
Control de la contaminación de aguas servidas en áreas rurales de alta sensibilidad sísmica, a través de humedales construidos: incidencia en la eliminación de potencial biológico evaluado como disrupción endocrina (CON²ASER)

**Gladys Vidal
y col.**

Ayudas a la investigación 2011

Investigador Principal

Gladys Vidal

Ingeniero Civil Industrial mención procesos y Doctora en Ciencias Químicas (Programa Biotecnología Ambiental) de la Universidad de Santiago de Compostela (España)
Profesor Titular y Subdirectora de Formación e Investigación en el Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile de la Universidad Concepción.
Dirección: Barrio Universitario s/n, Casilla: 160-C, Concepción-Chile;
Teléfono: (56-41) 224067; Fax: (56-41) 2204002; *E-mail: glvidal@udec.cl*

Equipo Investigador

Ana Baeza

Ingeniera Civil Química,
M. Sc. y Ph.D. en Ingeniería Ambiental
por la North Carolina State University (USA).
Profesor Asistente y Jefa de la Carrera de Ingeniería Ambiental
del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile
de la Universidad Concepción

Daniela López

Bióloga marina, Doctorado (c) en Ciencias Ambientales
del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile
de la Universidad de Concepción

Ismael Vera

Ingeniero Civil, Máster en hidrosistemas de la Pontificia
Universidad Javeriana (Colombia). Dr. en Ciencias Ambientales
del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile
de la Universidad de Concepción

Soledad Chamorro

Bióloga y Doctora en Ciencias Ambientales
por la Universidad de Concepción.
Postdoctorado del Centro de Ciencias Ambientales
EULA-Chile de la Universidad de Concepción

Índice

	Página
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
2.1. Introducción	5
2.2. Antecedentes bibliográficos	6
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	10
4.1. Características de la estación experimental	10
4.2. Estrategia de operación y monitoreo	12
4.3. Determinación de actividad estrogénica	12
4.4. Bioensayos agudos a través de <i>Daphnia magna</i>	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. Caracterización del influente	13
5.2. Parámetros <i>in situ</i>	14
5.3. Concentraciones de efluentes y eficiencias de eliminación	14
5.4. Evaluación de la toxicidad biológica del efluente por actividad endocrina y <i>Daphnia magna</i>	16
6. CONCLUSIONES	17
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
8. ANEXO. INSTALACIONES DE PLANTA DE TRATAMIENTO	20

1. RESUMEN

El problema del tratamiento de las aguas servidas, en zonas rurales es semejante a toda la América latina para resolverlo se necesitan sistemas que puedan depurar las aguas con bajos costos de mantención, limitaciones en el uso de energía y que puedan funcionar en situaciones de emergencia. Particularmente, después del terremoto del 27 de febrero de 2010 (8,8 grados Richter), que afectó principalmente el sur de Chile y su epicentro fue en la región del Bio Bio del país se pudo notar la vulnerabilidad de la disponibilidad del agua y las deficiencias en su tratamiento final. Las tecnologías naturales de tratamiento resultan como una opción atractiva, ya que la eliminación de las sustancias contaminantes de las aguas residuales se realiza a través de mecanismos y procesos naturales los cuales no requieren de energía externa, ni de aditivos químicos. Esta tecnología se caracteriza por su escasa necesidad de personal de mantenimiento, consumo energético reducido y baja producción de lodo y puede presentar ventajas frente a la eliminación de compuestos activos presente en las aguas servidas y que producen actividad biológica, entre ella, la disrupción endocrina.

El Proyecto tuvo como objetivo principal evaluar el comportamiento de operación de humedales artificiales de tipo subsuperficial utilizando *Schoenoplectus californicus* y *Phragmites sp.* para tratar aguas servidas provenientes de núcleos poblacionales rurales de baja densidad poblacional.

El Proyecto fue desarrollado en cuatro etapas: a) Implementación sistema de humedales construidos y la puesta en marcha del proyecto; b) Puesta en marcha, seguimiento y monitoreo de la operación de los sistemas de humedales construidos, caracterización influente

efluente, plantas y microbiología, c) Estudio de la respuesta toxicidad y de la actividad estrogénica del influente y efluente mediante *S. cerevisiae recombinante* y *D. magna* y d) Difusión a las autoridades públicas, empresas sanitarias y comunidad en general y rural en particular. Para la realización de este Proyecto se implementó de una estación experimental, constituida por 4 unidades paralelas de humedales subsuperficiales (HSS). Está ubicada dentro del terreno de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la comuna de Hualqui (Región del Biobío, Chile), perteneciente a la Empresa de Servicios Sanitarios del Biobío, ESSBIO S.A. Esta planta fue operada durante un año aproximadamente bajo parámetros de control específicos, evaluando la eliminación de materia orgánica nutrientes y potencial biológico.

Los resultados indican que todos los HSS evaluados en su puesta en marcha, presenta eliminaciones entre 50-98% para materia orgánica y sólidos, con mayores eficiencias a lo largo del año, debido probablemente a la aclimatación de la biomasa bacteriana. Por su parte, los nutrientes fueron eliminados hasta el 40% en el caso de $N-NH_4^+$ y hasta 60% en el caso del fósforo. Los efluentes tratados mediante HSS no presentaron toxicidad aguda evaluada a través de *Daphnia magna*. Sin embargo, no fue posible evaluar actividad endocrina debido a la interferencia que pudo haber con compuestos que fueron tóxicos para la activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

A través de este Proyecto se pudo corroborar que los humedales como sistemas de tratamiento de aguas servidas para zonas rurales de la región de Biobío (Chile), son una opción factible, más aún son estables por su capacidad de amortiguar los efectos negativos generados por los sismos. Debido a los resultados obtenidos este Proyecto fue

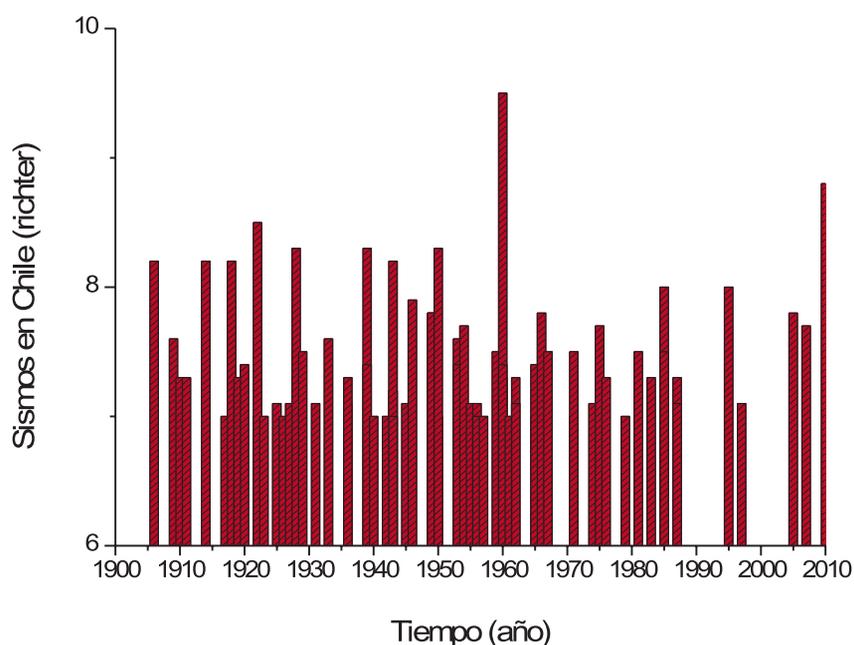


Figura 1. Sismos (Escala Richter) producidos en Chile desde 1900 al 2010.

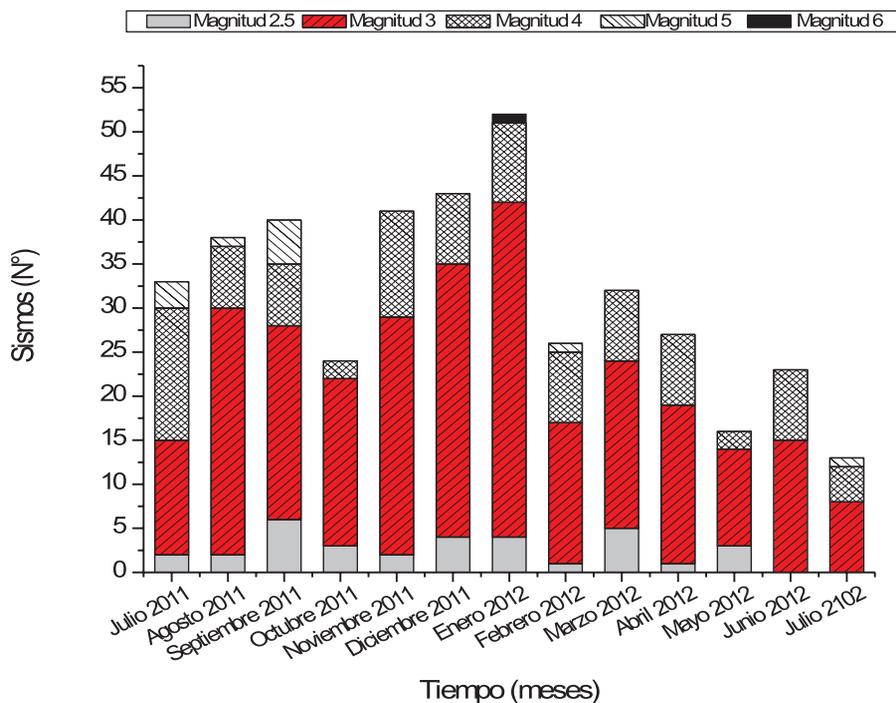


Figura 2. Sismos (Escala Richter) producidos en Chile entre 2011 y 2012.

difundido en un seminario patrocinado por la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental y la Empresa de Servicios Sanitaria del Biobío ESSBIO S.A.

2. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

2.1. Introducción

Chile es un país sísmico, debido a que se encuentra localizado sobre la conjunción de las placas de Nazca y Sudamericana que, al chocar, causan movimientos telúricos. Estadísticamente, la interacción entre estas placas tectónicas, produce un sismo destructor cada 10 años, con un promedio de 10 pequeños temblores diarios, y un total anual de 3.500 movimientos sísmicos, siendo la mayoría de ellos imperceptibles para la población. Generándose en los últimos 100 años aproximadamente 50 terremotos destructores (Figura 1).

En efecto, las pérdidas en vidas humanas y económicas generadas por este tipo de catástrofe natural han sido recurrentes a lo largo de la historia de Chile; especialmente impactantes han sido los efectos ocasionados por el terremoto del 27 de febrero de 2010 (8,8 grados Richter), que afectó principalmente el sur de Chile y su epicentro fue en la región del Bio Bio. Esta situación dejó de manifiesto la vulnerabilidad de la disponibilidad del agua potable y del tratamiento de aguas servidas. Específicamente, debido a la intensidad del sismo los sistemas de tratamiento convencionales (tipo lodo activado) pre-

sentaron fallas en las zonas urbanas (por las vibraciones que tuvo que soportar las infraestructura civil, inexistencia de suministro eléctrico, lixiviación de los suelos que sostenían la infraestructura, escases de combustibles, colapso de las telecomunicaciones, entre otros), factores que serían aún más críticos para afrontar en las comunidades rurales (Figura 2).

Es por ello, que a nivel mundial, una de las principales medidas para asegurar la salud pública y evitar enfermedades y epidemias infecciosas transmitidas por patógenos en el agua en situaciones de emergencia, es el establecimiento de sistemas de potabilización de agua y tratamiento de aguas servidas, que puedan responder de manera efectiva a situaciones de emergencia, con el fin de no dejar a la ciudadanía sin estos servicios básicos. La Figura 2, muestra el número de sismos producidos en Chile en el último año, observándose que mensualmente se producen en promedio entre 14 a 53 sismos, de los cuales en su mayoría presentan una magnitud inferior a 4° en la escala de Richter.

En Chile, desde la instauración del sistema que regula el abastecimiento de agua potable, alcantarillado y tratamiento de aguas residuales domésticas, se observado un aumento paulatino en las coberturas en el sector urbano (>85%). En el caso del sector rural, de acuerdo al Ministerio de Obras Públicas desde 1964 se ha llevado a cabo el programa de agua potable rural que ha logrado pasar de un 6% a un 98% la cobertura de población rural con acceso a agua potable. Sin embargo, de estas viviendas solo un 18% presenta sistema de alcantarillado y un 8% presenta sistema de tratamiento de aguas servidas.

Según la encuesta de Caracterización Socioeconómico Nacional 2009 (CASEN) en la Región del Biobío el 7,6% de hogares rurales está conectado al alcantarillado, el 54,6% posee fosa séptica, el 8,2% posee letrina sanitaria conectada a pozo negro, el 27,3% tiene cajón sobre pozo negro, el 0,1% cajón conectado a otro sistema, mientras que 2,2% no dispone de sistemas eliminación de excretas, por lo que más del 37% de los hogares rurales no posee tratamiento de sus aguas servidas.

Este hecho es preocupante desde el punto de vista social y sanitario ya que por ejemplo, estas aguas al no presentar tratamiento son dispuestas directamente sobre el suelo, infiltrando directamente a napas freáticas o se vacían en cursos de agua receptores, que posteriormente son usados para el riego de verduras para el consumo de localidades aguas abajo. Es por ello que el tratamiento de las aguas residuales domesticas constituye un reto para la sociedad, porque casi la totalidad de las aguas residuales domesticas rurales son dispuestas sin tratamientos y/o usadas para fines agrícolas, lo que constituye un problema sanitario de envergadura. Debido a lo anterior, los últimos años ha surgido la necesidad de buscar, evaluar y aplicar tratamientos de depuración eficientes, autónomos y económicamente viables para el sector rural. Entre las soluciones más atractivas, se encuentran los tratamientos que imitan los fenómenos que se generan en la naturaleza. Estos sistemas corresponden a los humedales construidos. El uso de estos sistemas para depurar aguas se ha incrementado durante los últimos años y en la actualidad, son una opción de tratamiento de aguas residuales reconocida y recomendada a nivel mundial.

Los Humedales Construidos (HC) son sistemas de tratamiento no convencionales que se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales desde mediados del siglo XX. Desde entonces, se han convertido en una tecnología de tratamiento confiable para distintos tipos de aguas residuales (Vymazal, 2005). En la actualidad se emplean con gran cobertura en Europa. Muchos se utilizan para viviendas individuales o pequeños grupos de casas, pero el uso más común es para el tratamiento de las aguas residuales domésticas en zonas rurales de baja densidad poblacional como tratamiento secundario o terciario (Cooper, 2009).

Los humedales construidos o artificiales se definen como sistemas biológicos confinados mediante algún tipo de impermeabilización, que surgen a partir de la simulación de los mecanismos propios de los humedales naturales para la depuración de las aguas, donde se combinan procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren al interactuar las aguas con el suelo, las plantas, los microorganismos y la atmósfera, permitiendo el tratamiento de aguas residuales. Están diseñados para tomar ventaja de muchos de los procesos que ocurren en los humedales naturales, pero lo hacen dentro de un ambiente más controlado (Vymazal, 2005).

Al igual que otros sistemas naturales de depuración, los humedales construidos presentan algunas ventajas frente a los sistemas convencionales mecanizados. Una

de ellas se relaciona con el bajo consumo energético (36.5 Kw-h/año), que está asociado principalmente al pretratamiento y equipos de bombeo, mientras que en sistemas de lodos activados el consumo es tres veces superior (129.648 Kw-h/año), asociado a las necesidades de aireación (Rojas, 2012). Otra ventaja se relaciona con la simplicidad en la operación. Sistema de humedales construidos requieren menos tiempo de operarios (0,6 horas/día) (García *et al.*, 2001). Además pueden ser manipulados por operarios con poca experiencia en tratamiento de aguas residuales. También los humedales construidos presentan una baja producción de residuos durante la operación del sistema. Los residuos se suelen limitar a los generados por el pretratamiento y el tratamiento primario. Otra ventaja competitiva, es el bajo costo de operación y mantenimiento del sistema. Los costos actuales estimados de los humedales se encuentran en torno a \$480 /hab · año (para una población de 2000 hab), generados en un 99% por el pago del operador (un estimado de 12 h a la semana), mientras que el costo para sistemas de lodos activados corresponde a \$15.466 /hab · año (Rojas, 2012). Finalmente otras ventajas se encuentran asociadas a un bajo impacto sonoro, buena integración con el medio ambiente natural, potenciando la fauna local, la educación ambiental y las zonas de recreo.

2.2. Antecedentes bibliográficos

2.2.1. Humedales construidos

Existen varios tipos de clasificaciones en la identificación de los humedales. Considerando a (Kadlec y Wallace, 2009), los humedales construidos pueden clasificarse de acuerdo al régimen hídrico en dos tipos de humedales: Humedal de flujo superficial y Humedal de flujo subsuperficial, dentro del cual se pueden encontrar humedales de flujo horizontal y vertical. Además, pueden existir combinaciones entre estos para formar sistemas híbridos. En los humedales de flujo superficial el agua está expuesta directamente a la atmósfera y circula preferentemente a través de los tallos de los macrófitos. El agua se vierte en la superficie en un extremo del lecho, y se mueve lenta y horizontalmente, para finalmente ser evacuada en el extremo opuesto del lecho, por medio de un vertedero. Las plantas acuáticas están enraizadas en el fondo del humedal y el flujo de agua se hace a través de las hojas y los tallos de las plantas (Brix, 1994).

Por otro lado, en los humedales de flujo horizontal subsuperficial (HSS), la lámina de agua no es visible. En estos el agua se distribuye en un extremo del lecho, se infiltra, y se transporta en sentido horizontal a través de un medio granular de relleno y entre las raíces de las plantas. Al final y en el fondo del lecho, el agua tratada se recoge y se evacua por medio de tuberías y/o vertederos. Las profundidades de estos humedales no suele exceder los 0.60 m y son construidos con una leve pendiente en el fondo, pero manteniendo en lo posible condiciones hidráulicas de flujo laminar para facilitar el transporte del

agua (Arias *et al.*, 2003). Sin embargo, en los humedales de flujo vertical subsuperficial (VSS), el agua se vierte y se distribuye en toda la superficie del lecho, fluye de manera descendente y percola entre las diferentes capas de material filtrante de relleno y las raíces de las plantas. El sistema de distribución del agua está en la superficie y reparte el agua uniformemente. Una vez que el agua pasa a través del lecho, se recoge en el fondo y se evacua por medio de tuberías. El lecho debe tener una profundidad no menor a 1 m (Arias *et al.*, 2003).

Los humedales de flujo superficial se suelen utilizar como tratamiento adicional a efluentes previamente tratados en depuradoras de tipo convencional. Hay muy pocos sistemas a escala real que traten directamente aguas residuales (Kadlec y Wallace, 2009). Además, suelen ser sistemas de gran tamaño con extensiones de varias e incluso hasta centenares de hectáreas. En este tipo de proyectos, los objetivos de restauración y creación de nuevos ecosistemas en general tienen una gran importancia (García y Corzo, 2008).

Los humedales de flujo subsuperficial son instalaciones de menor tamaño y que en la mayoría de los casos se utilizan como sistema de tratamiento de las aguas residuales generadas en casas, viviendas aisladas y núcleos de menos de 2000 habitantes (García y Corzo, 2008). Los HSS funcionan permanentemente inundados, aunque hay algunas experiencias recientes satisfactorias con sistemas intermitentes (Vymazal y Masa, 2003). Los VSS se diseñan con funcionamiento intermitente, es decir, tienen fases de llenado, reacción y vertido. La intermitencia y la inundabilidad permanente confieren propiedades muy diferentes a los sistemas verticales y horizontales respectivamente. En particular afectan mucho la transferencia de oxígeno y por tanto al estado de oxidación-reducción del humedal, produciendo los humedales verticales efluentes con mayor concentración de oxígeno y menor generación de olores (Martí, 2003).

2.2.2. Las aguas servidas y los compuestos con actividad disruptora endocrina

Las aguas servidas presentan una serie de características físicas, químicas y biológicas. Estos componentes se ven expresados en sólidos en suspensión (fracción orgánica e inorgánica), materia orgánica biodegradable y no biodegradable, patógenos, nutrientes (nitrógeno, fósforo), metales pesados y microcontaminantes que pueden o no tener actividad biológica. Para aguas domésticas brutas típicas el cociente DBO_5/DQO se halla entre 0,4 y 0,8 (Metcalf y Eddy, 1995).

Los compuestos microcontaminantes pueden o no tener actividad biológica entre ellos, pueden existir compuestos con actividad disruptora endocrina. Los compuestos disruptores endocrinos son conocidos desde los años 1930 y se definen como, "xenobióticos capaces de actuar en forma similar a hormonas y con habilidad de influenciar la regulación endocrina" (Dodds and Lawson, 1936, Chamorro *et al.*, 2007). Así, los disruptores hormonales alteran

el mensaje endocrino de varias formas: pueden imitar la hormona ocupando su lugar, pueden bloquear su acción compitiendo por el receptor hormonal, o pueden modificar la síntesis de la hormona o del receptor correspondiente. Como consecuencia, se produce una alteración del sistema hormonal que puede tener consecuencias neurológicas o reproductivas, dado que las hormonas están implicadas en el control de la reproducción, la coordinación de órganos, la organización del cerebro, y el metabolismo (Gillesby and Zacharewski, 1998; Fairchild *et al.*, 1992).

Existe una larga lista de compuestos que están contenidos en las aguas domésticas y que son considerados disruptores endocrinos, con distintas procedencias y diferentes propósitos. En las aguas servidas principalmente se pueden encontrar medicamentos y/o fármacos y compuestos de uso personal, entre otros (Chamorro *et al.*, 2007, Chamorro *et al.*, 2013).

2.2.3. Los humedales construidos y la eliminación de microcontaminantes que producen disrupción endocrina

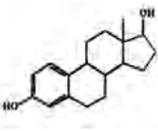
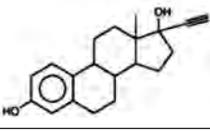
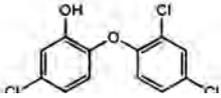
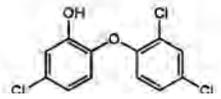
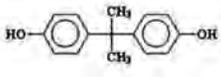
Entre los microcontaminantes de interés ambiental, los denominados disruptores endocrinos originan múltiples efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, afectando el crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos, o de su progenie (Hewitt *et al.*, 2008). De los efectos ambientales, la inducción de citocromo P-450, la mortalidad de ovas, la depresión de la fecundidad, la alteración en las características sexuales secundarias, y la disminución en la producción de hormonas reproductivas, aparecen como las más representativas (Tamagawa *et al.*, 2005). Por otro lado, las aguas servidas, son consideradas como la mayor fuente de compuestos disruptores endocrinos en el ambiente (Auriol *et al.*, 2006). Los compuestos más relevantes a nivel ambiental corresponden a hormonas, como estradiol, estrona, estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol y dietilstilbestrol, surfactantes, como los alquilfenoles, y compuestos industriales, como el bisfenol A, entre otros (Tamagawa *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2006). En aguas servidas tratadas mediante sistemas biológicos se han detectado estos compuestos en un rango de concentración de 0,2 a 100 ng/L (Desbrow *et al.*, 1998). Respecto a su eliminación de las aguas servidas, Servos *et al.* (2005), determinó que hormonas, como el 17 β – Estradiol, tratadas mediante sistemas biológicos secundarios del tipo lodos activos y lagunas aireadas, presentan eliminaciones superiores al 75%, llegando a valores del 98%. También, estos autores indican que el comportamiento de la hormona estrona, es más complejo ya que la eliminación puede variar desde 0 hasta 98%. En este mismo sentido, Andersen *et al.* (2003), evaluando también la eliminación de hormonas como Estrona, 17 β – Estradiol y 17 α -Etinilestradiol, presentes en aguas servidas tratadas por sistemas biológicos secundarios y terciarios, determinaron eliminaciones superiores al 90%. Sin embargo, establecieron que más del 50% de la eliminación se logra en la etapa de tratamiento terciario,

que consistía en un proceso de nitrificación-desnitrificación biológica. Por su parte, Auriol *et al.* (2006), intentando sintetizar el conocimiento relacionado con la eliminación de compuestos disruptores endocrinos, presentes en aguas servidas tratadas mediante sistemas biológicos convencionales, indicaron que los mecanismos de eliminación incluyen la adsorción al floculo microbiano, la degradación biológica y bioquímica, y la transformación y volatilización durante el proceso de aireación.

Por otro lado, para sistemas de tratamiento de aguas servidas del tipo humedales construidos, existe escaso conocimiento sobre la eliminación de microcontaminantes, como es el caso de los disruptores endocrinos (Hijosa-Valero *et al.*, 2011a). En este sentido, la Tabla 1 muestra porcentajes de eliminación de varios compuestos disruptores endocrinos presentes en aguas servidas tratadas por diferentes tipos de humedales construidos. La Tabla 1 muestra que humedales del tipo HSS presentan eliminaciones superiores al 50%. Si bien la Tabla 1 no permite

concluir cual es la mejor especie de planta, se ha indicado que su presencia favorece las condiciones de eliminación de microcontaminantes (Hijosa-Valero *et al.*, 2011a; Hijosa-Valero *et al.*, 2011b). Además, preliminarmente se ha mostrado que la eliminación de microcontaminantes en humedales construidos, se debe a los procesos de adsorción y biotransformación (Ávila *et al.*, 2012). En el caso de la adsorción, las características fisicoquímicas de los compuestos disruptores endocrinos, indican el mayor grado de afinidad a este mecanismo (Ávila *et al.*, 2010). Por su parte, la biotransformación, se ha evaluado por el potencial de oxidorreducción, mostrando que condiciones menos reducidas (>-100 mV), mejoran la eliminación de microcontaminantes (Hijosa-Valero *et al.*, 2011b; Ávila *et al.* 2012). Sin embargo, aún se debe prestar atención a mecanismos específicos de eliminación para compuestos disruptores endocrinos, así como también a los mecanismos de formación y eliminación de productos secundarios en humedales construidos (Ávila *et al.*, 2012).

Tabla 1. Porcentajes de eliminación de compuestos disruptores endocrinos en los diferentes tipos de humedales.

Tipo de Humedal	Profundidad (m)	Especie de planta	Compuesto	Estructura	Eliminación (%)	Ref.
HS	0,50	Ty, Sc	E2		36	(1)
			EE2		41	
HSS + HV	0,50	Ty, Za, Cf (HSS) + Ph(HFV)	NP		78	(2)
HSS	0,25	Za	NP		54	(3)
			NP [1-3] O		97	
HSS	0.25	Ph	BPA		65 -90	(4,5)

Grey and Sedlack (2005); (2) Belmont *et al.* (2006); (3) Belmont y Metcalfe (2003); (4) Ávila *et al.* (2010); (5) Ávila *et al.* (2012). HS: Humedal construido de flujo horizontal superficial; HSS: Humedal construido de flujo horizontal subsuperficial; HFV: Humedal construido de flujo vertical subsuperficial; Ty: *Typha spp.*; Sc: *Scirpus spp.*; Za: *Zantedeschia spp.*; Cf: *Canna spp.*; Ph: *Phragmites australis*; E2: 17-estradiol; EE2: Etinilestradiol; NP: Nonilfenol; NP [1-3] O: Nonilfenol 1-3 Etoxilatos; BPA: Bisfenol A.

2.2.4. Bioindicadores ambientales

– **Los bioensayos de toxicidad.** Las evaluaciones de riesgo ambiental han alcanzado en los últimos años gran importancia, particularmente debido al gran número de

contaminantes que son potencialmente dañinos y que pueden afectar el funcionamiento de los ecosistemas. Las metodologías de evaluación del riesgo para la protección de los ecosistemas acuáticos, se conceptualizan como un

procedimiento de dos componentes, que involucran por una parte, la evaluación de la exposición de los organismos a los contaminantes presentes en el ecosistema y por otro lado, la evaluación de los efectos que derivan de esa exposición. Dada la gran complejidad que presentan los ecosistemas acuáticos, no es posible evaluar el efecto de los contaminantes sobre la totalidad de los organismos que viven en ellos. Es por ello, que a través de la utilización de especies de prueba, como sustrato para evaluar los efectos individuales de los contaminantes, se ha podido extrapolar la información obtenida con dichas especies a la situación real del sistema analizado (Larsson *et al.*, 2002). La aproximación más importante para la evaluación del efecto se realiza por medio de técnicas bioanalíticas conocidas como bioensayos de toxicidad (Larraín, 1995, López *et al.*, 2011). La toxicidad es una propiedad inherente de un agente químico que produce efectos dañinos a un organismo cuando este es expuesto durante un cierto tiempo a determinadas concentraciones. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de un contaminante (sea una sustancia pura o efluente) sobre los sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio. Entre las pruebas de toxicidad, el bioensayo agudo es uno de los más utilizados. Son aquellos donde se mide el efecto de las exposiciones por un periodo de 24 ó 48 horas, evaluando la respuesta de mortalidad, mediante el un valor estadístico, LC_{50} , que es la concentración que resulta letal para el 50% de los organismos expuestos durante el período especificado.

Los bioensayos han sido desarrollado y estandarizados por agencias internacionales de normalización y protección ambiental (EPA, USEPA, ASTM). En Chile, la normativa vigente de bioensayos de toxicidad, es la Normativa Chilena Oficial 2083 (1999), de protección ambiental, ya que por su carácter cuantitativo, éstos representan una herramienta alternativa necesaria para mejorar la regulación y manejo del recurso agua. Inicialmente las pruebas para identificar, regular y monitorear problemas ambientales se realizaron con una sola especie. Posteriormente, los sustratos biológicos utilizados en los bioensayos de toxicidad se ampliaron a una batería de especies que representan a los diferentes niveles tróficos de un ecosistema acuático (algas, microcrustáceos y peces).

Dentro de los organismos más utilizados se encuentran los que corresponden al género *Daphnia* sp. Estos organismos tienen varios aspectos biológicos interesantes que las hacen ideales para los ensayos, entre ellas se pueden indicar las siguientes: a) su reproducción es partenogenética, con lo que se pueden obtener muchas generaciones que son clónicas entre sí, evitando así las diferencias genéticas, b) corto ciclo de vida (3 o 4 semanas) que permite la realización de ensayos de toxicidad crónicos en un espacio breve de tiempo, c) fácilmente cultivable en condiciones de laboratorio, ya que requiere poco espacio, siendo su mantenimiento más

económico que el de otros animales como los peces ó moluscos (Larraín, 1995). Por otro lado, representan a la comunidad de zooplancton, siendo un elemento importante en las cadenas alimenticias de las aguas dulces.

Existe gran información sobre su biología y ecología en múltiples estudios. Sin embargo, la característica más interesante es su sensibilidad a los tóxicos, ya que es capaz de acusar la presencia de, por ejemplo, 0,005 mg del peligroso mercurio en el agua, y aún menores concentraciones de residuos industriales (Leal *et al.* 1997).

- Detección de disrupción endocrina mediante biosensores. Detectar disrupción endocrina en las aguas residuales domesticas podría ser fundamental para evaluar sus posibles efectos en el ambiente acuático, de manera de prevenir que este tipo de compuestos llegue a afectar a la población. Por lo antes mencionado, el uso de biosensores como células o tejidos, sería altamente beneficioso ya que mediante el uso de éstos, se estaría evitando el sacrificio de organismos al ser utilizados como bioindicadores. Un ejemplo de biosensor, corresponde a levaduras modificadas genéticamente (*Saccharomyces cerevisiae* recombinante) mediante el ensayo YES: (Yeast Estrogen Screen) el cual permite la detección de disrupción endocrina de tipo estrogénica (Routledge y Sumpter, 1996, Chamorro *et al.*, 2010). El uso de una levadura presenta ventajas que facilitan su utilización, tales como: ser un hongo unicelular, poseer células de tipo eucarióticas, presentar ciclos de vida corto, gran capacidad de reproducción y fácil cultivo.

Otras características que avalan la utilización de levadura, es que estas no presentan otro tipo de receptor nuclear homólogo a los de vertebrados que pudiera interferir, además de que el plegamiento y modificaciones post-traduccionales de proteínas de vertebrados en levaduras, es bastante similar a la de mamíferos, lo que resulta bastante relevante ya que determina la especificidad del sistema, la cual se encuentra determinada por los elementos genéticos externos insertados en la levadura (Noguerol y col., 2006).

El bioensayo YES, descrito por Routledge y Sumpter (1996), consiste en la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante a nivel cromosomal con un gen receptor nuclear (hER- α) y con un plásmido que contiene elementos de respuesta estrogénicos (EREs) que controla la expresión del gen reportero (LacZ). Por lo tanto ante la presencia de un agente con potencial biológico en el medio (estrógeno), se activará la transcripción del receptor el cual funcionará como activador transcripcional de LacZ, que codifica para la síntesis de la proteína β -galactosidasa.

Cuya actividad enzimática, puede ser fácilmente detectada y cuantificada mediante el sustrato cromogénico clorofenol rojo-B-D-galactopiranosido (CPRG) el cual cambia de color amarillo a rojo (Figura 3) (Brix *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

El objetivo general del Proyecto es evaluar el comportamiento de operación de humedales artificiales de tipo subsuperficial utilizando *Scirpus sp.* y *Phragmites sp.* para tratar aguas servidas provenientes de núcleos poblacionales rurales de baja densidad poblacional.

Para la ejecución del Proyecto se consideraron los siguientes tres objetivos específicos:

- Evaluar la influencia de la estacionalidad en la eficiencia de operación en humedales construidos de tipo subsuperficial utilizando *Phragmites sp.* y *Schoenoplectus californicus*.
- Estudiar la eficiencia de eliminación de materia orgánica y nutrientes de un sistema de humedales artificiales de tipo subsuperficial bajo diferentes condiciones hidráulicas.
- Evaluar la eficiencia de eliminación del potencial biológico medido como actividad estrogénica contenido en un agua residual urbana a través de una tecnología de humedal construido usando bioensayos con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante y técnicas analíticas.

4. MATERIALES Y METODOLOGIA

4.1. Características de la estación experimental

4.1.1. Ubicación

Para la realización de este Proyecto se implementó una estación experimental, constituida por 4 unidades paralelas de HSS. Está ubicada dentro del terreno de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la comuna

de Hualqui, provincia de Concepción, Región del Biobío (Chile), perteneciente a la Empresa de Servicios Sanitarios del Biobío, ESSBIO S.A. (36°59'26.93" de la latitud sur, y 72°56'47.23" de longitud Oeste). La Figura 1 presenta la localización general de la estación experimental en el perímetro de la PTAS de la comuna de Hualqui (Figura 3).

4.1.2. Obtención del influente

Para la alimentación de la estación experimental se utilizó el agua servida que llega a la PTAS. La Figura 4 muestra el punto de extracción y el flujo de agua en la estación experimental. El agua fue extraída por una bomba para aguas negras modelo Vxm8/35-I (Marca Pedrollo), después del pre-tratamiento (cámara de rejillas y desarenador), y antes de ingresar al tratamiento biológico (Figura 4). El agua servida inicialmente fue llevada a un estanque de almacenamiento de 650 L. Éste a su vez alimenta por presión cada una de las 4 unidades de HSS. Sin embargo, debido a que el pre-tratamiento para el influente de agua servida cruda es solo cribado y desarenado en condiciones deficientes, se produjo el ingreso de grasas y sólidos menores a 40 mm a la zona de entrada de cada unidad de HSS. Como consecuencia, se observó el fenómeno de "clogging", en los primeros 0,20 m. El "clogging" ocurre por la acumulación de sólidos, generando la obstrucción del medio poroso e impidiendo la correcta circulación del agua (Kadlec y Wallace, 2009).

Para mitigar el problema, se implementó un sistema de tratamiento primario previo a la estación experimental. El sistema primario está constituido por: a) un tanque desarenador-desengrasador de 630 L, b) una fosa séptica de 1200 L, y, c) un tanque de 630 L, que actúa como pozo de bombeo. Del pozo de bombeo se entrega agua a un nuevo tanque de distribución de 1000L a las 4 unidades de HSS (Figura 4).



Figura 3. Ubicación de la estación experimental en la PTAS de la comuna de Hualqui (36°59'26.93" latitud sur y 72°56'47.23" de Longitud oeste).

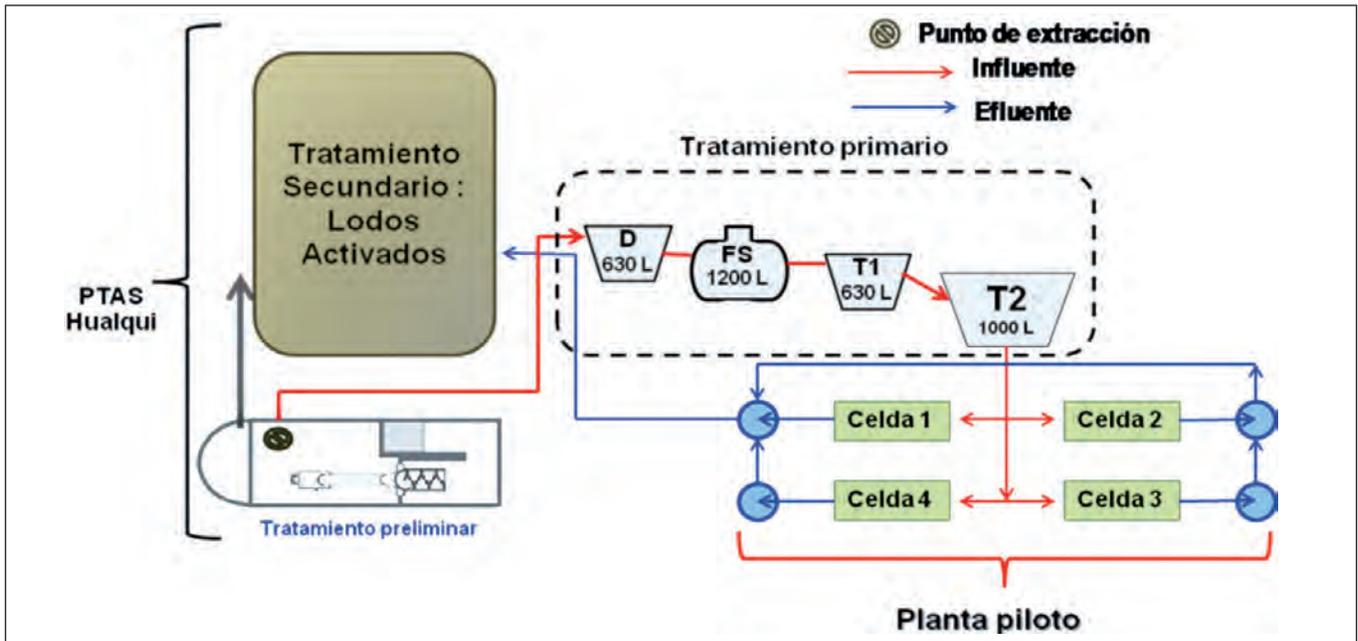


Figura 4. Punto de extracción, recorrido del influente y del efluente.

4.1.3.. Características de las unidades de HSS

El humedal consta de 4 unidades paralelas de HSS, con un área superficial de 4,5 m² cada una, y un volumen útil aproximado de 1,52 m³. Se utilizó como medio de soporte, gravilla de tamaño 3/4" a 1". El tiempo de retención hidráulico (TRH) varió entre 3 y 9 d, siendo función de la cantidad de agua servida aplicada. Cada unidad de HSS

está plantada con un total de 18 ejemplares. Las unidades 1 y 3 fueron plantadas con la especie de macrófita *Phragmites australis*, mientras que, las unidades 2 y 4, fueron plantadas con la especie *Schoenoplectus californicus*. La Figura 5 presenta el desarrollo de la vegetación en las 4 unidades de HSS al finalizar la estación de invierno.

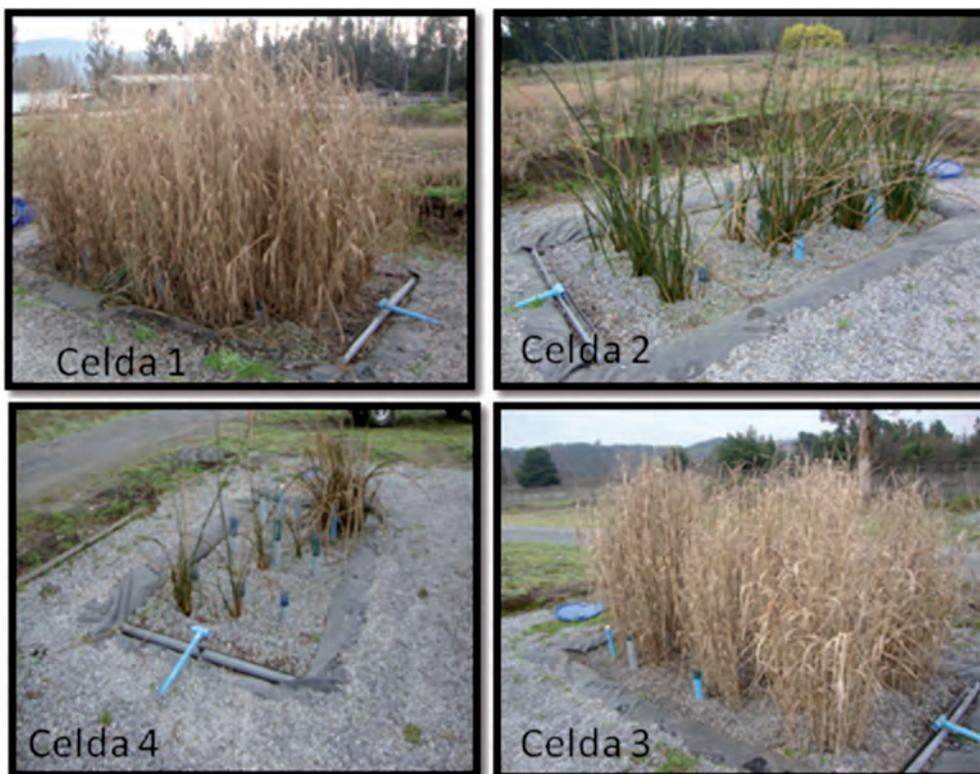


Figura 5. Unidades en la Planta piloto de HFHSS. Celda 1 y 3 *Phragmites australis*; Celda 2 y 4 *Schoenoplectus californicus*.

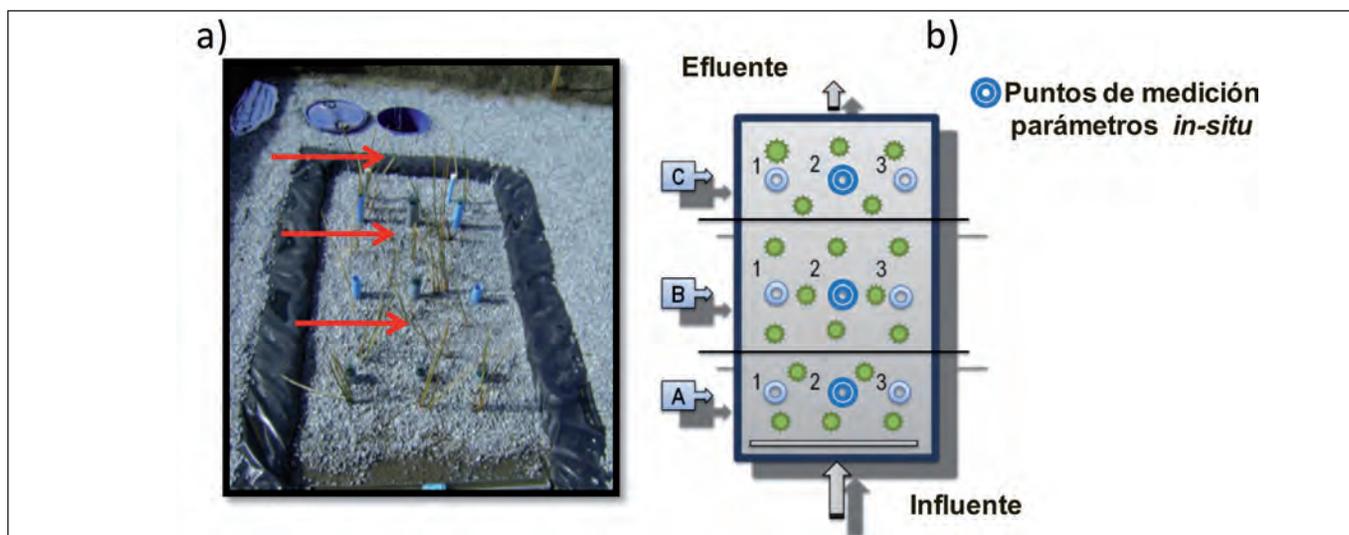


Figura 6. Puntos de muestreo para parámetros in-situ. a) fotografía celda recién plantada. b) Diseño de celda para monitoreo.

4.2. Estrategia de operación y monitoreo

4.2.1. Parámetros hidráulicos

La alimentación de los humedales es de aproximadamente 180 minutos diarios, 2 veces a la semana. En cada uno de estos días se tomaron los datos: a) tiempo de operación, b) aforos volumétricos de caudal, c) altura de la columna de agua en cada unidad, d) altura y tiempo de llenado del estanque distribuidor. Con estos datos, se calcularon los parámetros hidráulicos de operación de: caudal (l/s), carga hidráulica (mm/d) y tiempo de retención hidráulico (d).

4.2.2. Parámetros de campo

Parámetros *in-situ*: Los parámetros tomados in-situ medidos fueron: temperatura (°C), Potencial de Oxido Reducción (POR) (mV), Oxígeno Disuelto (OD) (ppm) y pH. La Figura 6 muestra la forma en que fue dividida cada unidad de HSS, presentado tres divisiones horizontales (A, B y C), junto a la clasificación numérica de los tres puntos de monitoreo por división horizontal.

Los parámetros *in-situ* fueron medidos quincenalmente en los muestreadores A2, B2 y C2, excepto el OD que se monitoreo solo en B2. Para la toma de los parámetros se utilizó un multiparamétrico portátil OAKTON PC650-480485, y un medidor de oxígeno disuelto portátil Hanna oxi 330i/set HI 9146-04.

4.2.3. Determinación de parámetros ex-situ

Se tomaron muestras a la salida de cada una de las unidades de HSS, y de la entrada general, cada 15 d. Las muestras fueron filtradas por membranas Wathman de 0,45 μm de tamaño de poro y luego refrigeradas a 6°C, para su posterior análisis. Los parámetros DQO, SST, SSV, amonio (N-NH_4^+) y fosfato (P-PO_4^{3-}) se midieron cada 15 días, mientras que, la DBO_5 , NT y PT se midieron cada 30 días.

4.3. Determinación de actividad estrogénica

La actividad estrogénica de los efluentes, fue determinada por el ensayo YES (Yeast Estrogen Assay), realizado según la metodología descrita por Routledge *et al.* (1996). Este ensayo permite la identificación de sustancias que son capaces de mimetizar la actividad del estrógeno humano por la interacción con el gen hER, presente en el ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.1. Cepa de levadura recombinante

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, fue modificada genéticamente por el Departamento de Genética da Glaxo, para ser usada como un test en la identificación de sustancias que pueden interactuar con el gen humano (hER). La cepa a utilizar en este ensayo, fue donada por la profesora Marcia Dezotti del departamento de ingeniería química de polución de aguas de la universidad Federal de Río de Janeiro. Esta cepa contiene el gen constitutivamente expresado el (hER), que controla la expresión del gen reportero lac-Z produciendo la enzima β -galactosidasa.

4.3.2. Ensayo de YES assay

Los análisis se realizaron en microplacas de 96 posiciones a 28 ° C y preparadas bajo campana esterilizada de acuerdo a lo descrito por Routledge and Sumpter (1996). Las muestras a analizadas se realizaron en duplicado para los efluentes provenientes de las celdas de los humedales. Se tomó una alícuota de 250 μl de un cultivo de 24 horas de levadura recombinante, la cual contiene aproximadamente 4×10^7 células y se incorporó al reactivo cromogénico (rojo cloro fenol-D-galactopiranosido, CPRG) más medio de cultivo. De esta mezcla se transfirió una alícuota de 200 μl a cada posillo de la microplaca, que contiene filas en duplicado de las muestras a evaluar, además de un control negativo (etanol) y un control posi-

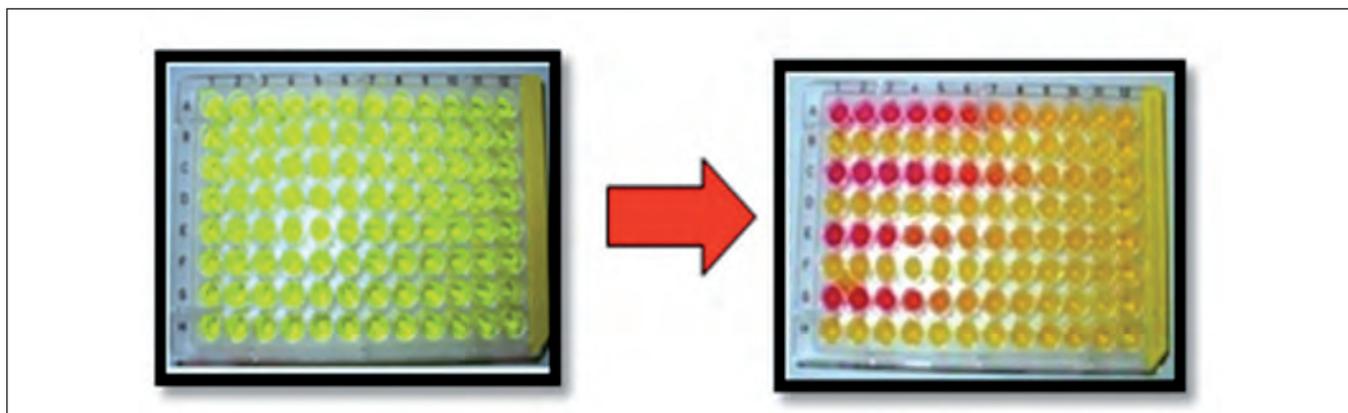


Figura 7. Ejemplo de ensayos positivos de disrupción endocrina.

tivo (compuesto patrón) la cual corresponde a una dilución seriada de 17 α -etil estradiol (99% pureza) en un rango de 54 ng/l a 26 ng/l. Luego de este procedimiento las microplacas fueron selladas, y agitadas por 5 min. Cada placa fue incubada por 72 horas a 30 °C.

La respuesta observada fue el cambio del color amarillo a rojo, el cual fue medido espectrofotométricamente a través de un lector de placas EL x 800, BioTex a 570 nm y a 630 nm, la resta de ambos, determinará la concentración del compuesto. El efluente fue filtrado a través de membranas estériles de 0,2 μ m (Figura 7).

4.4. Bioensayos agudos a través de *Daphnia magna*

4.4.1. Cultivos de *Daphnia magna*

Los organismos que se utilizaron en este trabajo, se obtuvieron desde cultivos del Laboratorio de Bioensayos del Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile (*Daphnia magna*) y del Laboratorio de Ficología (*Selenastrum capricornutum*), ambos de la Universidad de Concepción. Los cultivos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de normativa chilena (NCh2083. Of 1999). Estos organismos fueron mantenidos en envases de 1l, alimentados 3 veces a la semana con una suspensión de levadura, harina de pescado y alfalfa (5,2, 12,6 y 1,0 g/l, respectivamente) con un contenido equivalente de carbono de 7,2 mg C/l (Lunes y Miércoles) y 10,8 mg C/l (Viernes). Además se agregaron microalgas del género *Selenastrum capricornutum* (10^6 células/ml), juntamente con cada alimentación. Los medios de cultivo se mantuvieron a 20 °C, con fotoperiodo de 16 h luz - 8 h oscuridad. Antes de cada alimentación, se cambiaron los medios de cultivo y se removieron los neonatos. La dureza del medio fue controlada en 250 ± 25 mg CaCO_3 /l y el pH varió entre 7,5 y 8,6 (NCh2083, 1999).

Para la preparación del agua de medios de cultivos y de dilución, se utilizó agua para análisis (agua destilada), a la cual se le agregaron 75 ml de sales inorgánicas: NaHCO_3 (2,59 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/l), KCl (0,23 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,76 g/l), que fueron llevadas a un volumen

final de 3 L. El agua de reconstitución fue aireada por lo mínimo 12 horas antes de su uso, presentando un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80 % (EPA, 1993; NCh2083, 1999).

4.4.2. Determinación de toxicidad aguda de los efluentes en *D. magna*

Para el desarrollo de las pruebas de toxicidad aguda con *D. magna*, se emplearon neonatos (< 24 h nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes durante un periodo de 48 h evaluadas en 5 concentraciones (100; 50; 25; 12,5; 6,25 %) además de un control, con 4 réplicas por cada nivel. Las condiciones de los ensayos, así como los criterios de aceptabilidad de los bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* se realizaron de acuerdo a USEPA (1983) y NCh2083 (1999). La muerte se reconoció por la carencia de movilidad. Antes de efectuar las lecturas se agitaban los recipientes en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posaban inmóviles en el fondo. La respuesta evaluada en los organismos fue la concentración del efluente, que produce la muerte al 50 % de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL_{50}), a las 48 horas de exposición con un nivel de confiabilidad del 95%, cada una de las pruebas fueron calculadas a través del análisis Spearman-Kärber Method, version 1.5 (EPA, 1993).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Caracterización del influente

La Tabla 2 muestra la caracterización fisicoquímica del influente para las estaciones de verano, otoño e invierno. Las concentraciones de los parámetros DQO, SST, SST y SSV aumentaron entre un 30-45% en la estación de invierno, respecto a las otras dos estaciones. Por otra parte, PT y P-PO_4^{3-} se mantuvieron estables en las tres estaciones con concentraciones entre 8 -13 mg PO_4^{3-} /l y 13-15 mg PT/l. El influente presenta desviaciones estándar entre 2 y 30% en otoño, de 20 a 50% en verano y de 3% a 70% en in-

vierno (respecto a la media) para todos los parámetros evaluados. Estos datos concuerdan con Vera (2012).

Tabla 2. Caracterización del influente.

Parámetro	Concentración (mg/l)		
	Verano	Otoño	Invierno
DBO ₅	138,00 ± 127,3	138,53 ± 8,3	200,25 ± 61,4
DQO	210,65 ± 66,8	252,16 ± 46,5	419,68 ± 72,6
SST	342,50 ± 194,5	481,47 ± 79,6	587,00 ± 275,4
SSV	62,5 ± 38,9	458,23 ± 59,9	479,58 ± 230,9
NT	89,00 ± 1,4	92,33 ± 24,2	88,00 ± 65,1
N-NH ₄ ⁺	83,33 ± 22,2	120,33 ± 28,9	100,40 ± 39,2
NO ₃ ⁻	ND	ND	ND
PT	13,70 ± 1,9	15,17 ± 1,4	14,20 ± 2,5
PO ₄ ⁻³	8,53 ± 3,3	13,39 ± 0,2	10,06 ± 0,4

NO = No detectado.

5.2. Parámetros *in situ*

La Tabla 3 muestra los parámetros *in-situ* medidos en cada unidad de HSS, para las estaciones de verano, otoño e invierno. El POR para las 4 unidades de HSS fueron inferiores a -170 mV, en las tres estaciones. Siendo la estación de verano, la que presenta las mayores condiciones de anaerobiosis (-234 mV). Estos valores son similares a lo encontrado en HSS, indicando que bajo estas condiciones de oxido-reducción en el humedal se estarían generando ambientes anaeróbicos (García *et al.*, 2004; Faulwetter *et al.*, 2009). El pH no presenta cambios entre las estaciones, con variaciones entre 6,9-7,5, en las 4 unidades. La temperatura presentó un máximo de 22,4°C en verano, y un mínimo en de 9,9°C en invierno. El OD medido en las 4 unidades de HSS, es inferior a 0,6 mg/l. Siendo estos valores concordantes a lo encontrado en HSS en etapa inicial, encontrándose concentraciones de OD entre 0,1 y 0,2 mg/l (García *et al.*, 2004). Por otra parte, Vymazal y Kröpfelová, (2008) indican que HSS con OD menores a 2 mg/l, se consideran como sistemas anaeróbicos.

Tabla 3. Parámetros *in-situ* medidos en cada unidad de HSS por estación.

Parámetro	Estación	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
POR (mV)	V	- 217,2±30,0	- 227,5±34,4	- 242,2±55,6	- 250,3±60,9
	O	- 193,5±9,5	- 183,8±10,6	- 198,2±23,4	- 195,3±22,7
	I	- 190,5±79,5	-187,3±74,9	-171,3±104,4	-184,4±71,4
pH	V	7,0±0,2	7,1±0,2	7,0±0,1	7,1±0,2
	O	6,9±0,2	7,3±0,4	7,3±0,3	7,7±0,3
	I	7,2±0,5	7,5±0,6	7,5±0,5	7,4±0,5
T (°C)	V	21,6±1,8	22,4±1,7	22,2±1,4	22,1±1,2
	O	13,8±3,5	15,6±3,4	14,7±4,0	13,9±4,1
	I	9,9±1,1	10,4±1,2	10,7±1,5	10,5±1,5
OD (mg/l)	V	-	-	-	-
	O	0,3±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,5±0,2
	I	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,0	0,4±0,1

V: Verano. O: Otoño. I: Invierno. POR: Potencial de óxido reducción. T: Temperatura. OD: Oxígeno disuelto.

5.3. Concentraciones de efluentes y eficiencias de eliminación

La Figura 8 muestra las concentraciones obtenidas en cada unidad de HSS, para la DBO₅, DQO, SST, SSV, NH₄⁺ y PO₄⁺. Las concentraciones de DBO₅ obtenidas en las 4 unidades de HSS presentan valor promedio de 46 mg/l, con una eficiencia promedio de eliminación de 65%, sin diferencias por vegetación (Tabla 4). En la Tabla 4, se observa una mayor eficiencia en la eliminación de DBO₅ en otoño con un 75%, con res-

pecto al verano (60%) e invierno (73%). Para el caso de la DQO se obtuvieron concentraciones medias entre 60 y 200 mg/l (Figura 8), con eficiencias sobre 60% en las tres estaciones, sin diferencias por vegetación (Tabla 4).

Por otro lado, se encontraron concentraciones medias de SST entre 3-46 mg/l y SSV entre 3-27 mg/l (Figura 8), con eficiencias de eliminación de 88% SST y 85% SSV, observándose mayores eficiencias en invierno para los SST (98%) y SSV (97%) (Tabla 4). Éstas eficiencias

de eliminación son comparables a valores esperados >75% (Vymazal, 2005, Vera, 2012).

Respecto al $N-NH_4^+$ para la unidad 1 y 3, las eficiencias de eliminación fueron en promedio 25%, disminuyendo de 40% (verano) a un 20% (otoño) y un 13% en invierno. Respecto a las unidades 2 y 4, las eliminaciones fueron en promedio de 20,6%, disminuyendo de 30%

(verano) a 5% (otoño) y luego aumentando la eficiencia a 28% en invierno, con concentraciones inferiores a 80 mg/l. Cabe destacar, que el aumento en la eficiencia en la eliminación en invierno puede estar condicionado por las precipitaciones. Estas eliminaciones de $N-NH_4^+$ son similares a los valores propuestos por Vera *et al.* (2011) y Rojas (2012), y están dentro valor esperado para siste-

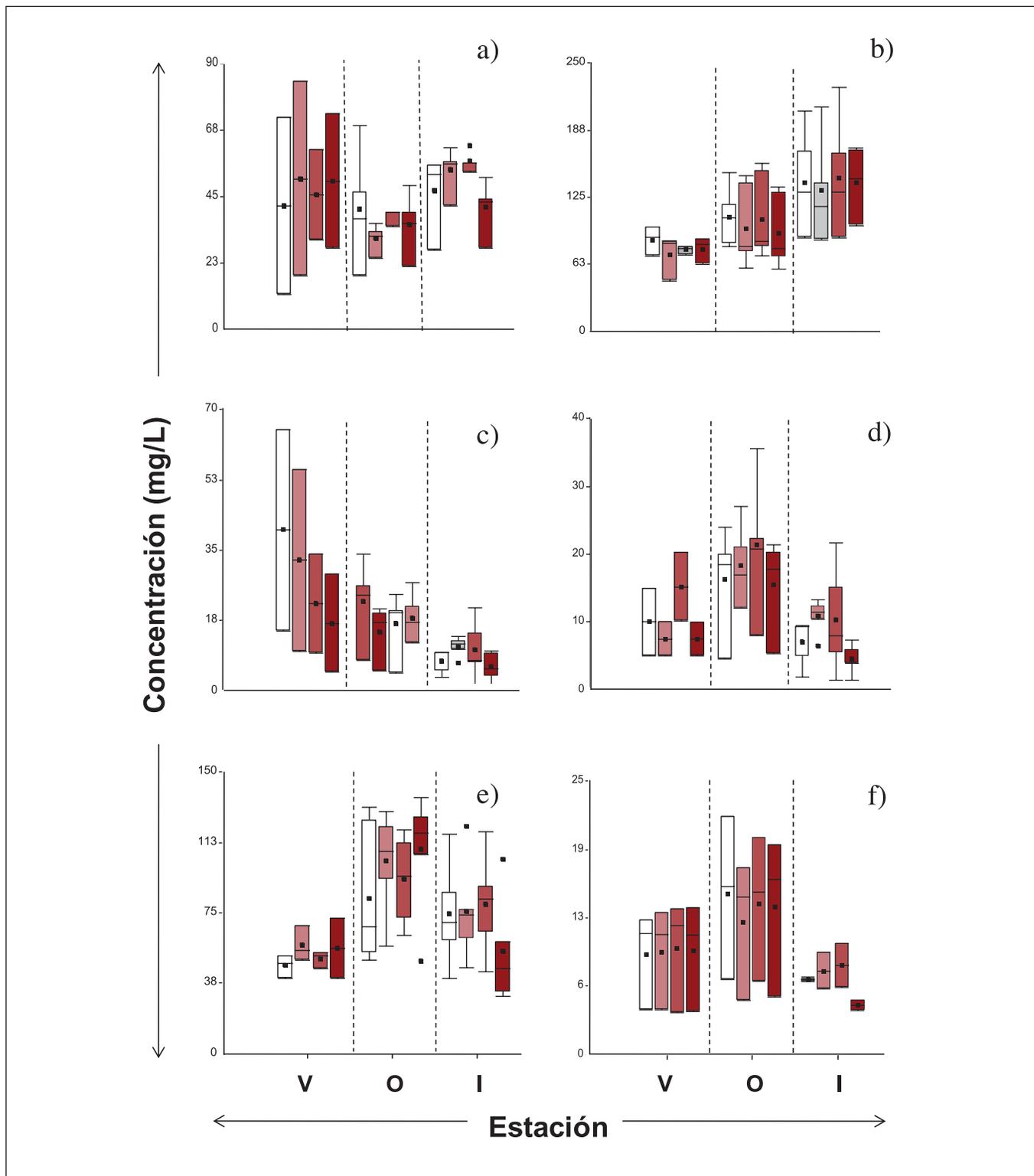


Figura 8. Concentración de los efluentes de cada HSS. a) DBO_5 , b) DQO, c) SST, d) SSV, e) $N-NH_4^+$, f) $P-PO_4^{-3}$ (□) HSS-1 y (■) HSS-2; (■) HSS-3 y (■) HSS-4. V: Verano. O: Otoño. I: Invierno.

mas HSS entre 30 y 60% (Plaza de los Reyes *et al.*, 2011).

Por otra parte, el P-PO₄⁻³ (representa más del 60% del PT en el agua servida (Henze *et al.*, 2002), presentó concentraciones mayores a 3,7 mg/l llegando incluso a 22 mg/l (Figura 8). Las eficiencias de eliminación en prome-

dio fueron bajas (<5%), encontrándose en algunas unidades de HSS mayores concentraciones de P-PO₄⁻³ en la salida. Estos resultados son similares a los encontrados por García *et al.* (2005), quienes habían reportado eliminaciones inferiores a 15%, y que son atribuibles principalmente a la absorción por las plantas.

Tabla 4. Eficiencias de eliminación para cada unidad de HSS por estación.

Parámetro	Estación	Eficiencia (%)			
		HSS-1	HSS-2	HSS-3	HSS-4
DBO5	V	71,7 ± 4,7	62,8 ± 0,5	55,6 ± 25,6	56,1 ± 17,4
	O	72,6 ± 19,9	80,2 ± 6,6	71,4 ± 13,6	77,1 ± 11,6
	I	74,7 ± 11,4	70,8 ± 11,4	69,8 ± 10,1	78,1 ± 8,7
DQO	V	57,7 ± 8,9	65,8 ± 2,3	61,4 ± 12,3	62,1 ± 7,9
	O	58,4 ± 10,2	62,9 ± 14,1	59,6 ± 14,7	64,6 ± 12,8
	I	67,4 ± 10,9	68,9 ± 10,6	66,3 ± 12,5	67,1 ± 5,5
SST	V	82,5 ± 20,2	85,5 ± 17,5	90,4 ± 10,6	92,2 ± 9,6
	O	97,1 ± 2,2	96,9 ± 1,7	96,3 ± 2,6	97,5 ± 1,6
	I	98,4 ± 1,0	97,6 ± 1,2	97,4 ± 2,0	98,6 ± 1,2
SSV	V	84,5 ± 1,7	87,3 ± 2,2	65,9 ± 32,5	82,9 ± 16,3
	O	96,9 ± 1,8	96,6 ± 1,3	96,3 ± 1,5	97,2 ± 1,4
	I	97,9 ± 1,5	96,7 ± 1,8	96,6 ± 2,7	98,7 ± 0,8
N-NH ₄ ⁺	V	41,7 ± 15,5	28,9 ± 14,0	36,5 ± 19,6	31,3 ± 19,5
	O	27,3 ± 31,2	6,3 ± 31,1	17,1 ± 23,2	–
	I	17,9 ± 38,8	15,4 ± 38,7	8,8 ± 46,2	41,5 ± 29,7
NT	V	41,5 ± 4,1	34,0 ± 6,5	49,8 ± 14,7	34,9 ± 11,7
	O	39,3 ± 33,4	27,3 ± 35,3	29,4 ± 29,8	19,4 ± 45,6
	I	31,6 ± 48,1	19,7 ± 68,2	17,7 ± 72,1	69,3 ± 13,8
PT	V	8,7 ± 0,1	1,4 ± 11,2	1,0 ± 1,4	4,5 ± 25,7
	O	-14,3 ± 42,6	1,6 ± 31,3	-13,3 ± 38,6	–
	I	36,9 ± 0,9	28,1 ± 23,8	21,9 ± 30,9	59,2 ± 7,3

5.4. Evaluación de la toxicidad biológica del efluente por actividad endocrina y *Daphnia magna*

Las muestras analizadas correspondieron a los efluentes provenientes de cada unidad de HSS. Los resultados de toxicidad, análisis de compatibilidad previo a los ensayos YES, arrojaron como resultado que existe toxicidad que esta relacionada con las características físico-químicas de los efluentes tratados. Debido a los resultados de eliminación en nutrientes que tuvieron las unidades HSS (Tabla 4), se pudo concluir que N-NH₄⁺ es uno de los compuestos que presenta inactivación de la producción de -galactosidasa y debido a esto el ensayo YES no sería una herramienta válida para la determinación de disrupción endocrina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Santos *et al.* (2012).

Por otra parte, utilizando *Daphnia magna* se evaluó la toxicidad aguda de los efluentes provenientes del pretratamiento, tratamiento primario y de las 4 celdas de los HSS bajo 5 concentraciones distintas (100, 50, 25, 12,5 y 6,25%), con el fin determinar la concentración letal que produce la muerte al 50% de la comunidad de Daphnideos (CL₅₀), evaluado a 24 y 48 horas de exposición. La Tabla 5 muestra que los efluentes provenientes del pretratamiento y del tratamiento primario presentan un CL₅₀ de 70,71%, en ambos casos. Sin embargo los efluentes tratados provenientes de las 4 celdas de HSS, no registraron toxicidad aguda (CL₅₀) a las 24 y 48 horas de exposición (López *et al.*, 2011).

Tabla 5. Toxicidad aguda (CL_{50}) en *Daphnia magna* (intervalo de Confianza 95%).

Parámetro	Toxicidad Aguda en <i>Daphnia Magna</i> (CL_{50})	
	24 h	48 h
Pretratamiento	70,71	70,71
Tratamiento Primario	70,71	70,71
Unidad 1 HSS	ND	ND
Unidad 2 HSS	ND	ND
Unidad 3 HSS	ND	ND
Unidad 4 HSS	ND	ND

NO = No detectado.

La eliminación de la toxicidad agua presente en el efluente, se puede deber principalmente a la capacidad que presentan los humedales de eliminar materia orgánica y sólidos suspendidos. Debido a esto, es que los efluentes provenientes del pretratamiento y tratamiento primario (que contienen materia orgánica y sólidos suspendidos), que contienen concentraciones mayor 200 mg/l de materia orgánica y sólidos suspendidos, generan una disminución del oxígeno disuelto (<1 mg/l) en los ensayos y pueden afectar directamente la sobrevivencia de estos organismos. *Daphnia magna* bajo condiciones limitadas de oxígeno (hipoxia) se ven afectadas en sus procesos fisiológicos, especialmente en su sistema circulatorio (Paul *et al.*, 1997) y la tasa metabólica (Wiggins y Frappell, 2000).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, H., Siegrist, H., Halling, B., Ternes, T. (2003) Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Environmental Science and Technology* 37, 4021-4026.
- Arias, C., Brix, H. and Johansen, N. (2003) Phosphorus removal from municipal wastewater in an experimental two-stage vertical flow constructed wetland system equipped with a calcite filter. *Water Science and Technology* 48(5), 51–58.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R., Adams, C., Surampalli, R. (2006) Endocrine disrupting compounds removal wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry* 41, 525-539.
- Ávila, C., Pedescoll, A., Matamoros, V., Bayona, J., García, J. (2010) Capacity of a horizontal subsurface flow constructed wetland system for the removal of emerging pollutants: An injection experiment. *Chemosphere* 81, 1137-1142.
- Ávila, C., Reyes, C., Bayona, J., García, J. (2012) Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influence of redox. *Water Research* (In Press).
- Belmont, M., Metcalfe, C. (2003) Feasibility of using ornamental plants (*Zantedeschia aethiopica*) in subsurface flow treatment wetlands to remove nitrogen, chemical oxygen demand and nonylphenol ethoxylate surfactants - a laboratory-scale study. *Ecological Engineering* 21(4-5), 233-247.
- Belmont, M., Ikononou, M., Metcalfe, C. (2006). Presence of nonylphenol ethoxylate surfactants in a watershed in central Mexico and removal from domestic sewage in a treatment wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 29–35.
- Brix, R., Noguero, T., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A., Tollefsen, K., Levy, W., Schramm K. y Barceló, D. (2010) Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International* 36, 361–367.
- Brix, H. (1994) Use of constructed wetlands in water pollution control: historical development, present status, and future perspectives. *Water Science and Technology* 30(8), 209-223.
- Campbell, C., Borglin, S., Green, F., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W. (2006) Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 65, 1265-1280.
- Chamorro, S., Xavier, C., Gajardo, M. y Vidal, G. (2007) Toxicidad aguda de precursores de compuestos con actividad hormonal tratados mediante sistemas biológicos. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 93, 80-83.
- Chamorro, S., Monsalvez, E., Hernández, V., Becerra, J., Mondaca, M.A., Piña, B. and Vidal, G. (2010) Detection of Estrogenic Activity from Kraft Mill Effluents by Yeast Estrogen Screen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84,165-169.
- Chamorro, S., Hernandez, V., Matamoros V., Dominguez, C., Becerra, J., Vidal, G., Piña, B., Bayona, J.M. (2013) Chemical characterization of organic microcontaminant sources and biological effects in riverine sediments impacted by urban sewage and pulp mill discharges. *Chemosphere* (In press).

6. CONCLUSIONES

- Todos los HSS evaluados en su puesta en marcha, presenta eliminaciones entre 50-98% para materia orgánica y sólidos, con mayores eficiencias a lo largo del año, debido probablemente a la aclimatación de la biomasa bacteriana.
- Respecto a los nutrientes, todos los HSS presentan eliminaciones inferiores al 40% en el caso de $N-NH_4^+$ y eficiencias de hasta 60% para el PT. Sin embargo la alta eficiencia observada en invierno puede estar potenciada por el efecto de las precipitaciones, generando una sobreestimación de la eficiencia en la eliminación de fósforo. Debido a esta sobreestimación, se propone como medida correctiva, la implementación de una estación meteorológica en la estación de los humedales.
- Los efluentes tratados mediante HSS no presentaron toxicidad aguda evaluada a través de *Daphnia magna*. Sin embargo, no fue posible evaluar actividad endocrina debido a la interferencia que pudo haber con compuestos que fueron tóxico para la activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.
- Finalmente, los humedales como sistemas de tratamiento de aguas servidas para zonas rurales, son una opción factible, más aún son estables por su capacidad de amortiguar los efectos negativos generados por los sismos.

- Cooper, P. (2009). What can we learn from old wetlands? Lessons that have been learned and some that may have been forgotten over the past 20 years *Desalination* 246,11-26.
- Desbrow, E., Routledge, E., Brighty, G., Sumpter, J., Waldock, M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science and Technology* 32, 1549-1558.
- Dodds E, Lawson W. (1936) Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*: 12, 137- 996.
- U.S.EPA. (Environmental Protection Agency) (1983). *Water quality criteria, 1972*. National Academy of Sciences, U.S. E.P.A. Research series. (Washington, D.C., U.S.A.). pp 1-6.
- Fairchild, J., Little, E., Huckins, J. (1992) Aquatic hazards assessment of the organophosphorus insecticide fonofos. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 22, 375-379.
- Faulwetter, J., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M., Brisson, J., Camper, A., Stein, O. (2009) "Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review". *Ecological engineering* 35 (6), 987-1004.
- García J. Mujeriego R., Obis J., Bou, J. (2001) Wastewater treatment for small communities in Catalonia (Mediterranean region). *Water Policy* 3, 341-350.
- García, J., Aguirre, P., Barragan, J., Mujeriego, R., Matamoros, V., Bayona, J. (2005) Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecological engineering* 25 (4), 405-418.
- García, J., Aguirre, P., Mujeriego, R., Huang, Y., Ortiz, L., Bayona, J. (2004) Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Water Research* 38 (7), 1669-1678.
- García, J. y Corzo, A. (2008) Depuración con humedales construidos: guía práctica de diseño, construcción y explotación de sistemas de humedales de flujo subsuperficial. 108 pp.
- Gray, J., Sedlak, D. (2005). The Fate of Estrogenic Hormones in an Engineered Treatment Wetland with Dense Macrophytes. *Water Environment Research* (77), 24-31.
- Gillesby, B., Zacharewski, T. (1998) Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 3-14.
- Henze, M., Harremoës, P., LaCour Jansen, J., Arvin, E. (2002) *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. 3rd Ed. Springer. Heidelberg, Germany. 430 pp.
- Hewitt L., Kovacs T., Dubé M., MacLatchy D., Martel P., McMaster M., Paice M., Parrott J., van Den Heuvel M., Van Der Kraak G. (2008) Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 682-697.
- Hijosa-Valero, M., Sidrach-Carmona, R., Martín-Villacorta, J., Valsero-Blanco, M., Bayona, J., Bécares, E. (2011a) Statistical modelling of organic matter and emerging pollutants removal in constructed wetlands. *Bioresource Technology* 102, 4981-4988.
- Hijosa-Valero, M., Matamoros, V., Sidrach-Carmona, R., Pedescoll, A., Martín-Villacorta, J., García, J., Bayona, J., Bécares, E. (2011b) Influence of design, physico-chemical and environmental parameters on pharmaceuticals and fragrances removal by constructed wetlands. *Water Science and Technology* 63, 2527-2534.
- Kadlec, R., Wallace, S. (2009) "Treatment Wetlands". 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 1016.
- Larrain, A. (1995) Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Ciencia y Tecnología Marina. Conama* (Nº Especial), 39-47.
- Larsson, D., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M., Förlin, L. (2002) Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicology Environmental Safety* 52, 13-20.
- Leal, H. E., Rocha, H. A. and Lema, J. M. (1997) Acute toxicity of hardboard mill effluents to different bioindicators. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 39- 42.
- López, D. Chamorro, S. Silva, J. Bay-Schimth, E. and Vidal, G. (2011) Chronic Toxicity of Pulp Mill Effluents and Phytosterols on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87, 633-637.
- Martí E. (2003) The Recycling Effect in the Nitrification-Denitrification Process in Vertical Flow Constructed Wetlands. ETSECCPB dissertation, Technical University of Catalonia, 120 pp.
- Metcalf y Eddy (1995) Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Editorial McGraw-Hill, Madrid. 1485 pp.
- Noguerol, T., Boronat, S., Casado, M., Raldúa, D., Barceló, D. y Piña, B. (2006) Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 1012-1019.
- Norma Chilena Oficial, NCh 2083 (1999). Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladóceras). INN-Chile.
- Paul, R., Colmorgen, M., Hüller, S., Tyroller, F., Zinkler D. (1997) Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *Journal of Comparative Physiology B* 167, 399-408.
- Plaza de los Reyes, C., Vera, I., Salvato, M., Borin, M., Vidal, G. (2011) Consideraciones para la eliminación de nitrógeno en humedales artificiales. *Tecnología del Agua* 31, 40-49.
- Rojas K. (2012) Puesta en marcha de un sistema piloto de humedales construidos de flujo subsuperficial para la depuración de aguas servidas rurales: Consideración de indicadores de sustentabilidad. Tesis para optar al grado Ingeniero ambiental. Universidad de Concepción, Chile. 11 pp.
- Routledge, J. y Sumpter, J. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 241-248.
- Santos J, Sousa MJ, Leão C (2012) Ammonium Is Toxic for Aging Yeast Cells, Inducing Death and Shortening of the Chronological Lifespan.
- Santos J, Sousa MJ, Leão C (2012) Ammonium Is Toxic for Aging Yeast Cells, Inducing Death and Shortening of the Chronological Lifespan. *PLoS ONE* 7(5): e37090.
- Servos, M., Bennie, D., Burnison, B., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S., Ternes, T. 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 336, 155-170.
- Tamagawa Y., Hirai H., Kawai S., Nishida T. (2005) Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 244, 93-98.
- Vera, I., García, J., Sáez, K., Moragas, L., Vidal, G. (2011) Performance evaluation of eight years experience of constructed wetland systems in Catalonia as alternative treatment for small communities. *Ecological engineering* 37 (2), 364-371.
- Vera, I. (2012) Análisis de funcionamiento y patrones asociativos de sistemas de tratamiento convencionales y naturales de aguas servidas para la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Tesis de

- doctorado en Ciencias Ambientales. Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile, Universidad de Concepción, 229 p.
- Vymazal J. y Masa, M. (2003) Horizontal sub-surface flow constructed wetland with pulsing water level. *Water Science and Technology* 48(5), 143-148.
 - Vymazal, J. (2005) Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological engineering* 25 (5), 478-490.
 - Vymazal, J., Kröpfelová. L. (2008) *Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow*. B. Alloway, J. Trevors (editors). Springer. Dordrecht, Netherlands. 566 pp.
 - Water Environment Federation (WEF) (2010) *Natural Systems for Wastewater Treatment*. 3rd Ed. MOP FD-16. Alexandria. Virginia. 506 pp.
 - Wiggins and Frappell, 2000 P.R. Wiggins, P.B. Frappell The influence of haemoglobin on behavioural thermoregulation and oxygen consumption in *Daphnia carinata* *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 153-160.
 - Zuñiga, J., Chamy, R., Schiapacasse, M., Cerda, M., Fuentes, J. (2003) "Tratamiento de aguas residuales urbanas mediante humedales". En: *Memorias XV Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS – Chile*. 2003 pp. 1-5.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.

8. ANEXO. INSTALACIONES DE PLANTA DE TRATAMIENTO



Desgrasador



Desgrasador y fosa séptica.



Línea tratamiento primario completa.



Vista Celda 2 *Schoenoplectus californicus*.



Celda 3 *Phragmites australis*.



Vista general planta.