EVALUACIÓN DE UN HUMEDAL ARTIFICIAL AIREADO EN EFLUENTE DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA ATUNERA, MANTA, MANABÍ, ECUADOR

EVALUACIÓN DE HUMEDAL ARTIFICIAL DE PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

AUTORES: Damián Eduardo Cedeño López[1]
Julio Abel Loureiro Salabarría[2]
María Margarita Delgado Demera[3]
Carlos Ricardo Delgado Villafuerte[4]
Piero Cristóbal Fajardo Navarrete[5]

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: damiancelo@hotmail.com

Fecha de recepción: 26-05-2020

Fecha de aceptación: 4-07-2020

RESUMEN

Los humedales artificiales se han implementado como medida alternativa a los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales, principalmente por sus bajos costos de construcción y mantenimiento; sin embargo, hay pocas investigaciones en efluentes líquidos de la industria atunera y no existen investigaciones evaluando el tratamiento de estas aguas con microorganismos aislados. Se evaluó el comportamiento de un humedal artificial aireado utilizando C*hrysopogon zizanioides, Saccharomyces cerevisiae y Trichoderma harzianum*, en efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria atunera. La investigación estuvo sujeta a un diseño completamente al azar (DCA), donde se aplicó un control (P_0) y 4 tratamientos (P_1, P_1M_1, P_1M_2, $P_1M_1M_2$) con tres réplicas cada uno, proporcionando un total de 15 unidades experimentales. Los tratamientos, P_1 (*Chrysopogon zizanioides*), P_1M_1 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l de *S. cerevisiae* con $4.3x10^8$ ufc/ml), P_1M_2 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l de *T. harzianum* con $1.95x10^8$ esporas/ml) y $P_1M_1M_2$ (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l mezcla de *S. cerevisiae* con $4.3x10^8$ ufc/ml y *T. harzianum* con $1.95x10^8$ esporas/ml). En los tratamientos (P_1, P_1M_1, P_1M_2,

[1] Ingeniero en Medio Ambiente, Estudiante de Postgrado en Universidad Técnica de Manabí, Chone, Manabí, Ecuador.
[2] Ingeniero Químico, Master en Ingeniería en Saneamiento Ambiental Mención: Saneamiento, Docente tiempo completo, Docente investigador, Departamento de Ingeniería Ambiental, Carrera de Ingeniería Ambiental, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López", Calceta, Manabí, Ecuador. E-mail: julio.loureiro@espam.edu.ec
[3] Ingeniera Agrónoma, Doctora en Ciencias Ambientales, Docente tiempo completo, Docente Investigador, Departamento de Agronomía, Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí, Manabí, Portoviejo. Ecuador. E-mail: margaritadelgado81216@gmail.com
[4] Ingeniero en Medio Ambiente, Maestría en Ciencias Ambientales con mención en Tecnología y Gestión, Docente Tiempo Completo, Docente Investigador GIRBDS, Carrera de Ingeniería Ambiental, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calceta, Manabí. Ecuador. E-mail: cdelgado@espam.edu.ec
[5] Ingeniero Agrícola, Analista-Investigador de Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Microbiología, Laboratorios del Área Agropecuaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Manabí, Calceta. Ecuador. E-mail: picrifana4@gmail.com

© Centro de Investigación y Desarrollo. Universidad Regional Autónoma de Los Andes - Extensión Santo Domingo. Ecuador.

$P_1M_1M_2$) se obtuvo una remoción de DBO promedio de 99.68%, el PT incrementó desde 3 mg/l hasta 4.95 mg/l. El pH disminuyó en todos los tratamientos excepto P_1M_2 respecto su valor inicial 6.3. La remoción más baja de NTK fue P_1 con 64.56% y la más alta de 73.81% para $P_1M_1M_2$. El efecto más apreciable fue la remoción de NTK, posiblemente la acción estimulante de *C. zizanioides* en la producción de ureasas y proteasas, la producción de aminoácidos de *S. cereviciae* y la actividad enzimática de *T. harzianum*, lograron que tratamientos donde estas variables se involucraron, removieran un mayor porcentaje.

PALABRAS CLAVE: C*hrysopogon zizanioides;* humedal artificial aireado; *Saccharomyces cerevisiae; Trichoderma harzianum.*

EVALUATION OF AN AERATED ARTIFICIAL WETLAND IN EFFLUENT OF A WASTEWATER TREATMENT PLANT OF THE TUNA INDUSTRY, MANTA, MANABÍ, ECUADOR

ABSTRACT

Constructed Wetlands have been implemented as an alternative option to conventional wastewater treatment processes, mainly due to their low construction and maintenance costs; however, there is little research on liquid effluents from the tuna industry and there is no research evaluating the treatment with isolated microorganisms. To evaluate the behavior of aerated constructed wetland using *Chrysopogon zizanioides*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichoderma harzianum*, in effluent from a wastewater treatment plant of the tuna industry. It was subject to a Completely Random Design (CRD), where a control (P_0) and 4 treatments were applied (P_1, P_1M_1, P_1M_2, $P_1M_1M_2$) with three replicates each, providing a total of 15 experimental units. The treatments specifically were P_1 (*C. zizanioides*), P_1M_1 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l of *S. cerevisiae* with $4.3x10^8$ cfu/ml), P_1M_2 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l of *T. harzianum* with $1.95x10^8$ spores/ml) and $P_1M_1M_2$ (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l mixture of *S. cerevisiae* with $4.3x10^8$ cfu/ml and T. *harzianum* with $1.95x10^8$ spores/ml). Results. After the treatments, an average BOD removal of 99.68% was obtained, TP increased from 3.34 to 4.95 mg/l. The pH decreased in all the treatments except P1M2 with respect to its initial value 6.3. The lowest TKN removal was P_1 with 64.56% and the highest of 73.81% for $P_1M_1M_2$. The most noticeable effect was the removal of TKN, possibly the stimulating action of *C. zizanioides* in the production of ureases and proteases, the production of amino acids of *S. cereviciae* and the enzymatic activity of *T. harzianum*, which allowed treatments where these variables they got involved, removed a higher percentage.

KEYWORDS: aerated constructed wetland; C*hrysopogon zizanioides; Saccharomyces cerevisiae; Trichoderma harzianum.*

INTRODUCCIÓN

La ciudad de Manta en la costa ecuatoriana, es el principal puerto atunero del país, su estratégica ubicación la hizo morada de numerosas industrias pesqueras, siendo esta una de las principales fuentes de empleo en la ciudad. Estas industrias descargan aguas residuales que han desencadenado un deterioro de la calidad ambiental, por incumplir en la mayoría de los casos la Normativa Ambiental Ecuatoriana, produciendo contaminación de ríos y playas, malos olores y el colapso del sistema de alcantarillado público, entre otros (Marín *et al*., 2015).

Las aguas residuales de la industria atunera se caracterizan por presentar elevada DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), las que pueden llegar a alcanzar valores de 100 000 mg/l debido a su compleja composición (Nemerow, 1977). Generalmente, están compuestas por sangre, partículas de pescado, escamas, así como, espumas aceitosas que provienen de actividades productivas tales como: agua de succión (bailwater), sanguaza (bloodwater) y agua de cola (stickwater) (Valdéz, 2006).

Durante décadas se han utilizado tratamientos convencionales para mejorar la calidad de efluentes líquidos en esta industria, figurando los físico-químicos (Pradhan *et al.*, 2015), biológicos (Ching & Redzwan, 2017) y las combinaciones de ambos (Cristovao *et al.*, 2015). La utilización de nuevas tecnologías como, biofiltros de membrana (Jemli *et al*., 2015), humedales artificiales (Liang *et al*., 2017) y lodos granulares aerobios (Corsino *et al.*, 2017), han proporcionado un amplio campo de estudio para la minimización de contaminantes en este tipo de residual.

Los Humedales Artificiales tienen una ventaja aparente en costos de construcción y operación frente a otros sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales (Zhang *et* al., 2012; Wu *et al.*, 2014). Existen diversas variantes y técnicas para este tipo de tratamiento, donde se aplican; recirculación, sistemas en serie, sistemas en paralelo y aireados (Huma & Ilyas, 2017), los mismos que se han utilizado ampliamente para tratar aguas residuales domésticas e industriales de acuerdo a Wu *et al.* (2014), Liang *et al.* (2017) y Huma & Ilyas (2017). El tratamiento con humedales artificiales consiste principalmente en la acción conjunta entre microorganismos y macrófitas; las raíces de las macrófitas son el soporte de los microorganismos (Choudhury *et al*., 2010), y es el lugar por donde se hace circular el agua residual.

Los autores Zapater *et al.* (2014), Zhouying *et al.* (2016) y Lv *et al.* (2017) afirman que, los microorganismos en los humedales artificiales, eliminan la materia orgánica del agua residual utilizándola como sustrato para funciones metabólicas y producen metabolitos para la nutrición y crecimiento de las macrófitas; la cantidad y diversidad de los microorganismos es influenciada por el tipo de humedal artificial utilizado y por el tipo de agua residual tratada. La elevada salinidad expresada como % NaCl, presente en las aguas residuales de la industria pesquera dificulta su tratamiento, debido a que disminuye la actividad enzimática de los microorganismos, y aumenta la presión osmótica en el exterior de la membrana celular bacteriana, haciendo que se pierda el plasma celular, causando la muerte de los microorganismos, y consecuentemente que disminuya la capacidad de tratamiento del humedal artificial (He *et al*., 2017), cuando la salinidad es mayor a 3% m/m se reduce la remoción de DBO según Ching & Redzwan (2017), los autores Val del Rio *et al*. (2018) encontraron disminución en la reducción de nitrógeno en salinidades >0.9 % m/m con bacterias aclimatadas a esta salinidad. La levadura *Saccharomyces cereviciae* (Hansen) Meyen ex E.C. Hansen y *Trichoderma harzianum* Rifai son microorganismos capaces de multiplicarse bajo este tipo de condiciones y han sido utilizados en diversas investigaciones realizadas por Sadhasivam *et al.* (2010), Kam *et al.* (2012), Aissaoui *et al.* (2017), Awasthi *et al.* (2017) y Hultberg & Bodin (2017) por su elevada capacidad en la remoción de materia orgánica.

Las macrófitas en los humedales artificiales aportan oxígeno, consumen nutrientes y materia orgánica del agua residual (Vymazal, 2013), además según la especie de macrófita a utilizar, estas pueden liberar por medio de las raíces enzimas y exudados, que alteran la actividad enzimática de los microorganismos presentes en los humedales (Kong *et al.*, 2009). Estas plantas pueden estar enraizadas a un lecho (Wu *et al.*, 2015), flotando en el agua residual (Delgadillo *et*

al., 2010) o adaptadas como sistemas hidropónicos (Darajeh *et al.*, 2016). De acuerdo a Vymazal (2013) se utilizan alrededor de 150 especies de macrófitas para el tratamiento de las aguas residuales con humedales artificiales. El *Chrysopogon zizanioides* (Linnaeus) Roberty comúnmente llamado pasto vetiver, es una especie de macrófita terrestre familia de las gramíneas, utilizada en humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales industriales (Darajeh *et al.*, 2016; Ramos *et al*., 2017), por su capacidad de aclimatación a diferentes condiciones ambientales y medios de crecimiento, en aguas residuales pueden tolerar concentraciones de metales pesados de hasta 63.7 mg/l, 51.4 mg/l y 31.5 mg/l para Zinc, Níquel y Manganeso respectivamente (Mudhiriza *et al.*, 2015). En estudios realizados por Darajeh *et al.* (2016), Ramos *et al.* (2017), Badejo *et al.* (2017) y Almeida *et al.* (2017) en humedales artificiales con este tipo de planta, también se han obtenido excelentes resultados en la remoción de materia orgánica.

Por todo lo antes planteado, con la finalidad de disminuir las concentraciones en el efluente industrial mediante el tratamiento en conjunto de estos microorganismos con la macrófita, la investigación se trazó como objetivo evaluar el comportamiento de un humedal artificial aireado utilizando *C. zizanioides*, *S. cerevisiae* y *T. harzianum* en efluente proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria atunera.

DESARROLLO

La presente investigación fue de tipo experimental y se realizó en una planta de tratamiento de residuales líquidos de las industrias atuneras, la cual se encuentra ubicada en las coordenadas 0º56’56,97” S-80º41’55,71” O ciudad de Manta, provincia Manabí, Ecuador.

Tabla 1. Descripción del humedal artificial aireado en cada tratamiento y su control.

Código	**Combinación de los tratamientos**	***C. zizanioides* (# individuos)**	**Dosis de Microorganismo(s) (ml/l)**	**Caudal Aire (l/min)**
P_0	-----	-----	-----	3
P_1	Pasto vetiver	15	-----	3
P_1M_1	Pasto vetiver + *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen	15	1.5	3
P_1M_2	Pasto vetiver + *T. harzianum* Rifai	15	1.5	3
$P_1M_1M_2$	Pasto vetiver + *S. cerevisiae* + *T. harzianum*	15	1.5	3

Inicialmente se caracterizó el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales mediante la recolección en un tanque de 500 litros, siguiendo la Norma 2176 de muestreo compuesto de INEN (2013), captando 20 litros cada 30 minutos en un periodo de 7 horas.

Se recolectó una alícuota de la muestra (2l) y se envió al laboratorio, donde se realizaron los análisis iniciales (pretratamientos) de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Nitrógeno Total Kjendahl (NTK), Fósforo Total (PT) y Potencial de Hidrógeno (pH).

La investigación fue a escala laboratorio y estuvo sujeto a un Diseño Completamente al Azar (DCA), donde se aplicó un control (P_0) y 4 tratamientos (P_1, P_1M_1, P_1M_2, $P_1M_1M_2$) con tres réplicas cada uno, proporcionando un total de 15 unidades experimentales.

El control (P_0) y los 4 humedales artificiales aireados (P_1, P_1M_1, P_1M_2, $P_1M_1M_2$) estuvieron sometidos a iguales condiciones ambientales de presión y temperatura (1atm y 25 ± 5 ºC respectivamente) con volumen de 16 litros de agua residual representando el 80% (v/v) del humedal artificial (20 l). Al control y los tratamientos se le proporcionó un caudal volumétrico continuo de aire de 3 l/min con un sistema de aireación ubicado en el fondo (Wang *et al.,* 2015), a través del conjunto (compresor - difusor poroso) marca AIR PUMP SC-7500 JAD.

En los humedales artificiales, se insertaron 15 individuos de *C. zizanioides*, los que se colocaron y sujetaron en el centro de una lámina de poliestireno de 3 cm de espesor de acuerdo a la metodología seguida por Darajeh *et al.* (2016). Se aplicó para los tratamientos P_1M_1, P_1M_2 y $P_1M_1M_2$, 24 ml de microorganismos, con la particularidad de que a este último se le suministró al 50% (v/v) del volumen total 24 ml, para cada uno de los microorganismos, siendo específicamente 12 ml de *S. cerevisiae* y 12 ml de *T. harzianum*.

Los tratamientos específicamente fueron; P_1 (*C. zizanioides*), P_1M_1 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l de *S. cerevisiae* con $4.3x10^8$ ufc/ml), P_1M_2 (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l de *T. harzianum* con $1.95x10^8$ esporas/ml) y $P_1M_1M_2$ (*C. zizanioides* + 1.5 ml/l mezcla de *S. cerevisiae* con $4.3x10^8$ ufc/ml y *T. harzianum* con $1.95x10^8$ esporas/ml). La Tabla 1 resume la descripción del control y cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente**.**

Siguiendo la metodología empleada por Mudhiriza *et al.* (2015) y Darajeh *et al.* (2016), modificada en este estudio, se realizaron transcurrido 21 días de tratamiento en modo batch, los análisis finales a cada unidad experimental (postratamiento) de DBO, NTK, PT y pH, donde se calculó con la ecuación 1 el porcentaje de remoción. Paralelamente, se compararon los resultados con los límites máximos permisibles de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado público, según la normativa ambiental ecuatoriana como lo establece el Libro VI Anexo 1 "Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua" del Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente (TULSMA).

$$\eta = \left(\frac{S_0 - S_f}{S_0}\right) 100 \quad [1]$$

Donde η es la eficiencia de remoción, S_0 es la concentración del contaminante al inicio del tratamiento y S_f la concentración del contaminante al final.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se desarrolló por medio del software MiniTab 15, en donde se analizó las variables independientes categóricas P_0, P_1, P_1M_1, P_1M_2 y $P_1M_1M_2$, para las variables dependientes DBO, NTK, PT y pH. Los datos se representaron como media $\pm$ desviación estándar y fueron analizados mediante Análisis de Varianza con significancia de 0.05, seguido de análisis Post hoc con la prueba de Tukey para comparar diferencias entre las medias de los tratamientos. Además, se representó con diagrama de barras los datos de todos los tratamientos para estas variables dependientes.

RESULTADOS

Tabla 2. Características del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria atunera y límites máximos permisibles de descarga de efluentes en la Normativa Ambiental Ecuatoriana.

Descripción	**Unidad**	**Concentración**	**Límite máximo permisible***
NTK	mg/l	463,8	60
DBO	mg/l	2058,3	250
PT	mg/l	3,34	15
pH	-----	6,3	6-9

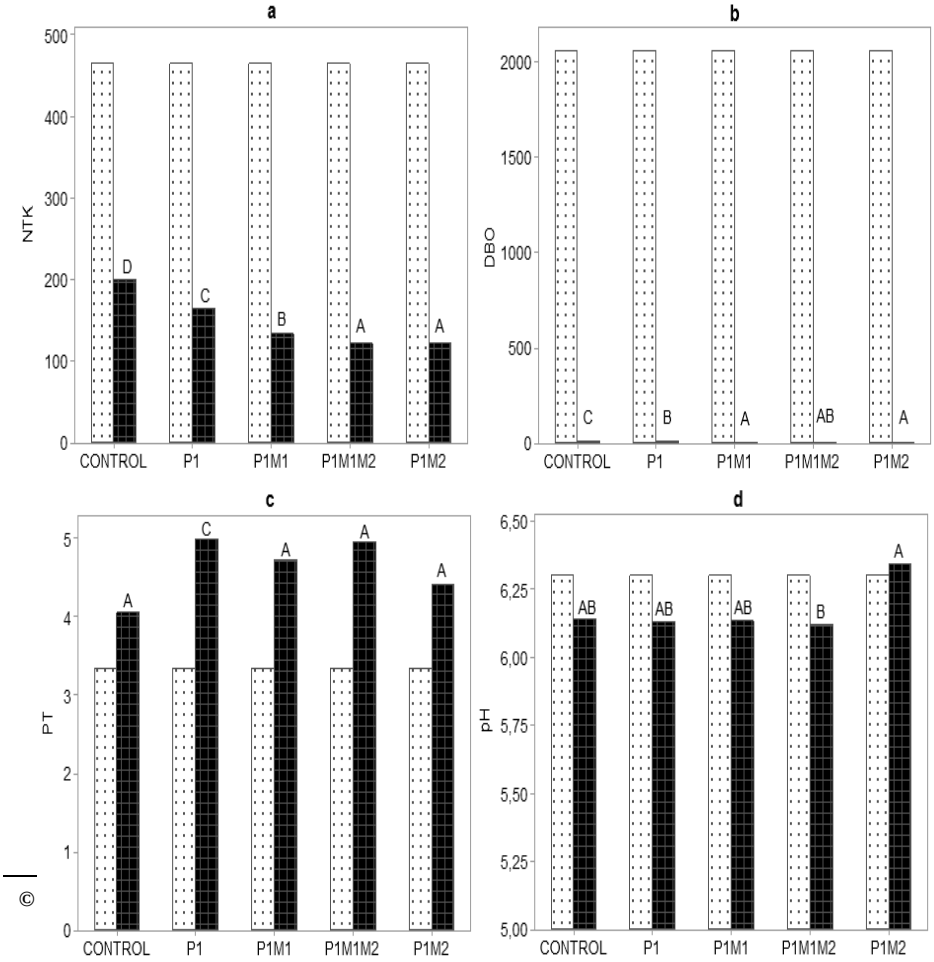
DBO = Demanda Bioquímica de Oxígeno, NTK = Nitrógeno Total Kjendahl, PT = Fósforo Total y pH = Potencial de Hidrógeno.

* Límite de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado público. Fuente: Libro VI Anexo 1 "Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua" TULSMA (2015).

Los resultados de los análisis iniciales (pretratamiento) son los mostrados en la Tabla 2, se evidencian concentraciones elevadas en DBO y NTK de 2058.3 mg/l y 453.8 mg/l respectivamente, la concentración de PT y el pH están dentro del límite máximo permisible para descarga de efluentes al alcantarillado público, con valores de 3.6 mg/l para PT y 6.3 en pH.

Figuras 2ª-d

La concentración de NTK descendió desde una concentración inicial de 463.8 mg/l hasta una



final con rangos entre 199.51 - 121.49 mg/l, el tratamiento con la concentración final más alta fue P_1 en donde se utilizó sólo al *C. zizanioides* y el que tuvo la concentración más baja fue $P_1M_1M_2$ en donde se utilizó al *C. zizanioides* junto a *T. harzianum* y *S. cereviciae* como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 2ª-d.

Tabla 3. Análisis de Varianza para cada variable.

Variable	F	p-valor
NTK	322.77	<0.0001
DBO	41.17	<0.0001
PT	1.8	0.2053
Ph	4.13	0.0313

Significancia cuando p-valor <0.05

La Tabla 3 muestra que para NTK hubo diferencias en las medias de los tratamientos (p-valor <0.05) con un valor de F de 322.77, este efecto fue diferente entre cada tratamiento y el control excepto para P_1M_2 y $P_1M_1M_2$, como se puede comprobar en la prueba de comparación múltiple que se ve en la Tabla 4, esta prueba indica que no hay diferencias entre estos tratamientos; por lo tanto, se asocia a que fue principalmente *T. harzianum* el que disminuyó la concentración de NTK en estos tratamientos.

Las medias de la concentración de DBO disminuyó en todos los tratamientos con rangos entre 5.35 – 8.59 mg/l, la concentración más alta de DBO se observó en el tratamiento P_1 y la concentración más baja para el tratamiento P_1M_1 como se observa en la Tabla 4 y la Figura 2b. De la misma manera que para el NTK, la Tabla 3 muestra que entre los tratamientos y el control también tuvieron diferencias en la concentración final de DBO (p-valor <0.05) con una valor de F de 41.17, pero para esta variable entre los tratamientos hay una menor diferencia como se puede ver en la prueba de comparación entre medias de la Tabla 4, para P1M1 y P1M1M2, en donde se utilizó a *S. cereviciae* fue observada la menor diferencia, por lo que se asocia al efecto de esta levadura en la menor concentración de DBO obtenida.

Tabla 4. Concentración de los contaminantes orgánicos y el pH después del tratamiento en el humedal artificial aireado.

Tratamiento	**NTK (mg/l)**	**DBO (mg/l)**	**PT (mg/l)**	**pH**
P_0	199.51±0.82 D[1]	14.18±1.62 C	4.05±0.20 A	6.14±0.13 AB
P_1	164.36±3.94 C	8.59±0.84 B	4.99±0.9 A	6.13±0.08 AB
P_1M_1	133.25±2.65 B	5.35±0.79 A	4.73±0.48 A	6.13±0.06 AB
P_1M_2	121.58±3.83 A	6.66±0.87 AB	4.41±0.41 A	6.34±0.09 B
$P_1M_1M_2$	121.49±3.86 A	5.82±0.18 A	4.95±0.23 A	6.12±0.02 A

± Es la desviación estándar de la media.

[1] Prueba de Tukey con significancia alfa de 0.05.

En todos los tratamientos y el control se obtuvo un aumento de PT desde una concentración inicial de 3.34 mg/l hasta 4.99 mg/l como se constata en la Tabla 4 y Figura 2c. La Tabla 3 indica que entre las medias de los tratamientos y el control no hay diferencias (p-valor<0.05) con un

valor F de 1.80, valor inferior al correspondiente a los grados de libertad (gl) de este experimento, con un valor F de 3.48 para gl inter grupos 4 y para intra grupos 10, por lo cual se acepta la hipótesis nula.

El pH descendió ligeramente para todos los tratamientos excepto P_1M_2, desde 6.3 a un rango entre 6.12- 6.14, como se muestra en la Tabla 4 y Figura 2d. La Tabla 3 indica que sí hubo diferencias entre las medias (p-valor<0.05) con un bajo valor de F de 4.13, y que de acuerdo a la comparación entre medias de los tratamientos y el control de la Tabla 4 se puede ver que solo se encuentran diferencias entre $P_1M_1M_2$ y P_1M_2, por lo cual se asocia que utilizando *C. zianioides* y *T. harzianum* en P_1M_2, hizo que sea el único en donde no disminuyera el pH.

Todos los tratamientos y el control obtuvieron concentraciones por debajo del límite máximo permisible para descargas de efluentes al sistema de alcantarillado público, límite que se puede observar en la Tabla 2, para DBO, PT y pH es 250 mg/l, 10 mg/l y entre 6 – 9 respectivamente; sin embargo, ningún tratamiento alcanzó una concentración de NTK que se encuentre debajo del límite de descarga (60 mg/l), la menor concentración la tuvo el tratamiento $P_1M_1M_2$ con 121.49 mg/l.

Tabla 5. Porcentaje de remoción al tratamiento del humedal artificial aireado aplicados en función de DBO y NTK.

Tratamientos	(%) Remoción DBO	(%) Remoción NTK
P0	99.31	56.98
P1	99.58	64.56
P1M1	99.74	71.27
P1M2	99.68	73.78
P1M1M2	99.72	73.81

DBO = Demanda Bioquímica de Oxígeno, NTK = Nitrógeno Total Kjendahl

En la Tabla 5, se muestran resultados de porcentaje de remoción al control y los tratamientos aplicados en función de NTK y DBO transcurrido 21 días de tratamiento.

El porcentaje de remoción de NTK osciló entre 64.56 - 73.81 % para todos los tratamientos, aunque no se pudo analizar en este estudio con absoluta certeza si el Nitrógeno Total Kjendahl pasó a $N\text{-}NO_3$ (nitrógeno en forma de nitratos) por nitrificación o se eliminó definitivamente del agua residual. De acuerdo a Vymazal (2007) la eliminación de Nitrógeno en agua residual utilizando humedales artificiales es compleja, se produce por la interacción de varios procesos físicos, químicos y biológicos, y que sin la estrategia adecuada de tratamiento, simplemente se tendrá el nitrógeno de una forma a otra de su ciclo, sin una verdadera eliminación. Los autores Fan *et al.* (2013) comprobaron que vía nitrificación utilizando humedales artificiales aireados como en el presente estudio, no hay una considerable eliminación del nitrógeno total del agua residual, en un mayor porcentaje pasa de una forma de nitrógeno reducida a una más oxidada, de amonio hasta llegar a nitratos, estos autores encontraron una remoción de nitrógeno amoniacal del 99% pasando casi en su totalidad a nitrato, en donde solo hubo una reducción del 29% del Nitrógeno Total del agua residual; sin embargo, a pesar de todo lo mencionado se puede observar que entre los tratamientos y el control existen diferencias significativas, lo cual indica que utilizando el *C. zizanioides* en humedales artificiales aireados se puede reducir el Nitrógeno Total Kjendahl del agua residual, y que esta reducción es mayor en los tratamientos con los microorganismos *S cereviciae* y *T. harzianum.*

El tratamiento $P_1M_1M_2$ tuvo la remoción más alta de NTK y no tuvo diferencias significativas con el tratamiento P_1M_2, en ambos coincide el uso del *C. zizanioides* y *T. harzianum*, correspondiente a una eficiencia de remoción de 73.8% y 73.79% respectivamente. El aporte de la macrófita en la remoción del NTK en estos tratamientos se puede explicar debido a que utilizándolas en humedales artificiales estas liberan exudados por las raíces que estimulan la producción de ureasas y proteasas por los microorganismos (Kong *et al.,* 2009), estás enzimas son las causantes de la disminución de $N\text{-}NH_3$ (nitrógeno en forma de amoniaco) del agua residual de acuerdo a Kong *et al.* (2009), ellos encontraron una correlación positiva entre la actividad de proteasas-ureasas frente a la remoción de $N\text{-}NH_3$, en donde entre mayor cantidad de estas enzimas, menor concentración de amoniaco, lo cual indica que estas enzimas promueven la nitrificación del agua residual. Esta nitrificación pasa el nitrógeno amoniacal a nitrato, en donde puede ser tomado por el *C. zizanioides*, efecto que posiblemente explica el crecimiento de la macrófita obtenido por Almeida et al. (2017) en función del aumento de la concentración de nitratos influente.

Los autores Hultberg y Bodin (2017) estudiaron al hongo *T. harzianum* tratando un agua residual de la industria cervecera, y en donde obtuvieron una remoción de Nitrógeno total del 52,16%, por lo cual la contribución de *T. harzianum* en $P_1M_1M_2$ y P_1M_2 se asocia a aplicar este hongo en estos tratamientos, debido a que tiene la capacidad de producir proteasas como lo manifiestan Kredics *et al*. (2005) y comprobado por Aissaoui *et al*. (2017), quienes cuantificaron la cantidad de proteasas producidas por *T. harzianum* creciendo en un medio líquido a base de residuos de pescado, estas proteasas por medio de hidrolisis enzimática hacen que las proteínas se desdoblen en péptidos más pequeños y aminoácidos, lo que aumenta el Nitrógeno Biodisponible que puede ser consumido para crecimiento de las plantas y la producción de nuevas células, lo que conlleva a una reducción de Nitrógeno Total en el agua residual.

El tratamiento P_1M_1 tuvo una media de remoción de NTK del 71.27%, el aporte de *S. cereviciae* para disminuir el NTK en este tratamiento pudo ser debido a que esta levadura puede disminuir la toxicidad del agua residual y producir aminoácidos esenciales y no esenciales de acuerdo a Pires *et al*. (2016), efecto que también pudo ser aprovechado por el *C. zizanioides,* además estos autores obtuvieron una remoción de 66.70% en el contenido de Nitrógeno Total tratando aguas residuales de la fermentación del jugo de caña.

En todos los tratamientos se obtuvo un porcentaje de remoción de DBO mayor al 99%, dato parecido al obtenido por Darajeh *et al.* (2016), quienes en su mejor tratamiento usando *C. zizanioides* alcanzaron hasta el 96% de remoción de DBO tratando agua residual de la industria del aceite de palma mediante un humedal artificial aireado; pero, estos autores no utilizaron tratamiento control sin el *C. zizanioides,* variable que si se consideró en el presente estudio, donde el control alcanzó una degradación parecida a los tratamientos, lo que indica que fueron principalmente los microorganismos nativos los que degradaron la materia orgánica, lo cual ha sido comprobado anteriormente por Fan *et al.* (2013) quienes tuvieron una remoción de 97 % de DQO en su humedal artificial aireado y en dónde también alcanzaron un 88 % de remoción en el tratamiento control sin airear y sin utilizar la macrófita; sin embargo, se puede ver que en los tratamientos en donde se utilizó al *C. zizanioides* sólo, o junto a los microorganismos, se obtuvieron diferencias significativas de la DBO, indicando que en estos tratamientos se eliminó un mayor porcentaje, aunque lamentablemente no se pudo comprobar en cual tratamiento se redujo el tiempo de tratamiento para alcanzar la menor concentración (aumento de la velocidad de reacción para degradar DBO). Darajeh *et al.* (2016) también mencionan que en su tratamiento

con la mayor concentración de DBO (350 mg/l) obtuvieron una remoción del 67.45 % en 27 días de tiempo de retención hidráulica, con lo que se puede ver que el agua residual de la industria atunera presenta una mayor capacidad biodegradable, debido a que se alcanzó una reducción superior, en sólo 21 días, partiendo de una DBO de 2058.3 mg/l.

Entre los tratamientos P_1M_1 y $P_1M_1M_2$ no se encuentran diferencias significativas, esto se asocia a la capacidad de *S. cerevisiae* para utilizar como fuente de carbono la materia orgánica del agua residual en la producción de nuevas células, de acuerdo a Kam *et al*. (2012) quienes obtuvieron 5.06 g de biomasa por litro de agua residual industrial pesquera tratada y con una reducción en la DQO del 81,2%.

El tratamiento P_1M_2 también tuvo una menor concentración de DBO respecto al control, esto se puede explicar porque *T. harzianum* también puede producir biomasa a partir del agua residual, Hultberg y Bodin (2017) encontraron una producción de biomasa utilizando *T. harzianum* de 0.695 g por cada litro de agua residual tratada y reduciendo la DQO 78.1%, además manifiestan que esta biomasa aumenta con la concentración de DQO. Anteriormente Sadhasivam *et al.* (2010) habían obtenido usando *T. harzianum* una reducción parecida de DQO del 75.5 % tratando agua residual de la industria del papel.

El aumento del PT en todos los tratamientos está en contra de lo encontrado por Cui *et al*. (2009), quienes mencionan que en tratamientos de aguas residuales mediante aireación el fósforo disminuye, las bacterias principalmente PAO (Organismos acumuladores de Polifosfatos) toman el fósforo del agua residual y lo acumulan como reserva energética; por lo tanto, el inusual aumento de PT en todos los tratamientos fue posiblemente efecto de la liberación del fósforo debido a que las bacterias fueron sometidas a inanición por la ausencia de una fuente de carbono (en términos de DBO) al final del tratamiento, en donde estos microorganismos comenzaron la respiración endógena y posteriormente se produjo la muerte celular como menciona Hao *et al.* (2010). Los autores Lopez *et al.* (2006) encontraron que, en condiciones aerobias, se produce la liberación de fósforo en el agua residual tan solo 0.15 días después del periodo de inanición. De acuerdo a Cui *et al*. (2009) y Cárdenas *et al*. (2012) para que haya una remoción total del fósforo en reactores batch debe haber un proceso anaerobio y posteriormente un aerobio, para finalmente eliminar el fósforo junto al lodo residual, lo cual no se hizo en el presente estudio.

El descenso del pH en los tratamientos puede ser explicado por el proceso de nitrificación, el cual hace descender el pH debido a la liberación de iones H^+ como consecuencia de la oxidación del amonio a nitrito y posteriormente a nitratos de acuerdo a Sharma y Ahlert (1977), por lo cual se asocia a que utilizando *T. harzianum* y *C. zizanioides* en el tratamiento P1M2 en donde no disminuyó el pH, pudo haber sido explicado por la mayor disponibilidad de carbono inorgánico en el agua residual, lo cual aumenta la alcalinidad y hace función de buffer, donde el pH no desciende según Raper *et al*. (2018).

CONCLUSIONES

El efecto más apreciable utilizando humedales artificiales aireados se observó en la remoción de NTK, posiblemente la acción estimulante de *C. zizanioides* en la producción de ureasas y proteasas, la producción de aminoácidos de *S. cereviciae* y la actividad enzimática de *T. harzianum*, lograron que los tratamientos en donde estas variables se involucraron, removieran un mayor porcentaje de NTK. La remoción de DBO se vio influenciada principalmente por la acción de los microorganismos nativos presente en el agua residual, aunque se alcanzó concentraciones menores de DBO en los tratamientos en donde se adicionó a *S. cereviciae* y *T. harzianum*, debido

a que ambos promueven la producción de biomasa, consumiendo la materia orgánica del agua residual.

Las pequeñas variaciones de PT y pH en los tratamientos al inicio y al final, no representarían ningún problema en tratamiento en escala planta. El PT aumentó en todos los tratamientos como consecuencia de la liberación del fósforo debido a la muerte celular por falta de sustrato al final del tratamiento y el pH disminuyó en todos los tratamientos excepto P_1M_2, disminución que se consideró por efecto de la nitrificación del NTK, la cual libera iones H^+ en el agua residual disminuyendo su pH. Finalmente, a pesar de que todos los tratamientos alcanzaron una concentración en DBO, PT y pH dentro de los límites máximos permisibles de la normativa ecuatoriana de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado público, ningún tratamiento pudo disminuir el NTK dentro de este límite, por lo cual se eligió P_1M_1 como la mejor opción, porque fue el tratamiento en donde se obtuvo la mayor remoción de DBO 99.78 % y donde la remoción de NTK estuvo cerca del mejor tratamiento con 71.27 % y además parece ser la mejor opción porque el aplicar *S. cereviciae* es más económico que aplicar *T. Harzianum* en P_1M_2 o la mezcla de ambos en $P_1M_1M_2$ y con resultados similares, aunque se debería tomar consideración para solucionar el problema del NTK, debido a que bajo estas condiciones esta agua residual no debiera ser descargada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aissaoui, N., J. M. Chobert., T. Haertlé, M. N. Marzouki & F. Abidi. 2017. Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate. *Applied biochemistry and biotechnology* 182 (2): 831-845. DOI: 10.1007/s12010-016-2365-4

Almeida, A., F. Carvalho., M. J. Imaginário., I. Castanheira., A. R. Prazeres & C. Ribeiro. 2017. Nitrate removal in vertical flow constructed wetland planted with *Vetiveria zizanioides:* Effect of hydraulic load. *Ecological engineering* 99: 535-542. DOI:10.1016/j.ecoleng.2016.11.069

Awasthi, A. K., A. K. Pandey & J. Khan. 2017. Potential of fungus *Trichoderma harzianum* for toxicity reduction in municipal solid waste leachate. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14 (9): 2015-2022. DOI: 10.1007/s13762-017-1271-9

Badejo, A. A., D. O. Omole., J. M. Ndambuki & W. K. Kupolati. 2017. Municipal wastewater treatment using sequential activated sludge reactor and vegetated submerged bed constructed wetland planted with *Vetiveria zizanioides*. *Ecological Engineering* 99: 525-529. DOI:10.1016/j.ecoleng.2016.11.012

Cárdenas, C., S. Yabroudi., A. Benítez., K. Páez., T. Perruolo., N. Angulo., I. Araujo & L. Herrera. 2012. Desempeño de un reactor biológico secuencial (RBS) en el tratamiento de aguas residuales domésticas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (2): 111-120. DOI**:** 10.15446/rev.colomb.biote

Corsino, S. F., M. Capodici., M. Torregrossa & G. Viviani. 2017. Physical properties and Extracellular Polymeric Substances pattern of aerobic granular sludge treating hypersaline wastewater. *Bioresource technology 229*: 152-159. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.024

Cristóvão, R. O., C. M. Botelho., R. J. Martins., J. M. Loureiro & R. A. Boaventura. 2015. Fish canning industry wastewater treatment for water reuse–a case study. *Journal of Cleaner Production 87*: 603-612. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.10.076

Cui, Y., S. Wang & J. Li. 2009. On-line Monitoring for Phosphorus Removal Process and Bacterial Community in Sequencing Batch Reactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17 (3): 484-92. DOI: 10.1016/S1004-9541(08)60235-9

Ching, Y. C., & G. Redzwan. 2017. Biological Treatment of Fish Processing Saline Wastewater for Reuse as Liquid Fertilizer. *Sustainability 9* (7): 1062. DOI: 10.3390/su9071062

Choudhury, B., M. Kalita & P. Azad. (2010). Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in marshy and shoreline vegetation of Deepar Beel Ramsar Site of Assam, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (11): 1965-1971. DOI 10.1007/s11274-010-0377-8

Chyan, J., C.J. Lin., Y. Lin & Y. Chou. 2016. Improving removal performance of pollutants by artificial aeration and flow rectification in free water surface constructed wetland. *International Biodeterioration & Biodegradation* 113: 146-154. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.04.034

Darajeh, N., A. Idris., H. R. Masoumi., A. Nourani., P. Truong & N. A. Sairi. 2016. Modeling BOD and COD removal from Palm Oil Mill Secondary Effluent in floating wetland by *Chrysopogon zizanioides* (L.) using response surface methodology. *Journal of environmental management* 181: 343-352. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.06.060

Delgadillo, O., A. Camacho., L. Pérez & M. Andrade. 2010. *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales*. Nelson Antequera, Cochabamba, Bolivia.

Fan, J., S. Liang, B. Zhang & J. Zhang. 2013. Enhanced organics and nitrogen removal in batch-operated vertical flow constructed wetlands by combination of intermittent aeration and step feeding strategy. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 2448-2455. DOI: 10.1007/s11356-012-1130-7

Hao, X., Q. Wang., J. Zhu & M. Van Loosdrecht. 2010. Microbiological Endogenous Processes in Biological Wastewater Treatment Systems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 40 (3): 239-265. DOI: 10.1080/10643380802278901

He, H., Y. Chen., X. Li., Y. Cheng., C. Yang & G. Zeng. 2017. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation 119*: 520-527. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.10.007

Hultberg, M. & H. Bodin. 2017. Fungi-based treatment of brewery wastewater-biomass production and nutrient reduction. *Applied microbiology and biotechnology* 101 (11): 4791-4798. DOI: 10.1007/s00253-017-8185-9

Huma, I. & M. Ilyas. 2017. The performance of the intensified constructed wetlands for organic matter and nitrogen removal: A review. *Journal of Environmental Management* 198 (1): 372-383. DOI:10.1016/j.jenvman.2017.04.098

INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización). 2013. *Norma 2176: Agua. calidad del agua. muestreo. Técnicas de muestreo*. Disponible en línea en: archive.org/stream/ec.nte.2176.1998#page/n0

Jemli, M., F. Karray., F. Feki., S. Loukil., N. Mhiri., F. Aloui & S. Sayadi. 2015. Biological treatment of fish processing wastewater: A case study from Sfax City (Southeastern Tunisia). *Journal of Environmental Sciences* 30: 102-112. DOI: 10.1016/j.jes.2014.11.002

Kam, S.B., A.M. Abedian & H.A. Younesi. 2012. Production of single cell protein from stickwater of fish meal production factories by *Chlorella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Iranian Journal of Biology* 25 (2): 158-71. ibs.org.ir/article-1-76-en.html

Kong, L., Y. Wang., L. Zhao & Z. Chen. 2009. Enzyme and root activities in surface-flow constructed wetlands. *Chemosphere* 76 (5): 601-608. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.056

Kredics, L., Z. Antal., A. Szekeres., L. Hatvani., L. Manczinger., C. S. Vágvölgyi & E. Nagy. 2005. Extracellular proteases of Trichoderma species. *Acta microbiologica et immunologica hungarica* 52 (2): 169-184. DOI:10.1556/AMicr.52.2005.2.3

Liang, Y., H. Zhu., G. Bañuelos., B. Yan., Q. Zhou., X. Yu & X. Cheng. 2017. Constructed wetlands for saline wastewater treatment: A review. *Ecological Engineering 98*: 275-285. DOI:10.1016/j.ecoleng.2016.11.005

Lopez, C., M. Pons & E. Morgenroth. 2006. Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological

Lv, T., P. Carvalho., L. Zhang., Y. Zhang., M. Button., C. Arias., K. Weber & H. Brix. 2017. Microbial community metabolic function in constructed wetland mesocosms treating the pesticides imazalil and tebuconazole. *Ecological Engineering* 98: 378-387. DOI:10.1016/j.ecoleng.2016.07.004.

Marín, J., C. Chinga., A. Velásquez., P. González & L. Zambrano. 2015. Tratamiento de aguas residuales de una industria procesadora de pescado en reactores anaeróbicos discontinuos. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina* 25 (1): 27-42. DOI: https://doi.org/10.18359/rcin.431

Mudhiriza, T., F. Mapanda., B.M. Mvumi & M. Wuta. 2015. Removal of nutrient and heavy metal loads from sewage effluent using vetiver grass, 51 *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty. *Water SA* 41 (4): 457-463. DOI:10.4314/WSA.V41I4.04

Nemerow, N. 1977. *Aguas residuales industriales: teorías, aplicaciones y tratamiento*. H. Blume Ediciones, Madrid, España. 572 p.

phosphorus removal. *Water Research* 40 (8): 1519-1530. DOI:10.1016/j.watres.2006.01.040

Pires, J. F., G. M. Ferreira., K. C. Reis., R. F. Schwan & C. F. Silva. 2016. Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. *Journal of environmental management* 182: 455-463. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.08.006

Pradhan, S., L. Fan & F. A. Roddick. 2015. Removing organic and nitrogen content from a highly saline municipal wastewater reverse osmosis concentrate by UV/H2O2–BAC treatment. *Chemosphere* 136: 198-203. DOI:10.1016/j.chemosphere.2015.05.028

Ramos, N., A. Borges., G. Gonçalves & A. Matos. 2017. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos, com Chrysopogon zizanioides e Polygonum punctatum cultivadas em leito 52 de argila expandida. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 22 (1): 123-132. DOI:10.1590/s1413-4152201687067

Raper, E., R. Fisher., D. Anderson., T. Stephenson & A. Soares 2018. Alkalinity and external carbon requirements for denitrification-nitrification of coke wastewater. *Environmental Technology* 39 (17): 2266-2277. DOI: 10.1080/09593330.2018.1437779

Sadhasivam, S., S. Savitha & K. Swaminathan. 2010. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment. *Journal of Cleaner Production* 18 (8): 799-806. DOI:10.1016/j.jclepro.2009.11.014

Sharma, B. & R. Ahlert. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Research* 11 (10): 897-925. DOI:10.1016/0043-1354(77)90078-1

TULSMA (Texto Unificado De Legislación Secundaria De Medio Ambiente). 2015. *Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua*. Ecuador.

Val del Rio, A., A. Pichel., N. Fernandez-Gonzalez., A. Pedrouso., A. Fra-Vázquez., N. Morales.,... & A. Mosquera-Corral. 2018. Performance and microbial features of the partial nitritation-anammox process treating fish canning wastewater with variable salt concentrations. *Journal of environmental management 208*: 112-121. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.12.007

Valdéz, H. S. 2006. Caracterización proximal y tratamiento enzimático del agua de cola generada por una industria productora de harina de pescado en Sonora (Tesis doctoral). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC Hermosillo, Sonora, México.

Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the total environment* 380(1-3): 48-65. DOI:10.1016/j.scitotenv.2006.09.014

Vymazal, J. 2013. Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: a review. *Ecological engineering* 61: 582-592. DOI:10.1016/j.ecoleng.2013.06.023

Wang, X., Y. Tian., X. Zhao., S. Peng., Q. Wu & L. Yan. 2015. Effects of aeration position on organics, nitrogen and phosphorus removal in combined oxidation pond constructed wetland systems. *Bioresource Technology* 198: 7-15. DOI:10.1016/j.biortech.2015.08.150

Wu, H., J. Zhang., H.H. Ngo., W. Guo., Z. Hu., S. Liang., J. Fan & H. Liu. 2015. A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: design and operation. *Bioresource technology* 175: 594-601. DOI:10.1016/j.biortech.2014.10.068

Wu, S., P. Kuschk., H. Brix., J. Vymazal & R. Dong. 2014. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research* 57: 40-55. DOI:10.1016/j.watres.2014.03.020

Zapater, M., E. Gashugi., D. P. Rousseau., M. R. Alam., T. Bayansan & P. N. Lens. 2014. Effect of aeration on pollutants removal: biofilm activity and protozoan abundance in conventional and hybrid horizontal subsurface-flow constructed wetlands. *Environmental Technology* 35 (16): 2086-2094. DOI:10.1080/09593330.2014.893024

Zhouying, X. U., B. A. Yihui., Y. Jiang., X. Zhang & L.I. Xiaoying. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in wetland habitats and their application in constructed wetland: a review. *Pedosphere* 26 (5): 592-617. DOI: 10.1016/S1002-0160(15)60067-4