). Por lo tanto, al evaluar el rendimiento global de *E. giganteum*, también debería considerarse el impacto del DOC liberado.

Independientemente de los mecanismos subyacentes que puedan explicar nuestros resultados y que demandan futuros estudios, nuestros hallazgos sobre la capacidad de *E. giganteum* para retener fósforo y nitrógeno en aguas residuales resultan relevantes para el diseño de estrategias de tratamiento de aguas residuales con humedales construidos. Explorar las alternativas de recuperación de nutrientes aquí planteadas permitiría evaluar la aplicación de *E. giganteum* y, quizás, otras especies emparentadas, como ingenieras ecosistémicas capaces de establecer procesos que mejoren el rendimiento, minimizando la emisión de GEI y ofreciendo alternativas de recuperación, alineándose así con los principios de las metodologías de tratamiento de aguas residuales verdes y sostenibles.

Adicionalmente, aunque quizás no menos importante, la aplicación de plantas nativas en tecnologías para el tratamiento de aguas se prefiere al uso de especies introducidas potencialmente perjudiciales. Además, suelen tener un valor cultural, social, económico, etc., en sus territorios, que podría proveer de un valor extra a su aplicación en caso de ser explotable. Con numerosos usos en medicina popular en América Latina y Central, *E. giganteum* se utiliza como diurético, antiinflamatorio y astringente y para tratar trastornos oftalmológicos y renales. También se utiliza para el control de plagas y como fertilizante en la agricultura debido a su alto contenido de silicio, y posee actividades antidiabéticas y antifúngicas (Feitosa et al., 2018).



## Material suplementario

	FA	Control	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>	<i>E. giganteum</i>
<b>Temperatura (°C)</b>	16,81 (±7,57)	15,18 (±8,74)	14,63 (±8,36)	14,29 (±7,76)	13,95 (±7,22)
<b>pH</b>	7,91 (±0,25)	8,11 (±0,3)	7,97 (±0,24)	8,14 (±0,24)	7,75 (±0,36)
<b>Conductividad (<math>\mu\text{s cm}^{-1}</math>)</b>	2575,93 (±428,83)	2393,93 (±408,26)	2777,67 (±574,27)	2429,9 (±407,9)	2841,67 (±546,99)
<b>Turbidez (NTU)</b>	34,8 (±24,31)	7,73 (±6,02)	10,07 (±7,52)	8,34 (±7,11)	13,69 (±19,07)
<b>Q in</b>	0 (±0)	8,17 (±1,26)	8,47 (±1,19)	8,42 (±1,11)	8,65 (±1,15)
<b>Q out</b>	0 (±0)	8,65 (±1,55)	7,14 (±2,19)	8,6 (±1,21)	6,75 (±2,02)
<b>Color (PCU)</b>	10,08 (±7,94)	2,5 (±5,76)	10 (±9,94)	4,17 (±5,29)	37,5 (±35,92)
<b>DQO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	78,45 (±37,09)	26,9 (±18,35)	34,17 (±23,55)	29,17 (±20,6)	36,44 (±22,23)
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	2,63 (±2,54)	38,17 (±9,58)	33,7 (±12,34)	37,81 (±8,6)	20,01 (±11,4)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,28 (±0,31)	0,05 (±0,07)	0,07 (±0,1)	0,06 (±0,1)	0,05 (±0,08)
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	37,63 (±9,72)	0,39 (±0,52)	0,41 (±0,48)	0,45 (±0,55)	1 (±2,75)
<b>NT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	42,06 (±8,22)	37,79 (±7,17)	33,69 (±11,5)	37,37 (±7,24)	20,07 (±10,29)
<b>PRS (mg L<sup>-1</sup>)</b>	3,84 (±2,03)	3,96 (±1,4)	4,06 (±1,62)	4,15 (±1,5)	1,14 (±1,18)
<b>PT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	4,49 (±2,21)	4,1 (±1,54)	4,32 (±1,84)	4,36 (±1,85)	1,4 (±1,41)

**Tabla Suplementaria 5.1.** Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos en los diferentes tratamientos (Control, *P. australis*, *T. latifolia*, *Equisetum*) y en el agua de entrada (FA) durante la etapa experimental.

		Control				<i>E. giganteum</i>			<i>P. australis</i>		<i>T. latifolia</i>
		<i>E. giganteum</i>	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>	FA	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>	FA	<i>T. latifolia</i>	FA	FA
<b>PRS</b>	T	10,26	-0,70	-2,83	1,00	-10,12	-10,42	-7,58	-0,74	1,09	2,32
	df	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	p	<b>0,00*</b>	1,00	0,07	1,00	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	1,00	1,00	0,25
<b>PT</b>	T	8,29	-1,25	-1,99	-2,71	-8,46	-7,88	-7,71	-0,31	-0,73	-0,62
	df	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	p	<b>0,00*</b>	1,00	0,54	0,10	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	1,00	1,00	1,00
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	T	9,43	2,95	0,56	21,11	-6,58	-9,64	9,68	-2,76	15,58	23,25
	df	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	p	<b>0,00*</b>	0,05	1,00	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	0,09	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	T	-0,08	-1,12	-0,37	-4,44	-0,92	-0,45	-4,53	0,68	-3,92	-4,28
	df	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	p	1,00	1,00	1,00	<b>0,00*</b>	1,00	1,00	<b>0,00*</b>	1,00	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
<b>N-NH<sub>3</sub></b>	T	-1,37	-0,25	-0,70	-24,83	1,34	1,27	-25,77	-0,34	-24,98	-25,21
	df	40	41	41	41	40	40	40	41	41	41
	p	1,00	1,00	1,00	<b>0,00*</b>	1,00	1,00	<b>0,00*</b>	1,00	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
<b>NT</b>	T	10,42	3,11	0,79	-4,47	-6,51	-10,67	-10,81	-2,73	-4,89	-4,51
	df	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,03*</b>	1,00	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	0,09	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
<b>DQO</b>	T	-4,31	-4,06	-2,33	-13,65	0,86	3,37	-9,26	2,56	-12,37	-12,70
	df	40	41	41	41	40	40	40	41	41	41
	p	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>	0,25	<b>0,00*</b>	1,00	<b>0,02*</b>	<b>0,00*</b>	0,14	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>

**Tabla Suplementaria 5.2.** Resultados de los test a posteriori en las concentraciones de PRS, PT, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>, NT y DQO para el factor de Tratamiento del RM-ANOVA durante el experimento. Se indican los valores del estadístico T, los grados de libertad y los valores de p corregidos por Bonferroni para cada comparación entre tratamientos. Los resultados significativos (p<0.05) se muestran en negrita con un asterisco (\*).

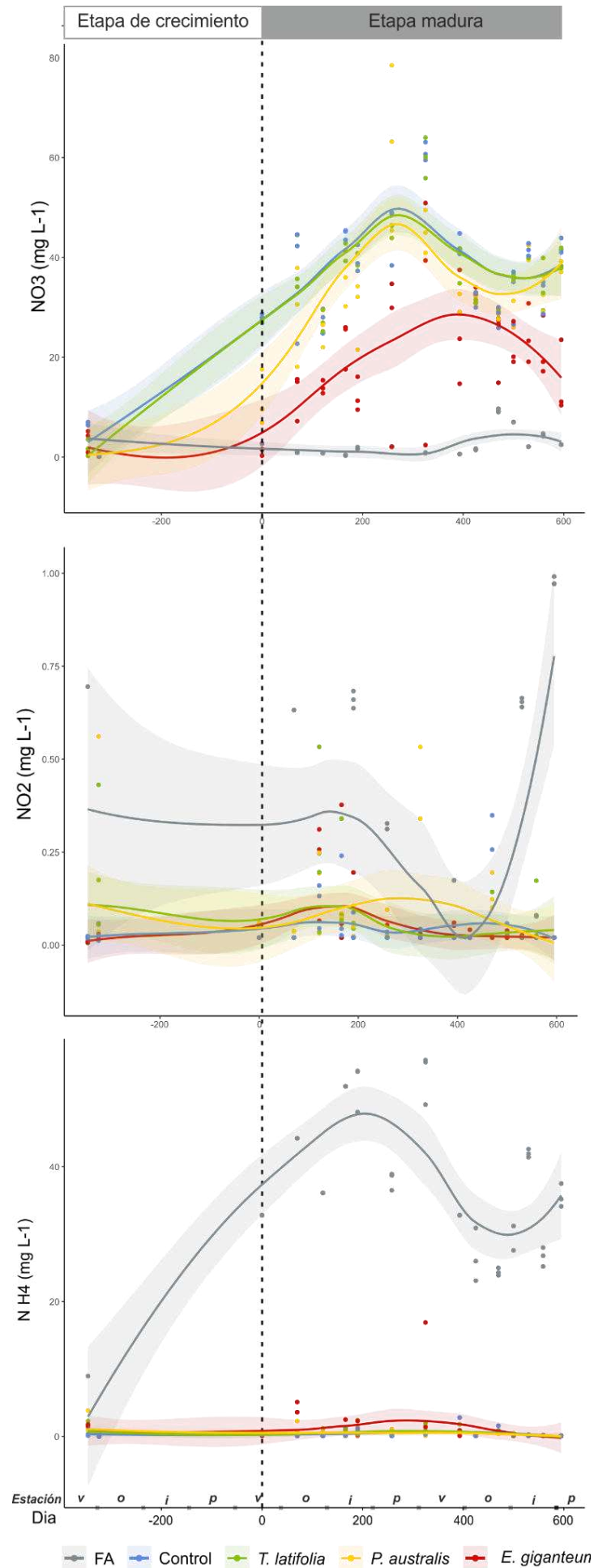
	Profundidad (cm)	Contenido de agua, %	% Pérdida por ignición
<b><i>P. australis</i></b>	0 - 5	26,3	1,5
	5 - 10	25,3	0,9
	10 - 15	11,4	0,4
<b><i>E. giganteum</i></b>	0 - 5	95,9	12,9
	5 - 10	37,9	5,8
	10 - 15	21,0	2,0
<b>Control</b>	0 - 5	9,4	0,6
	5 - 10	7,7	0,4
	10 - 15	9,0	0,2

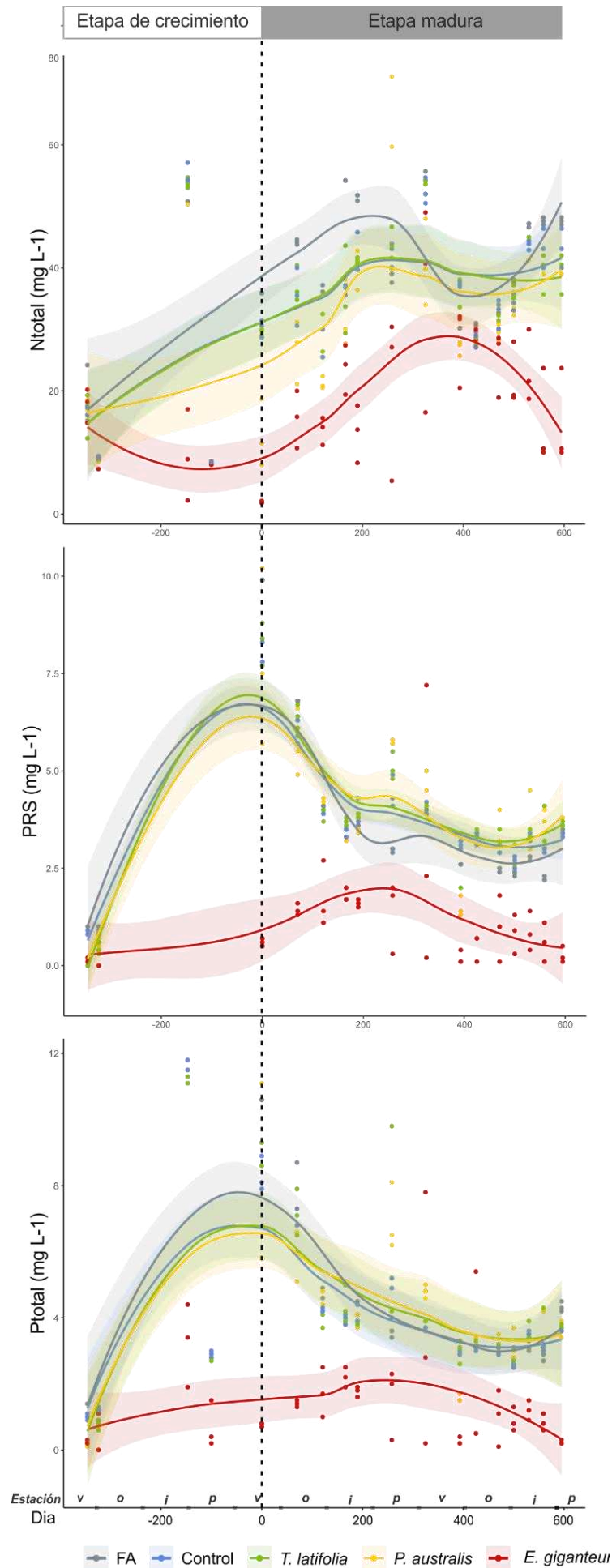
**Tabla suplementaria 5.3.** Porcentajes de contenido de agua y pérdida por ignición en el sedimento a distintas profundidades en los tratamientos.

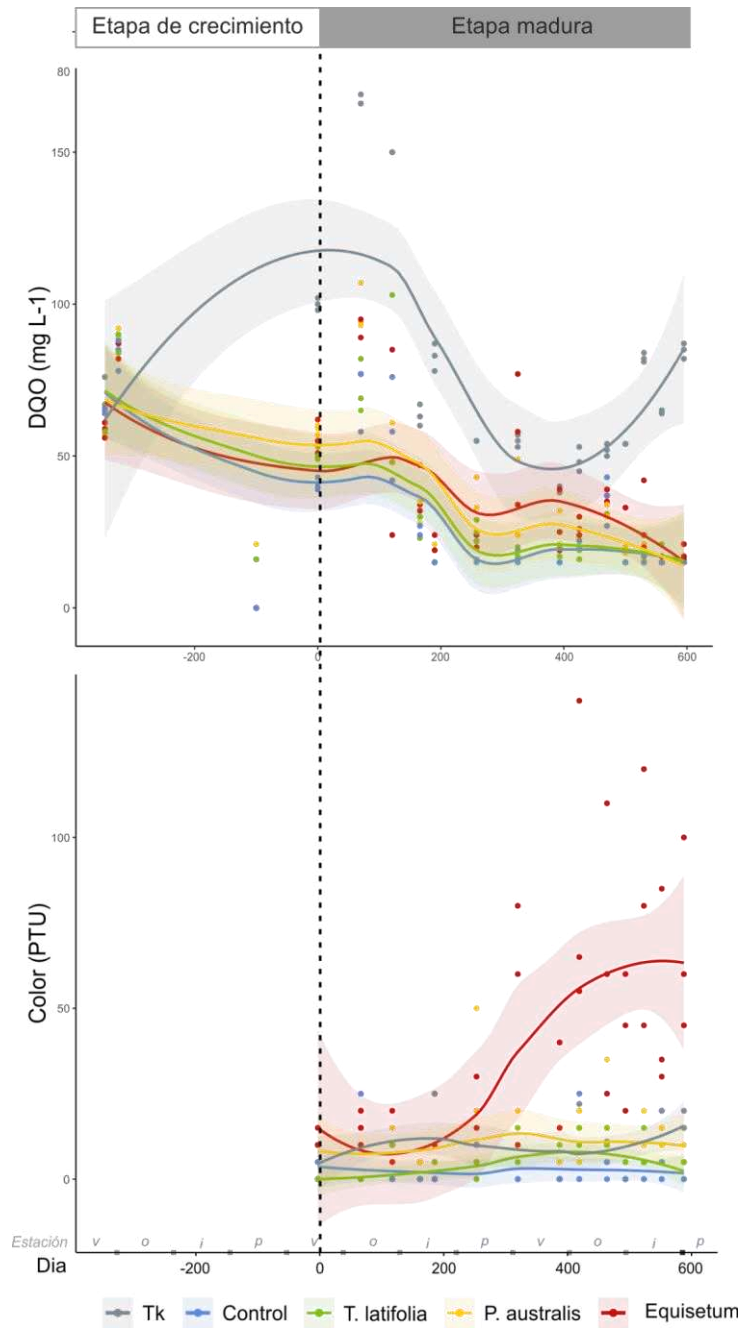
Tipo de humedal	Especies	Tipo de agua residual	Temp. <i>media, °C</i>	Area <i>m2</i>	HLR <i>m. d-1</i>	DQO - TC <i>g. m-2. d-1</i>	TN- TC <i>g. m-2. d-1</i>	TN- TR <i>g. m-2. d-1</i>	TN salida <i>mg L-1</i>	TP - TC <i>g. m-2. d-1</i>	TP - TR <i>g. m-2. d-1</i>	TP salida <i>mg L-1</i>	Sustrato	Referencia
F/FWS	NA	secundaria, cloacal	NA	6600,0	6,061	345,5	109,70	30,30	13,1 (NA)	3,64	0,85	0,5 (0,2)		Shen et al., 2018
FWS	Diversas	Secundaria, cloacal	10,2	10792,0	0,028	NA	0,79	0,27	18,8 (7,4)	0,06	0,02	1,5 (0,2)		Cooper et al., 2020
HSSF	<i>P. australis</i>	cruda, láctea/doméstica	NA	144,0	0,044	53,3	2,83	1,37	33,3 (NA)	0,56	0,34	5,0 (NA)	grava fina	Mantovi et al., 2011
VSSF (tidal)	<i>P. australis</i>	terciaria, cloacal	18,5	2280,0	0,044	0,9	0,39	0,06	7,5 (NA)	0,03	0,02	0,2 (0,0)	arena fina (+hierro)	Martín et al., 2013
FWS	Diversas	Secundaria, cloacal	10,2	2900,0	0,055	NA	3,24	2,01	23,0 (8,7)	0,48	0,31	3,1 (1,1)		Cooper et al., 2020
HSSF	<i>A. donax</i>	cruda, láctea/doméstica	17,5	50,0	0,060	12,9	5,46	2,84	43,7 (3,4)	0,84	0,33	8,4 (0,3)	grava gruesa	Licata et al., 2021
HSSF	<i>C. alternifolius</i>	cruda, láctea/doméstica	17,5	50,0	0,060	12,9	5,46	2,72	45,7 (2,4)	0,84	0,33	8,5 (0,3)	grava gruesa	Licata et al., 2021
HSSF	<i>C. Papyrus</i>	secundaria, cloacal	23,0	0,5	0,067	20,2	3,94	1,97	20,0 (NA)	2,38	1,02	15,0 (NA)	grava fina	Bateganya et al., 2015
VSSF	<i>A. donax</i>	terciaria cloacal	20,8	2,0	0,068	8,6	1,55	1,27	4,2 (NA)	0,33	0,32	0,2 (0,4)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021
VSSF	<i>S. purpurea</i>	terciaria cloacal	20,8	2,0	0,069	8,7	1,58	0,62	14,0 (NA)	0,34	0,25	1,3 (0,8)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021
VSSF	<i>T. gallica</i>	terciaria cloacal	20,8	2,0	0,073	9,2	1,67	0,86	11,2 (NA)	0,36	0,30	0,8 (0,5)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021
<b>VSSF</b>	<b><i>P. australis</i></b>	<b>secundaria, sintético</b>	<b>17,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,073</b>	<b>5,8</b>	<b>3,08</b>	<b>1,06</b>	<b>33,7 (11,5)</b>	<b>0,34</b>	<b>0,09</b>	<b>4,3 (1,8)</b>	<b>arena</b>	<b>Este estudio</b>
VSSF	<i>A. donax</i>	secundaria cloacal	20,8	2,0	0,074	22,6	2,89	2,46	5,8 (NA)	0,50	0,48	0,3 (0,4)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021
VSSF	<i>P. euphratica</i>	terciaria cloacal	20,8	2,0	0,074	9,3	1,69	0,86	11,3 (NA)	0,36	0,22	1,9 (0,9)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021

VSSF	<i>E. giganteum</i>	secundaria, sintético	17,1	0,1	0,075	5,9	3,15	1,91	20,1 (10,3)	0,35	0,27	1,4 (1,4)	arena	Este estudio
VSSF	<i>S. purpurea</i>	secundaria cloacal	20,8	2,0	0,094	28,5	3,65	2,54	11,8 (NA)	0,63	0,54	0,9 (0,8)	arena gruesa	Ennabili et al., 2021
VSSF/F/FWS/HSSF	NA	secundaria, cloacal	NA	40000,0	0,100	5,8	0,93	0,82	1,1 (NA)	0,07	0,06	0,1 (0,1)		Shen et al., 2018
HSSF	<i>T. latifolia</i>	secundaria, cloacal	22,1	72,3	0,110	20	3,54	0,22	30,0 (NA)	0,35	0,10	2,3 (NA)	Láminas de acero	von Spearling, 2015
VSSF (French I)	Grass Tifton 85	cruda, cloacal	22,1	86,4	0,160	72	4,81	0,62	27,0 (NA)	0,60	0,28	2,1 (NA)	grava fina	von Spearling, 2015
FWS	<i>T. latifolia</i>	cruda, cloacal	12,0	2840,0	0,162	100,2	5,86	2,93	18,0 (NA)	1,07	0,37	4,3 (NA)		Gunes et al., 2012
HSSF/FWS	<i>P. australis</i>	Secundaria, cloacal	17,3	2080,0	0,166	9,2	4,82	2,99	11,0 (6,0)	1,00	0,33	4,0 (3,0)	Volc. grava	Barbagallo et al., 2011
HSSF	<i>P. australis</i>	Secundaria, cloacal	17,5	1950,0	0,177	11,4	4,08	1,77	13,0 (7,0)	1,24	0,36	5,0 (2,0)	grava + Ca	Barbagallo et al., 2011
FWS	<i>A. donax/P. australis</i>	escorrentía vehicular	17,2	33,0	0,191	18,9	0,57	0,29	1,5 (NA)	0,65	0,38	1,4 (0,4)	grava	Terzakis et al., 2008
HSSF	<i>A. donax/P. australis</i>	escorrentía vehicular	17,2	32,0	0,191	19,5	0,59	0,35	1,2 (NA)	0,67	0,49	0,9 (0,4)	grava	Terzakis et al., 2008
VSSF	<i>C. Papyrus</i>	secundaria, cloacal	23,0	0,2	0,250	77,3	15,07	9,16	20,0 (NA)	9,10	5,41	10,0 (NA)	arena gruesa	Bateganya et al., 2016
VSSF(aer)/HSSF	<i>C. alternifolius</i>	secundaria, cloacal	14,4	394,0	0,287	19,8	10,92	5,17	20,0 (6,0)	0,92	0,40	1,8 (0,8)	arena gruesa	Zhai et al., 2016
FWS	<i>A. donax/P. australis</i>	escorrentía vehicular	17,2	33,0	0,382	37,8	1,15	0,57	1,5 (NA)	1,30	0,73	1,5 (0,3)	grava	Terzakis et al., 2008
HSSF	<i>A. donax/P. australis</i>	escorrentía vehicular	17,2	32,0	0,382	39,0	1,18	0,59	1,5 (NA)	1,34	0,87	1,2 (0,2)	grava	Terzakis et al., 2008

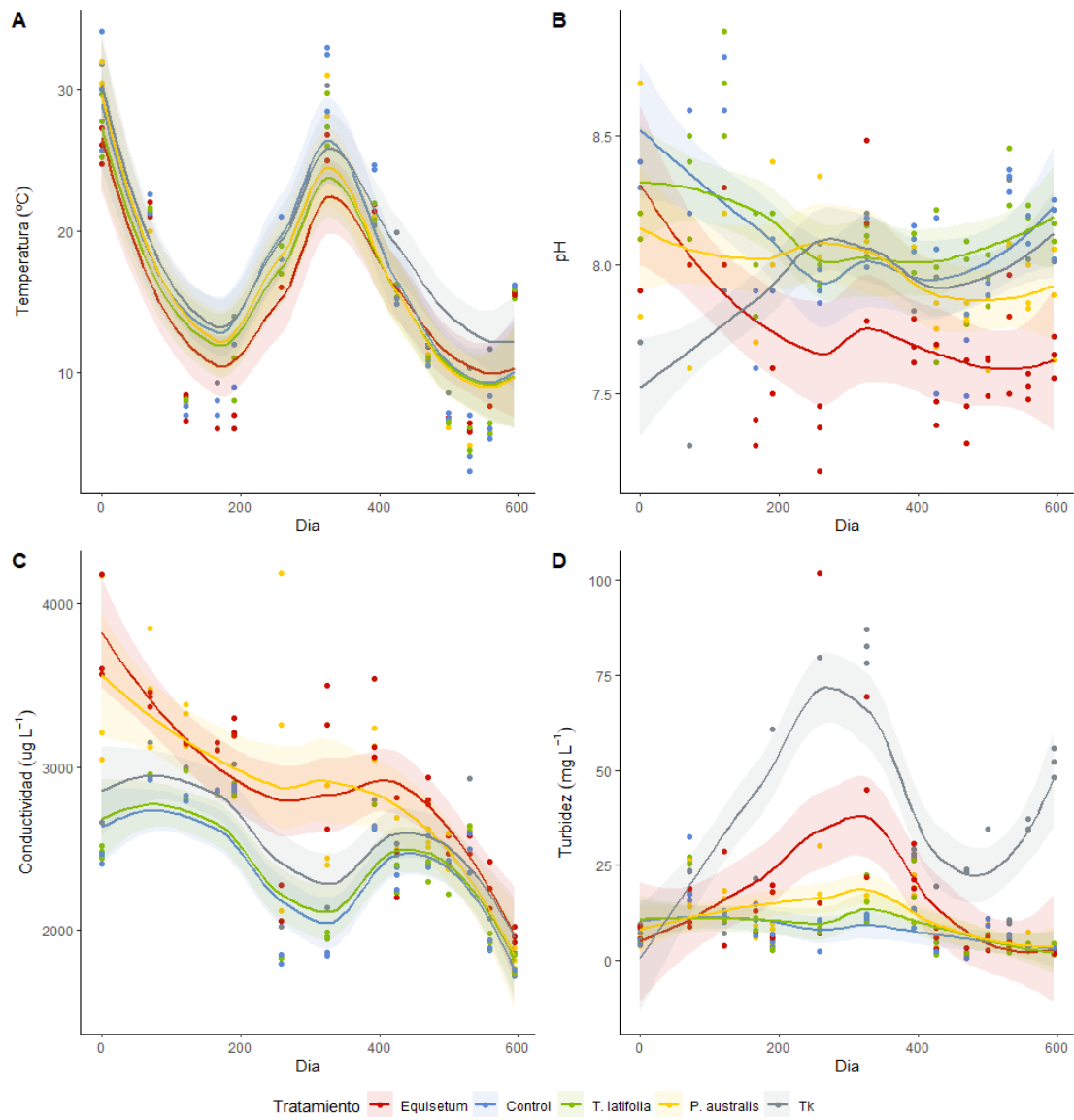
**Tabla suplementaria 5.4.** Revisión de condiciones experimentales y resultados de otros estudios con diseños similares al empleado en este estudio, ordenados por su tiempo de retención hidráulica (HRT). Se indica el tipo de humedal construido (FWS = superficie de agua libre; VSSF = Vertical subsuperficial; HSSF = horizontal subsuperficial), las plantas empleadas, el origen del agua residual, las tasas de carga (TC) de DQO, TN y TP, tasas de retención (TR) de TN y TP, las concentraciones de TP y TN a la salida del humedal y el tipo de sustrato utilizado.



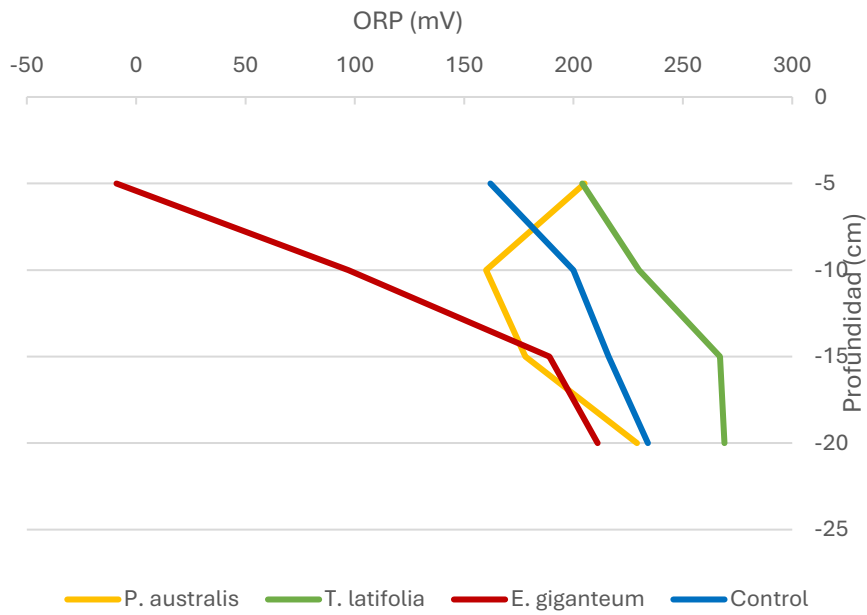




**Figura Suplementaria 5.1.** Variaciones de DQO, Color, PRS, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>3</sub>, NT y PT en la salida de los mesocosmos y en la entrada (FA) durante el crecimiento de las plantas (etapa de crecimiento, días -346 el día 0) y a lo largo del experimento (etapa madura, desde día 0 al día 595). En el eje horizontal también se indican las estaciones del año (i.e. v,o,i,p).



**Figura Suplementaria 5.2.** Variaciones de Temperatura, pH, Conductividad y turbidez en la salida de los mesocosmos y en la entrada (FA) lo largo del experimento.



**Figura Suplementaria 5.2.** Perfil de ORP en los mesocosmos (día 430, invierno) y fotografías de los rellenos de mesocosmos con *E. giganteum*, *P. australis*, *T. latifolia* y control a profundidades de hasta 5, 10, 15 y 20 cm. Se observa la presencia de materia orgánica oscura y un efecto de agregación de la arena con *E. giganteum*.

## CAPÍTULO 6

# CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente trabajo de tesis investigó el efecto de materiales de relleno accesibles y de especies vegetales nativas sobre la remoción conjunta de nitrógeno y fósforo en humedales de tratamiento.

A lo largo de los experimentos en mesocosmos y en campo se ha resaltado el papel determinante de las especies vegetales y los efectos del tipo de sustrato y las condiciones fisicoquímicas para la optimización de estos sistemas, aportando evidencias que permite reflexionar sobre su aplicación en contextos reales y su potencial de desarrollo como herramientas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales.

La investigación llevada a cabo en mesocosmos maduros de humedales de flujo ascendente sometidos a alta carga hidráulica y moderada carga orgánica (Capítulo 3), reveló que el tratamiento con especies vegetales y, en menor medida el sustrato y la interacción entre ambos, afectaron significativamente la remoción de fósforo. En sustrato de conchilla, los tratamientos rindieron mejores resultados y se alcanzaron las máximas eficiencias con *S. giganteus* y *S. californicus*. La excepción fue el tratamiento con *Z. bonariensis*, que alcanzó su máximo rendimiento en LECA. No se encontraron trabajos previos que demuestren el efecto de la vegetación, la variación específica y su interacción con el sustrato sobre la eficiencia de remoción de fósforo. La remoción de amoníaco, en cambio, se vio afectada por el tratamiento y, en menor medida, por la interacción con el sustrato, y las máximas eficiencias se alcanzaron con las mismas combinaciones de sustratos y tratamientos que para el fósforo. Se encontraron fuertes indicios de que las diferencias de rendimiento en la oxidación de amoníaco se pueden explicar por la provisión diferencial de oxígeno por ROL. La remoción de NT estuvo ligada a la oxidación microbiológica de amoníaco que, bajo condiciones microaeróbicas, encuentra facilitado el acoplamiento con procesos de reducción del nitrógeno oxidado con eliminación final de nitrógeno gaseoso. Finalmente, la remoción de DBO<sub>5</sub>, también afectada por sustrato y tratamiento, alcanzó los máximos rendimientos con las mismas combinaciones de sustrato y tratamiento y tampoco se encontraron evidencias de ello en trabajos previos. Este estudio pone

de manifiesto la interacción compleja entre sustratos y vegetales, evidenciando que ciertas combinaciones potencian la remoción de nutrientes de manera más eficaz.

En los mesocosmos de flujo vertical descendente rellenos de arena, un material más accesible pero menos reactivo para la remoción de fósforo, las cargas hidráulica y orgánica resultaron moderadas, consistentes con el objetivo de evaluar el rendimiento de remoción de nutrientes sobre un efluente con tratamiento secundario (Capítulo 5). Bajo este régimen de cargas más bajas que en el experimento anterior, la investigación reveló una elevada eficiencia de remoción de fósforo con *E. giganteum*, tres veces mayor que la obtenida con *P. australis*, y en el orden de las alcanzadas con sustratos reactivos, aunque con una carga de P un tercio más baja. La remoción de amoníaco, como era de esperar, fue completa (>98%) en todos los tratamientos, superándose así el déficit de oxígeno por el mayor aporte atmosférico (AR) en todo el lecho, favorecido además por una carga orgánica más baja. La remoción de NT, en cambio, alcanzó su valor máximo (61 %) con *E. giganteum* pero quedando por debajo del rendimiento de todos los mesocosmos plantados del experimento anterior. A diferencia de estos últimos, la remoción de nitrógeno estuvo limitada por la reducción del nitrógeno oxidado que solo fue significativa, aunque parcial, con *E. giganteum*, explicada por la singular producción de materia orgánica y reducción de ORP en su rizósfera.

En términos de remoción de nutrientes, la especie *Equisetum giganteum* demostró ser la más eficiente, superando a otras helófitas comúnmente utilizadas, como *Phragmites australis* y *Typha latifolia*. La mayor eliminación de fósforo total (77,1% de la carga aplicada) y nitrógeno total (60,6%) se logró en los mesocosmos plantados con esta especie, lo que representa tasas superiores a las reportadas en revisiones sistemáticas recientes. Este rendimiento podría atribuirse a las características únicas de *E. giganteum*, incluyendo su capacidad de modificar las condiciones redox en la rizosfera y actuar como una “bomba de nutrientes”, facilitando la movilización y el transporte de fósforo desde capas profundas hacia la superficie. Además, se detectó un enriquecimiento significativo de materia orgánica en los mesocosmos con *E. giganteum*, lo que podría haber contribuido a la creación de gradientes redox favorables para los procesos de desnitrificación simultánea con la remoción de fósforo. Con baja carga orgánica aplicada, las remociones de DQO no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

El sistema de tratamiento a escala real implementado en una escuela rural con cargas hidráulica y orgánica elevadas (Capítulo 5) demostró ser eficaz en la remoción de materia orgánica. Bajo ese régimen, los humedales triplicaron las tasas obtenidas en los mesocosmos de configuración correspondiente (conchilla y *Z. bonariensis*) y superaron su eficiencia de remoción (HAL = 80,0%). La remoción de nutrientes, en cambio, fue desmejorada bajo tales

condiciones. Para el amoníaco la tasa y la remoción porcentual en la etapa de humedales fue un tercio de la obtenida en el ensayo de mesocosmos con la misma configuración y la concentración en el vertido superó la normativa. Algo similar ocurrió con el NT. Respecto del P, las tasas obtenidas alcanzaron un quinto del valor obtenido en los mesocosmos correspondientes. Estos resultados reflejan tanto las limitaciones del diseño como las condiciones operativas subóptimas, especialmente en lo que respecta a las cargas hidráulicas aplicadas, que superaron los valores recomendados en la literatura para sistemas de humedales horizontales y verticales. La eliminación de coliformes fecales, aunque significativa (99,0% en la laguna de pulido), no alcanzó los estándares normativos requeridos para la descarga en cuerpos de agua superficial. La carga orgánica aplicada superó la requerida para una etapa de maduración con reducción de patógenos.

Las interacciones entre las condiciones fisicoquímicas del sistema, en particular el pH y el potencial de óxido-reducción (ORP), también jugaron un papel determinante en la eficiencia de remoción de nutrientes. Los modelos lineales generalizados aplicados revelaron que el pH fue la variable más influyente en la retención de fósforo y nitrógeno, mientras que las concentraciones de PRS y PT surgen como predictores de la retención de materia orgánica y nutrientes. Estos resultados subrayan la necesidad de un monitoreo constante de estas variables para optimizar el rendimiento de los sistemas de tratamiento en contextos reales.

## Recomendaciones prácticas para la optimización de humedales construidos

A partir de los resultados obtenidos, se pueden proponer las siguientes recomendaciones para el diseño y optimización de sistemas de tratamiento basados en humedales construidos:

- **Selección de especies vegetales:** Considerar el uso de *Equisetum giganteum* en humedales de flujo subsuperficial vertical, dada su mayor eficiencia en la eliminación de fósforo y nitrógeno en comparación con especies comúnmente utilizadas.
- **Optimización del sustrato:** Considerar el uso de **conchilla** en lugar de LECA cuando el objetivo es maximizar la adsorción de fósforo y mejorar la retención de materia orgánica.
- **Carga hidráulica adecuada:** Ajustar los caudales aplicados a los valores recomendados en la literatura para evitar sobrecargas y mejorar la eficiencia de remoción de nutrientes.

- **Monitoreo a largo plazo:** Implementar estudios prolongados para evaluar la estabilidad del rendimiento del sistema y los efectos de la acumulación de materia orgánica en la eficiencia de remoción de nutrientes.
- **Estrategias de recuperación de nutrientes:** Explorar el uso de biomasa de *E. giganteum* u otras especies como biofertilizante o en otras aplicaciones ecológicas y/o económicas.

## Líneas futuras de investigación

Si bien los resultados obtenidos son relevantes para el diseño y mejora de humedales construidos, se identifican diversas áreas que requieren investigación adicional para optimizar aún más estos sistemas:

1. **Optimización de sustratos para mejorar la retención de nutrientes**
  - Evaluar nuevos materiales de lecho con alta capacidad de adsorción de fósforo que no requieran reemplazo frecuente.
  - Estudiar la incorporación de biochar o sustratos enriquecidos con hierro, calcio o magnesio para mejorar la eliminación de fósforo.
2. **Evaluación del efecto de variaciones estacionales en la eficiencia del sistema**
  - Analizar la influencia de cambios estacionales en la temperatura, disponibilidad de oxígeno y actividad biológica sobre la remoción de nitrógeno y fósforo.
  - Determinar si es necesario ajustar la operación del sistema en función de la época del año.
3. **Estrategias para mejorar la eliminación de patógenos**
  - Estudiar el efecto de combinaciones de humedales con etapas de desinfección adicionales (Cloración, UV, filtración).
  - Evaluar el uso de plantas con propiedades antimicrobianas para mejorar la remoción de patógenos.
4. **Mecanismos específicos de remoción de fósforo en *E. giganteum***
  - Determinar si la eficiencia de eliminación observada se debe a mecanismos de adsorción en la rizosfera, acumulación intracelular u otros procesos biogeoquímicos específicos.
  - Analizar la liberación de carboxilatos y otros compuestos en la rizosfera como posible estrategia de movilización de fósforo.
5. **Impacto del enriquecimiento de materia orgánica en la emisión de gases de efecto invernadero**

- Evaluar si la acumulación de materia orgánica en humedales plantados con *E. giganteum* aumenta o disminuye la emisión de metano y óxido nitroso.
- Explorar el papel de las sustancias húmicas en la mitigación de emisiones en estos sistemas.

**6. Aplicaciones prácticas de la biomasa generada en humedales construidos**

- Investigar el potencial de *E. giganteum* como biofertilizante o en procesos de fitorremediación.
- Analizar su posible uso en la producción de biogás o materiales con aplicaciones industriales.

## BIBLIOGRAFIA

Ádám, K., Krogstad, T., Vråle, L., Søvik, A. K., & Jenssen, P. D. (2007). Phosphorus retention in the filter materials shellsand and Filtralite P®—Batch and column experiment with synthetic P solution and secondary wastewater. *Ecological Engineering*, 29(2), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.09.021>

Allen, W. C., Hook, P. B., Biederman, J. A., & Stein, O. R. (2002). Temperature and wetland plant species effects on wastewater treatment and root zone oxidation. *Journal of Environmental Quality*, 31(3), 1010-1016. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1010>

APHA, AWWA, WEF, Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. (Eds.). (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). APHA Press, Washington DC.

Apritama, M. R., Adicita, Y., Suryawan, I. W. K., Prajati, G., & Afifah, A. S. (2019). Removal of BOD and COD in TPA leachate using subsurface constructed wetland with *Equisetum hyemale*. 2019 2nd International Conference on Applied Engineering (ICAE), 1-4. <https://doi.org/10.1109/ICAE47758.2019.9221666>

Artigas, J., García-Berthou, E., Bauer, D. E., Castro, M. I., Cochero, J., Colautti, D. C., ... & Sabater, S. (2013). Global pressures, specific responses: Effects of nutrient enrichment in streams from different biomes. *Environmental Research Letters*, 8(1), 014002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/014002>

Austrian Standards International. (2009). ÖNORM B 2505:2009 03 01 Kläranlagen—Intermittierend beschickte Bodenfilter („Pflanzenkläranlagen“)—Anwendung, Bemessung, Bau, Betrieb, Wartung und Überprüfung. <https://www.austrian-standards.at/de/shop/onorm-b-2505-2009-03-01~p1714213>

Autoridad del Agua PBA. (2003). Boletín Oficial 24835 Resolución 336/2003: Modifica resolución de AGOSBA N° 389/98 relativa a las normas para el vertido de efluentes líquidos. <https://normas.gba.gob.ar/documentos/0P3k4eSA.html>

Barbagallo, S., Cirelli, G. L., Marzo, A., Milani, M., & Toscano, A. (2011). Hydraulic behaviour and removal efficiencies of two H-SSF constructed wetlands for wastewater reuse with different operational life. *Water Science and Technology*, 64(5), 1032-1039. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.553>

Bateganya, N. L., Kazibwe, A., Langergraber, G., Okot-Okumu, J., & Hein, T. (2016). Performance of subsurface flow constructed wetland mesocosms in enhancing nutrient removal from municipal wastewater in warm tropical environments. *Environmental Technology*, 37(8), 960-974. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1095245>

Bendschneider, K., & Robinson, R. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*, 11.

Boutin, C. (1987). Domestic wastewater treatment in tanks planted with rooted macrophytes: Case study; description of the system; design criteria; and efficiency. *Water Science and Technology*, 19(10), 29-40. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0095>

Breen, P. F., & Chick, A. J. (1995). Rootzone dynamics in constructed wetlands receiving wastewater: A comparison of vertical and horizontal flow systems. *Water Science and Technology*, 32(3), 281-290. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00629-X](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00629-X)

Brisson, J., & Chazarenc, F. (2009). Maximizing pollutant removal in constructed wetlands: Should we pay more attention to macrophyte species selection? *Science of The Total Environment*, 407(13), 3923-3930.

Brix, H. (1997). Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Water Science and Technology*, 35(5), 11-17. <https://doi.org/10.2166/wst.1997.0154>

Brix, H., & Arias, C. A. (2005). The use of vertical flow constructed wetlands for on-site treatment of domestic wastewater: New Danish guidelines. *Ecological Engineering*, 25(5), 491-500. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.07.009>

Brix, H., Arias, C. A., & Bubba, M. del. (2001). Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11-12), 47-54. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0808>

Comisión Europea, Berland, J., Cooper, P., & Faby, J. (Eds.). (2001). *Procesos extensivos de depuración de aguas residuales adaptados a comunidades pequeñas y medianas (de 500 a 5.000 equivalentes habitante)*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones.

Convención de Ramsar. (1971). Documento informativo Ramsar No. 1: ¿Qué son los humedales? Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional. <https://www.ramsar.org/es/document/documento-informativo-ramsar-no-1-que-son-los-humedales>

Cooper, R. J., Hawkins, E., Locke, J., Thomas, T., & Tosney, J. (2020). Assessing the environmental and economic efficacy of two integrated constructed wetlands at mitigating eutrophication risk from sewage effluent. *Water and Environment Journal*, 34(4), 669-678. <https://doi.org/10.1111/wej.12605>

Crumpton, W. G., Isenhardt, T. M., & Mitchell, P. D. (1992). Nitrate and organic N analyses with second-derivative spectroscopy. *Limnology and Oceanography*, 37(4), 907-913.

Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>

de Wit, H. A., Valinia, S., Weyhenmeyer, G. A., Futter, M. N., Kortelainen, P., Austnes, K., ... & Vuorenmaa, J. (2016). Current browning of surface waters will be further promoted by wetter climate. *Environmental Science & Technology Letters*, 3(12), 430-435. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00396>

Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall. (2017). DWA-A 262—Grundsätze für Bemessung, Bau und Betrieb von Kläranlagen mit bepflanzten und unbepflanzten Filtern | Lieferprodukt | A 262-17. <https://shop.dwa.de/DWA-A-262-Grundsätze-für-Bemessung-Bau-und-Betrieb-von-Kläranlagen-mit-bepflanzten-und-unbepflanzten-Filtern/A-262-17>

Di Giorgi, H., Rep, R., & Mariñelarena, A. (2009). Remoción de DBO5, nutrientes y bacterias en humedales de tratamiento de flujo vertical ascendente. *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)*, 4), 25-29. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/92498>

Doane, T. A., & Horwath, W. R. (2003). Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. *Analytical Letters*, 36(12), 2713-2722.

Dodds, W. K., & Welch, E. B. (2000). Establishing nutrient criteria in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 19(1), 186-196. <https://doi.org/10.2307/1468291>

Dotro, G., Langergraber, G., Molle, P., Nivala, J., Puigagut, J., Stein, O., & von Sperling, M. (2017). Treatment Wetlands. *Water Intelligence Online*, 16, 9781780408774. <https://doi.org/10.2166/9781780408774>

Ennabili, A., & Radoux, M. (2021). Nitrogen and phosphorus uptake and biomass production in four riparian plants grown in subsurface flow constructed wetlands for urban wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, 280, 111806. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111806>

Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M. M., ... & Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), Article 7288. <https://doi.org/10.1038/nature08883>

Fan, Y., Wu, X., Shao, L., Han, M., Chen, B., Meng, J., ... & Chen, G. (2021). Can constructed wetlands be more land efficient than centralized wastewater treatment systems? A case study based on direct and indirect land use. *Science of The Total Environment*, 770, 144841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144841>

Ferree, M. A., & Shannon, R. D. (2001). Evaluation of a second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater samples. *Water Research*, 35(1), 327-332. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00222-0)

Ferreira, C. S. S., Kašanin-Grubin, M., Solomun, M. K., Sushkova, S., Minkina, T., Zhao, W., & Kalantari, Z. (2023). Wetlands as nature-based solutions for water management in different environments. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 33, 100476. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2023.100476>

Gunes, K., Tuncsiper, B., Ayaz, S., & Drizo, A. (2012). The ability of free water surface constructed wetland system to treat high strength domestic wastewater: A case study for the Mediterranean. *Ecological Engineering*, 44, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.04.008>

Howarth, R. W. (2022). Nitrogen. En T. Mehner & K. Tockner (Eds.), *Encyclopedia of Inland Waters (Second Edition)* (pp. 155-162). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819166-8.00138-9>

Husby, C. (2013). Biology and Functional Ecology of Equisetum with Emphasis on the Giant Horsetails. *The Botanical Review*, 79(2), 147-177. <https://doi.org/10.1007/s12229-012-9113-4>

Imtiaz, M. N., Paterson, A. M., Higgins, S. N., Yao, H., Houle, D., & Hudson, J. J. (2025). Has lake brownification ceased? Stabilization, re-browning, and other factors associated with dissolved organic matter trends in eastern Canadian lakes. *Water Research*, 269, 122814. <https://doi.org/10/g82jcw>

Johansson Westholm, L. (2006). Substrates for phosphorus removal—Potential benefits for on-site wastewater treatment? *Water Research*, 40(1), 23-36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.006>

Johansson, L. (1997). The use of Leca (Light Expanded Clay Aggregates) for the removal of phosphorus from wastewater. *Water Science and Technology*, 35(5), 87-93. <https://doi.org/10.2166/wst.1997.0171>

Kadlec, R. H., & Wallace, S. D. (2009). *Treatment wetlands* (2nd ed.). CRC Press.

Katopodis, G. N., Rodríguez, C. A., Zárate, F. J., & Regueira, J. M. (2023). Diagnóstico y perspectivas del tratamiento de aguas residuales en Argentina [working paper]. CAF - Banco de Desarrollo de América Latina y el Caribe. <https://scioteca.caf.com/handle/123456789/2153>

Kritzberg, E. S. (2017). Centennial-long trends of lake browning show major effect of afforestation. *Limnology and Oceanography Letters*, 2(4), 105-112. <https://doi.org/10.1002/lol2.10041>

Kritzberg, E. S., Hasselquist, E. M., Škerlep, M., Löfgren, S., Olsson, O., Stadmark, J., ... & Laudon, H. (2020). Browning of freshwaters: Consequences to ecosystem services, underlying drivers, and potential mitigation measures. *Ambio*, 49(2), 375-390. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01227-5>

Kutschera, L., & Lichtenegger, E. (1960). *Wurzelatlas mitteleuropäischer Ackerunkräuter und Kulturpflanzen*. DLG-Verlag.

Lambert, T., Perolo, P., Escoffier, N., & Perga, M.-E. (2022). Enhanced bioavailability of dissolved organic matter (DOM) in human-disturbed streams in Alpine fluvial networks. *Biogeosciences*, 19(1), 187-200. <https://doi.org/10.5194/bg-19-187-2022>

Licata, M., Ruggeri, R., Iacuzzi, N., Virga, G., Farruggia, D., Rossini, F., & Tuttolomondo, T. (2021). Treatment of combined dairy and domestic wastewater with constructed wetland system in Sicily (Italy). *Water*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/w13081086>

Liu, H., Hu, Z., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Liang, S., ... & Wu, H. (2016). Optimizations on supply and distribution of dissolved oxygen in constructed wetlands: A review. *Bioresource Technology*, 214, 797-805. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.003>

Mackereth, F. J. H., Heron, J., & Talling, J. F. (1989). *Water analysis: Some revised methods for limnologists* (2. impr.). Freshwater Biological Association.

Mantovi, P., Marmioli, M., Maestri, E., Tagliavini, S., Piccinini, S., & Marmioli, N. (2003). Application of a horizontal subsurface flow constructed wetland on treatment of dairy parlor wastewater. *Bioresource Technology*, 88(2), 85-94. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00291-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00291-2)

Marsh, A. S., Arnone, J. A., Bormann, B. T., & Gordon, J. C. (2000). The role of *Equisetum* in nutrient cycling in an Alaskan shrub wetland. *Journal of Ecology*, 88(6), 999-1011. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00520.x>

Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.

Mitsch, W. J. (2012). What is ecological engineering? *Ecological Engineering*, 45, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.04.013>

Mitsch, W. J., & Gosselink, J. G. (2015). *Wetlands* (5th ed.). John Wiley & Sons, Inc.

Mlih, R., Bydalek, F., Klumpp, E., Yaghi, N., Bol, R., & Wenk, J. (2020). Light-expanded clay aggregate (LECA) as a substrate in constructed wetlands – A review. *Ecological Engineering*, 148, 105783. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105783>

Monteith, D. T., Stoddard, J. L., Evans, C. D., de Wit, H. A., Forsius, M., Høgåsen, T., ... & Vesely, J. (2007). Dissolved organic carbon trends resulting from changes in atmospheric deposition chemistry. *Nature*, 450(7169), 537-540. <https://doi.org/10.1038/nature06316>

Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., & Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60-82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>

Nocetti, E., Hadad, H. R., Maine, M. A., Di Luca, G. A., & Mufarrege, M. M. (2024). Effect of pollutant loading rate and macrophyte uptake on the performance of a pilot-scale hybrid wetland system for the final treatment of dairy wastewater. *Ecological Engineering*, 204, 107290. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2024.107290>

Pai, S.-C., Tsau, Y.-J., & Yang, T.-I. (2001). pH and buffering capacity problems involved in the determination of ammonia in saline water using the indophenol blue spectrophotometric method. *Analytica Chimica Acta*, 434(2), 209-216. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00851-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00851-0)

Poikane, S., Kelly, M. G., Salas Herrero, F., Pitt, J.-A., Jarvie, H. P., Claussen, U., ... & Phillips, G. (2019). Nutrient criteria for surface waters under the European Water Framework Directive: Current state-of-the-art, challenges and future outlook. *Science of The Total Environment*, 695, 133888. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133888>

Roseth, R. (2000). Shell sand: A new filter medium for constructed wetlands and wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 35(8), 1335-1355. <https://doi.org/10.1080/10934520009377039>

Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112, 429-448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.011>

Shen, X., Huang, D., Zhang, C., & Hu, K. (2018). Performance evaluation of constructed wetlands treating wastewater treatment plant effluent in Taihu Lake, China. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 46(1), 1600442. <https://doi.org/10.1002/clen.201600442>

Sijimol, M. R., Mansa, M. L., & Joseph, S. (2021). Analysis of potential of Napier grass, Vetiver and Equisetum plants for the treatment of domestic greywater using box-type constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 84(10-11), 2913-2922. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.289>

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100(1), 179-196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)

Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14(5), 799-801. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.5.0799>

Søvik, A. K., & Kløve, B. (2005). Phosphorus retention processes in shell sand filter systems treating municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 25(2), 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.04.007>

Strauss, E. A., Mitchell, N. L., & Lamberti, G. A. (2002). Factors regulating nitrification in aquatic sediments: Effects of organic carbon, nitrogen availability, and pH. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(3), 554-563. <https://doi.org/10.1139/f02-032>

Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., ... & Jetten, M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446-449. <https://doi.org/10.1038/22749>

Tanner, C. C. (2001). Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11-12), 9-17. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0804>

Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Tsuchihashi, R., Burton, F. L., Abu-Orf, M., Bowden, G., Pfrang, W., & Metcalf & Eddy (Eds.). (2014). *Wastewater engineering: Treatment and resource recovery* (5th ed.). McGraw-Hill Education.

Terzakis, S., Fountoulakis, M. S., Georgaki, I., Albantakis, D., Sabathianakis, I., Karathanasis, A. D., ... & Manios, T. (2008). Constructed wetlands treating highway runoff in the central Mediterranean region. *Chemosphere*, 72(2), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.044>

Valenzuela, E. I., & Cervantes, F. J. (2021). The role of humic substances in mitigating greenhouse gases emissions: Current knowledge and research gaps. *Science of The Total Environment*, 750, 141677. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141677>

van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., ... & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555-559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>

Verhoeven, J. T. A., & Meuleman, A. F. M. (1999). Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological Engineering*, 12(1-2), 5-12. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(98\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(98)00050-0)

Verma, V., Soti, A., Kulshreshtha, N. M., Rampuria, A., Brighu, U., & Gupta, A. B. (2022). Strategies for enhancing phosphorous removal in vertical flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Management*, 317, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115406>

Vohla, C., Köiv, M., Bavor, H. J., Chazarenc, F., & Mander, Ü. (2011). Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands—A review. *Ecological Engineering*, 37(1), 70-89. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.08.003>

Von Sperling, M. (2007). *Waste Stabilisation Ponds*. IWA Publishing. Volume 6. <https://doi.org/10.2166/9781780402109>

Wahyudianto, F. E., Imron, M. F., Oktavetri, N. I., Nisa' AlFikry, S. C., Rahmatullah, L. T., & Rahman, D. A. (2020). Effect of media on constructed wetlands performance with *Equisetum*

hyemale. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 17(3), 65-69. <https://doi.org/10.3233/AJW200038>

Wahyudianto, F., Oktavetri, N., & Hariyanto, S. (2019). Kinetics of phosphorus removal from laundry wastewater in constructed wetlands with *Equisetum hyemale*. *Journal of Ecological Engineering*, 20(6), 60-65. <https://doi.org/10.12911/22998993/108919>

Wallace, S. D., & Knight, R. L. (2006). *Small Scale Constructed Wetland Wastewater Treatment Systems: Feasibility, Design Criteria, and O&M Requirements*. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780403991>

Wang, J., Xia, L., Chen, J., Wang, X., Wu, H., Li, D., ... & He, X. (2021). Synergistic simultaneous nitrification-endogenous denitrification and EBPR for advanced nitrogen and phosphorus removal in constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*, 420, 127605. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127605>

Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Gulf Professional Publishing.

Wu, H., Wang, R., Yan, P., Wu, S., Chen, Z., Zhao, Y., ... & Zhang, J. (2023). Constructed wetlands for pollution control. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s43017-023-00395-z>

Wu, H., Wang, X., He, X., Zhang, S., Liang, R., & Shen, J. (2017). Effects of root exudates on denitrifier gene abundance, community structure and activity in a micro-polluted constructed wetland. *Science of The Total Environment*, 598, 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.150>

Xia, Y., Zhang, M., Tsang, D. C. W., Geng, N., Lu, D., Zhu, L., ... & Ok, Y. S. (2020). Recent advances in control technologies for non-point source pollution with nitrogen and phosphorus from agricultural runoff: Current practices and future prospects. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-0493-6>

Xu, H., Paerl, H. W., Qin, B., Zhu, G., Hall, N. S., & Wu, Y. (2015). Determining critical nutrient thresholds needed to control harmful cyanobacterial blooms in eutrophic Lake Taihu, China. *Environmental Science & Technology*, 49(2), 1051-1059. <https://doi.org/10.1021/es503744q>

Xue, J., Wang, Q., & Zhang, M. (2022). A review of non-point source water pollution modeling for the urban-rural transitional areas of China: Research status and prospect. *Science of The Total Environment*, 826, 154146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154146>

Yang, W. H., Weber, K. A., & Silver, W. L. (2012). Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction. *Nature Geoscience*, 5(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/ngeo1530>

Yang, Y., Zhao, Y., Liu, R., & Morgan, D. (2018). Global development of various emerged substrates utilized in constructed wetlands. *Bioresource Technology*, 261, 441-452. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.085>

Zhai, J., Xiao, J., Rahaman, M. H., John, Y., & Xiao, J. (2016). Seasonal Variation of Nutrient Removal in a Full-Scale Artificial Aerated Hybrid Constructed Wetland. *Water*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/w8120551>

Zhai, Jun, Jun Xiao, Md Hasibur Rahaman, Yasinta John, y Jingsong Xiao. «Seasonal Variation of Nutrient Removal in a Full-Scale Artificial Aerated Hybrid Constructed Wetland». *Water* 8, n.º 12 (diciembre de 2016): 551. <https://doi.org/10.3390/w8120551>.

Zhou, Q., Sun, H., Jia, L., Wu, W., & Wang, J. (2022). Simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus from secondary effluent of wastewater treatment plants by advanced treatment: A review. *Chemosphere*, 296, 134054. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134054>

Zhou, T., & Penning-Rowsell, E. (2021). China's 'Sponge Cities': The role of constructed wetlands in alleviating urban pluvial flooding. *Water and Environment Journal*, 35(3), 1133-1146. <https://doi.org/10.1111/wej.12705>