

Artículo original de investigación

Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica

Clemencia León Bogarín* y David Chaves Artavia

Laboratorio Biotecnología de Microalgas (LABMA),
Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

* Autor de correspondencia: clemleon@gmail.com

Resumen

Se desarrolló una alternativa para mejorar la calidad y dispersión del efluente vacuno sin diluir, tratándolo en dos lagunas de estabilización (5x10x1 m) con flujo semi-continuo, una con microalgas inmovilizadas, otra con *Lemna aequinoctiales* y utilizando un humedal subsuperficial (10x1.5x0.65 m) con flujo horizontal, sembrado con plantas de altura. La productividad promedio en peso húmedo de las microalgas utilizadas durante la estación seca fue para *Chlorella emersoni* ($107 \pm 9.59 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), *Fischerella muscicola* ($113 \pm 10.87 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), *Lyngbya hieronymusii* ($115.14 \pm 11.11 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), y para *L. aequinoctiales* fue $109.7 \pm 39.84 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. El tiempo de retención hidráulica (TRH) fue 7.056, 7.903 y 5.60 días para cada laguna y el humedal respectivamente. Luego de 35 días de retención, las microalgas removieron DBO₅ (91.4%), N-NO₃ (98.8%), P-PO₄ (92.7%), sólidos suspendidos totales (SST) (77%) pero aumentó el nitrógeno amoniacal (N-NH₄) en un 248%, debido a la desnitrificación como el principal mecanismo de remoción. En el humedal se obtuvo DBO₅ (61.8%), N-NO₃ (93%), P-PO₄ (91.44%), TSS (84.12%) pero aumentó N-NH₄ (142%). En la laguna inoculada con *Lemna*, DBO₅ (99.2%), N-NO₃ disminuyó en 94.9%, N-NH₄ (96.4%), P-PO₄ (97.3%), SST (95%), pero persistió el olor a estiércol y los coliformes ($\geq 1.6 \times 10^4$). En la laguna con microalgas no se apreció olor a estiércol, y los coliformes disminuyeron hasta 99%, desapareciendo al final de la investigación. Las plantas que se adaptaron al humedal fueron *Ludwigia inucta*, *Zantedechia aetiopica*, *Hedychium coronarium* y *Canna generalis* y el TRH fue de 5.8. Este estudio determinó que tanto las microalgas como *Lemna* y el humedal son muy eficientes para reducir considerablemente la carga del residual vacuno y satisfacen los estándares recomendados para aguas residuales.

Palabras clave: Microalgas, cianobacterias, humedal subsuperficial, *Lemna aequinoctiales*, estiércol vacuno, plantas acuáticas

Abstract

An alternative to improve the quality and land spreading of dairy raw manure effluents has been developed using a microalgal-based and a duckweed (*Lemna aequinoctiales*)-based, semi-continuous stabilization ponds (5x10x1m), and a sub-surface horizontal flow constructed wetland (10x1.5x0.65m) with altitude plants. The dry season average productivity (wet weight) of the immobilized microalgae utilized was for *Chlorella emersoni* ($107 \pm 9.59 \text{ gm}^{-2} \text{ d}^{-1}$), *Fischerella*

muscicola ($113 \pm 10.87 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$) and *Lyngbya hieronymusii* ($115.14 \pm 11.11 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$), while for *L. aequinoctiales* was $109.7 \pm 39.84 \text{ gm}^{-2}\text{d}^{-1}$. The hydraulic retention times (HRT) were 7.056, 7.903 and 5.80 days for each pond and wetland respectively. Removal efficiencies were analyzed in samples from the influent and effluent waters of the system and after 35 days retention time in the algae pond were: BOD₅ (91.4%), NO₃-N (98.8%), PO₄-P (92.7%), TSS (77%), increasing NH₄-N (248%) due to denitrification as the main nitrogen removal mechanism. In *Lemna* pond were BOD₅ (99.2%), NO₃-N (94.9%), PO₄-P (97.3%), TSS (95%) and NH₄-N (96.4%). In the wetland were for BOD₅ (61.8%), NO₃-N (93%), PO₄-P (91.44%), TSS (84.12%) but increased NH₄-N (142%). The manure odor and coliform bacteria ($\geq 1.6 \times 10^4$) remained in the *Lemna* pond and wetland, but were reduced to 99% in the microalgae pond being absent at the end of the experiment. The plants utilized were *Ludwigia inueta*, *Zantedechia aetiopica*, *Hedychium coronarium* y *Canna generalis*. These results demonstrate that microalgae, *Lemna* or wetlands are quite successful in removing nutrients from manure wastewater and satisfy the recommended standards for waste waters.

Keywords: *Microalgae, cyanobacteria, subs-surface wetland, Lemna aequinoctiales, cow manure, aquatic plants.*

1. Introducción

En Costa Rica son escasos los residuales vacunos que reciben un tratamiento adecuado. Sin embargo, algunas lecherías utilizan lagunas de oxidación poco profundas o lagunas de estabilización, pero en la mayoría de los casos, el residual se diluye y es utilizado para irrigación de los pastizales o bien se vierte crudo directamente en los ríos. El uso de lagunas de oxidación para tratar estos efluentes, ha reducido la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y los sólidos totales suspendidos (TSS) en el punto de descarga. Sin embargo la calidad de estos parámetros es extremadamente variable, tanto entre los diferentes sistemas de tratamiento como su variación a través del tiempo (Hickey *et al.*, 1989).

Una elevada concentración de nutrientes, coliformes fecales y sólidos presentes en estos residuales contribuyen eventualmente a la eutrofización de cuerpos de agua y a la proliferación de microalgas y plantas perjudiciales al ambiente, las cuales, en altas concentraciones, pueden llevar a sofocar las cuencas y causar condiciones anaerobias (Quinn y Hickey 1993). También las altas

concentraciones de nitrógeno en la forma de NH₃ libre son tóxicas para peces y otras formas de vida acuática, así como los coliformes fecales son indicadores de un riesgo potencial de patógenos para el ganado y la gente que entra en contacto con estas aguas, además de causar gases de efecto invernadero (Craggs *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2009). La reciente concientización de la contaminación ambiental producida por los efluentes con residual vacuno, así como la necesidad de mejorar las condiciones generales de las lecherías en Costa Rica, han abierto la posibilidad de mejorar su calidad utilizando otras opciones que se practican en otros países. Algunas de estas son el uso de lagunas con microalgas o con plantas acuáticas como la lenteja de agua *Lemna* sp., y los humedales artificiales. Las microalgas presentes en estas aguas, al producir oxígeno mediante la fotosíntesis, son capaces de mantener la oxidación bacteriana de los productos contaminantes, asegurando su degradación microbiana aeróbica, un proceso complejo conocido como “auto purificación” (Oswald 1988, Soeder 2004). Es por esta razón que la aplicación de las microalgas es a la vez atractiva para el

tratamiento de aguas contaminadas debido a que tienen simples requerimientos nutricionales como energía solar, dióxido de carbono y su cultivo no requiere de sustratos de alto costo.

Las microalgas se han utilizado en diferentes países desde 1963, principalmente para el tratamiento de aguas municipales, en canales someros de menos de 50 cm de profundidad, en forma de meandros y mezclados mecánicamente (Shelef 1979). Actualmente las microalgas se están empleando en tratamientos terciarios para descontaminar aquellas aguas que contienen metales pesados o con alto contenido de nutrientes y compuestos xenobióticos y también para secuestrar CO₂. Esto debido a que algunas especies han desarrollado altas capacidades para bioacumular metales así como tener una alta biosorción y transformar y degradar xenobióticos (Cañizares *et al.*, 1993; Travieso *et al.*, 1994; Becker, 1994; Zümriye, 1997; Olgún, 2003).

Recientemente se está utilizando también la planta acuática *Lemna sp.*, para descontaminar aguas. Esta es conocida como “lenteja de agua” y está descrita como una pequeña planta flotante que pertenece a la familia de las Lemnaceas. A este género se han reportado 13 especies, las comunes son: *aequinoctiales*, *gibba*, *minor*, *minuta*, *obscura*, *perpusilla*, *trifulca*, *turionifera* y *valdiviana*. Se distribuye en un amplio rango de condiciones climáticas y es una de las plantas de más rápido crecimiento. Su tasa reproductiva se ha calculado entre 0.1 a 0.5 g día⁻¹ y puede tolerar grandes cambios de temperatura, pH y concentración de nutrientes, siendo resistente a pestes, enfermedades y condiciones extremas de desecación (Landolt, 1987). Tiene además la habilidad de crecer rápidamente en aguas contaminadas removiendo minerales y nutrientes orgánicos necesarios para su crecimiento. Investigaciones realizadas por Smith y Moelyowati (2001) han indicado

que está especialmente adaptada para remover fosfatos y nitrógeno, particularmente amonio. *Lemna* toma estos directamente por sus raíces y frondas y además indirectamente a través de su superficie que sirve como sustrato para algas y bacterias que crecen formando una biopelícula, donde se llevan a cabo la nitrificación y desnitrificación.

Dentro del contexto del tratamiento de aguas contaminadas, los estanques con *Lemna* pueden calificarse como secundarios o terciarios lo que significa que el pretratamiento por sedimentación siempre se recomienda para remover sólidos suspendidos hasta un 65-70% y gran parte de la materia orgánica (30-45% de DBO₅). La mayoría de estos pretratamientos se practican en reactores anaerobios de alto rendimiento cuyas tasas de remoción pueden llegar hasta 75% y 80% para los sólidos suspendidos y DBO₅ respectivamente (Arceivala, 1998; Gijzen y Veenstra, 2000).

El tratamiento de efluentes con lentejas de agua cumple con los estándares deseados. Se ha reportado que *Lemna gibba* puede remover N con eficiencia de 34 a 99% y P de 14 a un 99%. Además, esta planta acuática puede ser una buena fuente de proteínas y almidones y puede utilizarse eventualmente para obtener productos de valor agregado como alimento para animales de granja y producir etanol. (Sutton y Ornes, 1975; Oron *et al.*, 1986; Zirschky, J., y Reed, 1988; Hammouda *et al.*, 1995; Vatta *et al.*, 1995; Alaerts *et al.*, 1996; Körner y Vermaat, 1998; Vermaat y Hanif, 1998; Körner *et al.*, 2003, Chen y Stomp, 2009).

Los humedales artificiales son otra opción para depurar aguas, y colocados después de las lagunas de oxidación, han mejorado considerablemente la calidad del efluente, pero su acción tiende a disminuir con el tiempo (Tanner y Sukias 2003). El agua que ingresa a un humedal artificial (afluente) puede provenir de un tratamiento previo,

mientras el agua efluente puede ser recirculada o pasar posteriormente a un sistema convencional. Así se forman los sistemas mixtos, en serie o en batería, lo que confiere al conjunto un máximo rendimiento.

Para la depuración de aguas se han utilizado dos tipos específicos de humedales artificiales que se diferencian entre sí por el sistema de circulación del agua. Estos son los humedales de flujo libre superficial, donde el agua circula sobre el lecho en el que se siembran las plantas y los humedales de flujo subsuperficial, en los que el agua fluye oculta a través del sustrato (Seoáñez y Gutiérrez 1999).

Las tasas de nitrificación en las lagunas facultativas también han mejorado últimamente mediante la adición de aireación mecánica y agregando biopelículas en el fondo de las lagunas; sin embargo estos tratamientos sólo remueven el nitrógeno amoniacal y no toman en cuenta otros problemas del efluente. El sistema que ha demostrado reducir la carga orgánica considerablemente, ha sido el llamado "sistema avanzado de lagunas" que consiste en una laguna anaerobia seguida por otra con alta tasa de oxidación, un par de lagunas para sedimentar las algas y una laguna de maduración. (Craggs *et al.*, 2004, Sukias *et al.*, 2003).

Mediante la presente investigación pretendemos reducir la contaminación del efluente vacuno y evitar su distribución a campo abierto, para lo que utilizaremos tres metodologías de fácil manejo y bajo costo, las cuales podrían utilizarse conjuntamente o en forma separada. Se comparará el efecto de las microalgas y la lenteja de agua para reducir la contaminación del efluente vacuno en dos lagunas de estabilización con el efluente vacuno sin diluir y se utilizará además un humedal de flujo subsuperficial con plantas de altura. La investigación en el campo se realizó durante tres años y abarcó tanto la época lluviosa como la seca, con

datos de las lagunas antes y después de haber construido el humedal.

2. Materiales y Métodos

La investigación se realizó durante el primer año en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas (LABMA) de la Universidad Nacional y la de campo en la finca lechera "Dos Portones", ubicada en Concepción de San Rafael, en la Provincia de Heredia, Costa Rica, durante un período de dos años. Es una zona fría con ocho meses lluviosos al año cuyas coordenadas son 10° 2' 46" Norte y 84° 4' 17" Oeste y con una altitud aproximada de 1.700 m.s.n.m.

El efluente vacuno es el resultado del manejo del estiércol de 30 vacas que lo producen durante su permanencia en el corral (3pm-5am). El efluente se compone de materia fecal (48%), orina (27%) y agua (25%). Contiene grandes cantidades de nitrógeno (3- 4%), fósforo (1-2%), potasio (1,5-3%), calcio (0,6%) y patógenos que pueden producir enfermedades en las personas o constituir un peligro potencial de contaminación al suelo (Dyer y O'Mary, 1975; Fernández *et al.*, 2002).

Se cultivaron las microalgas y la lenteja de agua físicamente separadas en las dos lagunas de oxidación, pero compartiendo el mismo residual vacuno sin diluir, el cual se distribuyó desde un reservorio común de 3m³ donde se homogenizaron las aguas, a través de una tubería de cuatro pulgadas de diámetro que recorrió 200 metros de distancia hasta las dos lagunas, las cuales se alimentaron en paralelo, cada día a la misma hora, con 250 litros de efluente vacuno fresco sin diluir.

2.1 Cultivo de microalgas

De varias especies de microalgas colectadas, aisladas y cultivadas, obtenidas de focos de contaminación del río Tibás (Heredia), que acarrea aguas procedentes de lecherías, cultivos ornamentales y caseríos, se

escogieron aquellas microalgas que lograron el más alto y rápido crecimiento en la mayor concentración del efluente vacuno. De seis especies se escogió finalmente la microalga verde CR-G-49-*Chlorella emersoni* y las cianobacterias CR-BG-48-*Lyngbya hieronymusii* y CR-BG-02-*Fischerella muscicola*, esta última obtenida de la colección del Laboratorio (LABMA-UNA). Las especies de microalgas colectadas se aislaron, purificaron y cultivaron en el laboratorio en medio f/2 (con agua dulce) y BG-11, y las cianobacterias diazótroficas, sin nitrógeno combinado. El residual vacuno se filtró dos veces a través de una tela para quitar las partículas grandes (e.g. pasto, etc.) y luego cuatro veces a través de filtros Whatman cuantitativos con una capacidad de retención de partículas aproximada de 20 μ , 16 μ , 8 μ , y 2.5 μ respectivamente, hasta obtener un residuo libre de sólidos suspendidos. Los bioensayos para determinar la sobrevivencia de las microalgas en el efluente vacuno se realizaron primeramente en tubos de ensayo con diferentes porcentajes de dilución de medio de cultivo con el residual vacuno concentrado.

Aquellas concentraciones (residual-medio) donde hubo crecimiento algal y habían soportado la mayor concentración del residual fueron luego escogidas para crecer y escalar los cultivos hasta volúmenes de 70 litros. Estos recipientes de plexiglass transparente fueron previamente tratados con cloro y agua hirviendo para lograr condiciones de asepsia y se mantuvieron con aireación e iluminación constante (3000 lux).

El crecimiento de las microalgas bajo condiciones de laboratorio se midió por clorofilas, peso seco y absorbancia a una longitud de onda de 665 nm. Cuando cada cultivo alcanzó su crecimiento a la mitad de la fase exponencial, se le agregó 100 cuadrados de poliuretano de 400 cm², previamente lavados, pesados y esterilizados, donde se absorbieron e inmovilizaron las microalgas de cada especie en recipientes separados y fueron luego transportados al campo. Para poder identificar cada una de las especies inmovilizadas, se perforó con sacabocados uno, dos o tres círculos en las esquinas de cada cuadrado, y así poder identificar cada especie correspondiente. Todos los cuadrados impregnados con cada cepa fueron luego trasladados a una sola laguna al aire libre, de 5m ancho x 10 m largo x 1m alto, conteniendo 1000 litros de residual vacuno heterogéneo sin diluir, el cual se continuó agregando a la laguna cada día en forma discontinua a razón de 250 Ld⁻¹ (Foto 1). Otra laguna igual y con las mismas condiciones, dimensiones y residual se inoculó con *Lemna*, y posteriormente se alimentó el humedal con el mismo residual. Las dos lagunas y el humedal se alimentaron con el residual vacuno en forma paralela. Cada laguna tenía desagües en las esquinas para drenar el agua llovida diariamente. El crecimiento de estas microalgas inmovilizadas en la laguna se midió como peso húmedo. Además se midió el crecimiento de las microalgas planctónicas por determinación de clorofilas y absorbancia.



Foto 1. La laguna con microalgas siendo llenada con el efluente vacuno (izq.) y una vista de los cuadrados después de tres meses de inoculados con las microalgas (der.).

2.2 Cultivo de *Lemna aequinoctiales*

En otra laguna similar, también con el residual vacuno anaerobio, se inoculó 500 g la planta acuática *Lemna aequinoctiales*, obtenida de un cultivo al aire libre, y con un mes de crecimiento. (Foto 2). Se escogió esta especie por ser muy abundante y porque demostró tener mejor crecimiento que *L. valdiviana*. El crecimiento como “peso húmedo” se determinó semanalmente pesando el contenido de tres cuadrados de cedazo de 50 cm de lado con la lenteja

previamente escurrida y también midiendo la longitud de las raíces de 20 plantas, muestra representativa para evitar cometer errores de medición debido a su pequeño tamaño. En ambas lagunas y el humedal se colectó muestras semanales en cinco sitios distintos de cada laguna, para la determinación de oxígeno disuelto, DBO₅, sólidos totales (ST), sólidos suspendidos totales (SST), amonio (N-NH⁴⁺), nitrato (N-NO³⁻) y los iones Ca, Mg, K, P, Fe, Zn, Cu, Mn, Na y se midió pH y temperatura.



Foto 2. *Lemna aequinoctiales* en la laguna al inicio de la inoculación (izq.) y después de tres meses (der.).

2.3 Construcción del humedal

Se realizó en dos etapas. En la primera se construyó un “tanque de captación del efluente” con una capacidad de 500 litros para medir el volumen del agua entrante (250 L/d) y calcular el caudal antes de ingresar éste al sistema semicontinuo. Luego se construyó un canal de 10 metros de largo,

1.5 metros de ancho y 0.65 metros de profundidad promedio con inclinación perpendicular de 15 cm en las paredes pequeñas. Se cubrió con un plástico negro de 7 milímetros, unido a un geotextil que lo protege de posibles agujeros producidos por las piedras que componen el sustrato, el cual tiene 0.55 metros de altura promedio, un

volumen de 8.25 m³ y puede retener 3.000 litros de efluente aproximadamente. Está compuesto por una sección inferior de piedra quinta volcánica y otra superior de tierra.

Cuenta además con un sistema de aireación pasiva, que consiste de una red de tuberías perforadas que recorren el largo del sustrato para la salida y entrada de gases (Foto 3).



Foto 3. Construcción del humedal por etapas. A la derecha del canal se observa el precultivo de las plantas.

Durante la segunda etapa se realizó la siembra de la vegetación de altura previamente seleccionada, crecida y mantenida en estañones con tierra, partidos a la mitad e irrigados con el efluente vacuno. Se sembró, *Hedychium coronarium* (heliotropo), *Ludwigia inucta*, *Zantedeschia aetiopica* (cala), *Canna generalis* (platanilla) de la variedad con flores anaranjadas, *Dracaena dremensis* (Janet creil), de la variedad compacta), *Dracaena fragans* de la variedad “Massangeana” (caña india) y *Alocasia sp* (hoja de pato). Estas plantas se escogieron de entre otras que no lograron sobrevivir a las condiciones del efluente y el ambiente. Por simple observación se evaluó su adaptación y desarrollo de cada planta en el sistema de tratamiento. Se realizaron mediciones de crecimiento y multiplicación

y se tomaron datos de altura, producción de hojas y retoños. El resultado fue únicamente de “adaptación” o “no adaptación”.

La ubicación de las plantas dentro del humedal artificial se realizó en cuadrantes de 50 x 50 cm señalados con cuerdas a través del humedal y en cada cuadrante se sembró dos plantas. Se colocaron según sus características fisiológicas y anatómicas, poniendo las de mayor tamaño, cobertura y crecimiento más agresivo a la entrada del efluente. Estas plantas se escogieron de entre otras que no lograron sobrevivir a las condiciones del humedal. No se utilizó la especie *Juncus effusus*, ya que se supo que se convierte en plaga en fincas lecheras, porque invade el potrero, desplazando el pasto del que se alimenta el ganado.

Tanto para el humedal como los estanques, se calculó el tiempo de retención hidráulica (TRH) o τ que es una medida del promedio del tiempo que un compuesto soluble permanece en un biorreactor y que es igual a volumen/flujo de descarga. (Lenntech 2009).

2.4 Métodos analíticos

Los análisis químicos y bacteriológicos se realizaron de acuerdo con el "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1998), y siguiendo las normas de American Public Health Association, American Water Works Association, y Water Environment Federation, en los laboratorios: CIA, CICA e INISA de la Universidad de Costa Rica y LASEQ y LAMRHI de la Universidad Nacional. Para el análisis de clorofila, 100 mL de la muestra se filtraron en triplicado a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatmann GF/F) y se mantuvieron en refrigeración durante 24 hrs. Para la extracción de los pigmentos, los filtros se homogenizaron y la clorofila se extrajo con 5 mL acetona (90%). Luego se centrifugaron y analizaron 24 horas después utilizando un Spectronic 20 (SCOR-UNESCO 1980).

2.5 Análisis estadístico

Se comparó los valores promedios de las variables medidas en las lagunas y el humedal a partir del primer mes de actividad de los biorremediadores, con los valores iniciales del efluente vacuno crudo sin diluir, antes de agregar la lenteja de agua y las microalgas. Las diferencias significativas se obtuvieron a través de la prueba de t .

3. Resultados y discusión

Se escogieron las microalgas y la lenteja de agua utilizadas en el presente estudio, por resistir temperaturas entre 7 °C y 17 °C, y crecer relativamente bien en el residual vacuno y también por haber logrado reducir primordialmente nitratos y fosfatos en pruebas preliminares bajo condiciones de laboratorio. La cianobacteria diazótrofa *F. muscicola* fue la especie que mejor creció bajo condiciones del laboratorio en el residual vacuno. Su crecimiento en 80% del residual vacuno se puede apreciar en la Fig. 1. Las especies restantes sobrevivieron en porcentajes menores de dilución: *C. emersoni* (10-20%) y *L. hieronymusii*, (40-60%). Todas las especies de microalgas se adaptaron bien a las condiciones de los estanques y fueron aumentando su biomasa inmovilizadas en los cuadrados de espuma, conforme fue avanzando la investigación.

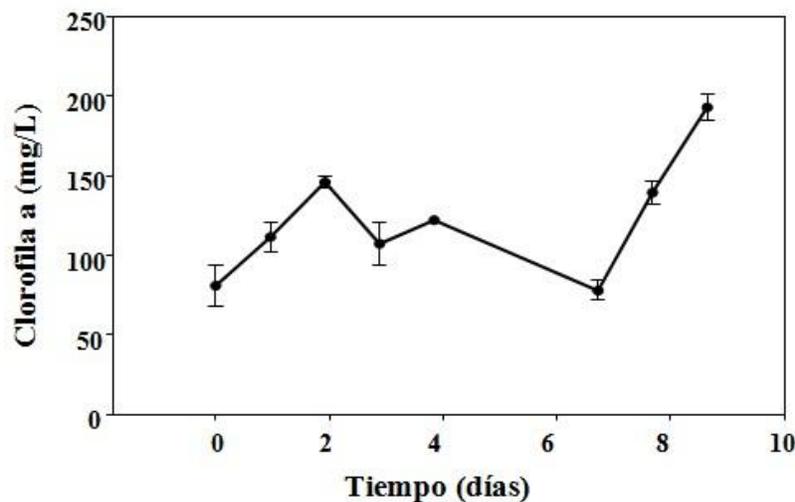


Figura 1. Crecimiento de *Fischerella muscicola* (en base de la clorofila a) en 80% de residual vacuno.

Cuando se utilizan microalgas como ficorremediadoras, es importante no solo seleccionar aquellas especies capaces de degradar el contaminante, sino también que puedan ser capaces de crecer bien y rápido en el ambiente especial al que son sometidas. La composición de las especies de microalgas fitoplanctónicas que han caracterizado las lagunas de estabilización y que han sido reportadas en la literatura desde 1963 pertenecen a las divisiones Euglenophyta y Chlorophyta (Volvocales y Chlorococcales) y las especies fitobentónicas: cianobacterias filamentosas y diatomeas. Sin embargo la composición algal cambia con las condiciones climáticas y las características del efluente (Mezrioui y Oudra, 1998). Estos resultados están en concordancia con las observaciones del presente estudio, donde las especies planctónicas verdes y cianobacterias (no filamentosas) proliferaron durante la época lluviosa, mientras las microalgas inmovilizadas aumentaron su biomasa durante la estación seca. También se observó las cianobacterias inmovilizadas *Lyngbya* y *Fischerella* creciendo libremente adheridas al fondo y paredes de la laguna. La productividad promedio medida en las lagunas para las microalgas inmovilizadas fue: *Chlorella* $107 \pm 9.59 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, *Fischerella* $113 \pm 10.87 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y *Lyngbya* $115.14 \pm 11.11 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

La lenteja de agua ha sido muy utilizada y efectiva en otras latitudes para remover principalmente nitrógeno y fósforo de aguas contaminadas, con eficiencias de remoción de un 30% a 90% (Zimmo *et al.*, 2002, 2004, Uysal y Zeren, 2004). La especie *L. aequinoctiales* se utilizó en la presente investigación por su abundancia y adaptación al residual vacuno, a bajas temperaturas y porque demostró tener un mejor crecimiento que *L. valdiviana*. Su productividad promedio fue de $109.7 \pm 39.84 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

La máxima tasa de crecimiento relativo que se ha obtenido para las especies más pequeñas como *Lemna aequinoctiales* Welw. y *Wolffia microscopica* (Griffith) Kurz ha sido de 0.73 a 0.79 d^{-1} , que comparado con plantas herbáceas, estas tienen valores de 0.031 a 0.365 d^{-1} (Lambers y Porter, 1992), mientras que para las microalgas el rango va de 0.26 a 2.84 d^{-1} (Nielsen y Sand-Jensen, 1990).

Estos valores máximos de la lenteja corresponden a doblar su tiempo de crecimiento de 20 a 24 h, con una tasa de aumento de 64 g/g peso seco/semana, o 73 ton/ha/año (Landolt y Kandeler, 1987). Se tiene como norma un aumento en el peso para *Lemna* de 10-20 $\text{ton m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. En el presente estudio se obtuvo una tasa de crecimiento relativo menor de 0.20 d^{-1} , probablemente debido a las condiciones climáticas imperantes en la zona y el efluente vacuno. Este corresponde a doblar su crecimiento aproximadamente de 5 a 7 días. Sin embargo en estudios preliminares y condiciones naturales la misma especie, dobló su crecimiento de 20 a 24 h.

En la Fig. 2, se puede observar los parámetros físico-químicos (temperatura, % saturación de Oxígeno disuelto y pH) medidos en los estanques con microalgas y *Lemna*. No hubo diferencias significativas entre éstos, excepto en relación al oxígeno disuelto, que es un indicador del grado de contaminación del agua. Los valores registrados para el oxígeno disuelto oscilaron entre 0.34 a 5.4 mg L^{-1} en el estanque con *Lemna* y entre 0.1 y 4.55 mg L^{-1} para el de microalgas y se mantuvieron bajos durante la investigación. El mayor aumento en OD se registró a los 19 días de tratamiento en el estanque sembrado con la lenteja de agua, alcanzando su máximo nivel (66% y 5.4 mg L^{-1} OD), aceptable para mantener vida acuática.

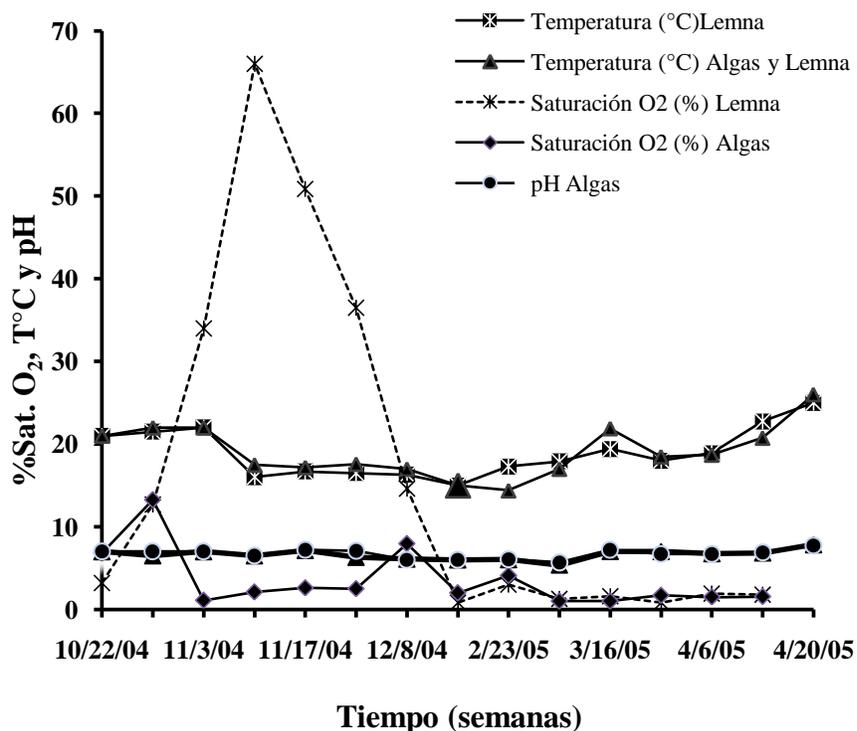


Figura 2. Parámetros físico-químicos medidos en los estanques con microalgas y *Lemna*, durante parte de la estación lluviosa (Octubre-diciembre 2004) y la seca (enero-abril 2005).

Esto se observó por la proliferación de renacuajos y larvas de insectos. Al siguiente mes los valores bajaron considerablemente manteniéndose así hasta el final del estudio, lo que coincidió con un tapete grueso de la lenteja que impidió el paso de la luz y consecuentemente fotosíntesis por las microalgas. Estos valores bajos de saturación de oxígeno indican que se está llevando a cabo la oxidación de la materia orgánica y además el oxígeno es consumido por material inorgánico presente en las lagunas (Fig. 3).

En la laguna con microalgas, los valores de % de saturación de oxígeno disuelto fueron bajando paulatinamente después de haber un aumento de clorofila, indicativo de un aumento en la biomasa algal y producción de oxígeno debido a la fotosíntesis. Estos

valores de saturación se mantuvieron muy bajos durante el resto de la época lluviosa y empezaron a subir durante la época seca, confirmando lo anterior. Tanto las microalgas como la lenteja *Lemna* se mantuvieron creciendo en las lagunas durante la época lluviosa (8 meses) y seca en dos años consecutivos.

A los dos meses de iniciado el estudio en el campo, se observó en las dos lagunas una disminución de N-NO_3 ($p < 0.001$) y P-PO_4 ($p < 0.001$). En la de *Lemna* el N-NH_4 disminuyó ($p < 0.001$) mientras que en la laguna con microalgas más bien aumentó considerablemente ($p > 0.05$). Se puede observar en las Tablas 1 y 2 a los 35 días de retención, mayor captura de N-NO_3 por las microalgas inmovilizadas (98%), que con *Lemna* (95%).

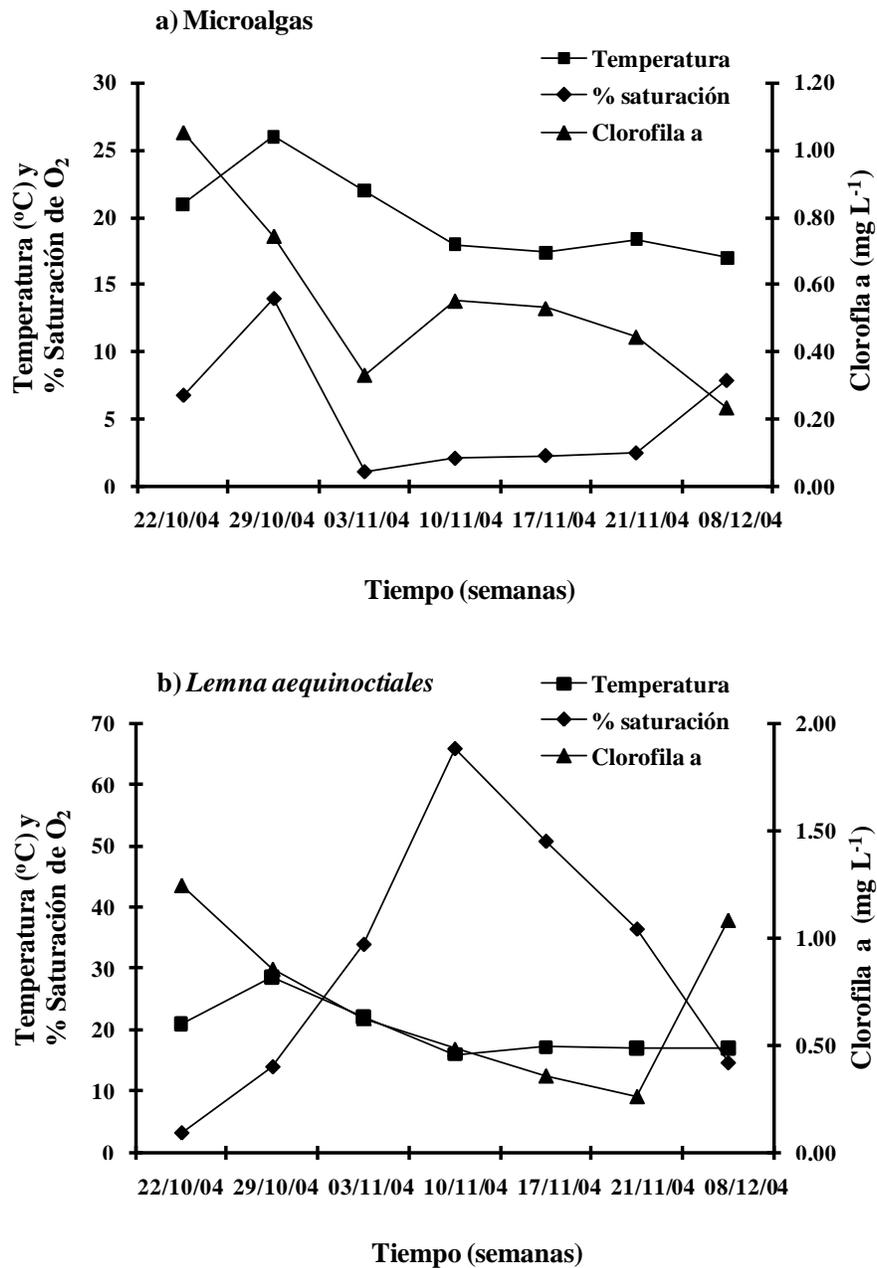


Figura 3. Determinación de la temperatura (°C), % saturación de oxígeno y Clorofila a, en el agua de estanques con **a)** microalgas y **b)** *Lemna aequinoctiales* con el residual vacuno, durante la época lluviosa de 2004.

Tabla 1. Datos obtenidos en mg L⁻¹ de los mayores constituyentes del residual vacuno crudo y medidos en las lagunas con microalgas, al final de la estación lluviosa de 2004.

mg L ⁻¹	20/10/2004	17/11/2004	24/11/2004	09/12/2004	Promedio	DS	p*	
Amonio	1.12	13.57	2.78 (248%)	9.882	8.74	±5.48	>0.05	
Fosfato	60.57	7.54	4.44 (93%)	7.48	6.49	±1.77	<0.001	
Nitrato	13.4	0.68	0.15 (99%)	0.11	0.31	±0.32	<0.001	
DBO₅	1788.3	----	153.4 (91%)	21.8	87.59	±93.04	<0.001	
Coliformes	Totales	7.50E+09	2.30E+06	----	4.00E+03	1.15E+06	±1.62E+06	<0.001
	Fecales	4.30E+09	9.00E+05	----	2.00E+03	4.51E+05	±6.35E+05	<0.001
Sólidos totales	2501	565	476 (81%)	500	513.67	±46.05	<0.001	
Sólidos sedimentables	2129	----	489 (77%)	0	244.50	±345.78	>0.01	
Alcalinidad	847	----	207 (76%)	201	204.00	±4.24	<0.01	
Sólidos filtrables	2129	532	----	489	510.50	±30.41	<0.001	

* Prueba de *t*, altamente significativo $p < 0.001$, no significativo: $p > 0.05$

Tabla 2. Datos obtenidos en mg L⁻¹ de los mayores constituyentes del residual vacuno crudo y medidos en las lagunas con *Lemna aequinoctiales*, al final de la estación lluviosa de 2004.

mg L ⁻¹	20/10/2004	17/11/2004	24/11/2004	09/12/2004	Promedio	DS	p*	
Amonio	1.12	0.08	0.04 (96%)	0.01	0.06	±0.03	<0.001	
Fosfato	60.575	2.465	1.63 (97%)	1.11	1.74	±0.68	<0.001	
Nitrato	13.4	0.12	0.68 (95%)	0.05	0.28	±0.35	<0.001	
DBO₅	1788.3	----	13.43 (99%)	3.2	8.32	±7.23	<0.001	
Coliformes	Totales	7.50E+09	4.30E+04	----	4.00E+03	2.35E+04	±2.76E+04	<0.001
	Fecales	4.30E+09	1.50E+04	----	4.00E+02	7.70E+03	±1.03E+04	<0.001
Sólidos totales	2501	235	139 (99.5%)	105	159.67	±67.42	<0.001	
Sólidos sedimentables	2129	----	105 (95%)	0	52.50	±74.25	<0.001	
Alcalinidad	847	----	54 (94%)	43	48.50	±7.78	<0.001	
Sólidos filtrables	2129	203	----	105	154.00	±69.30	<0.001	

* Prueba de *t*, altamente significativo $p < 0.001$, no significativo: $p > 0.05$

Esto mismo fue observado por Zimmo y colaboradores (2004) en un estanque cultivado con *Lemna gibba* y otro con microalgas donde hubo también mayor remoción de nitrógeno en el estanque con microalgas (80%) vía sedimentación y desnitrificación, comparada con el de *Lemna* (55%), a los 21 días de retención durante los meses de verano, coincidiendo con mayores temperaturas y carga orgánica. Resultados

obtenidos por Meutia en 2001, demostraron que la eficiencia de remoción de nitrato fue mayor durante la estación lluviosa, que en la etapa de transición o la época seca, lo que coincidió también con los resultados obtenidos en este trabajo (Fig.4 y 5), y que son favorecidos por una temperatura óptima para la tasa de eliminación del nitrato y el crecimiento microbiano.

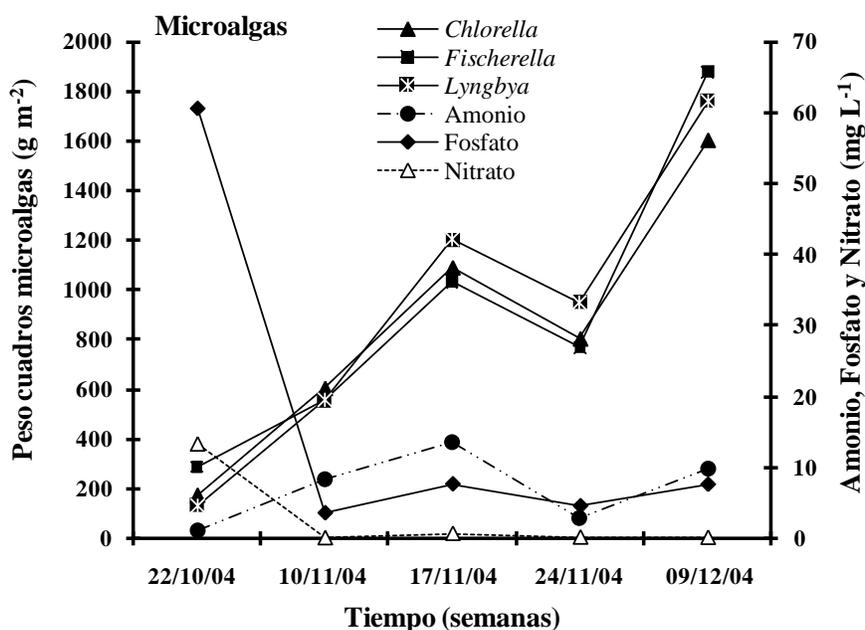


Figura 4. Crecimiento de las microalgas inmovilizadas (medido como peso húmedo) y nutrientes presentes en la laguna durante parte de la estación lluviosa (octubre-diciembre 2004).

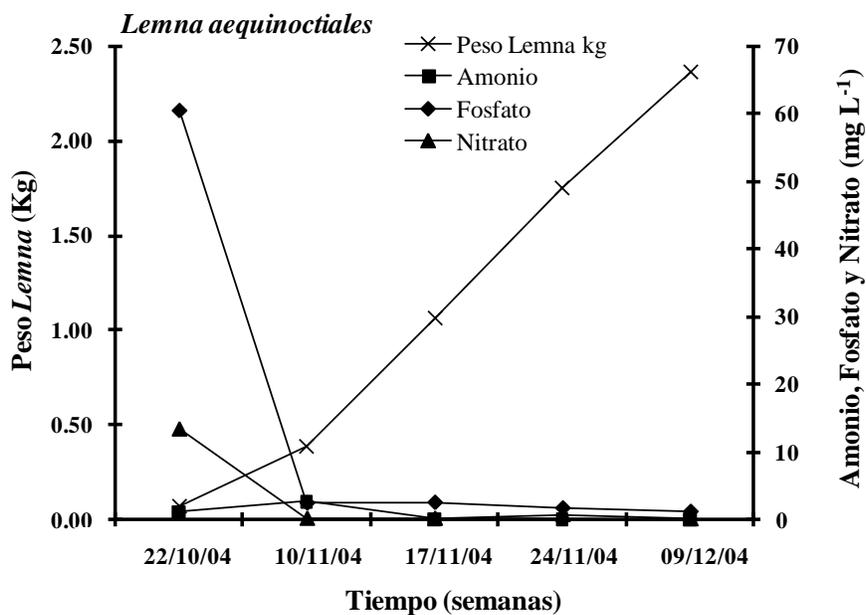


Figura 5. Crecimiento de *Lemna aequinoctiales* (medido como peso húmedo) y nutrientes medidos en la laguna.

La asimilación del N-NH₄ por las microalgas sobre las otras formas de nitrógeno, para incorporarlo a su masa celular, ha sido bien documentada en la literatura. En estudios donde se ha cultivado una misma especie con N-NH₄ o N-NO₃ han demostrado la gran versatilidad de las especies para tomar cualquiera de esas fuentes de nitrógeno si están disponibles en ese momento y es así como dependerá de las especies y la fuente de nitrógeno presentes (Joint *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2008, Bradley *et al.*, 2010). Aunque no se realizaron estudios para determinar la forma de asimilación del nitrógeno por las microalgas en las lagunas, es muy posible que en la de microalgas, donde se observó mayor cantidad de N-NH₄, el principal mecanismo de remoción sea la desnitrificación, seguido por la asimilación de la biomasa y nitrificación. Este proceso coincidió con picos en el aumento de biomasa algal seguidos por períodos con muy baja cantidad de oxígeno disuelto, que indican que está siendo utilizado por las bacterias para degradar la

materia orgánica (Sanderson *et al.*, 2008). Mientras que en la laguna con *Lemna*, la nitrificación pudo haber sido el mecanismo principal de remoción del nitrógeno, seguido por la asimilación de la biomasa y desnitrificación. En la etapa de nitrificación se reduce la concentración de amonio mediante su conversión a nitrato. Sin embargo en este paso el nitrógeno apenas ha cambiado de forma y no se ha eliminado. En la desnitrificación, el nitrato se convierte en un producto gaseoso (N₂) que es eliminado. Algo similar fue observado por González-Fernández *et al.*, (2010) en una laguna con lodos de origen porcino.

También durante la conversión de nitrato a nitrógeno se produce un aumento en la alcalinidad y en el pH, lo que se comprueba en este estudio donde se observa (Tablas 1 y 2) un aumento en la alcalinidad en la laguna con microalgas (207 mg L⁻¹), comparada con 54 mg L⁻¹ en la laguna con *Lemna*. La concentración de amonio y el valor del pH en el agua de las lagunas se puede observar en la Fig. 6.

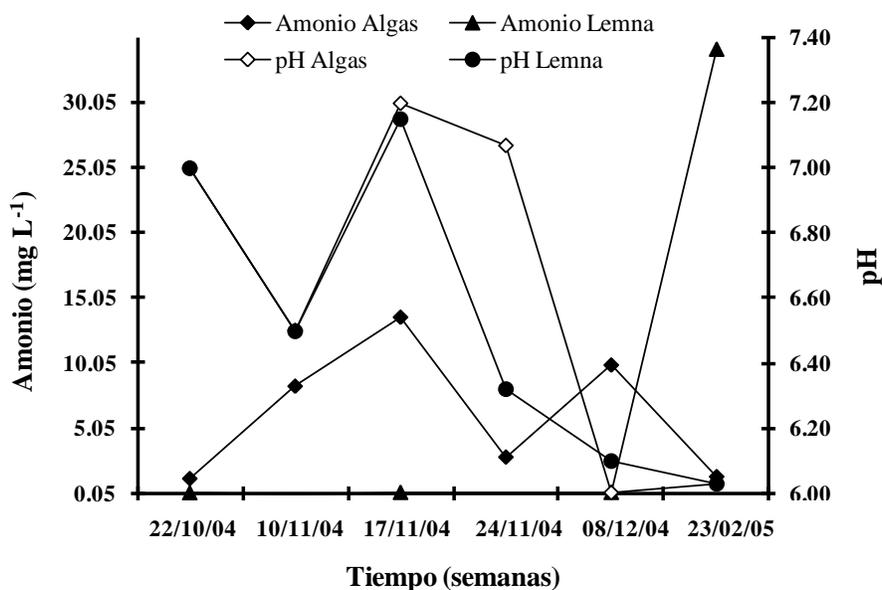


Figura 6. Relación entre la concentración de amonio y pH en la laguna con microalgas y *Lemna aequinoctiales*.

Para microalgas el pH varió de 8 a 10.4 mientras que para *Lemna* de 7.2 a 10. El amonio en la laguna con microalgas fue proporcional al pH durante los meses lluviosos, y se mantuvo bajo con *Lemna* pero aumentó en los meses secos. El aumento en pH también es el producto de la fotosíntesis algal y este promueve la pérdida de amonio hacia la atmósfera y la precipitación del ortofosfato (Olguín *et al.*, 2003). El crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en la laguna con microalgas, pudo también haber aportado amonio directamente al medio, siendo otra causa para el aumento de este elemento en esta laguna, lo que habría que estudiar más a fondo. El aumento de N debido a la contribución de la fijación de nitrógeno en una laguna con la lenteja, se ha calculado en 1 a 2 mg N m⁻² d⁻¹ (Duong y Tiedje, 1985).

Por otra parte, se ha reportado también que el amonio ha resultado tóxico para *Lemna gibba*, debido al efecto de la forma no ionizada de NH₃ y a concentraciones mayores de NH₃-N de 1 mgL⁻¹. No obstante esta especie ha sido capaz de tratar aguas con altas concentraciones de amonio, siempre y cuando los niveles de pH no excedan de 7.8 y se ha obtenido una producción de 55 kg peso seco ha⁻¹ d⁻¹ que es comparable con valores hallados en lagunas a gran escala (Alaerts *et al.*, 1996). El tratamiento de aguas con *L. gibba* ha sido imposible a niveles de pH mayores a 9.8 por lo que se recomienda utilizar un pretratamiento anaerobio (Veenstra *et al.* 1995).

Con respecto al P-PO₄, este fue reducido en un 97.3% ($p < 0.001$) por *Lemna* y en un 92.7% ($p < 0.001$) por las microalgas (Tablas 1 y 2, Fig.5). La contribución relativa de *Lemna* a la remoción del P (lo que absorbe la planta y la biopelícula adherida), depende más de las concentraciones iniciales de P, aunque se ha demostrado que la lenteja contribuye poco a altas o bajas concentraciones iniciales de P. En promedio, una cuarta parte de la pérdida total de P no estaba relacionada directa o indirectamente a la lenteja. La contribución

directa de *L. minor* a la remoción del P, se ha calculado entre 9 y 61% mientras que la removida por *L. gibba* se ha reportado entre 14 y 99% y varía entre 8 y 220 mg P m⁻² d⁻¹. (Culley *et al.*, 1981; Reddy y Smith, 1987; Zirschky y Reed, 1988; Alaerts *et al.*, 1996; Körner y Vermaat, 1998; Vermaat y Hanif, 1998; Sutton y Ornes, 1975; Oron *et al.*, 1986). No se tienen datos para *L. aequinoctiales* debido a que no han sido reportados y se ha utilizado muy poco.

La remoción de N y P en los sistemas con *Lemna* se atribuye a lo que la planta captura directamente a través de sus raíces (9%) y fronda (61%), lo que captura indirectamente la biopelícula formada por microalgas y bacterias y que está asociada a la lenteja (35%) y también la biopelícula presente en las paredes del sistema (46%), a la remoción debida a nitrificación-desnitrificación por estas biopelículas (31 a 71%), y lo que se remueve debido a la sedimentación de N y P particulado. En cuanto a la volatilización de NH₃ puede ser importante en sistemas con alto pH y alta concentración de amonio, aunque una densa cobertura de esta planta puede prevenir este proceso. (Reddy y Smith, 1987; Alaerts *et al.*, 1996; Körner y Vermaat, 1998; Vermaat y Hanif, 1998).

En otro estudio realizado por Cedergreen y Madsen en 2004 con *L. minor*, se demostró que la actividad de la nitrato reductasa se localizaba primordialmente en las raíces y se correlacionaba con la captura de N-NO₃ a través de las hojas, y estaba regulada por cambios en irradiación, de tal manera que las raíces juegan un papel principal en la reducción del NO₃ a pesar de tener una amplia captura foliar. La remoción de N y P por la lenteja según Körner y Vermaat (1998), se lleva a cabo principalmente en tejidos recién formados y no por el aumento de N y P en los tejidos. De esta manera, su tasa de remoción dependerá de la tasa de crecimiento que a la vez va a depender de las concentraciones iniciales de N y P en el sistema. El contenido

de estos nutrientes típico para la lenteja en aguas contaminadas está en el orden de 22 a 63 g N kg⁻¹ peso seco y 3 a 14 g P kg⁻¹ peso seco (Vermaat y Hanif, 1998).

Consecuentemente la DBO₅ disminuyó en la laguna de *Lemna* en un 99% ($p < 0.001$) mientras que en la de microalgas en un 91% ($p < 0.001$), así como los sólidos totales que se redujeron en un 99% ($p < 0.001$) con *Lemna* y en 81% ($p < 0.001$) con microalgas. Resultados similares fueron obtenidos por Zimmo y colaboradores (2002), en un estudio realizado durante doce meses con microalgas y *L. minor*. Ellos obtuvieron diferencias significativas para los valores de pH y OD en el estanque con microalgas, mientras que en el estanque sembrado con *Lemna*, hubo mayor remoción de materia orgánica (DBO₅ y SST) y menor reducción de coliformes fecales que en el estanque con microalgas. En el presente trabajo también hubo mayor remoción de coliformes totales y fecales en la laguna con microalgas y al final de la investigación no se detectaron del todo en esta laguna. Esto se asoció a la desaparición del olor a estiércol, el que sí se percibió y persistió en la laguna con *Lemna*, durante todo el período de la investigación. Aunque tenía poca profundidad (1m), la laguna con *Lemna* se convirtió en facultativa con lodos activos, mientras la laguna con las microalgas se convirtió en una fotosintética.

De acuerdo con Gijzen y Veenstra (2000), la remoción de patógenos en los estanques con microalgas es inducida por la penetración de la radiación ultravioleta e indirectamente por las fluctuaciones del pH y oxígeno disuelto debido a la actividad fotosintética, mientras que los estanques con *Lemna* no tienen un buen desempeño para removerlos, debido a que la gruesa cobertura de la lenteja previene la penetración de la luz en la columna de agua e inhibe tanto el oxígeno que entra al agua por difusión del aire o el producido por el fitoplancton debido a que este recibe poca

incidencia de luz. Asimismo la remoción de DBO₅ disminuye en estanques cubiertos con la lenteja debido a una limitada transferencia de oxígeno al agua. (Culley y Epps, 1973; Morris y Barker, 1976; Brix y Schierup, 1989; Zirschky y Reed, 1988). Hay también evidencia de que las microalgas producen sustancias que inhiben el crecimiento de las bacterias como *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (Borowitzka 1997). Sin embargo Alaerts y colaboradores (1996), hallaron que la columna de agua en una laguna cubierta con la lenteja, aún con baja DBO₅, siempre permanecía aeróbica. Además que en un sistema poco profundo con 100% de sustrato contaminado, había significativamente más oxígeno que el control sin la lenteja. Esto probablemente ocurre debido al oxígeno que se desprende de las raíces que maximizan la tasa de superficie de la lenteja con el volumen del agua (Korner *et al.*, 1998).

Las concentraciones de clorofila producto de las microalgas presentes en la columna de agua en ambas lagunas se observan en la Fig. 7. Se aprecia una disminución de esta conforme aumenta la cobertura de *Lemna*, en tanto se mantiene uniforme en la laguna con microalgas.

Durante el período lluvioso intenso de 2005 ambas lagunas, a pesar de tener drenajes, se diluyeron a tal extremo que se perdió toda la biomasa y proliferaron microalgas de los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Oscillatoria*, *Klebsormidium*, *Euglena*, *Phacus*, *Synechococcus*, *Microcystis*, *Chlorococcum*, *Synechocystis*, entre otras menos frecuentes. Éstas llegaron a ser más abundantes en las aguas de la laguna con *Lemna* en la época lluviosa y en la de microalgas durante la época seca, como se pudo observar a través de la clorofila (Fig.7). Las microalgas inmovilizadas fueron colonizadas también durante la época lluviosa por cianobacterias filamentosas de los géneros *Oscillatoria* y *Nostoc*, además de protozoarios, rotíferos y larvas de insectos.

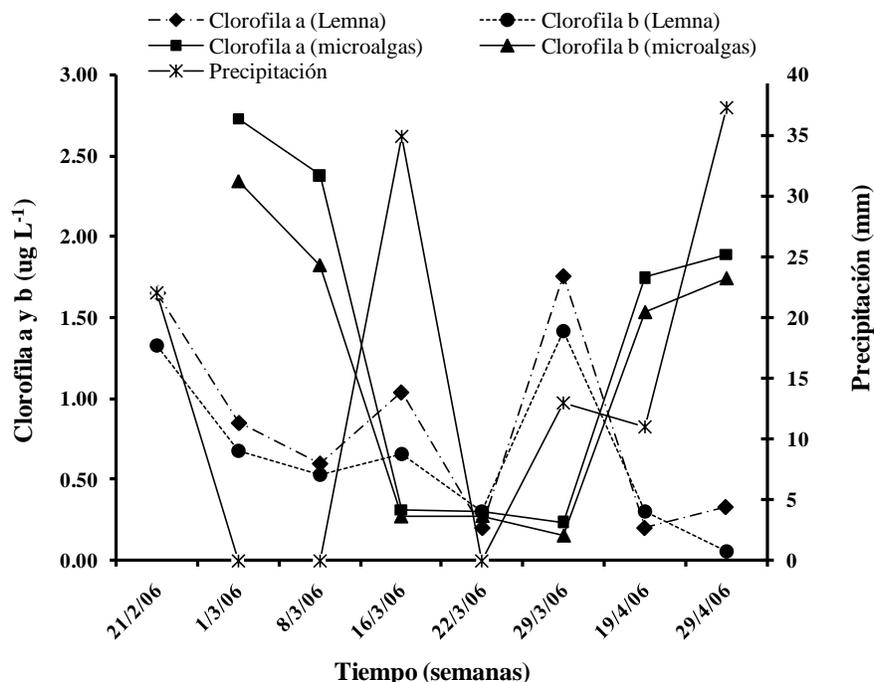


Figura 7. Determinación de clorofila a y b y la precipitación semanal en las lagunas con *Lemna* y microalgas y el residual vacuno, durante la estación seca de 2006.

En cuanto al tiempo de retención hidráulica en las lagunas, se obtuvo para *Lemna* 7.9 días y para microalgas 7.0 días lo que es similar a lo obtenido por Zimmo *et al.*, (2004), pero utilizando *L. gibba* y otras microalgas donde en ambas lagunas obtuvieron un TRH de 7 días. También Uysal y Zeren (2004) obtuvieron un TRH de 6 días con *L. minor*. Para el humedal el TRH calculado fue de 5.8 días, más alto que lo obtenido por Ran y colaboradores (2004) en un estudio similar donde obtuvieron un TRH de 4.26 días.

Los humedales son sistemas altamente eficientes para tratar aguas contaminadas de distintas fuentes. Se han utilizado más para tratar aguas municipales que aguas de origen vacuno. En el presente estudio el humedal se pensó primeramente para reducir los sedimentos que causaban anoxia en el fondo del estanque de *Lemna* y evitaban el paso de la luz en el estanque de microalgas, así como malos olores producto de la alta descomposición bacteriana de la materia

orgánica. Sin embargo el humedal no demostró mayores reducciones que las obtenidas con *Lemna* o microalgas removiendo N-NO₃ (92.8%) ($p < 0.5$), P-PO₄ (91.45%) ($p > 0.01$), DBO₅ (61.8%) ($p > 0.01$) y aumentando el N-NH₄ (141%) ($p > 0.5$), aunque a los dos meses de haber sembrado las plantas, este se redujo en un 50% ($p < 0.5$) y el fósforo aumentó su concentración con las plantas en un 5%. Los sólidos totales ($p > 0.001$) disminuyeron con el aumento en precipitación y la DBO₅ bajó considerablemente obteniéndose los niveles más bajos a los tres meses de su funcionamiento (Tabla 3 y Figs. 8 y 9). En un estudio similar realizado por Ran y colaboradores (2004), la remoción de fósforo fue imperceptible mientras que la del nitrógeno fue baja (10-20%). La mayor remoción la obtuvo con los sólidos suspendidos y materia orgánica.

En el año 2006, se comparó el humedal y los estanques con microalgas y *Lemna*, todos alimentados de nuevo con el residual vacuno

sin diluir y posteriormente se utilizó el humedal en serie con los dos estanques, pero debido a la reducción de nitrógeno y fósforo

en el efluente que salió del humedal y que alimentó las lagunas, no hubo un buen crecimiento de *Lemna* y microalgas.

Tabla 3. Datos obtenidos en mg L⁻¹ de los mayores constituyentes del residual vacuno crudo comparados con el efluente saliente del humedal, sin plantas y con plantas, durante la estación lluviosa de 2005.

mg L ⁻¹	13/07/2005	03/08/2005	13/09/2005	p* ¹	18/10/2005	15/11/2005	06/12/2005	p* ²	
Amonio	78.76	107.42 (142%)	206.14	>0.5	34 (55%)	54.29	116.21	>0.5	
Fosfato	14.38	1.23 (91.44 %)	2.99	>0.05	2.07(86%)	1.66	1.84	>0.05	
Nitrato	1.53	0.11 (93%)	0.01	<0.5	Trazas	0.05	0.07	<0.5	
DBO₅	1242	474 (62%)	361.9	<0.01	59.53 (95%)	12.03	122.4	<0.5	
Coliformes	Totales	≥1.6E+04	≥1.6E+04	≥1.6E+04	>0.5	≥1.6E+04	≥1.6E+04	≥1.6E+04	>0.5
	Fecales	≥4.3E+04	1.5E+04	≥1.6E+04	>0.5	-----	-----	-----	>0.5
Sólidos totales	1830	1163 (36%)	361.9	<0.05	412 (22.5%)	491	984	<0.005	
Sólidos sedimentables	800	127 (84%)	260	<0.001	27 (97%)	35	252	<0.005	

* Prueba de *t*. altamente significativo $p < 0.001$, no significativo: $p > 0.05$

1= Comparación muestras efluente vacuno sin tratamiento con muestras efluente saliente del humedal.

2= Comparación muestras efluente saliente del humedal sin plantas con efluente saliente del humedal con plantas.

En el presente estudio, la reducción de los sólidos suspendidos bajó un 84% y todavía más dos meses después de haber sembrado las plantas en el humedal (97%), lo que cumplió con las expectativas para reducirlos lo suficiente y poder utilizar luego el efluente para crecer *Lemna* o microalgas. Sin embargo el contenido total de nitrógeno y fósforo en esta agua no fue suficiente para levantar el crecimiento de *Lemna* y microalgas observándose proliferación de otras microalgas verdes que compitieron con las inoculadas en la laguna. En cuanto a la DBO₅ hubo mayor reducción después de haber sembrado las plantas (95%) y los coliformes no se redujeron del todo en el humedal y su concentración se mantuvo igual.

De las ocho especies de plantas sembradas a modo de prueba en el humedal, sólo cuatro se mantuvieron viables y crecieron bajo las condiciones imperantes del sistema: Cala (*Zantedeschia aethiopica*); Platanilla (*Canna generalis*); Heliotropo (*Hedychium coronarium*) y *Ludwigia inucta*. Estas son autóctonas de clima tropical de altura para Costa Rica, y además brindan un valor agregado al paisaje, pues su floración, follaje y apariencia general es agradable. Tanto su follaje como las flores son productos comerciales, lo que abre la posibilidad de que estos humedales artificiales con estas especies vegetales puedan utilizarse para dicho fin.

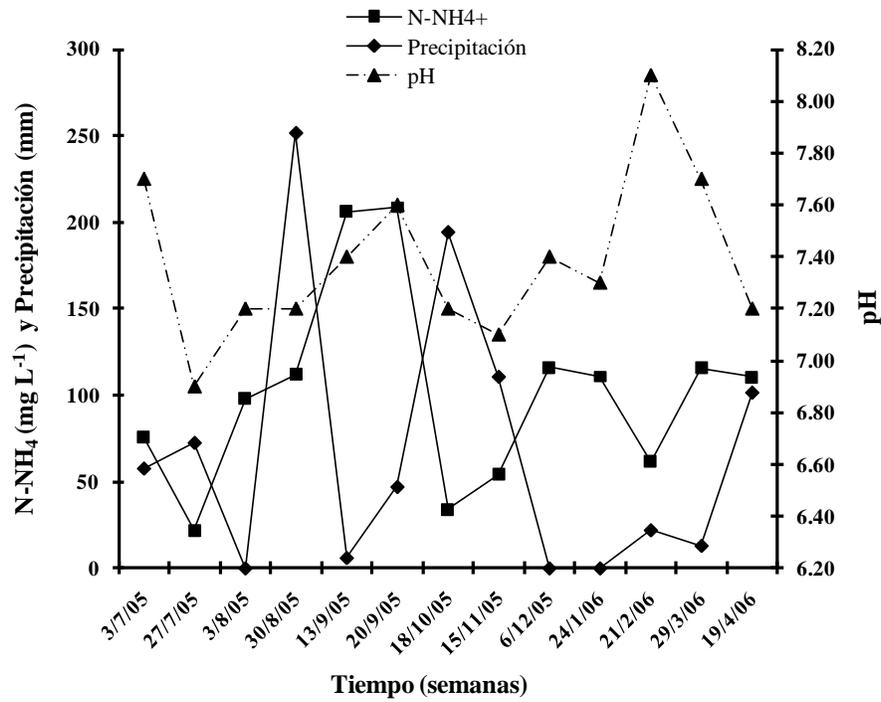


Figura 8. Relación entre cantidad de amonio, precipitación y pH en el efluente del humedal.

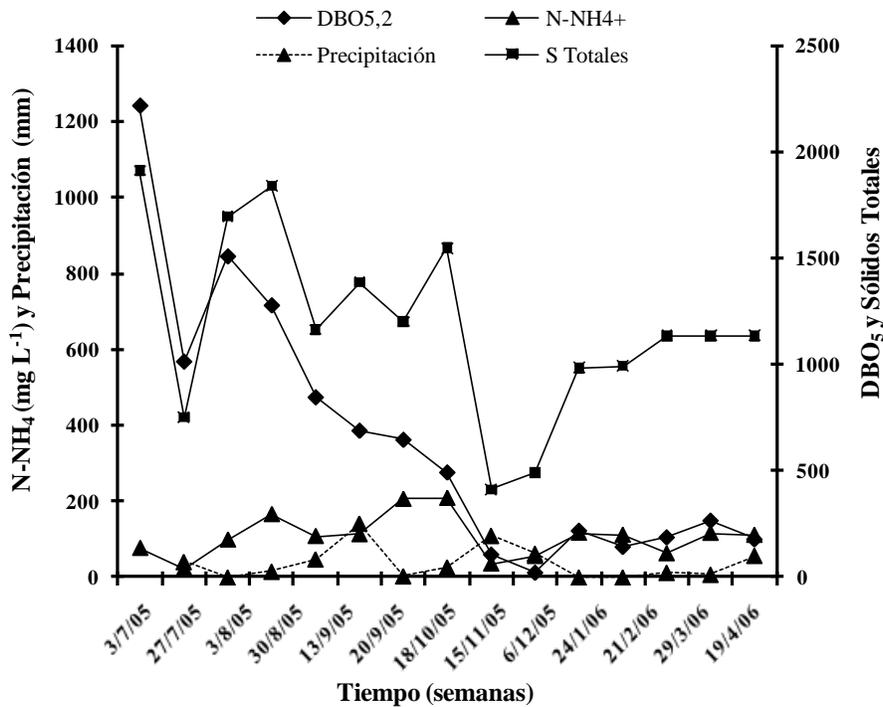


Figura 9. Relación de la precipitación con DBO_{5,2} y los sólidos totales en el efluente del humedal, durante la estación seca y lluviosa 2005-2006.

Este estudio determinó que tanto las microalgas como la *Lemna* y el humedal son muy eficientes para reducir considerablemente la carga del residual vacuno, y cumplen los estándares recomendados para aguas residuales. El humedal fue muy importante para reducir sólidos en general y bajar la DBO₅. Sin embargo, los coliformes persistieron en el humedal y en la laguna sembrada con *Lemna* pero no así en la laguna sembrada con las microalgas.

4. Recomendaciones

Se recomienda probar especies de *Lemna* de mayor tamaño y utilizar otras cianobacterias como *Spirulina (Arthrospira) sp.*, así como probar otras plantas acuáticas y el helecho acuático *Azolla sp.*, que han resultado ser muy eficientes en otras latitudes.

También se debe determinar la sensibilidad de estas especies a altas concentraciones de amonio y su contribución para remover los contaminantes en mayor o menor cantidad. Se sugiere utilizar canales en forma de meandros de poca profundidad, en lugar de lagunas y estanques de maduración como tratamiento primario, para evitar estratificación y favorecer la penetración de la luz solar y además reducir los patógenos y los sólidos sedimentables. Alternativamente se recomienda tratar previamente las excretas y el sedimento de las lagunas para compostaje.

5. Reconocimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Costa Rica el financiamiento del proyecto y a la Compañía Nacional de Fuerza y Luz por el aporte financiero a la construcción del humedal. Asimismo agradecemos la ayuda en el campo brindada por el Máster Jesús

Rojas y la asistencia en el trabajo de campo y laboratorio de los estudiantes José Rafael Cruz, Irene García y Jennifer Rodríguez.

6. Bibliografía:

- Alaerts, G.J., Mahbubar Rahman M., Kelderman, P. 1996. Performance analysis of a full-scale duckweed covered lagoon. *Water Res* 30:843-852.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (Eds.) American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 20th ed. 1325 pp.
- Arceivala, S.J. 1998. Wastewater treatment for pollution control. Tata Mc Graw-Hill, New Delhi, India.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, 301p.
- Borowitzka, M.A. 1997. Limits to Growth. In: Wong, Y.S., Tam, N.F.Y. (Eds). Wastewater Treatment with Algae. Springer-Verlag. Berlin. pp 203-227.
- Bradley P.B., Sanderson M.P., Nejstgaard J.C., Sazhin A.F., Frischer M.E., Killberg-Thoreson LM, Verity P.G., Campbell L., Bronk D.A. 2010. Nitrogen uptake by phytoplankton and bacteria during an induced *Phaeocystis pouchetii* bloom, measured using size fractionation and flow cytometric sorting. *Aquat Microb Ecol* 61:89-104.
- Brix, H., Schierup, H.H. 1989. The use of aquatic macrophytes in water pollution control. *Ambio* 18:101-107.
- Cañizares, R.O., Domínguez, A.R., Rivas, L., Montes, M.C., Travieso, L., Benítez, F. 1993. Free and immobilized cultures of *Spirulina maxima* for swine waste treatment. *Biotechnol Lett* 15(13):321-326.

- Cedergreen Madsen, T.V. 2002. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytol* 155(2):285-292.
- Cedergreen, N., Madsen, T.V. 2004. Light regulation of root and leaf NO₃-uptake and reduction in the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytol* 161(2):449-457.
- Cheng, J.J., Stomp, A.M. 2009. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *CLEAN - Soil Air Water* 37(1):17-26.
- Craggs, R.J., Sukias, J.P., Tanner, C.T., Davies-Colley, R.J. 2004. Advanced pond system for dairy-farm effluent treatment. *NZ J Agric Res* 47:449-460.
- Culley, D.D., Epps, E.A. 1973. Use of duckweeds for waste water treatment and animal feed. *J Water Pollut Control Fed.* 45:337-347.
- Culley, D.D., Rejmankova E., Kvet, J., Frey, J.B. 1981. Production, chemical quality and use of duckweeds (*Lemnaceae*) in aquaculture, waste management, and animal feeds. *J World Maric Soc* 12:27-49.
- Duong, T.P., Tiedje, J.M. 1985. Nitrogen fixation by naturally occurring duckweed-cyanobacterial associations. *Can J Microbiol* 31:327-330.
- Dyer, I.A. y O'Mary, C.C. Engorde a corral (The Feedlot), Ed. H. Sur, 1975.
- Fernández Cirelli, A.; Miretzky, P.; Martins Alho, M. 2002. (The Feedlot) Principales problemas, parámetros físico químicos asociados y metodologías para su determinación. *En: Pérez Carrera, A.; Garaicoechea, J. y col. Aspectos ambientales de las actividades agropecuarias.* Pp. 27-90.
- Gijzen, H.J., Veenstra, S. 2000. Duckweed based wastewater treatment for rational resource recovery and reuse. *In: Olguin, E.J., Sanchez, G., Hernandez, E.J. (eds). Environmental biotechnology and clean bioprocesses.* Taylor and Francis, London. pp 83-100.
- González-Fernández C., Molinuevo-Salas B., García-González M.C. 2010. Nitrogen transformation under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium, treating pig slurry. *Bioresource Technol* (101)6: 1611-1627.
- Hammouda, O., Gaber, A., Abdel-Hameed, M.S. 1995. Assessment of the effectiveness of treatment of waste water-contaminated aquatic systems with *Lemna gibba*. *Enzyme Microb Technol* 17:317-323.
- Hein, M., Pedersen, M.F., Sand-Jensen K. 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro and microalgae. *Mar Ecol Ser* 18:27-253.
- Hickey, C.W., Quinn, J.M., Davies-Colley, R.J. 1989. Effluent characteristics of dairy shed oxidation ponds and their potential impacts on rivers. *NZ J Mar Freshwat Res* 23:569-584.
- Körner, S., Vermaat, J.E. 1998. The relative importance of *Lemna gibba* L., bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic waste water. *Water Res* 32:3651-3661.
- Körner, S., Das, S.K., Veenstra, S., Vermaat, J.E. 2001. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in waste water and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquat Bot* 71:71-81.
- Körner, S., Vermaat, J.E., Veenstra, S. 2003. The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design. *J Environ Qual* 32:1583-1590.
- Lambers, H., Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: In search for physiological causes and ecological consequences. *Adv Ecol Res* 23:187-261.
- Landolt, E., Kandeler, R. 1987. The family of *Lemnaceae* - A monographic study. Vol. 2. Stiftung Rübel 95. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH Zürich.

- Lenntech Water Treatment Solutions. 2009. Calculating the Hydraulic Retention Time (HRT) or t (tau) URL: <http://www.lenntech.com/wwtp/calculate>
- Martinez J., Dabert, P., Barrington, S., Burton, C. 2009. Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. *Bioresource Technol* 100(22):5527-36.
- Meutia, A.A. 2001. Treatment of laboratory wastewater in a tropical constructed wetland comparing surface and subsurface flow. *Water Sci Technol* (11-12):99-506.
- Mezrioui, N., Oudra, B. 1998. Dynamics of Picoplankton and Microplankton flora in the experimental wastewater stabilization ponds in the arid region of Marrakech, Morocco and cyanobacteria effect on *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* survival. In: Wong, Y.S., Tam, F.Y. (Eds). Wastewater treatment with algae. Springer-Verlag and Landes Bioscience. pp165-188.
- Morris, P.F., Barker, W.G. 1976. Oxygen transport rates through mats of *Lemna minor* and *Wolffia spec.* and oxygen tension within and below the mat. *Can J Bot* 55:1926-1932.
- Nielsen, S.L., Sand-Jensen, K. 1990. Allometric scaling of maximal photosynthetic growth rate to surface/volume ratio. *Limnol Oceanogr* 35:177-181.
- Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol Adv* 22:81-91.
- Oron, G., Porath, D., Wildschut, L.R. 1986. Waste water treatment and renovation by different duckweed species. (Reston, VA) *J Environ Eng* 112:247-263.
- Oswald, W.J. 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.) Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, pp. 305-328.
- Quinn, J.M. Hickey, C.W. 1993. Effects of sewage waste stabilization lagoons effluent on stream invertebrates. *J Aquat Ecosyst Health* 2:205-219.
- Ran, N., Agami, M., Oron, G. 2004. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel. *Water Res* 38(9):2241-2248.
- Sanderson M.P., Bronk D.A., Nejstgaard J.C., Verity P.G. Sazhin A.F., Frischen M.E. 2008. Phytoplankton and bacterial uptake of inorganic and organic nitrogen during an induced bloom of *Phaeocystis pouchetii*. *Aquat Microb Ecol* 51:153-168.
- Reddy, K.R., Smith, W.H. 1987. Aquatic plants for water treatment and resources recovery. *Magnolia*, Orlando, FL, USA.
- Shelef, 1979. Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities (UNU), (UNU), 178 pp.
- Smith, M.D. Moelyowati, I. 2001. Duckweed based wastewater treatment (DWWT): design guidelines for hot climates. *Water Sci Tech* 43(11): 291-299.
- Soeder, C.J. 2004. Water pollution and bioremediation by microalgae. Impacts of microalgae on the quality of drinking water. In: Richmond, A. (Ed). Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing. pp 448-453.
- Seoáñez, C.M., Gutiérrez, O.A. 1999. Aguas residuales. Tratamiento por humedales artificiales. Mundi-Prensa. Barcelona, España. 326 p.
- Sukias, J.P.S., Craggs, R.J., Tanner, C.C., Davies-Colley, R. J., Nagels, J.W. 2003. Combined photosynthesis and mechanical aeration for nitrification in dairy waste stabilization ponds. *Water Sci Technol* 48: 137-144.
- Sutton, D.L., Ornes, W.H. 1975. Phosphorus removal from static sewage effluent using duckweed. *J Environ Qual* 4:367-370.
- Tanner, C.C., Sukias, J.P.S. 2003. Linking pond and wetland treatment performance of

domestic and farm systems in New Zealand. *Water Sci Technol* 48:331-339.

- Travieso, L., Benítez, F., Conde J.L., Sánchez, E., Cañizares, R.O., Weiland, P., Domínguez, A.R., Dupeirón, R. 1994. Pollutants removal by immobilized microalgae cultures. International Congress and Workshop on Environmental Biotechnology, pp. 4-10.
- Uysal, Y., Zeren, O. 2004. Removal efficiencies of nutrients from wastewater treated with duckweed (*Lemna minor* L.). *Fresenius Environ Bull* 13(10): 1016-101.
- Vatta, G., Rota, R., Boniard, N., Nano, G. 1995. Dynamic modelling of waste water treatment plants based on *Lemna gibba*. *Chem Eng J* 57:37-48.
- Vermaat, J.E., Hanif, K.M. 1998. Performance of common duckweed species (*Lemnaceae*) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Res* 32:2569-2576.
- Veenstra, S., Al-Nozaily, F., Alaerts, G.J. 1995. Purple non sulphur bacteria and their influence on waste stabilization pond performance in the Yemen Republic. *Water Sci Technol* 31:141-149.
- Zimmo, O.R., Al-Saed, R.M., van der Steen, N.P., Gijzen, H.J. 2002. Performance assessment of algae-based and duckweed-based wastewater treatment systems. *Water Sci Technol* 45(1):91-101.
- Zimmo, O.R., van der Steen, N.P., Gijzen, H.J. 2004. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilization ponds. *Water Res* 38(4):913-920.
- Zirschky, J., Reed, S.C. 1988. The use of duckweed for waste water treatment. *J. Water Pollut Control Fed* 60:1253-1258.
- Zümriye Aksu. 1997. Biosorption of Heavy Metals by Microalgae in Batch and Continuous Systems. *In: Wastewater Treatment with Algae*. Eds: Wong, Y.S., Tam, N.F.Y. Springer-Verlag. Berlin. pp 37-50.