

# Bacterias nitrificantes y desnitrificantes asociadas a la rizosfera y a la biopelícula formada en humedales artificiales de flujo subsuperficial y flujo superficial

*Nitrifying and denitrifying bacteria associated with the rhizosphere and biofilm formed in subsurface flow and surface flow constructed wetlands*

Astrid Eugenia Ruiz M<sup>1</sup>, Kelly Leani Quintero García<sup>2</sup>,  
María Elena González Duque<sup>3</sup>, Brenda Arcila<sup>4</sup> & Asesor: Sergio Arango<sup>5</sup>

Recibido: 27 julio de 2019 Aprobado: 28 noviembre de 2019

**Resumen.** El crecimiento acelerado de la población, la elevada producción de agua residual y su falta de tratamiento, junto con la concienciación de la sociedad respecto de la calidad ambiental, han llevado a la búsqueda de sistemas de depuración eficientes, económicos, fáciles de operar y que permitan considerar el agua residual como un recurso. Los humedales construidos son sistemas de tratamiento promisorios para este fin, pero la investigación sobre los microorganismos involucrados en la transformación de los nutrientes en estos humedales es aún incipiente.

En este estudio se reportan los resultados de la cuantificación de bacterias nitrificantes y desnitrificantes asociadas a la rizosfera y a la biopelícula formada en dos humedales construidos (HC), un humedal artificial de flujo subsuperficial y uno de flujo superficial, los cuales fueron sometidos a distintas cargas hidráulicas y diferentes especies vegetales: *Heliconia psittacorum*, *Lemna minor* y uno con *Heliconia psittacorum* como control. El humedal con *Lemna minor* presentó mayor densidad de bacterias desnitrificantes y fijadoras de nitrógeno. El elevado número de las poblaciones

1 Especialista en Microbiología Ambiental. I.U. Colegio Mayor de Antioquia. Colombia, Medellín. aeruizm@gmail.com. ORCID: 0000-0003-2913-0987

2 Magister en Desarrollo Sostenible. I.U. Colegio Mayor de Antioquia. Colombia, Medellín. kelly.quintero@colmayor.edu.co. ORCID: 0000-0002-6928-8247

3 Especialista en Gestión Ambiental. I.U. Colegio Mayor de Antioquia. Colombia, Medellín. maria1.gonzalez@colmayor.edu.co. ORCID: 0000-0002-3375-5026

4 Ingeniera Ambiental. I.U. Colegio Mayor de Antioquia, Colombia, Medellín. brendaarcilacorrea@gmail.com. ORCID: 0000-0002-5293-0977

5 Ingeniero Químico. Universidad de Antioquia, Colombia, Medellín.

encontradas, sugiere la importante actividad metabólica y dinámica de estos microorganismos en los sistemas de humedales construidos.

**Palabras clave:** Humedales artificiales, Nitrificación, Desnitrificación, Fijación de Nitrógeno, *Heliconia psittacorum*, *Lemna minor*.

**Abstract.** *The accelerated population growth, the high wastewater production and its lack of treatment, along with the awareness of society towards environmental quality have led to the search for efficient, economical, and easy to operate efficient purification systems that allow considering wastewater as a resource. Constructed wetlands are promising treatment systems for this purpose, but research on the microorganisms involved in the transformation of nutrients in this wetlands is still incipient. In this study the quantification results of nitrifying and denitrifying bacteria associated with rhizosphere and biofilm formed in artificial wetlands of flow subsurface and flow surface in two constructed wetlands (HC), under different hydraulic loads and with different plant species are reported: Heliconia psittacorum, Lemna minor and one with Heliconia psittacorum as control. The wetland Lemna minor showed higher density of denitrifying and nitrogen-fixing bacteria. The high number of bacteria in found populations suggests the significant metabolic activity and dynamics of these microorganisms in constructed wetlands systems.*

**Keywords:** Artificial Wetlands, nitrification, nitrogen fixation, *Heliconia psittacorum*, *Lemna minor*.

## Introducción

La contaminación del agua es un problema importante que provoca impactos económicos, sociales y ambientales [1]; las enfermedades asociadas al agua y alimentos contaminados son consideradas en la actualidad como un problema de salud pública. Los entes gubernamentales regulan y establecen una normatividad más exigente para dar cumplimiento a los parámetros requeridos de disposición final adecuada.

Los humedales artificiales se consideran apropiados

para el tratamiento del agua residual y control de la contaminación del agua. Como se afirma en [2], el interés en los sistemas naturales está basado en la conservación de los recursos asociados con estos sistemas, en oposición al proceso de tratamiento convencional de aguas residuales que es intensivo respecto al uso de energía y químicos. Además, los humedales artificiales son vistos como una alternativa viable, amigable con el medio ambiente, que remueve una cantidad importante de contaminantes por medio de procesos físicos, químicos y biológicos.

La actividad microbiana cumple un papel relevante en estos sistemas de tratamiento junto con las interacciones que se presentan entre las plantas, el soporte y la biopelícula formada. En [3] se aclara que los procesos de nitrificación (proceso de conversión de nitritos a nitratos) son llevados a cabo por bacterias aerobias y facultativas, mientras que la desnitrificación (el nitrato es reducido por bacterias heterótrofas a nitrógeno molecular, en ausencia de oxígeno y presencia de carbono orgánico) sucede en condiciones anaerobias.

En este artículo se presenta una propuesta de implementación de un sistema de humedales artificiales empleados en el tratamiento de las aguas de la quebrada Pelahueso ubicada en el barrio San Javier, en la ciudad de Medellín (Antioquia).

Para lograr este objetivo, primero se hace la evaluación cualitativa del agua residual usada para los humedales (caracterización química y microbiológica), posteriormente, se adecúan los sistemas de humedales que se van a operar en flujo semi-continuo y se evalúan las eficiencias de remoción de contaminantes para los tiempos de retención hidráulica encontrados para cada humedal. Existen variaciones en el tipo y diseño de los humedales construidos, sin embargo, esta investigación se lleva a cabo sobre humedales construidos de flujo vertical superficial y subsuperficial, sembrados con *Heliconia psittacorum* (humedal C) y *Lemna minor* (lenteja de agua) (humedal B)

## Marco teórico

Según la Unesco, Latinoamérica cuenta con un déficit en los procesos de depuración de aguas residuales, ya que el 80 % de estas no están siendo tratadas [4]. Las últimas revisiones de la Asociación Colombiana de Ingeniería (Acodal) indican que el 70 % de las aguas residuales domésticas en los centros urbanos del país no son tratadas y la accesibilidad de agua potable en la zona rural es escasa [5]. Para cumplir con la normativa vigente de vertimientos, las alcaldías municipales optan por tener plantas de tratamiento convencionales, las cuales son costosas y requieren una alta inversión económica y personal especializado para su funcionamiento y mantenimiento, lo que hace inviables estos sistemas en poblaciones con pocos recursos.

Para la remoción de contaminantes en aguas residuales, las especies de plantas más utilizadas son las eneas (*Thypha* spp.), el carrizo (*Phragmites australis*) y juncos (*Scirpus* spp.) típicos de las zonas húmedas [6]. Sin embargo, se han reportado en Colombia ensayos con plantas como *Lemna minor* (lenteja de agua) y *Heliconia psittacorum*. La lenteja de agua se usa como complemento alimenticio para animales domésticos y, especialmente, se utiliza en fitorremediación por su capacidad de absorber nutrientes y contaminantes de los ecosistemas acuáticos; la *Heliconia psittacorum* es una planta ornamental, especie monocotiledónea, que produce brotes o vástagos y un pseudotallo aéreo, erecto, aunque su verdadero tallo está constituido por un vigoroso rizoma provisto de yemas vegetativas y abundantes, y fibrosas raíces largas y fuertes, y usualmente se propaga de manera natural a través del desarrollo de las yemas vegetativas presentes en su tallo rizomatoso [7]. Autores mencionan el papel fundamental en la remoción de contaminantes de esta planta: en un estudio realizado en Tabasco, México, se reportan con esta planta valores de remoción de DBO5 (99,09 % y 97,49 %) y DQO (94,49 % y 93,50 %) [8], y estudios llevados a cabo en Medellín, Antioquia, reportan para *Heliconia psittacorum*, 97,39 % en remoción de DQO y de DBO5, 97,13 % [9].

## Antecedentes

Los humedales pueden reducir significativamente la demanda biológica de oxígeno (DBO), los sólidos suspendidos (SS), el nitrógeno, los metales y patógenos, sin embargo, los procesos de mayor importancia son las interacciones microbianas y la ayuda de la vegetación [10], con el uso de macrófitas en los humedales construidos, en particular los de sistema de flujo subsuperficial horizontal, se desarrolla la remoción de materia orgánica de aguas residuales domésticas [11].

Debido al desconocimiento del funcionamiento interno de los humedales construidos, se ha identificado la necesidad de entender mejor el efecto y el comportamiento de los diferentes tipos de plantas en la remoción de materia orgánica [12]. Algunos de los estudios previos referentes a humedales construidos de flujo subsuperficial en Colombia son los nombrados a continuación: Universidad Militar Nueva Granada Bogotá, en esta universidad crearon una planta piloto en el campus de Cajicá [13]. Implementación del primer humedal documentado en Colombia de flujo subsuperficial. Universidad Javeriana Cagua [14]; Humedal de flujo subsuperficial seguido de tanque séptico [15]. El tratamiento de aguas residuales por medio de humedales artificiales es uno de los sistemas más factibles en las poblaciones de bajos recursos económicos y que se encuentren ubicados en zonas rurales con amplios espacios de construcción.

## Materiales y métodos

Los humedales para el caso de estudio fueron operados en sistemas de flujo continuo, uno sub-superficial de flujo vertical (Humedal C) y otro superficial de flujo vertical (Humedal B); se ubicaron en la Institución Universitaria Tecnológico de Antioquia; en ellos se plantaron *Heliconia psittacorum* (Humedal C) y *Lemna minor* (lenteja de agua) (Humedal B) con un sustrato compuesto de grava seleccionada (32 a 128 mm de diámetro), además se tuvo un humedal como control (Humedal D) plantado con *Heliconia psittacorum* y regado con agua corriente con el fin de comparar el estado de salud de esta planta.

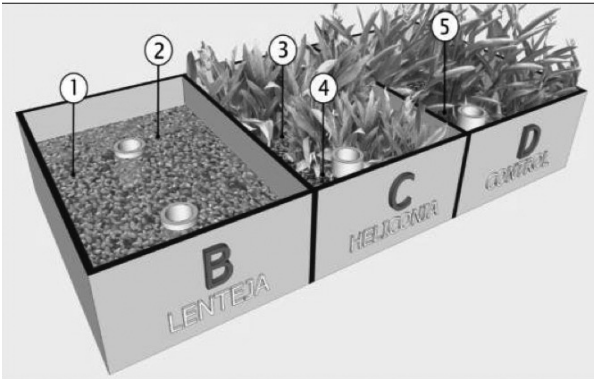


Figura 1. Puntos de muestreo de los humedales.  
Fuente: Elaboración propia (2016)



Figura 2. Sistemas de humedales construido. T. de A.  
Fuente: Elaboración propia (2016)

Luego del montaje y estabilización de las plantas en los humedales, como se observa en la Figura 3, se inició su alimentación con las aguas de la quebrada diluidas 1:2, empleando un tiempo de retención hidráulica de 5 días; se realizaron

muestreos para la cuantificación de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes asociadas a la biopelícula formada en el sustrato y a las raíces de las plantas empleadas en los humedales.

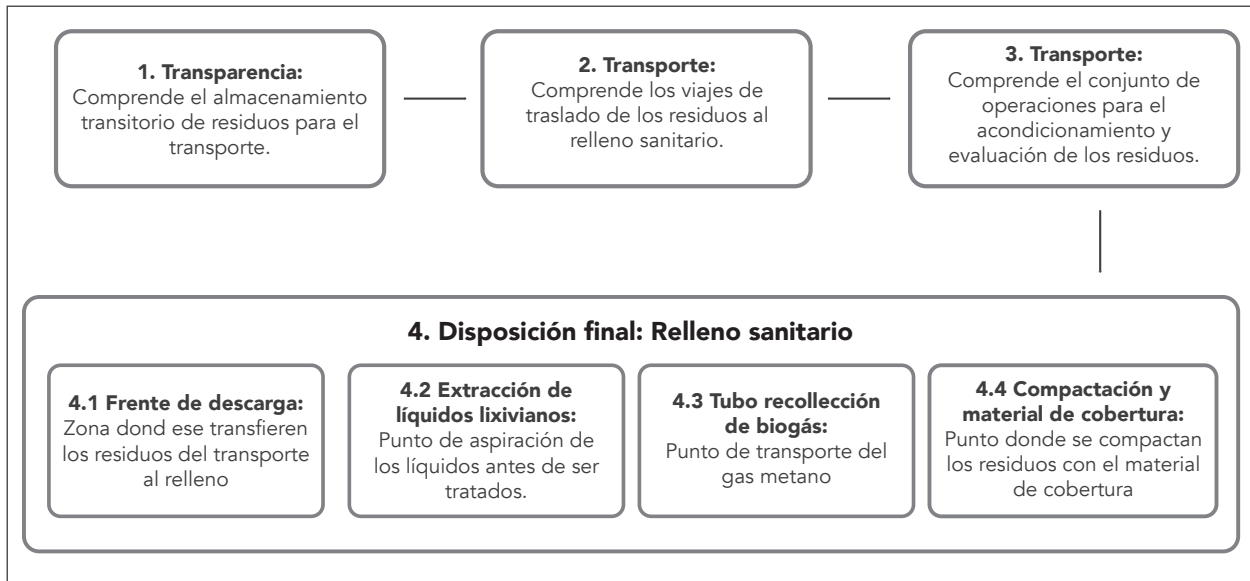


Figura 3. Esquema del humedal.  
Fuente: Elaboración propia (2016)

Previamente se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua de la quebrada La Pelahueso (cuatro muestreos) (ver Tabla 1); se inició en el mes de marzo de 2016 con

fenómeno de El Niño (tiempo seco) hasta el mes de abril (comienzo de lluvias), para establecer las plantas y fijar las condiciones de trabajo (45 días).

**Tabla 1.** Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua de la quebrada La Pelahueso.

Muestras	PQ1	PQ2	PQ3	PQ4
Coliformes totales (NMP/100ml)	130.000	9.200.000	1.600.000	16.000.000
Coliformes fecales (NMP/100ml)	13.000	130.000	1.600.000	9.200.000
<i>Enterococos fecales</i> (UFC/ml)	$4.6 \times 10^4$	$5.5 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$3 \times 10^4$
Mesófilos (UFC/ml)	$1 \times 10^{11}$	$4 \times 10^8$	$2.4 \times 10^7$	$6.2 \times 10^6$
<i>Clostridium</i> sulfitorreductores (UFC/ml)	$6 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^2$	$4.4 \times 10^3$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/ml)	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$5 \times 10^2$

Fuente: Elaboración propia. PQ1, PQ2, PQ3, PQ4 (2016)

### Sistema de humedales

Los humedales artificiales se clasifican en humedales de flujo superficial (HAFS) o de flujo subsuperficial (HAFSS). En los primeros, el agua se encuentra expuesta directamente a la atmósfera y circula preferentemente a través de los tallos de las plantas; para los humedales de flujo subsuperficial, el agua circula exclusivamente a través de un material granular (arena, grava), de permeabilidad suficiente, y al no estar el agua en contacto con la atmósfera se reducen olores y vectores y son menos sensibles a cambios en las condiciones externas del sistema. Durante el paso del agua residual a través del lecho poroso, se produce un contacto con zonas aerobias, anóxicas y anaerobias; la zona aerobia se encuentra cercana a la superficie, alrededor de las raíces y rizomas de las plantas [16]. El diámetro de la grava de ingreso y salida oscila entre 50 mm y 100 mm, la zona de plantación está constituida por grava fina de un solo diámetro, de entre 5 a 8 mm. Es fundamental que el agua se mantenga a un nivel inferior a la superficie (5-10 cm) [16].

Para determinar las cargas hidráulicas se usó la ecuación:

$$q = V/TRH$$

Donde  $q$  = carga hidráulica en la entrada [L/t],  $V$  = volumen,  $TRH$  = tiempo de retención hidráulica; obteniendo  $q = 42 \text{ cm}^3/\text{min}$  para el humedal con *Lemna minor* (lenteja de agua) y  $q = 22 \text{ cm}^3/\text{min}$  para el humedal con *Heliconia psittacorum*, con una duración de 5 días para cada carga. En los humedales de flujo subsuperficial, como se evidencia en [1], es necesario medir la pérdida de energía entre la entrada y la salida del sistema para evitar problemas significativos de estancamiento e inundación.

Las muestras se tomaron desde el 12 de mayo hasta el 23 de junio de 2016, con un total de seis muestreos aleatorios de las zonas del soporte cerca de la rizosfera y la raíz de las plantas *Heliconia psittacorum* y *Lemna minor*, para determinar las poblaciones de bacterias nitrificantes y desnitrificantes mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) y análisis microbiológicos

en el afluente y efluentes de los humedales en estudio, con el fin de cuantificar bioindicadores de contaminación fecal y evaluar su porcentaje de reducción (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*), microorganismos asociados a la calidad del agua como coliformes totales y mesofilos, y, finalmente, *Pseudomonas aeruginosa*, reportada como formadora de biopelícula y responsable de procesos de desnitrificación; la técnica empleada fue filtración por membrana. A la par, se realizaron análisis fisicoquímicos: pH, demanda química de oxígeno (DQO), temperatura, turbiedad, sólidos disueltos y conductividad, según los protocolos en [17].

### Cuantificación de bacterias nitrificantes y desnitrificantes

Las bacterias nitrificantes y desnitrificantes fueron enumeradas mediante la técnica del NMP. La composición química de los medios de cultivo empleados para bacterias nitrificantes y desnitrificantes tomada de Belser [18] se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Composición química de los medios de cultivo.

	Compuesto	Cantidad
Medio caldo amonio (nitrificantes)	$(NH_4)_2SO_4$	0.5g
	$CaCO_3$	1g
	$KH_2PO_4$	1g
	$NaCl$	0.3g
	$FeSO_4$	0.03g
	Agua destilada	950ml
	pH Entre	7.89 y 8.54

	Compuesto	Cantidad
Medio caldo nitrato (desnitrificantes)	$KNO_3$	0.5g
	$CaCO_3$	2.5g
	Sulfato de sodio ( $Na_2S$ )	0.1g/L
	Resazurin (Modificado por González, Ruíz y Quintero, 2016)	0.1MI/L
	Glucosa	10g
	Solución salina	50ml
	Agua destilada	950ml
	pH	7.89 y 8.54

Fuente: Elaboración propia (2016)

Para el caso de las plantas, las muestras correspondientes a la rizosfera se maceraron en una cápsula de porcelana estéril, posteriormente, se tomó el equivalente a 1 ml y se adicionó como diluyente 9 ml de solución salina estéril al 0,85 %. En cuanto al soporte, se pesó un gramo en una cápsula de porcelana estéril y se llevó a un tubo con 9 ml de solución salina estéril al 0,85 %. Para estimar la densidad poblacional se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ , se empleó solución salina estéril al 0,85 % como diluyente, y se sembró 1 ml de cada dilución en 5 tubos y 4 diluciones por muestra en caldo de amonio y nitrato, respectivamente. Se utilizó un vortex para agitar durante 3 minutos cada dilución, con el fin de desprender las bacterias adheridas al soporte y raíces.

### Condiciones de incubación y lectura para nitrificantes

Las muestras se incubaron a 24 °C y HR 56 % durante dos semanas en el Centro de Biotecnología de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Luego de este tiempo, se procedió a la lectura a partir del número de tubos positivos y negativos en cada dilución.

Para bacterias oxidantes de amonio o nitrificantes, previa agitación, se tomaron 100  $\mu$ l de cada tubo y se llevaron a placas de poliestireno de 96 pozos, se adicionaron 100  $\mu$ l de reactivo Griess con el fin de detectar nitritos; los tubos positivos tomaron coloración roja después de 3 minutos; a los tubos negativos se les adicionó polvo de zinc para detectar la presencia de nitratos residuales en el medio, los tubos positivos adquirieron coloración rojiza naranja y los que no cambiaron se tomaron como tubos negativos a los cuales se les adicionó reactivo de Nessler (para visualizar una verdadera reacción negativa) y confirmar la presencia de amonio, indicativo de que no existió proceso de nitrificación.

Posteriormente, con el número obtenido de los tubos positivos y negativos, se buscó el código en

la tabla de Mac Grady y se informó, 100 g o 100 mL de muestra, según el caso.

### Número más probable de bacterias desnitrificantes

Luego de la incubación, se procedió a determinar el número de tubos positivos y negativos en cada dilución para bacterias reductoras de nitratos (desnitrificantes). Previa agitación, se tomaron 100  $\mu$ l de cada tubo y se llevaron a placas de poliestireno de 96 pozos, se adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo Griess con el fin de realizar la detección del amonio (ver Figura 4). Los tubos positivos tomaron coloración roja después de 3 minutos, a los tubos negativos se les adicionaron dos gotas del reactivo de Nessler para detectar la presencia de amonio en el medio. Los tubos positivos presentaron una coloración amarilla, y los que no presentaron cambios se tomaron como tubos negativos, para lo cual se hizo una adición de polvo de zinc con el fin de confirmar la presencia de nitratos residuales, lo cual significa que no se dio el proceso de desnitrificación. Posteriormente, con el número obtenido de los tubos positivos y negativos se buscó el código en la tabla de Mac Grady y se informó, 100 g o 100 mL de muestra según el caso.

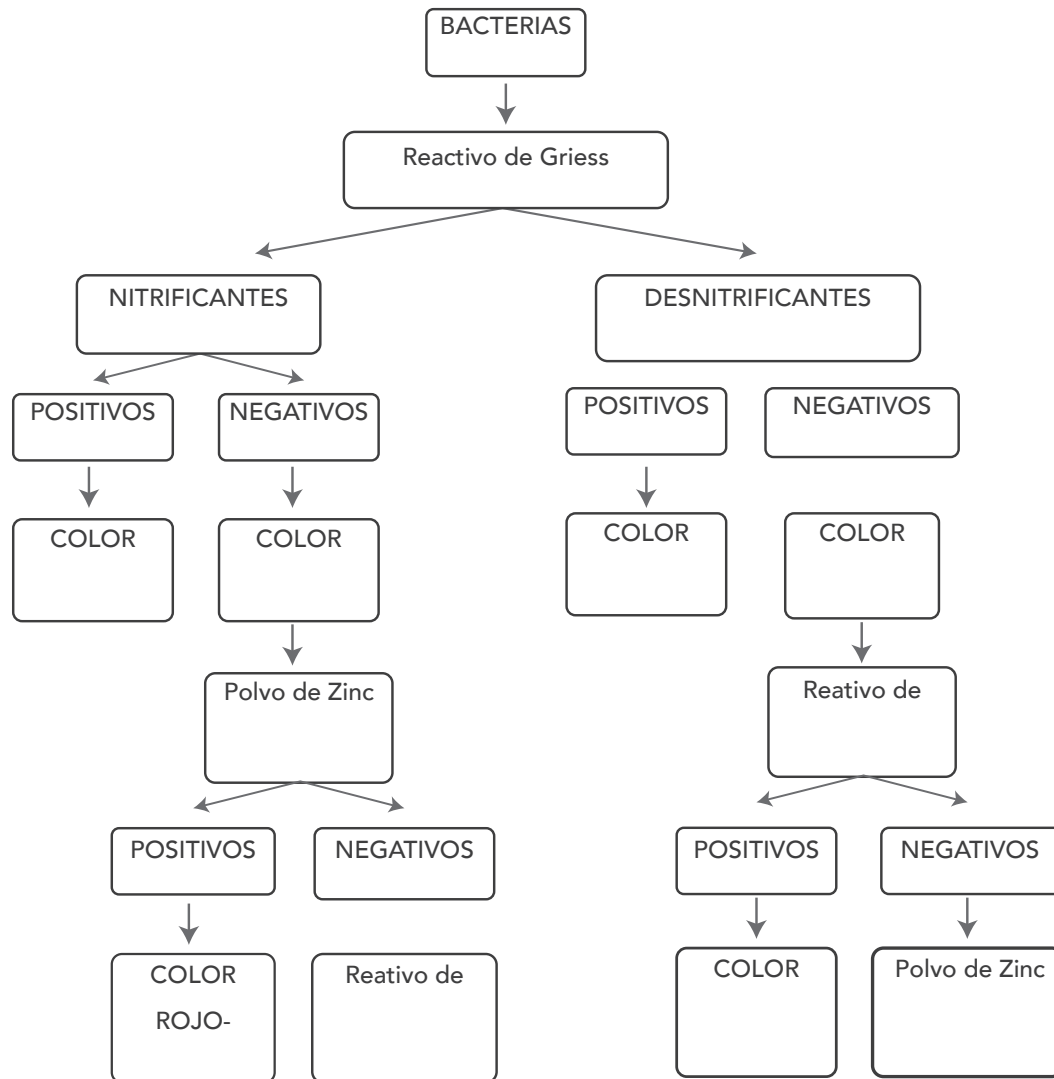


Figura 4. Proceso de identificación de bacterias.  
Fuente: Elaboración propia (2016)

## Resultados

### Resultados fisicoquímicos de la quebrada La Pelahueso, San Javier

La investigación se realizó teniendo en cuenta la caracterización inicial del agua de la quebrada La Pelahueso, la cual nace en la cota 1900 y desemboca a la quebrada La Hueso. La Pelahueso (Figura 5) posee un lecho contaminado debido

a vertimientos y residuos sólidos en el sector del barrio San Javier, además sus retiros se encuentran invadidos por construcciones y son utilizados para el depósito de escombros. Por todo lo anterior, la quebrada adquiere características de aguas residuales; a continuación, se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos del afluente y efluente en los muestreos realizados (ver Tabla 3).





Figura 5. Ubicación quebrada La Hueso, barrio San Javier.  
 Fuente: Elaboración propia (2016)

**Tabla 3.** Caracterización fisicoquímica del afluente y efluentes de los humedales B y C.

Parámetro	Unidad	Media			Desviación estándar			Porcentaje de variación	
		A	EH	EL	A	EH	EL	EH	EL
Temperatura	°C	21,4	21,1	21,1	2,7	2,0	2,2	1,3	1,5
pH	Unidad pH	6,95	4,85	5,8	0,4	1,2	0,5	30,2	17,2
Sólidos disueltos	mg/L	0,3	0,15	0,1	0,0	0,1	0,1	34,8	51,4
Conductividad	µs	0,43	0,28	0,2	0,1	0,1	0,2	34,4	47,0
Turbidez	NTU	7,60	1,4	2,1	4,7	0,6	1,6	77,1	72,0

Fuente: Elaboración propia (2016)

De acuerdo con estos resultados, se observa en el humedal C (*Heliconia psittacorum*) un mejor desempeño, por cuanto la turbidez se redujo en 77 % lo mismo que los sólidos disueltos, comparado con el humedal B, con 72 %. En cuanto al pH, se observa una disminución en los dos humedales respecto al afluente, debido posiblemente a los procesos metabólicos de hidrólisis y acidogénesis

en los que se liberan ácidos volátiles de cadena corta que ocasionan una baja en el pH.

#### Remoción de DQO

Se hizo la evaluación de la eficiencia del sistema para remover la demanda química de oxígeno (DQO) en el muestreo N.º 4 (ver Figura 6).

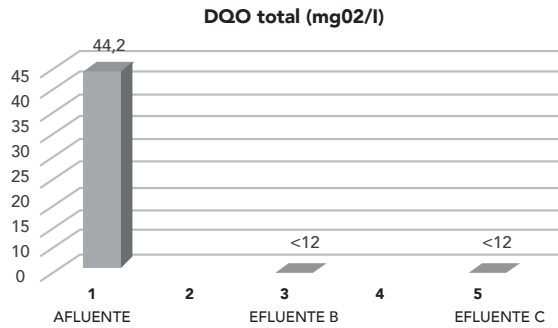


Figura 6. Remoción de DQO afluente/efluente Humedales B y C. Fuente: Elaboración propia (2016)

Se observa el comportamiento de la DQO para el afluente y los efluentes de los humedales, una buena remoción de materia orgánica finalizado el proceso.

Con los resultados para los efluentes de los humedales, se determinó cómo la DQO es afectada de forma positiva por los microorganismos cuya presencia y actividad se realizan por los procesos mediados por las plantas en los humedales. Según lo descrito por [19], remociones superiores al 72,85 % pueden deberse al crecimiento de las raíces densas y plumosas lo que favorece la adhesión de las comunidades de bacterias degradadoras de la materia orgánica. La comunidad microbiana formada en la biopelícula de la grava facilita el proceso de remoción de la materia orgánica y pequeños materiales, y una drástica disminución de bacterias patógenas presentes en aguas residuales empleando valores de flujo bajos.

### Resultados microbiológicos

A continuación, se presentan los resultados microbiológicos del afluente y efluentes en los seis muestreos realizados para los dos humedales con el fin de evaluar la eficiencia dada por la remoción de bioindicadores de contaminación fecal, como se muestra en la Figura 7.

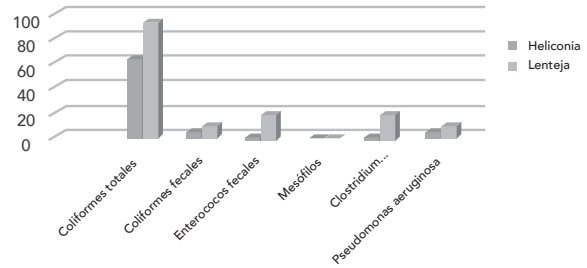


Figura 7. Resultados microbiológicos de afluente y efluentes de los humedales B y C. Fuente: Elaboración propia (2016)

Una vez terminado el tiempo de experimentación en los humedales, se obtuvo una disminución de microorganismos, especialmente para coliformes fecales (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*. No ocurre igual para los mesófilos y los coliformes totales que permanecieron en valores elevados; lo anterior ha sido reportado por otros autores.

El humedal de *Heliconia* presentó mayor reducción de *Pseudomonas aeruginosa*: se partió de valores >200 UFC, luego, en los muestreos realizados, el valor mínimo encontrado en el efluente fue de 2 UFC (Tabla 3).

El humedal B (con lenteja de agua) presentó una reducción considerable en el número de coliformes totales, caso contrario ocurrió en el humedal C (con *Heliconia*), el cual mostró un comportamiento significativo para la eliminación de coliformes fecales, se partió de valores de >200 UFC hasta terminar en valores negativos (0 UFC). En el humedal C (*Heliconia*) se eliminaron los *Enterococcus faecalis*, en 5 de los 6 muestreos. En el bioindicador *Clostridium perfringens* disminuyó hasta 10 UFC.

Para el caso de los mesófilos, no se observó una disminución significativa (>200 UFC), no obstante, se encontraron valores negativos de los bioindicadores de contaminación fecal.

### **Cuantificación de bacterias nitrificantes y desnitrificantes en el soporte y raíces de plantas**

Una vez realizado el recuento de bacterias nitrificantes y desnitrificantes (Figura 8), se encontraron valores mayores de bacterias

desnitrificantes teniendo como consideración la eliminación total del nitrógeno del medio de cultivo. En la Figura 8 se muestra una foto de las lecturas de bacterias nitrificantes y desnitrificantes en las microplacas.

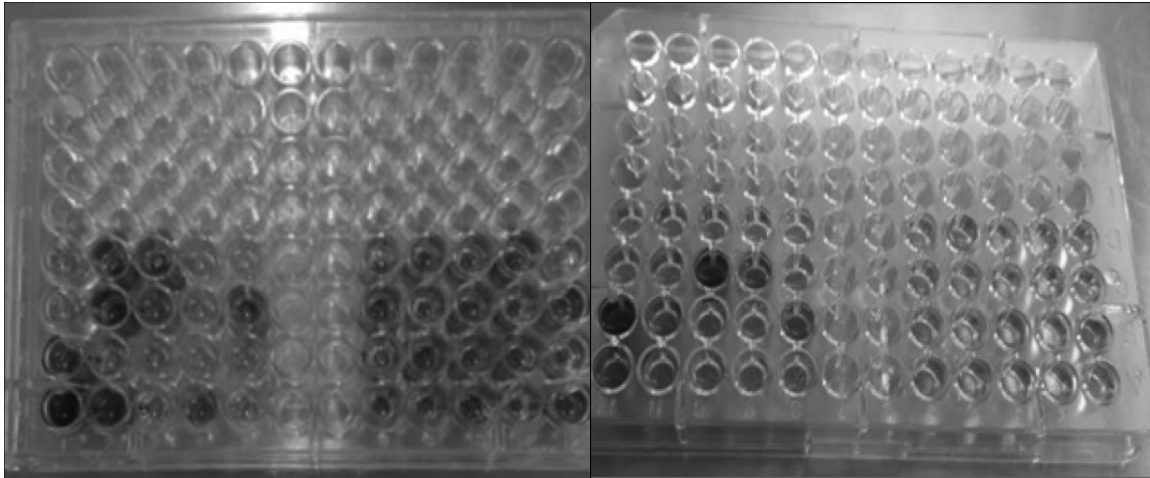


Figura 8. Lectura de microplacas para bacterias nitrificantes y desnitrificantes  
Fuente: Elaboración propia (2016)

Las muestras fueron analizadas microbiológicamente para estimar el número de bacterias nitrificantes y desnitrificantes asociadas a la rizosfera de las plantas y al medio de soporte.

En la Tabla 4 se relacionan los datos obtenidos para cada una de las muestras, mediante la estimación del Número más probable (NMP/g).

**Tabla 4.** Cuantificación de bacterias nitrificantes y desnitrificantes mediante NMP (1/2).

No de muestras		HUMEDALES					
		HUMEDAL B					
MUESTRA 1	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	3	DESNIT	270	3	DESNIT	60	
	3	NITRIF	16000	4	NITRIF	>24000	
MUESTRA 2	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	4	DESNIT	3500	3	DESNIT	3500	
	3	NITRIF	>24000	3	NITRIF	9200	
MUESTRA 3	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	6	DESNIT	3500	5	DESNIT	16000	
	6	NITRIF	>24000	5	NITRIF	16000	
				5	PUNTO A	DESNIT	16000
				5	PUNTO A	NITRIF	16000
MUESTRA 4	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	6	DESNIT	260	6	DESNIT	9200	
	6	NITRIF	>24000	6	NITRIF	1700	

HUMEDALES							
HUMEDAL B							
No de muestras	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
MUESTRA 5	6	PUNTO 1			PUNTO 2		
		DESNIT	9200	6	DESNIT	260	
		NITRIF	1700	6	NITRIF	>24000	
	5	PUNTO A	16000				
	5	PUNTO A	>24000				
	6	PUNTO B	330				
	6	PUNTO B	940				
MUESTRA 6	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	4	DESNIT	3500	4	DESNIT	2800	
	5	NITRIF	>24000	5	NITRIF	16000	
				6	PUNTO A	DESNIT	2800
				6	PUNTO A	NITRIF	16000
			5	PUNTO B	DESNIT	2800	
			5	PUNTO B	NITRIF	16000	
HUMEDALES							
HUMEDAL C							
No de muestras	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
MUESTRA 1		PUNTO 1			PUNTO 2		
	3	DESNIT	340	3	DESNIT	3500	
	3	NITRIF	3500	3	NITRIF	16000	

No de muestras		HUMEDALES					
		HUMEDAL C					
MUESTRA 2	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	3	DESNIT	2400	4	DESNIT	2200	
	3	NITRIF	2400	3	NITRIF	16000	
MUESTRA 3	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	6	DESNIT	>24000	4	DESNIT	2200	
	6	NITRIF	>24000	6	NITRIF	40	
MUESTRA 4	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	6	DESNIT	16000	6	DESNIT	6200	
	6	NITRIF	>24000	6	NITRIF	9200	
MUESTRA 5	Dilución	SOPORTE		Dilución	LENTEJA		
		PUNTO 1			PUNTO 2		
	4	DESNIT	9200	5	DESNIT	3400	
	4	NITRIF	>24000	4	NITRIF	16000	
	5	PUNTO B	DESNIT	16000			
	5	PUNTO B	NITRIF	>24000			
5	PROFUND	DESNIT	16000				
5	PROFUND	NITRIF	2800				

No de muestras		HUMEDALES				
		HUMEDAL C				
		Dilución	SOPORTE	Dilución		
			PUNTO 1		LENTEJA	
					PUNTO 2	
<b>MUESTRA 6</b>	7	7	DESNIT	2200	DESNIT	1100
	7	7	NITRIF	>24000	NITRIF	>24000

Fuente: Elaboración propia (2016)

En la Tabla 4, se observa el comportamiento de las muestras según los resultados obtenidos: para el muestreo 1, todos los recuentos se encontraron en la dilución  $10^3$ ; se obtuvieron valores similares en el soporte para las bacterias desnitrificantes, se observaron comportamientos contrarios para las raíces de las plantas, y se encontraron valores mayores en *Heliconia*. En el caso de las bacterias desnitrificantes, la lenteja presentó valores mayores en el soporte y las raíces. En general, para el muestreo 1 se encuentra un mayor número de bacterias nitrificantes en comparación con las desnitrificantes.

A la semana siguiente se realizó otro muestreo y se encontraron bacterias nitrificantes y desnitrificantes del orden de  $10^3$  para las raíces, y bacterias desnitrificantes del orden de  $10^4$  para el soporte, lo cual sugiere la formación de biopelículas, proceso que ocurre de 8 a 10 días. También, se observó una carencia de diferencias para los valores de desnitrificantes en los dos humedales, mientras que las bacterias nitrificantes presentaron un aumento en el soporte del humedal B.

En el siguiente muestreo (3), se observó un aumento de 3 logaritmos de bacterias nitrificantes en *Heliconia* con respecto al primer muestreo para el soporte y raíces, y para las raíces de lenteja el aumento fue de 3 log; las bacterias desnitrificantes aumentaron en ambos humedales sobresaliendo el soporte del humedal C. Las bacterias nitrificantes se encontraron iguales en el soporte de ambos

humedales y en las raíces se presentó un menor valor para el humedal C comparado con el B.

Para los muestreos siguientes se presentaron bacterias en la dilución  $10^6$ . No obstante, por encontrarse en la misma dilución, se observaron valores menores para las nitrificantes, excepto en las raíces del humedal C, con un comportamiento similar al del tercer muestreo, menos para las raíces de *Heliconia* que aumentaron de 40 a 9200 NMP/g. En este muestreo se observó una estabilización de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes en ambos humedales asociadas a la remoción de la materia orgánica y a los bioindicadores de contaminación fecal.

Las bacterias nitrificantes y desnitrificantes en los muestreos adicionales del soporte del humedal B presentes confirman la investigación de [20], según la cual, a medida que aumenta la profundidad, disminuye el número de bacterias.

En el muestreo 6 se observó una disminución de 1 y 2 log en el humedal B ( $10^4$  y  $10^5$ ), mientras que en el humedal C aumentó en  $10^7$ . En este muestreo se encontraron valores mayores de bacterias nitrificantes, en comparación con las desnitrificantes, y un aumento de 1 orden de magnitud en el soporte. Para el humedal C se presenta una similitud en el aumento de las nitrificantes para el soporte y raíces. En las muestras adicionales para el humedal C en raíces el comportamiento es similar.



Figura 9. Muestras efluente/afluente. Humedales construidos.  
Fuente: Elaboración propia (2016)



## Discusión

Los resultados encontrados en este estudio permiten considerar el empleo de humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales, por cuanto se evidencia una disminución y/ o eliminación de bioindicadores de contaminación fecal y valores elevados de bacterias nitrificantes y desnitrificantes responsables de los procesos de nitrificación y desnitrificación en estas aguas.

Aunque Belser [18] expresa que los experimentos con bacterias desnitrificantes requieren tres semanas de tiempo de incubación, durante el desarrollo del proyecto se obtienen valores que indican presencia de bacterias nitrificantes y desnitrificantes en un periodo de dos semanas, tiempo en el cual se estabilizan los grupos.

En los dos humedales se presentan valores mayores de 2.400 para las bacterias nitrificantes; datos similares a los recuentos obtenidos los presentaron Pérez, Peña, y Sanabria [1], que reportan para bacterias nitrificantes en humedales con *H. psittacorum* valores de 5.11 Log<sub>10</sub> UFC<sub>g</sub>-1 y 6.79 Log<sub>10</sub> UFC<sub>g</sub>-1 para desnitrificantes.

Asimismo, la DQO presenta remoción en los dos humedales. No obstante, el humedal con lenteja de agua no alcanza a cubrir completamente el espejo de agua; además, se observa la presencia de algas Clorococales.

Al relacionar los resultados fisicoquímicos y microbiológicos se encuentra un número de bacterias desnitrificantes mayor comparado con las nitrificantes, y se establece que las primeras realizan su proceso en valores de pH entre 6.5 y 7.5.

Con los resultados de los bioindicadores, se observa una disminución o resultados negativos especialmente para: coliformes fecales (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*. También, se evidencia que no ocurre igual para los mesófilos y los coliformes totales, los cuales permanecen con valores elevados. Estos resultados concuerdan con los encontrados por [21], donde humedales construidos muestran valores entre 1 y 2.5 unidades logarítmicas en la eliminación de bacterias coliformes fecales.

## Conclusiones y trabajo futuro

El número de bacterias nitrificantes y desnitrificantes es mayor en las muestras tomadas en el sustrato (a una profundidad de 10 cm del tubo), en comparación con la rizosfera de las macrofitas, debido posiblemente a la adherencia en la biopelícula formada.

A partir del cuarto muestreo se estabiliza el crecimiento de los dos grupos bacterianos, que se evidencia aún más en los muestreos 4 y 6 con valores de 10<sup>6</sup> y las muestras del punto 1 de los dos humedales para las bacterias nitrificantes, donde se encuentran valores mayores de 2.400. Con la técnica para recuento de bacterias usada en este proyecto se cuantifican las bacterias nitrificantes y desnitrificantes en el humedal artificial. Sin embargo, se pasa por alto una gran población de microorganismos presentes como algas y protozoos.

Como trabajo futuro, se propone continuar con el aislamiento en medio sólido de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes y su posterior caracterización; además, la remoción de las formas de nitrógeno presentes.

## Referencias

- [1] N. Pérez, M. Peña, y J. Sanabria, "Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos", *Ingeniería y Competitividad*, vol. 13, núm. 2, pp. 83-92, 2011. Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/xmlui/bitstream/handle/10893/3451/06Art.pdf?sequence=1>
- [2] W. Llagas Chafloque y E. Guadalupe Gómez, "Diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales en la UNMSM", *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, vol. 9, núm. 17, pp. 85-96, 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.15381/iigeo.v9i17.699>
- [3] A. Eaton, L. Clesceri, E. Rice, & A. Greenberg, Eds., *Standard Methods for the Examination*

of Water and Wastewater, 21st Ed., American Public Health Association, 2005.

- [4] Unesco, Programa Mundial para la Evaluación de los Recursos Hídricos, *Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas 2017: Aguas residuales, el recurso desaprovechado*. Francia: Unesco, 2017.
- [5] ACODAL, 2017.
- [6] J. L. Fuster Soto, "Estudio de la aplicabilidad de humedales artificiales para la mejora de la calidad de las aguas en los meandros abandonados del río Segura", Tesis de grado, Universidad Politècnica de València, 2016.
- [7] E. Jerez, "El cultivo de las Heliconias", *Rev. Cul. Trop.*, vol. 28, núm. 1, p. 8. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215858005>
- [8] C. Marín, R. Solís, G. López, R. Bautista, y M. Romellón, "Tratamiento de aguas residuales por humedales artificiales tropicales en Tabasco, México", *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, vol. 5, núm. 13, 2016. Disponible en: 10.23913/ciba.v5i10.54
- [9] H. Gutiérrez, M. R. Peña, y A. Aponte, "Estimación del balance de nitrógeno en un humedal construido subsuperficial plantado con *Heliconia psittacorum* para el tratamiento de aguas residuales domésticas", *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, núm. 56, pp. 87-98. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-62302010000600009&script=sci\\_abstract&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-62302010000600009&script=sci_abstract&lng=es)
- [10] A. Silva y H. Zamora, "Humedales artificiales", Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia sede Manizales Facultad de Ingeniería y Arquitectura Departamento de Ingeniería Química, Manizales, Colombia.
- [11] R. Kadlec, R. Knight, J. Vymazal, H. Brix, P. Cooper, & R. Haberl. *Constructed Wetlands for Pollution Control: Processes, Performance, Design and Operation*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers, IWA Publishing, 2000. Disponible en: <http://biblioteca.cehum.org/handle/CEHUM2018/1649>.
- [12] M. Kemp & D. George, "Subsurface flow constructed wetlands treating municipal wastewater for nitrogen transformation and removal", *Water Environment Research*, vol. 69, núm. 7, pp. 1254-1262, 1997. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/25044993>.
- [13] D. P. Forero Velásquez y A. M. Guayacundo Gómez, "Dimensionamiento de un humedal construido piloto. Caso de estudio Campus Cajicá", Tesis de grado, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, 2011.
- [14] Organización Lara Tunja, Implementación del primer humedal documentado en Colombia de flujo subsuperficial, 1997.
- [15] K. Senhadji, M. Ruíz, y J. Rodríguez, "Estado ecológico de algunos humedales colombianos en los últimos 15 años: Una evaluación prospectiva", *Colombia Forestal*, vol. 20, núm. 2, pp. 181-191, 2017. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v20n2/v20n2a07.pdf>
- [16] C. E. Ortiz, "Factibilidad del diseño de un humedal de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas residuales municipales de 30.000 habitantes", Tesis de grado, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, 2014.
- [17] E. Rice, R. Baird, A. Eaton, & L. Clesceri, Eds., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd edition. Amer Public Health Ass., 2012.
- [18] L. Belser, "Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 34, núm. 4, pp. 403-410, 1977. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/34/4/403.full.pdf>
- [19] J. Montoya et al., "Estudio comparativo de la remoción de materia orgánica en humedales construidos de flujo horizontal subsuperficial usando tres especies de macrófitas", *Revista EIA*, núm. 14, pp. 75-84, 2011.

- [20] R. Manser, W. Gujer, & H. Siegrist, "Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems", *Science Direct*, vol. 40, núm. 12, pp. 2416-2426, 2006. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135406002351>
- [21] J. García, J. Morató, y J. Bayona, Eds, *Nuevos criterios para el diseño y operación de humedales construidos. Una alternativa de bajo coste para el tratamiento de aguas residuales*, CPET, Centro de Publicaciones de Campus Nord, 2004.