



Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Centro de Estudio de Biotecnología Industrial



Título: Fitoremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas de piscinas.

Tesis en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología
Mención Ambiental

Autor: Ing. Fernando Pérez Quintero

Tutores: Dr. C. Suyén Rodríguez Pérez
Dr. C. Yans Guardia Puebla
Dra. Florina Ramírez Vives

Santiago de Cuba, 2017

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por haberme guiado, dado la fuerza de voluntad ante las adversidades, la confianza, la determinación para seguir adelante y haber alcanzado uno de mis mayores propósitos en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Dr. C. Yans Guardia Puebla, Dr. C. Suyén Rodríguez Pérez, Dra. Florina Ramírez Vives, por su apoyo durante la preparación y elaboración de este trabajo.

A todas las personas e instituciones que de una forma u otra contribuyeron con la realización de este trabajo. Llegue el testimonio de mi más sincera gratitud.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1 Las piscinas ecológicas.....	7
II.1.1 Funcionamiento de las piscinas ecológicas.....	7
- Zona de Filtración.....	8
- Zona de aireación.....	8
II.2 Clasificación de las piscinas ecológicas.....	8
- El biotipo (Tipo 1).....	8
- Piscina ecológica con poca técnica (Tipo 2).	9
- Piscina ecológica con equipo técnico (Tipo 3).	9
- Piscinas ecológicas con mucha técnica (Tipo 4).....	10
II.4 Tratamiento de aguas residuales con humedales artificiales (HAs).....	12
II.4.1 Factores que influyen en la degradación microbiana de los HAs.....	12
- Disponibilidad de materia orgánica.....	13
- Condiciones redox y de operación.....	14
- Temperatura.....	15
- pH.....	16
- Características del medio filtrante.....	16
II.7 La presencia de vegetales en los HAs.....	17
II.7.1 Tipo de plantas utilizadas en los humedales artificiales.....	18
II.7.2 Uso de la <i>Typha domingensis</i> en la fitoremediación de aguas residuales.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
III.1 Extracción y caracterización de los materiales utilizados en el medio filtrante.....	21
III.2 Metodología de preparación y colocación del material filtrante.....	22
III.3 Recolección y preparación del agua a tratar.....	23
III.4 Biorreactores a escala de laboratorio.....	23
III.5 Recolección, siembra y aclimatación de la <i>Typha domingensis</i>	24
III.5.1 Control del crecimiento de la <i>Typha domingensis</i>	25
III.6 Procedimiento experimental.....	25

III.7 Métodos analíticos para la caracterización físico-química y microbiológica de las aguas.	26
III. 8 Diseño experimental y análisis estadístico.	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	29
IV.1 Consideraciones a tener en cuenta para la sostenibilidad de los HAs.....	30
IV.2 Caracterización físico-química y mecánica de los materiales filtrantes.....	31
IV.3 Caracterización del agua utilizada para simular el humedal artificial.	36
IV.4 Eficiencia de remoción de contaminantes en el biorreactor que simula el humedal vertical artificial de flujo subsuperficial.....	38
IV.5 Calidad microbiológica del agua tratada.....	49
IV.6 Evaluación de una biopiscina a escala real.....	53
IV. CONCLUSIONES.....	59
V. RECOMENDACIONES	61
VI. REFERENCIAS.....	62

NOMENCLATURA

COV: Carga orgánica volumétrica.

DBPs: Compuestos formados por la reacción entre los productos desinfectantes y la materia orgánica (*disinfection by-products*).

HFS: Humedal con flujo superficial.

HFSS: Humedal con flujo subsuperficial.

HFSS-H: Humedal de flujo subsuperficial horizontal

HFSS-V Humedal de flujo subsuperficial vertical

HAs: Humedales artificiales.

PEs: Piscinas ecológicas (*natural swimming pools*)

THMs: Trihalometanos.

TRH: Tiempo de retención hidráulica.

MO: Materia orgánica

PEAD: polietileno de alta densidad

RESUMEN

Los métodos de bioremediación por fitoremediación han sido muy aplicados en el tratamiento de las aguas para piscinas de usos tanto recreativos como deportivos. La modalidad más empleada de fitoremediación de las aguas de piscinas son los humedales artificiales, principalmente los de flujo vertical. En este trabajo se presenta la evaluación de un humedal artificial de flujo vertical sembrado con la planta *Typha domingensis*, para el tratamiento de aguas de piscinas a escala de laboratorio y en condiciones climáticas de la provincia de Santiago de Cuba. Se pudo demostrar que el humedal artificial construido en las condiciones climáticas de Cuba y utilizando la especie *Typha domingensis*, permite mantener en valores permisibles la contaminación orgánica y microbiológica en la biopiscina ecológica simulada y construida, cuando se aplica una carga hidráulica de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. En el tratamiento, para la zona de filtración se utilizan varias granulometrías de arena procedente de la cantera de Juraguá, cuya utilización favorece el cumplimiento de las condiciones establecidas por la norma de calidad NC-22: 1999, para el baño seguro.

ABSTRACT

The methods of bioremediation by phytoremediation have been very applied in the treatment of waters for swimming pools of both recreational and sports uses. The most used modality of phytoremediation of swimming pool waters are artificial wetlands, mainly those of vertical flow. This work presents the evaluation of an artificial vertical flow wetland planted with the *Typha domingensis*, for the treatment of swimming pool waters at laboratory scale and in climatic conditions of the province of Santiago de Cuba. It was possible to demonstrate that the artificial wetland built in the climatic conditions of Cuba and using the species *Typha domingensis*, allows to maintain in the permissible values the organic and microbiological contamination in the simulated and constructed ecological bio-pool, when a hydraulic load of $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ is applied. In the treatment, sand from the Juraguá quarry with different granulometry are used for the filtration zone, whose use favors compliance with the conditions established by the NC-22:1999 quality standard for safe bathing.

I. INTRODUCCIÓN

La natación es un deporte muy recomendado por tener efectos potencialmente benéficos sobre la salud humana y, en sentido general, sobre el bienestar personal. Un amplio sector de la población utiliza las piscinas para varias actividades dentro del ámbito atlético, recreativo o médico; pero en esos ambientes las personas están propensas a contraer varios tipos de enfermedades (WHO, 2005). Muchos tipos de microorganismos patógenos u oportunistas pueden introducirse a los humanos en las piscinas, mediante el agua o por la vía de la contaminación indirecta, los cuáles pueden provocar varias enfermedades cutáneas, gastrointestinales y respiratorias, a los bañistas (WHO, 2006). Las fuentes principales de contaminación en las piscinas están provocadas, fundamentalmente, por los propios bañistas (excreciones corporales, lociones, cosméticos, entre otros); además de las fuentes de aguas utilizadas, las cuáles pueden contener elementos trazas de algunos compuestos químicos, las reacciones entre ellos y los flujos diarios de contaminación orgánica aportada por los clientes, también influyen significativamente (Teo *et al.*, 2015).

Varias han sido las investigaciones realizadas sobre la contaminación química de las piscinas, las cuáles han sido enfocadas principalmente para su reducción en la utilización de productos desinfectantes (Zwiener *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). La prioridad fundamental del proceso de desinfección en las piscinas es mantener la calidad microbiológica del agua con el objetivo de inhibir la propagación de infecciones y enfermedades. Para compensar la demanda, comúnmente se utilizan en las piscinas altas dosis de hipoclorito para asegurar un agua libre de microorganismos (Richardson, 2010). Sin embargo, con el aumento de las concentraciones de los compuestos químicos en las aguas de las piscinas, actualmente se le ha prestado mucha atención al efecto de los mismos en los bañistas. No obstante, varios países no tienen todavía especificados los límites máximos de concentración de los compuestos químicos para la desinfección de las aguas de piscinas; pero, algunos

países como Alemania y Francia reportan niveles máximos de trihalometanos (THMs) de 20 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Florentin *et al.*, 2011).

Según Chowdhury *et al.* (2014) es necesaria la reducción de los niveles de los contaminantes químicos mediante métodos alternativos y emergentes, con el objetivo de mejorar la calidad de las aguas de piscinas.

Las piscinas naturales o biológicas son cuerpos de agua, las cuales están separadas de los cuerpos de aguas superficiales y subterráneas, por construcciones artificiales; con la característica de que no requieren de una desinfección química, por aprovechar la capacidad de recuperación de estos acuatorios y su flujo constante. Actualmente, la demanda de las piscinas naturales se ha incrementado. Éste aumento se debe a varios factores: la eliminación de compuestos clorados para la desinfección del agua; la reducción de compuestos tóxicos formados por la reacción de los desinfectantes y la materia orgánica natural denominados DBPs (del inglés *disinfection by products*); la estética característica de los lagos naturales, debido a los atractivos diseño utilizados; así como los bajos costos de construcción, operación y mantenimiento, comparado con otros métodos disponibles (Casanovas-Massana y Blanch, 2013). El uso de esta tecnología es adecuada para dar respuesta a los inconvenientes que comúnmente se presentan en las piscinas convencionales; además, tienen la característica de ser económicas, sustentables, armoniosas con el medio ambiente, y con alto valor estético y paisajístico (Arroyo *et al.*, 2015).

La fitodepuración es ampliamente utilizada para mejorar la calidad química-microbiológica de las piscinas naturales. Esta es una tecnología de tratamiento sencilla, y solo requiere de pocos equipos de bombeo para la recirculación del agua; además, en función de la modalidad de piscina, éste se puede suprimir si así es deseado. En su construcción se emplean generalmente materiales locales de construcción, los cuáles constituyen el material soporte de la zona de filtración (Littlewood, 2005).

La modalidad más empleada de fitodepuración en las piscinas naturales son los humedales artificiales (HAs), *wetlands* en inglés, los cuales consisten en áreas que se caracterizan por tener un suelo saturado de agua y una comunidad de microorganismos vivientes adaptados a la vida acuática o a un suelo saturado, en asociación con especies vegetales seleccionadas para este fin (Guittonny-Philippe *et al.*, 2014; Sultana *et al.*, 2014; Vymazal, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Actualmente, numerosos estudios se han enfocado en el diseño, desarrollo y el funcionamiento de los HAs, los cuáles han reportado que éstos son eficientes en la remoción de varios compuestos contaminantes (materia orgánica, nutrientes, elementos trazas, contaminantes farmacéuticos, patógenos, etc.) de las aguas residuales (Yalcuk y Ugurlu, 2009; Cui *et al.*, 2010; Harrington y Scholz, 2010; Saeed y Sun, 2013; Badhe *et al.*, 2014). Sin embargo, el adecuado funcionamiento y la operación sostenible de los HAs permanece siendo un reto: por un lado, los parámetros operacionales son significativos en la eficiencia de remoción del sistema (Wu *et al.*, 2014); mientras, las especies de plantas y los distintos medios soportes, también son influyentes en la eliminación de los contaminantes (Arias *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008).

La *Thypha* sp. como variedad vegetal actualmente se le ha prestado mucha atención por su utilidad en varios campos ecológicos, tales como: mejorar la calidad de las aguas en los sistemas de tratamiento (Coveney *et al.*, 2002; Schroder *et al.*, 2003; Hegazy *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013), la restauración de la diversidad de los humedales (Newman *et al.*, 1996; Boers *et al.*, 2007), la influencia de la vegetación en las emisiones de gases de efecto invernadero en los humedales (Chanton *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1993) y el reciclaje de nutrientes (Sharma *et al.*, 2006).

Varios países europeos, tales como: España, Portugal, Alemania y Suiza, cuentan con muchos años de experiencia en la aplicación de los métodos de fitodepuración con HAs para el tratamiento de agua de piscinas. Sin embargo, todavía no existe una directriz regulatoria europea para el diseño, la construcción y el manejo de las

piscinas naturales; aunque varias de ellas estén homologadas por las autoridades sanitarias competentes (Marion *et al.*, 2010). En América Latina, países como México, Brasil, Argentina y Colombia han incursionando en esta área, y actualmente varias de esas tecnologías están en fase de desarrollo y homologación (Geraldés *et al.*, 2014). En Cuba la experiencia de aplicación de la fitodepuración con HAs se ha empleado, fundamentalmente, para el tratamiento de aguas residuales urbanas (González, 2006; González-Díaz y Deas-Valdés, 2011). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado su potencialidad para el tratamiento de agua de piscinas en nuestro país.

Según los estudios realizados por Casanovas-Massana y Blanch (2013) se plantea que el sistema de depuración natural puede ser insuficiente para reducir la carga de patógenos, por lo que es necesario seguir investigando este tipo de piscinas para llegar a determinar los parámetros que garanticen un riesgo microbiológico aceptable para los usuarios.

Por las razones antes expuestas, la **problemática** a resolver con la realización de este trabajo es el siguiente: Existe la necesidad de evaluar un sistema de tratamiento para mantener una apropiada calidad del agua en las piscinas naturales a construir en la provincia Santiago de Cuba.

Por tanto, se selecciona como **objeto de investigación**: la reducción de la contaminación orgánica y microbiológica generada en las aguas de las piscinas.

Para dar solución al problema antes planteado, se propone la siguiente **hipótesis de investigación**: Si se aplica la fitoremediación a través de un humedal artificial para el tratamiento de las aguas de piscinas naturales, se podrán establecer las condiciones apropiadas de operación para proponer un sistema alternativo de tratamiento que mantenga una apropiada calidad del agua.

Objetivo general: Evaluar el uso de un humedal artificial de flujo subsuperficial vertical para el tratamiento del agua de una piscina natural de Santiago de Cuba.

Objetivos específicos.

1. Caracterizar las aguas superficiales de fuentes naturales utilizadas con fines recreativos en Santiago de Cuba.
2. Seleccionar y caracterizar las propiedades del material filtrante a utilizar en un sistema de humedal artificial.
3. Evaluar la eficiencia de desempeño de un humedal artificial, con flujo vertical, a escala de laboratorio.
4. Estudiar el efecto de los factores de operación (medio filtrante, carga hidráulica, fuente de agua, vegetación) que influyen en la eficiencia de eliminación de contaminantes en el biorreactor.
5. Probar para una mayor escala, un humedal artificial como técnica de fitodepuración para el tratamiento de las aguas de piscinas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Las piscinas ecológicas.

Las piscinas ecológicas (PEs), *natural swimming pools* - NSPs en inglés, son cuerpos de agua creado artificialmente los cuales están separados de las aguas superficiales y subterráneas; además, tienen la característica de que no precisan de productos químicos o sistemas de esterilización para desinfectar el agua, por tanto, imitan el ciclo de la naturaleza para realizar la depuración y filtración del agua, mediante tierras de diferentes granulometrías y varias plantas acuáticas (Casanovas-Massana y Blanch, 2013). Las primeras PEs fueron construidas en Austria en los inicios de la década de 1980 (Littlewood, 2005). Posteriormente, el mercado tuvo un intenso crecimiento, fundamentalmente en Europa, donde más de 20 000 piscinas se construyeron en ese continente en el año 2010. Este incremento en la demanda de las PEs se debe, fundamentalmente, a muchos aspectos: la eliminación del uso de productos químicos para desinfectar las aguas, la reducción de los DBPs, la atractiva estética natural comparada con las piscinas convencionales, los diversos diseños atractivos con bajos costos de construcción y mantenimiento, entre otras cuestiones (Arroyo *et al.*, 2015).

II.1.1 Funcionamiento de las piscinas ecológicas.

En la Figura 1 se muestra una representación general de los principales elementos que integran las PEs. En las horas diurnas, y principalmente durante el uso de la piscina, el agua recorre varias veces un ciclo cerrado por las diferentes zonas, con el empleo de una estación de bombeo, siguiendo el siguiente orden o secuencia: desde la zona de baño (5) hacia la zona de filtración (2), luego, y mediante la estación de bombeo (4), el agua se envía hasta la zona de oxigenación (3), donde se incorpora nuevamente a la zona de baño (5), y el ciclo se repite varias veces. A continuación, se realizará una breve descripción de las zonas o componentes principales que intervienen en el proceso de fitodepuración en las PEs.

- **Zona de Filtración.**

Es la principal zona para el tratamiento del agua (Figura 2a), la cual puede estar integrada a la zona de baño o estar separada en otro depósito. En esta zona ocurre la mayor remoción de las cargas contaminantes aportadas por los bañistas, mediante un proceso de fitodepuración. La zona de filtración está constituida por un lecho filtrante con diferentes granulometrías, donde se desarrollan los microorganismos, y en la cual se desarrollan las plantas acuáticas propias de los humedales. El agua procedente de la zona de baño recorre lentamente esta zona, de manera que los contaminantes microbiológicos, la turbiedad y los nutrientes, tales como el nitrógeno (N), fósforo (P), etc., son removidos de manera similar a la autodepuración natural que ocurre en las corrientes de agua superficiales, tales como ríos, lagunas o estuarios (Brotherhood, 2013; Gerald *et al.*, 2014).

- **Zona de aireación.**

La oxigenación es muy importante para el ciclo del carbono, sin el cual no es posible albergar vida en el estanque de manera prolongada. Según Brotherhood (2013), en estas zonas se puede emplear humedales artificiales de flujo libre y combinarlo con arreadores de cascadas, fuentes, para mejorar la mezcla de aire-agua y a su vez contribuir con la estética del paisaje (Figura 2b).

II.2 Clasificación de las piscinas ecológicas.

Según la Asociación de Constructores de Piscinas Biológicas Austriaca (VÖS), las PEs clasifican en cuatro tipos de sistemas: i) el biotipo (tipo 1), ii) la piscina ecológica con poca técnica (tipo 2), iii) la piscina ecológica con equipo técnico (tipo 3), y iv) la piscina ecológica con mucha técnica (tipo 4) (Littlewood, 2005). A continuación, se presentará una breve descripción de cada tipo de piscina.

- **El biotipo (Tipo 1).**

Este tipo de piscina ecológica es sencilla, donde se utiliza, aproximadamente el 70 % de la superficie del agua para la zona de regeneración. Su principal característica es la gran densidad de plantas acuáticas y subacuáticas; además no

se utiliza ningún tipo de equipamiento tecnológico, y el equilibrio biológico del sistema regula la calidad del agua.

La visibilidad del agua varía según la época del año, debido que se acumula sedimentos en el fondo por el ciclo natural de las plantas. Estas piscinas se suelen construirse con una profundidad superior a los 2 m, ya que los bañistas removerían el sedimento y, por tanto, el agua se enturbiaría. Por tal motivo, ésta debe limpiarse una a dos veces al año para eliminar el sedimento y los restos de las plantas. Es un sistema que se estabiliza biológicamente después de años de operación, pero que requiere poco trabajo en el diseño del proyecto y con un escaso coste energético (Figura 3).

- **Piscina ecológica con poca técnica (Tipo 2).**

Las piscinas ecológicas con poca técnica, son similares a las de tipo 1, ya que también se caracterizan por utilizar cerca del 70 % para la zona de regeneración. Asimismo, presentan una gran densidad de plantas acuáticas, con la diferencia fundamental de que están equipadas con una pequeña bomba para la recirculación del agua; por tanto, requieren una superficie de terreno menor (Figura 4).

- **Piscina ecológica con equipo técnico (Tipo 3).**

Es el tipo de piscina ecológica más extendida, donde aproximadamente el 30 % de la superficie total está cubierta con plantas. Las PEs tipo 3 tienen la particularidad de que tienen al menos un tamiz curso (*skimmer*), dispositivo que mantiene la superficie del agua limpia de hojas e impurezas flotantes, y una bomba que genera una corriente superficial que permite la recirculación del agua (Figura 5). La bomba mantiene su funcionamiento durante las horas diurnas, aproximadamente entre 6 y 12 horas. La superficie del agua de la piscina se mantiene limpia y la sedimentación es muy escasa, dado que se reduce la biomasa vegetal en el sistema. Por otro lado, la profundidad suele ser menor de 2 m, según las necesidades o preferencias del cliente; además, pueden utilizarse un dispositivo de limpieza automática para el sedimento.

- **Piscinas ecológicas con mucha técnica (Tipo 4).**

Las piscinas ecológicas con mucha técnica (tipo 4) presentan una zona de regeneración inferior al 40 % del total de la superficie de agua. En ellas suelen utilizarse varios materiales filtrantes, bombas y *skimmers*; por tanto, el sistema puede controlarse con facilidad y no prolifera el crecimiento de algas (Figura 6). El precio total de estos sistemas son superiores comparadas con las otras piscinas ecológicas, así como su mantenimiento. También, las bombas utilizadas suelen ser de mayor potencia.

II.3 Características microbiológicas de las piscinas biológicas.

La contaminación fecal de las aguas es el principal riesgo microbiológico en las PEs y, de forma general, en las aguas recreativas y deportivas. La contaminación fecal se debe a las heces directamente liberada por los bañistas, por las fuentes contaminadas de las aguas o la contaminación indirecta por animales. Otras secreciones humanas no fecales, son también potenciales fuentes de microorganismos patógenos (WHO, 2006).

Varios estudios han sido descritos relacionados con los brotes de algunas enfermedades en piscinas y aguas recreativas, tales como: *Shigella* spp., *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira* spp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, adenovirus, entre otros, (Hildebrand *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996; Craun *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1998; CDC, 2001; Fiorillo *et al.*, 2001; CDC, 2004; Yoder *et al.*, 2004; Sinclair *et al.*, 2009; Schets *et al.*, 2010; Tirodimos *et al.*, 2010). En mucho de los casos, las enfermedades estuvieron causados por un inadecuado sistema de desinfección del agua, los cuáles no pudieron eliminar los patógenos. Un adecuado sistema de desinfección y su fiabilidad son aspectos críticos en la calidad y seguridad microbiológica de las aguas de las piscinas. Por tanto, la ausencia de esos tratamientos en las PEs ha sido controversial en términos de riesgo a la salud humana (Casanovas-Massana y Blanch, 2013).

En Europa, el decreto 2006/7/EC, la cual regula la calidad del agua de baño en las zonas costeras y ríos, se ha adoptado como la norma de referencia para la calidad

de las PEs, considerando que las condiciones ambientales son similares a esos tipos de aguas que a las aguas de las piscinas convencionales (Anonymous, 2006).

Por otro lado, debido a la falta de regulaciones en este campo, los países europeos que cuentan con las mayores experiencias en la construcción de las PEs (Alemania, Suiza, Austria y Francia) han emitido algunas recomendaciones para la construcción y mantenimiento de estas piscinas, los cuales están adaptados a los parámetros de los sistemas cerrados de la Directiva Europea (Ofice_Fédéral_de_la_Santé_Publique, 2004; The_Landscaping_and_Landscape_Development_Research_Society, 2006; French_Agency_for_Environmental_and_Occupational_Health_Safety, 2009). De acuerdo a esas recomendaciones, los niveles máximos permisibles para la adecuada calidad de las aguas indican que las concentraciones de *E. coli* son de 100 UFC/100 ml, los *Enterococcus* inferiores a 40-50 UFC/100 ml y la *P. aeruginosa* por debajo de 10 UFC/100 ml.

Aunque el baño recreativo es el principal propósito, tanto de las piscinas biológicas como de las piscinas convencionales, son sistemas totalmente diferentes en cuanto a los parámetros límites microbiológico, sanitario, regulatorio, químico y de manejo. Las piscinas convencionales se rigen por regulaciones nacionales, los cuáles establecen que las aguas deben contener muy bajas concentraciones de coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, u otros patógenos. El uso de agua potable para las piscinas, el adecuado tratamiento de desinfección y el apropiado procedimiento de manejo, no asegura la completa eliminación de esos microorganismos (Kamihama *et al.*, 1997; Lutz y Lee, 2011).

Muchas de las PEs construidas son sistemas privados familiares para un número limitado de bañistas. En la literatura científica no se han reportado brotes de enfermedades en esas piscinas, aunque esto no refiera total confianza en este hecho. Pero con el incremento en la demanda de construcciones de las PEs, se necesitan incrementar los conocimientos en cuanto a la seguridad bacteriológica

de las piscinas biológicas, así como la capacidad de mantener la calidad sanitaria para uso público (Casanovas-Massana y Blanch, 2013).

II.4 Tratamiento de aguas residuales con humedales artificiales (HAs).

Comparado con los procesos de tratamiento de aguas convencionales, los HAs son tecnologías económicas, medioambientalmente amigables y sostenibles, debido a sus bajos costos, de fácil operación y con poco mantenimiento, los cuáles reproducen los procesos físicos, fisiológicos y biológicos de los humedales naturales (Vymazal, 2011; Meng *et al.*, 2014). Éstos sistemas han sido empleados para la remoción de contaminantes de un amplio rango de aguas residuales, tales como: industriales, domésticas y agroindustriales, e inclusive en el tratamiento de lixiviados de los rellenos sanitarios (Saeed y Sun, 2012).

El mecanismo de tratamiento en los HAs se le atribuye la convergencia de una variedad de procesos como desinfección, filtración, precipitación, adsorción, volatilización y de asimilación de nutrientes cuando las aguas residuales pasan a través de un lecho poroso, en conjunto con la acción de los varios microorganismos y plantas acuáticas (Wu *et al.*, 2015).

La mineralización de los compuestos orgánicos se realiza fundamentalmente por la acción de microorganismos aerobios y anaerobios. La remoción del nitrógeno se realiza por el metabolismo microbiano; mediante los procesos de formación de amoníaco (NH_3), la nitrificación-desnitrificación (formación y oxidación del NO_2^- a NO_3^-) y el Anammox (oxidación anaerobia del NH_4^+). También, los microorganismos juegan un importante papel en las transformaciones del sulfuro y la remoción de fósforo y metales pesados (Faulwetter *et al.*, 2009; Truu *et al.*, 2009; Knowles *et al.*, 2011; Saeed y Sun, 2012).

II.4.1 Factores que influyen en la degradación microbiana de los HAs.

Varios factores externos e internos influyen en los procesos microbianos de los HAs, entre los cuales se encuentran: disponibilidad de materia orgánica, condiciones redox, temperatura, pH, presencia de plantas y características del

medio filtrante. Una breve descripción de esos factores y la degradación microbiana se presenta a continuación.

- **Disponibilidad de materia orgánica.**

La biodegradabilidad de la MO es un factor clave en el proceso de degradación microbiano. En general, algunos compuestos orgánicos, como son los carbohidratos, lípidos, y proteínas, son inestables y fácilmente degradados; mientras que, otras materias, tales como lignina y hemicelulosa son recalcitrantes. Además, muchos haluros orgánicos, especialmente los compuestos orgánicos clorados, son propensos a ser resistentes a la biodegradación (Dordio y Carvalho, 2013). Particularmente, la nitrificación autótrofa es limitada por la fuente de C inorgánica; mientras, la nitrificación depende del C orgánico, especialmente de la fracción fácilmente degradable, presente en los HAs (Meng *et al.*, 2014).

Aunque muchos autores han reportado una alta tasa de remoción de compuestos orgánicos con el incremento de la carga orgánica (Saeed y Sun, 2012), la sobrecarga orgánica puede generar una excesiva acumulación de la MO y la producción de una serie de efectos negativos (Figura 7). Primeramente, como la MO gradualmente se acumula, se produce una oclusión de los espacios vacíos y, por tanto, se genera una reducción de la conductividad hidráulica y del volumen efectivo de la matriz del medio filtrante (Knowles *et al.*, 2011). Por esa razón, el TRH del agua residual que atraviesa el humedal se reduce, acompañado con una distribución no homogénea del agua que entra al medio, un deficiente funcionamiento de la hidráulica del sistema y/o la generación de cortocircuitos o estancamientos en la superficie del humedal (Álvarez *et al.*, 2008); además, se reduce significativamente el transporte de oxígeno y se limita el funcionamiento microbiano (Langergraber *et al.*, 2008).

Como norma general para el diseño de los HAs se recomienda una COV máxima de 20-25 gDQO m⁻² d⁻¹ para los HFSS vertical; mientras, para los HFSS horizontal se acepta una máxima COV de 6 gDBO m⁻² d⁻¹ (Knowles *et al.*, 2011).

- **Condiciones redox y de operación.**

Las condiciones de oxidación-reducción (redox) es uno de los principales factores responsables de la mineralización de la materia orgánica en los HAs; sin embargo, el rango de potencial redox es diferente para cada proceso microbiano. En general, para promover las condiciones aerobias y oxidar la MO se requieren altos potenciales redox (desde +250 hasta 700 mV), comparado con el potencial necesario para promover las condiciones anaerobias y la reducción del sulfato (+250 hasta -400 mV) (Faulwetter *et al.*, 2009). Dos factores importantes que influyen en las condiciones redox de un humedal artificial son el tipo de HAs y el modo de operación; por tanto, una descripción general de ambos elementos se discute seguidamente.

Basado en las condiciones hidrológicas del flujo, los sistemas HAs se clasifican para su operación en dos tipos: los humedales artificiales de flujo sub superficial (HFSS) y los humedales artificiales de flujo superficial (HFS) (Figura 8) (Knowles *et al.*, 2011).

Los HFS son similares a los pantanos naturales o canales, en los que la superficie del agua se encuentra expuesta a la atmósfera, los cuáles tienden a ocupar superficies poco profundas con bajas velocidades de flujos de agua que pasan a través de un medio filtrante y por las plantas emergentes están enraizadas sobre una capa de suelo.

En los HAs de flujo sub-superficial, el agua residual fluye horizontal (HFSS-H) o verticalmente (HFSS-V) a través de un lecho poroso compuesto por suelo, arena, roca o un medio filtrante artificial. La purificación de los procesos ocurre durante el contacto de la superficie del medio filtrante y los rizomas de las plantas, estableciendo una red de zonas aerobias, anóxicas y anaerobias.

Los HFSS son más efectivos que los HFS en la remoción de contaminantes, con la aplicación de una alta carga orgánica volumétrica (COV). La MO orgánica presente en el agua residual se degrada por los procesos microbianos aerobios y anaerobios, así como por la filtración y sedimentación de la MO suspendida. Debido a la saturación y la carga aplicada continua, en el lecho filtrante prevalecen

los procesos anaerobios/anóxicos, estando los procesos aerobios restringidos a pequeñas zonas cercanas a las raíces y rizomas de las plantas y a las capas superiores donde la difusión de oxígeno se produce por el contacto con la atmósfera (Vymazal, 2014). Sin embargo, la sobrecarga orgánica y el estancamiento de la zona de filtración puede reducir la eficiencia de depuración del sistema (Shutes, 2001).

Una combinación de varios tipos de HAs, conocidos como HAs híbridos, también se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales; este sistema generalmente consiste en dos etapas de varios humedales paralelos ubicados en serie (Vymazal, 2013b). También, otros tipos de sistemas, denominados humedales multi-etapas con más de 3 etapas, han sido utilizados como sistemas de tratamiento (Kadlec y Wallace, 2009). En los últimos años, además, se han realizado algunas investigaciones con el objetivo de intensificar y mejorar los procesos de remoción de contaminantes en los humedales, utilizando tecnologías artificiales de aireación (Wu *et al.*, 2014).

Los modos de operación de los HAs se clasifican en 3 categorías: continuos, en batch o lote y de flujo intermitente. La operación continua es la más simple y común técnica utilizada para alimentar un humedal. No obstante, los bajos potenciales redox resultan en una menor remoción efectiva de contaminantes que la operación en batch o intermitente, ya que existe una menor actividad de los microorganismos aerobios (Caselles-Osorio *et al.*, 2007). La alimentación en batch es un proceso secuencial donde el agua residual permanece por un período de tiempo determinado en el sistema, y luego es completamente drenada antes de que el próximo lote se aplique. Mientras, la alimentación intermitente es un procedimiento que consiste en alimentar con agua residual, en un flujo periódico y posteriormente drenada, hasta alcanzar una aireación sub-superficial y mejorar las condiciones redox (Knowles *et al.*, 2011).

- **Temperatura.**

De forma general, las altas temperaturas resultan en mayores tasas de actividad biológica y de crecimiento; mientras, las bajas temperaturas restringen la actividad

biológica y conduce a la acumulación de la MO en los HAs (Faulwetter *et al.*, 2009). La temperatura óptima para la actividad de nitrificación está entre 28-36 °C (Truu *et al.*, 2009); sin embargo, las bacterias que oxidan el amoníaco crecen más rápidamente que las bacterias que oxidan el nitrito a temperaturas por encima de 15 °C. Mientras, las bacterias nitrificantes son inhibidas cuando la temperatura es inferior a 10 °C; no obstante, su actividad se mejora cuando las temperaturas son elevadas (Faulwetter *et al.*, 2009).

- **pH.**

Los procesos microbianos son sensibles al pH en los HAs, como en cualquier otro sistema de tratamiento biológico. Generalmente, la tasa de producción heterótrofa es cercano a valores de pH neutro. El pH adecuado para las bacterias formadoras de metano y las bacterias nitrificantes se encuentra entre 6.5 – 7.5 (Saeed y Sun, 2012) y 7.0 – 8.0 (Paredes *et al.*, 2007), respectivamente. El rango de pH óptimo para la actividad de nitrificación está entre 6.0-8.0, reduciéndose a pH de 5.0 e inclusive ausente a pH inferiores de 4.0 (Vymazal, 2007). Por otro lado, el pH apropiado de las bacterias que oxidan el metano está entre 6.5-8.5 (Saeed y Sun, 2012).

- **Características del medio filtrante.**

Como un vital componente en los HAs, el medio filtrante juega un importante papel, no solo por la capacidad de absorción directa de los contaminantes, sino también para proveer las condiciones adecuadas para el desarrollo de las plantas y el crecimiento microbiano (Liu *et al.*, 2014) Las propiedades físico-químicas del medio filtrante, las cuales incluyen el tamaño de las partículas, el área superficial, la porosidad, la conductividad hidráulica, el pH, y le contenido de MO, son determinantes en la microbiología del proceso (Brix y Arias, 2005).

El tamaño de las partículas es uno de los principales parámetros que influyen en la efectividad de la filtración o retención de los sólidos suspendidos y la tasa de transferencia de masa de oxígeno. Sin embargo, un tamaño excesivamente grande de partícula no debe de emplearse pues el área superficial en las capas superiores del filtro es inadecuada para el crecimiento de la biopelícula

microbiana. Asimismo, los granos pequeños provenientes de suelo orgánico proveen una mayor área superficial para el establecimiento de la biopelícula. No obstante, los diámetros de partículas muy pequeñas tienden a estrechar el espacio entre los poros y dificultar el paso del agua (Brix y Arias, 2005).

Algunos materiales ricos en MO, tales como compost y algunos tipos de suelos, proveen una necesaria fuente de carbón que promueven los procesos bacterianos en los HAs. Los materiales porosos también contribuyen con una amplia área superficial para el desarrollo de las biopelículas, porque se incrementa el área de contacto con los contaminantes presentes en el agua residual (Dordio y Carvalho, 2013).

En la selección del medio filtrante son, también, factores muy importantes la permeabilidad hidráulica y la capacidad de absorber contaminantes. Una baja permeabilidad hidráulica puede conllevar a la obstrucción del sistema y, por tanto una baja absorción del medio, lo que afectaría a largo plazo en la eficiencia de remoción del humedal (Wang *et al.*, 2010).

Muchos son los medios filtrantes que se han utilizado en los HAs; dentro de los más utilizados se encuentran materiales naturales y artificiales, así como bioproductos industriales. Un resumen de varios de esos medios se muestra en el Anexo 1.

II.7 La presencia de vegetales en los HAs.

Las plantas juegan un importante rol en los procesos de tratamiento con humedales, no solo por la absorción de nutrientes, sino también por ser útiles en la adherencia microbiana. Varios estudios han demostrado que la densidad, la actividad y la diversidad microbiana se mejoran en los rizomas de las plantas (Brix y Arias, 2005; Faulwetter *et al.*, 2009; Kadlec y Wallace, 2009; Truu *et al.*, 2009).

La actividad enzimática derivada de exudados de las plantas, es un importante aspecto que define la condición general de las poblaciones microbianas asociadas, la cual está influenciada por la actividad y el crecimiento de las raíces en los HAs (Huang *et al.*, 2012; Korboulewsky *et al.*, 2012; Salvato *et al.*, 2012; Cui

et al., 2013). Además, las plantas emiten MO disuelta, lo cual incrementa la actividad bacteriana heterótrofa (Truu *et al.*, 2009). Como una de las máximas fuentes de carbono en los humedales, las plantas liberan debido a la caída de las hojas y ramas, entre 500-2000 gC m⁻² y algunos compuestos orgánicos, los que incluyen aminoácidos, azúcares ácidos grasos volátiles (AGV) (Meng *et al.*, 2014). Aunque, el incremento entre un 5-15 % de ésta biomasa puede dificultar la eficiencia de la nitrificación debido al incremento de material lignocelulósico refractario a la degradación microbiana (Kadlec y Wallace, 2009).

También las plantas influyen en la transferencia de oxígeno en las HAs, ya que la entrada de oxígeno depende de la transferencia directa del aire con la superficie y de la transferencia de este compuesto emitida por las plantas en su metabolismo (Kadlec y Wallace, 2009). Varias especies de plantas exhiben diferentes tasas de emisión de oxígeno en los HAs: *Typha latifolia* (1.41 mg h⁻¹ planta⁻¹), *Phragmites australis* (1.0 mg h⁻¹ planta⁻¹), *Juncus effuses* (0.69 mg h⁻¹ planta⁻¹) y *Iris pseudacorus* (0.34 mg h⁻¹ planta⁻¹) (Truu *et al.*, 2009).

II.7.1 Tipo de plantas utilizadas en los humedales artificiales.

Las plantas utilizadas en los humedales deben de poseer varias propiedades relacionadas con el proceso de tratamiento en los HAs, las cuáles son un componente esencial en el proceso de diseño del sistema. No obstante, solamente unas pocas especies de plantas se han utilizado en los HAs. Para la selección de una planta se deben de tener en cuenta varias características fundamentales: tolerancia a medios muy húmedos y a las condiciones de eutrofización, y la capacidad de absorber contaminantes, además de la adaptación a condiciones climáticas extremas (Wu *et al.*, 2014).

Las macrofitas frecuentemente usadas en los HAs incluyen plantas emergentes, sumergidas y flotantes en la superficie de agua. En la actualidad existen reportes de más de 150 especies de macrofitas que se han empleado en los humedales (Vymazal, 2013a). Dentro de las especies emergentes comúnmente usadas se encuentran: *Phragmites* spp (gramíneas o poáceas), *Typha* spp (tifáceas), *Scirpus*

spp (ciperáceas), *Iris* spp (iridáceas), *Juncus* spp (juncáceas) y *Eleocharis* spp (ciperáceas). Dentro de las plantas sumergidas frecuentemente utilizadas están: *Hydrilla verticillata*, *Ceratophyllum demersum* (ceratofiláceas), *Vallisnerianatans*, *Myriophyllum verticillatum* (milénrama de agua) y *Potamogeton crispus* (lila de agua). Mientras, dentro de la plantas se utilizan generalmente: *Nymphaea tetragona*, *Nymphoides peltata*, *Trapa bispinosa*, *Marsilea quadrifolia*, *Eichhornia crassipes*, *Salvinianatans*, *Hydrocharisdubia* y *Lemnaminor* (Wu et al., 2015).

Entre las macrofitas mencionadas anteriormente, las plantas emergentes son la principal vegetación utilizadas en los HFS y HFSS para el tratamiento de las aguas residuales. Dentro de las plantas emergentes más utilizadas, la *Phragmites australises* la especie más empleada en Europa y Asia; la *Typha latifolia* en América del Norte, la *Cyperus papyrus*, la *Scirpus validus* en Oceanía y la *P. australis*, así como la *Typha domingensis*, en América del Sur (Vymazal, 2011).

II.7.2 Uso de la *Typha domingensis* en la fitoremediación de aguas residuales.

La *Typha domingensis* es una planta macrofita emergente que crece en todas las regiones de clima tropical y templado (Anexo 2). Es una planta acuática, herbácea, enraizada, emergente y perenne, la cual puede crecer hasta 2,5 m de altura. Sus hojas igualan o exceden la altura de las espigas, la cuales están ubicadas en la parte superior de la vaina hacia la lámina; éstas son asimétricas, con epidermis ventrales con gran cantidad de glándulas mucilaginosas de color oscuro, dispuestas longitudinalmente y hacia la base de la lámina. Ésta planta crece naturalmente en tierras inundadas, pantanos, en las orillas de embalses y canales de drenaje (Gomes et al., 2013).

Aunque muchas veces esta planta ha sido considerada como una especie invasiva, ha recibido mucha atención por su utilidad en el campo ecológico, fundamentalmente en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales (Eid et al., 2012). Muchas han sido los estudios realizados con el objetivo de evaluar la productividad (Mason y Bryant, 1975; Hill, 1987), la fisiología (Fiala,

1978; Dickerman y Wetzal, 1985), la competencia con otras plantas (Weihe y Neely, 1997; Grace y Wetzal, 1998; Bellavance y Brisson, 2010) y el reciclaje de nutrientes de las aguas residuales (Garver *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988; Sharma *et al.*, 2006).

Las plantas usadas en los HAs sufren el estrés medioambiental cuando tratan varios tipos de contaminantes; las condiciones extremas pueden exceder la tolerancia de las plantas y limitar su supervivencia y potencial de tratamiento. En particular, cuando se tratan altas COV de aguas residuales o residuales con alto contenido de tóxicos contaminantes, los HAs pueden operar sosteniblemente conociendo las propiedades de las plantas empleadas. Asimismo, el estrés puede provocar un daño directo a las plantas del humedal, por ejemplo, la eutrofización puede inhibir el crecimiento, e inclusive causar la completa desaparición de la planta (Wu *et al.*, 2015). Tenido en cuenta estos aspectos, varios estudios se han realizado con el objetivo de evaluar la tolerancia de los niveles de contaminantes en la especie *Typha* tratando varios tipos de aguas residuales domésticas e industriales, esta última con altas concentraciones de metales pesados (Dunbabin *et al.*, 1988; Surrency, 1993; Abdel-Ghani *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Lominchar *et al.*, 2015; Luca *et al.*, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se exponen los materiales y metodologías utilizadas para la realización de esta investigación.

Para el desarrollo experimental del mismo se usaron materiales y equipamiento de los Laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente, y de los Laboratorios de Higiene y Epidemiología (Ministerio de Salud Pública) y de la Delegación de Recurso Hidráulico (Ministerio de Recursos Hidráulicos), del municipio de Santiago de Cuba.

III.1 Extracción y caracterización de los materiales utilizados en el medio filtrante.

Los materiales utilizados en el medio filtrante para los biorreactores HFSS-V fueron arena lavada de la cantera Juraguá y gravas procedentes de la cantera Los Guao, ambos ubicados en el municipio de Santiago de Cuba. La arena se extrajo de lotes de arena guardada en almacenes de la cantera. Se escogió un lote de este material tratado, se retiró la capa superior expuesta a la intemperie, y se tomó el material presente por debajo de esta capa. Se extrajeron 0.25 m³ de arena y se depositaron en bolsas de polietileno para su traslado. Los áridos gruesos (gravas) se extrajeron de la cantera Los Guao utilizando el mismo procedimiento de extracción utilizado anteriormente. Una pequeña parte de ambos materiales (10 kg) fueron utilizados para su caracterización.

La caracterización de los áridos se realizó en el Laboratorio de Materiales de la Construcción de la Universidad de Oriente, siguiendo la metodología especificada en las Normas Cubanas, las cuáles se referencias a continuación:

- Granulometría del árido: diámetro efectivo (D_{10}), coeficiente de uniformidad (CU), factor de forma, diámetro máximo y diámetro mínimo; según NC-178 (2002).
- Determinación de las impurezas orgánicas, según NC-185 (2002).

- Peso específico y absorción de agua, según NC-186 (2002).
- Determinación del porcentaje de huecos, según NC-177 (2002).
- Determinación del contenido de partículas de arcilla, según NC-179 (2002).

La caracterización relacionada con la composición química del material fue realizada en el laboratorio provincial de la Industria de los Materiales de la Construcción.

La dureza es la oposición que ofrecen los materiales a alteraciones como la penetración, la abrasión, el rayado, la cortadura, y las deformaciones permanentes entre otras. La dureza del material de filtrante (gravas) se determinó por el método de la escala de Mohs: el cual consiste en un ensayo de dureza basado en la resistencia que ofrece un material no metálico a ser rayado. Este método de dureza al rayado consiste en practicar una serie de rayas sobre el mineral objeto de ensayo con el filo de una serie de cuerpos de durezas diferentes. Para cuantificar la dureza, Mohs estableció una escala en la que cada mineral raya a los anteriores a él y es rayado por los que le siguen (Askeland, 2011). La escala de Mohs quedó establecida del modo siguiente: 1. Talco, 2. Yeso, 3. Calcita, 4. Fluorita, 5. Apatito, 6. Feldespato, 7. Cuarzo, 8. Topacio, 9. Corindón, 10. Diamante (Anexo 3).

El análisis del desgaste por la acción de ácidos se realizó por la metodología empleada por (González, 2006). Para ello, las gravas se pusieron en contacto directo con diferentes tipos de ácidos: ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) y ácido nítrico (HNO₃) durante 24 horas. Luego se midió el porcentaje de desgaste del material de filtrante empleado.

III.2 Metodología de preparación y colocación del material filtrante.

La arena y las gravas se lavaron con agua a temperatura ambiente antes de ser depositadas en los biorreactores. En orden ascendente, y como material filtrante, primeramente, se colocó una capa de 50 mm de grava con diámetro efectivo de 20 mm; luego ubicó una capa de 50 mm de grava con diámetro efectivo de 32 mm; y

por último se pusieron 500 mm de un lecho de arena lavada. Después de la colocación del material filtrante en cada biorreactor, se procedió a la desinfección con hipoclorito de sodio (NaHCO) diluido a 2 mg/L durante 30 minutos con el objetivo de evitar una posible contaminación bacteriana. Una vez transcurrido ese tiempo, los biorreactores fueron lavados con agua destilada estéril, para posteriormente proceder con el sembrado de la especie vegetal seleccionada en el biorreactor R1.

III.3 Recolección y preparación del agua a tratar.

Las aguas utilizadas en los experimentos de biodegradación a escala de laboratorio, para modelar un humedal vertical con flujo subsuperficial -HFSSV- fueron recolectadas de diferentes fuentes de agua superficial en el territorio de Santiago de Cuba, tales como: la cascada “Juan González”, el río Carpintero y la piscina natural de la Finca “Porvenir”, ésta última después de un día de explotación. Después de recolectada el agua, ésta fue transportada en recipientes plásticos de 20 L hasta el lugar de los experimentos.

III.4 Biorreactores a escala de laboratorio.

En la Figura 9 se muestra el esquema del sistema experimental, a escala de laboratorio, utilizada para evaluar el uso de un humedal artificial para el tratamiento de aguas de piscinas. Para el experimento, en el sistema de humedal se utilizaron dos biorreactores de tipo HFSS-V, denominados R1 y R2, con un lecho filtrante de arena y soporte de grava.

Ambos biorreactores fueron construidos con tuberías de cerámica roja con un diámetro interno de 0,1 m y altura de 1,0 m, alcanzando un área transversal de $0,0078 \text{ m}^2$ y un volumen de $0,078 \text{ m}^3$. En el interior de cada biorreactor se colocó un lecho filtrante granular en orden descendente compuesto por tres diferentes granulometrías. Primeramente, se ubicó un lecho de arena lavada con un diámetro efectivo de 0,35 mm y diámetro máximo de 4,76 mm, con aproximadamente un 32% de huecos y un coeficiente de uniformidad de 4. Mientras, el segundo lecho

filtrante consistió en una capa de grava de 50 mm, con un diámetro efectivo 20 mm (3/4”). Por otro lado, la tercera capa filtrante estuvo compuesta por una capa de grava de 50 mm con diámetro efectivo de 32 mm (1 1/4”). En Anexo 4 se muestra imagen de los biorreactores diseñados.

En el biorreactor R1 se sembraron rizomas de *Typha domingensis* como planta acuática emergente; mientras, en el biorreactor R2 no se sembró ningún tipo de vegetación. En cada uno de los biorreactores se instaló por la parte inferior de la base una tubería de PEAD, con diámetro de 6 mm y una longitud de 1,0 m, como conducto de salida y para la toma de muestras. Además, se ubicó un depósito de 20 L de capacidad, con dos mangueras de suero serológico con sus correspondientes válvulas y una para cada biorreactor, encargadas de suministrar un caudal y carga hidráulica superficial determinado de manera uniforme y constante a los biorreactores.

Durante la aclimatación (30 días) ambos biorreactores fueron regados con agua potable libre de cloro residual, a flujo continuo y uniforme durante una hora al día.

III.5 Recolecta, siembra y aclimatación de la *Typha domingensis*.

Se recolectaron varios ejemplares de *Typha domingensis* en el “Bosque de la Amistad”, lugar ubicado al lado del “Parque de los Sueños”, del municipio de Santiago de Cuba. La siembra del material vegetal en el biorreactor R1 se realizó por medio de la extracción de un rizoma de la planta recolectada. El rizoma se extrajo de la planta con el uso de una piocha (comúnmente conocido como coa o pico), mientras las hojas fueron cortadas mediante unas tijeras. Posteriormente, los restos fueron lavados con agua corriente para eliminar los restos de sustrato y desinfectados con agua oxigenada.

Después de ser sembrado el rizoma en el biorreactor R1, se mantuvo éste en un régimen de riego continuo y uniforme, durante 24 h, con agua potable libre de cloro residual. Después, el procedimiento de riego se realizó durante 1 h diaria con agua potable y agua recolectada de la cascada “Juan González” hasta que brotaron las primeras hojas de la planta. El tiempo de aclimatación se ajustó a 1

mes y luego comenzaron las evaluaciones de las respuestas a los diferentes tratamientos.

III.5.1 Control del crecimiento de la *Typha domingensis*.

Desde el momento en ocurrió el brote de las primeras hojas de la *Typha domingensis* se registró el crecimiento de las mismas, midiendo el largo y el ancho del tallo, el número de hojas y sus dimensiones. Esto permitió evaluar la adaptabilidad de la planta al medio soporte y su desarrollo vegetativo en las condiciones experimentales. El control del crecimiento de la planta se realizó en dos etapas: uno a escala de laboratorio y otro a escala piloto. En la primera etapa se determinaron la velocidad de crecimiento de la vegetación, la cantidad y el ancho de las hojas, la cobertura vegetal y el peso húmedo de cada planta en el biorreactor con vegetación; mientras, en la segunda etapa se midieron las mismas variables, pero un área superficial mayor (1 m²) con el objetivo de valorar el desarrollo de la vegetación ante a una escala mayor.

III.6 Procedimiento experimental.

Después de un período de aclimatación de 30 días, considerando éste como un tiempo necesario para el crecimiento de la vegetación en el biorreactor R1 y la formación de la biopelícula de microorganismos en el biorreactor R2, se procedió a la evaluación de las diferentes condiciones del experimento. R1, es el reactor “con vegetación” y R2 el reactor “sin vegetación”.

La alimentación de los biorreactores para cada condición experimental fue realizada durante 2 días consecutivos, una hora diaria, sustituyendo paulatinamente con el agua recolectada de las diferentes fuentes; para evaluar las diferentes condiciones operacionales. El ajuste de las cargas hidráulicas se realizó mediante el aforo volumétrico en las zonas de entrada y salida de los biorreactores. En los experimentos, la carga hidráulica superficial se evaluó a dos condiciones (0,25 y 0,5 m³ m² h⁻¹) y el caudal aplicado entre 0,002 y 0,004 m³ h⁻¹ (Tabla 1). Estos valores corresponden con los criterios de diseño para filtros

múltiples y filtros lentos de arena, utilizados como métodos de desinfección de agua (USEPA, 2000). Por otro lado, los valores de profundidad del lecho de arena se ajustaron a 0,6 m, distancia necesaria para el crecimiento del sistema radicular de la *Typha domingensis*.

Para la evaluación de la influencia de “la fuente” en la calidad microbiológica, se probaron las aguas provenientes de la cascada “Juan González”, el río Carpintero y la piscina natural de la Finca “Porvenir”; bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente.

Los experimentos se realizaron por duplicado y cada muestreo se realizó de diferentes volúmenes de llenado del reactor.

Para el escalado de los resultados obtenidos se ensayó las condiciones de operación seleccionada, en un reactor similar al R1, pero con un área superficial de 1m² (Anexo 5), con una carga hidráulica superficial de 0,25 m³ m² h⁻¹ y se hizo énfasis en el seguimiento del desarrollo de la vegetación de especies de *Typha domingensis*. Se evaluó puntualmente a escala real un humedal artificial HSS-V, aprovechando la construcción de una piscina natural de 350 m³ en el Parque de los Sueños, de Santiago de Cuba (Anexo 6).

III.7 Métodos analíticos para la caracterización físico-química y microbiológica de las aguas.

La caracterización físico-química y microbiológica de las aguas utilizadas en los experimentos, se realizó de acuerdo con las técnicas analíticas recomendadas por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters* (APHA, 1995). Para el análisis de las muestras se emplearon los laboratorios provinciales del Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos (INRH) y del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), ambos pertenecientes al municipio de Santiago de Cuba. En cada muestra fueron determinadas las concentraciones de DQO, DBO₅, nitratos, amonios y pH.

La determinación de coliformes totales y fecales se realizó en los Laboratorios de Higiene y Epidemiología del Ministerio de Salud Pública; a través de la técnica del

recuento por dilución, Número más Probable (NMP). Para la diferenciación entre Coliformes totales y fecales, se incuban durante la fermentación de la lactosa a 37 °C y 44 °C, respectivamente (McCrary, 1915).

La DBO₅, es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días. El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se han inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos (McCrary, 1915).

DQO; el procedimiento se basa en la oxidación de la materia utilizando Dicromato Potásico como oxidante en presencia de Ácido sulfúrico e iones de plata como catalizador. La disolución acuosa se calienta bajo reflujo durante 2 h a 150 °C. Luego se evalúa la cantidad del Dicromato sin reaccionar titulando con una disolución de hierro (II). La demanda química de oxígeno se calcula a partir de la diferencia entre el Dicromato añadido inicialmente y el Dicromato encontrado tras la oxidación (McCrary, 1915).

Amonio (NH₄⁺); el método se fundamenta en la medición colorimétrica de un compuesto de color azul intenso, (indo fenol) que se forma por la reacción del ión amonio con hipoclorito y fenol catalizada por una sal de manganeso, se lee a una longitud de onda de 630 nm en cubetas de 1cm de espesor (McCrary, 1915).

Nitrato (NO₃); la determinación de nitrato por el método ultravioleta se fundamenta en la absorción que tienen los iones nitratos a 220 nm. Esta técnica es utilizada para muestras que tengan bajas concentraciones de materia orgánica (McCrary, 1915).

III. 8 Diseño experimental y análisis estadístico.

Los resultados de los análisis y los gráficos fueron obtenidos a partir del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV. Para el diseño experimental se utilizó un diseño factorial, en el cual se estudian los efectos de los *i-ésimos* niveles de varios

factores cuantitativos y sus interacciones en una respuesta de interés. Las variables que representan los factores a estudiar son: carga hidráulica superficial (τ), vegetación (β), fuentes de agua superficial (γ) y las muestras evaluadas (δ); mientras, los demás parámetros del modelo caracterizan el efecto de las interacciones entre los factores antes mencionados, respectivamente.

Los niveles de los factores fueron definidos como sigue: la carga hidráulica superficial se evaluó a dos niveles (0,25 y 0,50 m s⁻¹), la vegetación a 2 condiciones (con vegetación y sin vegetación), 3 niveles de fuentes de agua que constituyen las diferentes fuentes, y la toma de muestras se realizó a dos tiempos distintos, según se muestra en la Tabla 2.

Para el análisis de los niveles de los factores se utilizó la metodología del Análisis de Varianza donde se calculó el estadígrafo F de Fisher, para un valor de probabilidad determinado ($p < 0,05$), y se comparó contra un valor tabulado, para así poder determinar las diferencias significativas entre las medias de los efectos principales y las interacciones en la tabla de análisis de varianza (ANOVA). Para los parámetros de respuesta porcentaje de remoción, se realizó un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, y de ser necesario una transformación de escala. Posteriormente, se realizó una prueba de comparación de medias *a posteriori* por el método de distancias mínimas, con la finalidad de investigar las medias que causan diferencias significativas detectadas en el ANOVA.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las piscinas constituyen de las opciones recreativas más utilizadas en países con climas tropicales como el nuestro; no obstante, la afluencia a ella de gran número de personal, pone en riesgo la calidad de sus aguas y la seguridad de este tipo de recreación. Por eso, las piscinas están a menudo asociadas con enfermedades transmitidas por el agua (Guida *et al.*, 2009).

Varios parámetros operaciones y de tratamiento, tales como la fuente de agua utilizada, el tipo de desinfectante, la temperatura y el pH, influyen en la forma de desinfección del agua de las piscinas artificiales (Teo *et al.*, 2015). La cloración es la vía más utilizada para el tratamiento de aguas de piscinas, y se conoce como un eficiente método de desinfección para aguas municipales; siendo el hipoclorito de sodio (NaClO), el hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂) y el dicloro (Cl₂), y algunos compuestos estabilizados de cloro, los más utilizados (Chowdhury *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). Pero, las piscinas para uso recreativo y deportivo generalmente tienen la característica de que presentan altas temperaturas (cercas a los 30 °C), lo que provoca una rápida descomposición del hipoclorito y, por tanto, una mayor tasa de consumo de este reactivo. Por otro lado, según Teo *et al.* (2015) los niveles de los compuestos químicos en las piscinas son mucho mayores que las utilizadas para potabilizar el agua de beber, por tanto, la exposición prolongada de los bañistas en una piscina puede afectar su salud.

Las piscinas naturales o biológicas se erigen como alternativas para la recreación y esparcimiento, que día a día ganan terreno. El uso de esta tecnología es adecuada para dar respuesta a los inconvenientes que comúnmente se presentan en las piscinas convencionales; además, tienen la característica de ser económicas, sustentables, armoniosas con el medio ambiente, y con alto valor estético y paisajístico (Arroyo *et al.*, 2015). Estas no utilizan dosificadores para productos químicos o filtros construidos con materiales especiales; asimismo, tampoco se requiere de dispositivos para el control automático del proceso (Casanovas-Massana y Blanch, 2013). La autodepuración de estos sistemas se puede lograr mediante mezclas de material filtrante, con diferentes granulometrías,

y/o el empleo de plantas como variantes de la fitoremediación; convirtiéndose en humedales artificiales - HAs.

Como tecnologías de tratamiento, los HAs se pueden construir basado en dos sistemas: los humedales con flujo superficial (*free water surface*) y con flujo subsuperficial (*sub surface flow*). Los humedales con flujo superficial (HFS) son similares a los humedales naturales, con una corriente de agua residual poco profunda que circula sobre un sustrato saturado; mientras, en los sistemas con flujo subsuperficial (HFSS), el agua residual fluye horizontalmente o verticalmente por un medio filtrante el cual permite el crecimiento de las plantas, ubicado en la dirección del flujo (Koukia *et al.*, 2009; Saeed y Sun, 2012).

En la provincia de Santiago de Cuba se realizó un levantamiento de los centros recreativos con capacidad para dar servicio de piscinas, como parte de la reanimación de la ciudad en el Plan del Verano 2015 (*Gobierno Provincial, Información personal*). Como resultado de la visita a 28 instalaciones estatales que tienen piscinas convencionales, sólo 11 están funcionando, de las cuales 8 pertenecen al sector turístico. Todas estas piscinas cuentan con tratamientos físico-químico, lo que incrementa los gastos de mantenimiento y operación para su adecuado funcionamiento. En el 2016, en la propia provincia se llevó a cabo la construcción de una piscina en ambiente natural, ejecutándose en la finca “El Porvenir”, una zona aledaña a la Gran Piedra, de tradición para los pobladores como zona de esparcimiento. Es una piscina con fines turísticos, donde el agua circula por vía natural; sin embargo, en este caso no existe un tratamiento por fitodepuración.

IV.1 Consideraciones a tener en cuenta para la sostenibilidad de los HAs.

Varios estudios han demostrado que los HAs son tecnologías de tratamiento adecuados para varios tipos de aguas residuales después de muchos años de estudios e implementación. Las actuales investigaciones indican que se han alcanzado avances en el diseño y operación de los HAs lo cual ha incrementado la eficiencia de remoción de los contaminantes, así como en la aplicación sostenible

de este sistema de tratamiento. Por ejemplo, se han alcanzado excelentes funcionamientos de HAs en el tratamiento de aguas residuales de alta carga contaminante, incluso en condiciones ambientales templadas, manejando adecuadamente la carga hidráulica y orgánica aplicada, el modo de operación y la posibilidad de una selección de plantas y medios filtrantes. No obstante, y debido al aumento de las legislaciones sobre la calidad de las aguas, todavía existen algunas limitaciones en la aplicación de los HAs; los cuáles todavía se requiere incrementar los conocimientos de investigación y desarrollo, en los aspectos críticos de esta tecnología y algunas de las consideraciones generales se resumen a continuación (Wu *et al.*, 2015):

- Las plantas y el medio filtrante son factores críticos para una adecuada remoción de contaminantes de las aguas residuales en los HAs; por esas razones, es muy importante la apropiada selección de las especies de macrofitas a usar, (*por ejemplo*: la producción de biomasa de la planta, la tasa de emisión de oxígeno y de compuestos de carbono, la tasa de remoción de metales pesados y de compuestos inorgánicos, y la tolerancia a las altas cargas de contaminantes), el efecto de varias especies de plantas en la eficiencia del sistema y el efecto de las distintas temporadas.
- El óptimo funcionamiento de los HAs depende de las condiciones ambientales, así como de las condiciones hidráulicas y de operación; por eso, conocer las condiciones óptimas de esos factores todavía demanda estudios más profundos.
- Los nutrientes y otros contaminantes asimilados por las plantas pueden ser liberados al agua cuando las plantas mueren; por tanto, se requieren adecuadas estrategias de manejo para el reciclaje de éstas en los HAs.

IV.2 Caracterización físico-química y mecánica de los materiales filtrantes.

El material filtrante en el área de fitodepuración de la piscinas biológicas cumple importantes funciones en la configuración de los humedales de flujo subsuperficial tales como: dar soporte a las plantas, permitir la adhesión de microorganismos, promover la sedimentación, adsorción, absorción, y otros mecanismos

responsables de la remoción de los contaminantes (Dordio y Carvalho, 2013; Makvana y Sharma, 2013). Esto es posible por las características del propio material utilizado como lecho filtrante, por tanto, la caracterización físico-química y mecánica del material es un paso primordial para su utilización.

Como se comentó en el capítulo anterior, la arena lavada fue extraída de la cantera Juraguá; mientras, los dos tipos de gravas seleccionados procedieron de la cantera Los Guao.

El yacimiento de Juraguá se encuentra ubicado aproximadamente a 18 Km al suroeste (SE) de la ciudad de Santiago de Cuba, vía carretera Santiago – Baconao, cuya localización se muestra en el Anexo 7, en la hoja cartográfica Siboney 5075-1 con escala 1:50000, según el Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía (ICGC). También la cantera los Guao se encuentra ubicada en la provincia de Santiago de Cuba, a 5 km al Oeste de la ciudad; el área está en explotación desde enero de 1978 y constituye la principal abastecedora de áridos en la provincia (Montes de Oca Risco y Ulloa Carcassés, 2013).

La Tabla 3 muestra el porcentaje promedio de los componentes de la arena del yacimiento de Juraguá. La caracterización de la arena lavada mostró un comportamiento homogéneo, predominando una arena de granulometría gruesa. Según la norma NC 251/05, este tipo de arena se define como natural, obtenida directamente de la desintegración natural de las rocas. Asimismo, dentro de esta clasificación se encuentra la arena cernida, resultando del cribado por la separación de las fracciones superiores a 4,76 mm; mientras, la arena beneficiada resulta de la clasificación, el lavado y la separación de los tamaños inferiores a 4,76 mm y por encima de 0,146 mm, de la arena natural.

El material que se extrae en la cantera los Guao es del tipo Porfirita (100%), de color gris verdoso, compacto y macizo en muchas partes, con visible agrietamiento natural. La resistencia a la compresión presenta valores mínimos y máximos entre 800 – 1200 kg cm², con valores de pesos volumétricos seco y saturado de 2.55 y 2.61 g cm³, respectivamente, y una absorción de 2,8%. El coeficiente de

esponjamiento está entre 1.5 a 1.8, con un grado de dureza de 6 según la escala de Mohs.

Los datos expuestos, fueron tomados del Informe Geológico de Exploración dentro de los límites del Coto Minero en el yacimiento de arena Juraguá y de la cantera los Guao.

La Tabla 4 muestra el porcentaje de desgaste de la grava de la cantera de Guao, usado como posible material soporte del lecho filtrante, después de exponerlo a la acción de diferentes ácidos de durante 24 horas. En la primera columna se exponen los ácidos y sus concentraciones, en la segunda y tercera columna el peso inicial y final, respectivamente, de las muestras de áridos grueso (soporte del filtro), antes y después de la exposición a los ácidos; también, en la cuarta columna se expone el porcentaje de desgastes después de 24 horas.

El mayor desgaste para este material fue de un 8.97 % correspondiente al ácido clorhídrico, y el menor valor, 1.71 %, con el ácido nítrico (Tabla 4). Ambos desgastes se consideran aceptables para su uso como material filtrante (USEPA, 2000; González, 2006). Éste material es bastante resistente a la acción de los ácidos y a las acciones mecánicas, debido a que son materiales granitoides, considerados como duro en un rango de 6 de la escala de Mohs. Esta característica lo hace un material adecuado para su uso como soporte de material filtrantes, por tal razón ha sido recomendado por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2000); y además, han sido utilizados en los filtros de la potabilizadora Quintero 1 y 2, ubicadas en Santiago de Cuba.

En el análisis realizado a la arena lavada de la cantera Juraguá (Tabla 3), se evidencia que contiene entre 40 – 45 % de cuarzo, la cual se considera también como duro (rango de 7 de la escala de Mohs), y es capaz de rallar los aceros comunes y es bastante resistente a la acción de los ácidos. Además, es un material muy inerte a las biopelículas adheridas y muy difícil de erosionar por la fricción o el intemperismo. Además, la arena está compuesta por otros minerales con menor dureza, tales como: feldespato (30 – 25 %) y materiales de mica (5 %),

los cuáles se disgregan, son propensos a la erosión de la intemperie, con una menor dureza (rango 3.5 – 4.0 de la escala Mohs), y reaccionan a la acción de los ácidos (Tabla 5) con mayor desgaste que el que se provoca al material proveniente de la cantera de los Guaos (Tabla 4).

No obstante, ésta arena puede utilizarse para este fin, material filtrante del humedal artificial, ya que no estará expuesta a productos químicos corrosivos (trihalometanos, ácidos haloacéticos, cloratos y tricloruro de nitrógeno, etc.) los cuáles pueden encontrar en las piscinas convencionales (Orts *et al.*, 2012; Montes de Oca-Risco y Ulloa-Carcassés, 2013). La arena lavada presentó un tamaño máximo de la muestra de 4.76 mm (tamiz #4), con un módulo promedio de finura 3.46 mm, según se muestra en el Anexo 8. Según el método propuesto por la NC-177 (2002), el porcentaje de huecos tuvo un valor promedio de 35 ± 2.5 %, el diámetro efectivo (D_{10}) de 0.21 mm, con un coeficiente de uniformidad (CU) de 4. Estos valores de diámetro efectivos y porcentaje de huecos están dentro de los propuestos para arenas y gravas utilizadas en los HFSS, según se muestra en el Anexo 9.

La arena de la cantera Juraguá es un árido que tiene la calidad para ser utilizado en la elaboración de hormigón, ya que no presenta altos contenidos altos de carbón, lignito u otras sustancias orgánicas y arcillas; pero, a su vez, cumple con los requisitos de calidad de los materiales para su uso como filtros para el tratamiento de aguas residuales (USEPA, 2000). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre el uso de este material como material filtrante en el país, el que podría sustituir la arena sílice utilizado en los filtros lentos y rápidos de arena usados en la potabilización del agua para consumo humano, previo lavado del material. También, ésta podría utilizarse en zanjas filtrantes y filtros intermitentes como tratamiento secundario en los sistemas de depuración de aguas residuales urbanas.

En los HFSS, la arena y las gravas son los principales componentes del lecho filtrante, aunque se han utilizado otros materiales naturales y artificiales (González, 2006). El diámetro de las partículas es uno de los principales parámetros que

influyen en la efectividad de la filtración o retención de los sólidos suspendidos y la tasa de transferencia de masa de oxígeno. En la práctica en medios granular los parámetros de tamaño-frecuencia que son utilizados son el diámetro efectivo (D_{10}) y el coeficiente de no uniformidad (CU) o mal llamado (de no uniformidad). Hazen escogió al percentil 10 como diámetro efectivo (hidráulicamente) porque había observado que la resistencia hidráulica en los lechos granulares principalmente en arena no estratificado, permanecía relativamente no afectado por la variación del tamaño hasta un coeficiente de uniformidad cercano a 5.

Los áridos finos como la arena; con diámetro efectivo entre 0.25 mm y 2 mm son por excelencia utilizados en la remoción de patógenos y remoción de nutrientes (Kadlec y Wallace, 2009); no obstante, tienden a estrechar el espacio entre los poros y dificultar en paso del agua y son propenso a la colmatación del filtro (Brix y Arias, 2005). Por otra parte, en los áridos gruesos (gravas) con diámetros mayores de 2 mm, permite que los poros sean más grandes y que el agua drene con facilidad, por lo cual no se taponan fácilmente (Knowles *et al.*, 2011); sin embargo, el área superficial en las capas superiores del filtro es inadecuada para el crecimiento de la biopelícula microbiana.

Existen otros materiales con diámetro similares a la arena pero con estructura porosos como la zeolitas, carbón activado, carbón antracita y otros que contribuyen con una amplia área superficial para el desarrollo de las biopelículas, porque se incrementa el área de contacto con los contaminantes presentes en el agua residual permitiendo una mayor adsorción y absorción de contaminantes (Dordio y Carvalho, 2013).

Otro factor importante es la dureza del material del lecho de filtrante, los materiales duros por encima de 6 en la escala de Mohs, son capaces de resistir las acciones físicas del cernido o al impacto inercial durante la filtración. Sin embargo, en humedales subsuperficiales se ha utilizado materiales como arcillas, obteniendo resultados buenos en la remoción de metales y microorganismos patógenos en agua residuales urbanas (González, 2006).

IV.3 Caracterización del agua utilizada para simular el humedal artificial.

Como se describe en materiales y métodos, las muestras de agua a tratar fueron recolectadas de diferentes fuentes de agua superficial en el territorio de Santiago de Cuba, en ocasiones utilizadas para fines recreativos, tales como: la cascada “Juan González”, el río Carpintero y la piscina natural de la Finca “Porvenir”, ésta última después de un día de explotación. En la Tabla 6 se observan las características de las aguas antes del tratamiento que se aplica en este estudio; lo que permite la evaluación de la capacidad de autodepuración y calidad de estos acuatorios naturales y la necesidad de un tratamiento *a priori* para los fines turísticos. Estas se compararon con los criterios de calidad reportados por la norma cubana NC-22 (1999). Las muestras M1 y M2 corresponden al agua recolectada de las distintas fuentes, para diferentes tiempos (semanas).

El resumen estadístico del conjunto de muestras se expone en la Figura 10 y se presentan a continuación: DBO₅ (valor promedio de 4.75 mg L⁻¹, desviación estándar de ±2.0); DQO (16.7 ± 6.4 mg L⁻¹); nitratos (1.7 ± 0.8 mg L⁻¹); amonio (4.6 ± 3.5 mg L⁻¹); pH (7.5 ± 0.1); coliformes totales (640 ± 753 NMP/100 mL) y coliformes fecales (342 ± 629 NMP/100 mL). Como se aprecia en dicha figura y los datos, existe amplia variabilidad en el comportamiento de parámetros químicos en dichas aguas, en dependencia del muestreo y de la afluencia de personas a dichos recursos de agua e incluso, en dependencia del caudal propio. Estos factores que influyen en la variabilidad, son difíciles de controlar bajo condiciones naturales; por lo que se requiere un sistema de autodepuración efectivo y versátil para su manejo, que además no requiera una intervención agresiva del entorno paisajístico en que se sitúan.

El pH medido estuvo en la neutralidad, entre 7 – 7,5; sólo resultando ligeramente alcalino (pH 8) en uno de los muestreos de la finca El Porvenir. Estos valores de pH favorecen el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos que soportan los procesos bioquímicos de biodegradación. La presencia de MO, de compuestos nitrogenados y de microorganismos del grupo de coliformes, se deben por lo general a la acción antrópica a la que están sometidos estos

acuatorios, pues las secreciones humanas fecales o no, son potenciales fuentes de microorganismos patógenos (Hildebrand *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996; Craun *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1998; CDC, 2001; Fiorillo *et al.*, 2001; CDC, 2004; Yoder *et al.*, 2004; WHO, 2006; Sinclair *et al.*, 2009; Schets *et al.*, 2010; Tirodimos *et al.*, 2010).

Aunque se observan bajos valores de concentración de contaminantes químicos en las aguas recolectadas, si se compara con la NC-22 (1999), no califican muchas veces por la calidad microbiológica requerida para el baño, excepto en la cascada “Juan González” la cual es un curso de agua de manantial natural, el cual corre todo el año sin interrupciones.

De forma general, existen altas concentraciones de coliformes totales en el Río Carpintero y en menor medida, en la piscina de la finca Porvenir; sobrepasando ambos los límites permitidos por la NC de referencia que refiere ≤ 200 NMP/100 mL (Tabla 6). De igual manera la presencia de coliformes fecales, alertan sobre la necesidad de un tratamiento apropiado de estas aguas para evitar afectaciones a la salud de los bañistas. Las concentraciones de coliformes, en particular los fecales, son muy variable debido a que las fuentes naturales de agua están sujetas a amplias variaciones ambientales y antrópicas; tales como, avenidas de sedimentos por fuertes lluvias, el aporte de los animales oriundos de la zona, la descarga de desechos en los asentamientos cercanos del lugar, entre otros (Tabla 6, Figura 10). Esto hace difícil mantener la calidad microbiológica mediante el uso de desinfectantes, además de las implicaciones para la salud que este proceder puede acarrear, ya mencionadas.

La remoción de microorganismos patógenos representa uno de los principales objetivos en los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Mientras, la norma cubana NC 22: 1999 que rige los parámetros y sus valores permisibles para la calidad de agua en ríos y lagunas destinados para baño y uso recreativo, establece los límites de concentración de *E. coli*, y coliformes totales y fecales por debajo de 200 NMP/100ml. También, esta norma sugiere los límites con respecto a la concentración de contaminantes básicos que

pueden contribuir al deterioro de las características organolépticas y estéticas del agua, y el riesgo de contagio de enfermedades hídricas.

Cada una de estas fuentes de aguas, fue fuente de alimentación del biorreactor simulando un humedal vertical, al que se le alimentó con un flujo subsuperficial.

IV.4 Eficiencia de remoción de contaminantes en el biorreactor que simula el humedal vertical artificial de flujo subsuperficial.

Con cada fuente de agua propuesta en el estudio, se evaluó el funcionamiento de un humedal artificial, bajo diferentes condiciones de operación; a continuación, se exponen los principales resultados.

En la Tabla 7 se muestra los resultados del análisis de varianza para el parámetro de respuesta, eficiencia de remoción de los contaminantes orgánicos; demostrando que todos los factores evaluados (carga hidráulica, vegetación) influyen en la eficiencia de remoción de DQO, DBO₅, nitratos y amonios. También se detectaron diferencias significativas entre las fuentes de agua seleccionadas (Cascada Juan González, Río Carpintero y la Piscina de la finca Porvenir), así como entre los dos muestreos realizados, como era de esperar.

En la Figura 11 se muestran las concentraciones promedio de DBO₅, DQO, nitratos y amonios, en el efluente de los biorreactores estudiados. La presencia de vegetación (R1), en todos los casos favorece la reducción de la concentración de estos compuestos nitrogenados (nitratos y amonios) o de la demanda de oxígeno, para completa oxidación de los materiales orgánicos a mineralizar (DBO, DQO). Esto refiere a la presencia de los procesos de asimilación de estos compuestos, ya sea que resultan en nutrientes para el crecimiento de la especie vegetal o por la acción de los microorganismos asociados al rizoma de esta planta, estableciendo un mecanismo simbiótico favorable para la depuración.

Nótese que las diferencias de remoción en cuanto a nitratos resultan de menor significación que los de amonio, entre R1 y R2 (Fig. 11c); por cuanto esta última es las formas más asimilables de nitrógeno por las plantas (Pester et al., 2012). Pero igualmente existen mecanismos de utilización de este compuesto por los

microorganismos. Para el amonio, la concentración mínima obtenida en el sistema con vegetación alcanzó un valor de 2.15 mg L^{-1} ; estando en todo momento dentro de los límites permisibles por las regulaciones sanitarias (NC-22, 1999).

El mecanismo de remoción del amonio propuesto en los Has, ha sido descrito anteriormente por Austin (2006), éste está dividido en dos fases. Primeramente, cuando los humedales reciben el agua a tratar, los cationes del amonio (NH_4^+) se impregnan en las superficies cargadas negativamente del medio filtrante, y luego son translocados a los rizomas de las plantas. Mientras, en otra etapa, se forman los aniones nitratos (NO_3^-) como productos de la oxidación de amonio, los cuáles a su vez son los aceptores de electrones terminales para la desnitrificación, usando el carbono orgánico del agua de alimentación. Para incrementar la remoción de amonio en éstos sistemas, mediante la nitrificación, la disponibilidad de oxígeno debe de incrementarse (Xi *et al.*, 2012).

Trabajos previos de Vaillant *et al.* (2004) describieron que el proceso de nitrificación puede afectarse por la competencia del oxígeno disponible entre las bacterias nitrificantes y los microorganismos que remueven la materia contaminante; por tal razón, la mayoría de oxígeno disponible que se transporta dentro de la planta se utiliza para la remoción de la MO biodegradable. Este efecto inhibe el establecimiento de una mayor población de bacterias nitrificantes y, como resultante, se favorece la eficiencia de remoción de DBO_5 en el sistema (Koukia *et al.*, 2009).

Las plantas juegan un importante rol en los procesos de tratamiento con humedales, no solo por la absorción de nutrientes, sino también por ser útiles en la adherencia microbiana. Los mecanismos de remoción de nitrato en los HAs están involucrados con el crecimiento de las plantas y el proceso de nitrificación. La desnitrificación es el mayor y dominante mecanismo en los humedales, especialmente cuando las cargas de nitrato en el agua residual son elevadas. Esta ocurre en las zonas anóxicas de sedimentos o en micrositos anóxicos de las biopelículas adheridas a las plantas o al medio filtrante. Por tal razón, el nitrato es

uno de los contaminantes que es eficientemente removido usando los sistemas de humedales (Cui *et al.*, 2010).

En este estudio, las concentraciones de nitrato en ambos efluentes cumplieron con la norma de calidad (NC-22, 1999). Con respecto a la remoción de nitratos, la Figura 11c muestra las concentraciones promedio obtenidas en el efluente de los biorreactores estudiados. El reactor con vegetación, para una carga hidráulica superficial de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, se mantuvo en un valor promedio de 1.4 mg L^{-1} ; mientras que para $0.5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ fue similar. No obstante, en la última semana de evaluación se alcanzaron muy bajos valores de concentración (0.915 mg L^{-1}) para la menor carga hidráulica.

El nitrógeno es un nutriente esencial para la planta, éste se remueve por la conversión del amonio o el nitrito, el cual permanece en su forma orgánica en la vegetación de los HAs; aunque una porción de éste nutriente se retorna al sistema cuando las plantas mueren y se descomponen (DeBusk, 1999).

Por otro lado, la degradación microbiana de contaminantes es un importante proceso en los HAs. La biodegradación de compuestos químicos a menudo involucra una serie de reacciones bioquímicas, y generalmente varía con los microorganismos presentes en el proceso (Vymazal, 2007; Faulwetter *et al.*, 2009).

Debido a la variedad de formas de nitrógeno existentes en los HAs, los grupos microbianos involucrados en la remoción de nitrógeno son diversos. En general, las comunidades microbianas dominantes relacionadas con la remoción de nitrógeno incluyen los grupos que oxidan el $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ a $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, los procesos de nitrificación-desnitrificación y anammox (Meng *et al.*, 2014). La oxidación del NH_3 es la primera y la etapa limitante del proceso de nitrificación, que lo convierte a nitrito en los HAs (Pester *et al.*, 2012). Por su parte el proceso anammox es una reacción anaerobia de oxidación del amonio, donde éste es convertido directamente a gas nitrógeno a partir del nitrito. Comparado con los procesos de nitrificación y desnitrificación, el proceso anammox tiene la ventaja de que no

necesita de fuentes de carbono externas y ocurre en ambientes anóxicos (Munz *et al.*, 2012; Pester *et al.*, 2012).

Mediante el paso a través de las distintas etapas de tratamiento en un sistema de HAs, los contaminantes del agua residual son degradados. La remoción de esos tipos de contaminantes (DBO₅, DQO, SS, nitratos, etc.) del agua a tratar, indican la importancia de las fases física (filtración y sedimentación), química (adsorción y precipitación) y la biológica (biodegradación y asimilación de las plantas), como mecanismos importantes que ocurren de manera sucesiva y concomitante, en un humedal. Su prevalencia depende de las condiciones que se crean en el propio biorreactor y del tiempo de tratamiento; por cuanto los procesos vegetativos son más prolongados, que los inmediatos procesos degradativos microbianos.

No obstante, en el reactor R1 y R2 al parecer se establece un equilibrio que compensa procesos de fitoremediación y degradación microbiana, además de la filtración, mostrando similar comportamiento para cada parámetro evaluado, según los muestreos en el tiempo (M1, M2) (Fig. 11, *columna a la derecha*); excepto para la DQO, por cuanto en esta se evalúan todos los procesos oxidativos y se correlaciona además con la presencia de la materia orgánica (MO), sugiriendo una valoración de la COV aplicada a cada uno.

En ese caso (Fig. 11b) la capacidad de remoción de la DQO del reactor sin vegetación -R2- se reduce casi 4 veces en la salida, siendo 2,6 % comparada con el 10 % del R1. Por otro lado, los valores aproximados de remoción de los compuestos determinados decrecen en el orden NH₄⁺ (31%) > NO₃⁻ (20%) y DBO (16%) > DQO (10%, el mayor valor); sugiriendo que la presencia de nitratos como especie más oxidada de los compuestos nitrogenados, limita su eliminación del “agua tratada” y sólo puede ser significativa si al humedal se le incorpora la fitodepuración como tratamiento.

Por su lado, la biodegradación de la materia orgánica (MO) por vía microbiana en los HAs está asociada con las bacterias heterótrofas y autótrofas, hongos y determinados protozoos (Kadlec y Wallace, 2009). Las bacterias aerobias heterótrofas oxidan los compuestos orgánicos, utilizando el oxígeno como el

aceptor final de electrones y liberan dióxido de carbono (CO_2) y otros compuestos químicos. Por otro lado, las bacterias anaerobias realizan el proceso de degradación en dos etapas: fermentación y metanogénesis, liberando igualmente CO_2 (Faulwetter *et al.*, 2009; Truu *et al.*, 2009).

La remoción o el decremento de los nutrientes por el HAs parecen ser menos significativo si se compara con los resultados alcanzados de la remoción de los contaminantes orgánicos por otros sistemas de HFSS-H estudiado por González (2006) en Cuba. Resultados similares a los obtenidos en este estudio, fueron reportados por Koukia *et al.* (2009), donde evaluaron el funcionamiento de un humedal combinado HFSS-H y HFSS-V diseñado para el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Al incrementar las cargas hidráulicas aplicadas sólo se observó una afectación de la medición de la DQO y DBO_5 , siendo muy significativa en esta última (Fig. 11a), la cual se relaciona con la capacidad de oxidar la MO por vía biológica; siendo favorecida con el menor valor ensayado de carga, posiblemente por el mayor contacto de estos contaminantes con los sistemas biológicos presentes. No obstante, en todos los casos en el biorreactor con vegetación se obtuvo mejores valores de eficiencia comparados con el sistema sin vegetación, por la mayor confluencia de fenómenos biológicos asociados a esto. En la primera semana para R1, y para una carga hidráulica superficial de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ se obtuvieron valores promedios cercanos a $3.55 \text{ mg DBO}_5 \text{ L}^{-1}$, con una eficiencia de remoción de 25.7 %. Asimismo, en este sistema, para igual carga hidráulica se obtuvo una eficiencia de remoción de DQO de 16 %, con valores de concentraciones en el efluente alrededor de $14.1 \text{ mg DQO L}^{-1}$.

Para ambos biorreactores, la eficiencia de remoción fue baja si se tienen en cuenta otros sistemas de tratamientos. Sin embargo, los humedales permiten el tratamiento de aguas residuales de baja carga, menor 1.0 g L^{-1} donde algunos de esos sistemas tienen sus limitaciones (Arroyave, 2010).

Bajo el mismo contexto, algunas investigaciones han reportado en los HAs, la MO disuelta que entra al sistema es removida, primeramente, por el metabolismo

microbiano anaerobio y, posteriormente, por el metabolismo aerobio cercano a las raíces de las plantas y las capas cercanas a la superficie del lecho filtrante (Koukia *et al.*, 2009). Según Kadlec y Wallace (2009). Un humedal debe tener ambientes aireados (mediante el uso de aireadores o cascadas) para su adecuado funcionamiento, ya que la remoción de DQO y materia nitrogenada está influenciada por la disponibilidad de oxígeno para estas poblaciones.

El medio filtrante tiene una importante rol en como medio de soporte para el crecimiento de las plantas y como mecanismo de filtración y de adherencia microbiana en los humedales, pero también influyen en la capacidad de absorción del amonio (Liu *et al.*, 2014). Según estos autores, la remoción de amonio depende significativamente del medio filtrante utilizado. Esta afirmación la confirmó mediante una investigación en la cual evaluó la influencia de diferentes medios filtrantes (zeolita, arena sílice, cerámica y roca volcánica) en la dinámica de transformación del nitrógeno en HAs. En todos los sustratos, se desarrolló rápidamente una biopelícula con una suficiente disponibilidad de oxígeno, obteniendo así una alta remoción de amonio. Sin embargo, los autores les atribuyen éstos resultados a dos cuestiones: al drenaje del lecho y la capacidad de absorción del filtro.

En esta investigación se demostró la factibilidad del uso de arenas y gravas de dos canteras de Santiago de Cuba, las cuales pueden utilizarse como medios filtrantes en la construcción de HAs para el tratamiento de aguas residuales y de piscinas ecológicas (ver tópico IV.3).

Un aspecto importante que influye en la eficiencia de operación de un sistema de tratamiento con humedales es la oclusión de los espacios vacíos del lecho filtrante. Aslam *et al.* (2007) plantean que la oclusión del lecho puede evitarse si se tienen en cuenta los siguientes aspectos: el bajo contenido de MO en el agua a tratar, el eficiente pretratamiento de los sólidos antes del entrar a los HAs, y finalmente, la baja densidad de plantas por área, restringiendo la producción y acumulación de las partes muertas. Este fenómeno se produce además debido a

la acumulación y/o el crecimiento de las raíces de las plantas, lo que provoca una reducción de la disponibilidad del oxígeno (Austin, 2006).

Debe considerarse que, el uso de aguas con bajo contenido orgánico es un factor importante en prevenir la oclusión del lecho, aspecto este que ha de monitorearse. En las fuentes de aguas evaluadas la DBO₅ oscila entre 2 - 7 mg/L (Tabla 6).

Algunos investigadores han reportado que la oclusión es más severa entre los primeros 1/4 y 1/3 del sistema de filtración (Young *et al.*, 2000). De hecho, la oclusión del filtro superficial en los HFSS-V constituye uno de los principales problemas a considerar cuando se tratan aguas residuales con alta carga orgánica contaminante. La obstrucción del lecho lleva a una rápida afectación en el funcionamiento del sistema y, por tanto, la reducción del oxígeno disponible. Langergraber *et al.* (2003) plantean que el atasco del lecho puede ser contrarrestado aplicando bajas cargas hidráulicas y orgánicas al humedal o por la disposición de más lechos de reposo. Durante este período, de reposo, el material orgánico que bloquea los poros es degradado y la conductividad hidráulica se restablece.

Teniendo en cuentas las anteriores citas se sugiere que las aguas a tratar en una piscina ecológica, según estudio realizado, no rebasen una carga hidráulica superficial de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, considerando que estas son de baja carga orgánica (APHA, 1995). Esto evitará que se generen obstrucciones en el medio filtrante, haciéndolo efectivo para la limpieza y el tratamiento.

A su vez, Willis y Mitsch (1995) reportaron que cuando la planta libera las partes muertas, éstas se depositan produciendo un sedimento, lo cual reduce el oxígeno disuelto y el potencial redox, y libera fósforo como parte de los compuestos degradados en el agua. El aumento de nutrientes provoca el aumento de algas en el humedal, como otro fenómeno asociado, lo que compite con el crecimiento de otras nuevas macrofitas (Makvana y Sharma, 2013).

Por eso, la planta usada en este sistema de tratamiento, y la influencia del crecimiento de la biomasa de raíces, tiene una particular importancia en la remoción del contenido de compuestos nitrogenados, los que juegan un

importante papel en proceso. Además, ella también contribuye a la reducción de altos contenidos de MO, empleada como fuente de carbono y debido a la transferencia de oxígeno de sus raíces y rizomas, para la fijación del CO₂ que también es producido en el ecosistema (Brix y Arias, 2005).

Para la selección de una planta se deben de tener en cuenta varias características fundamentales: tolerancia a medios muy húmedos y a las condiciones de eutrofización, y la capacidad de absorber contaminantes, además de la adaptación a condiciones climáticas extremas (Wu *et al.*, 2014).

Varios estudios muestran que las especies de *Thypha* spp. tienen una alta tolerancia y elevadas capacidades de descontaminación para las aguas y suelos (Dordio *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Dordio *et al.*, 2010).

Se realizó un control del crecimiento de la *Typha domingensis* en el biorreactor R1, para lo cual se seleccionaron algunos parámetros de crecimiento de la planta: se determinaron, velocidad de crecimiento de la vegetación, cantidad y ancho de las hojas, cobertura vegetal y el peso húmedo de cada planta emergida.

Cuando se sembró el rizoma en el biorreactor R1, y al transcurrir la primera semana de operación del sistema, comenzaron los brotes de la planta. Transcurrido el primer mes, el crecimiento fue constante a razón de 0.24 m semana⁻¹ hasta alcanzar una altura de 0.95 m, con hojas de un ancho promedio de 0,006 m. Al finalizar el primer mes brotó el primer hijo, y a partir de este punto la velocidad de crecimiento de la planta principal disminuyó a razón de 0.07 m semana⁻¹; este comportamiento se mantuvo hasta el inicio del tercer mes donde ocurrió un segundo brote y con velocidades similares decrecimiento (0.09 m semana⁻¹). En este período, la planta principal alcanzó una longitud de 1.60 m, con 12 hojas y un ancho promedio de 0,011 m; de estas 5 se marchitaron al finalizar el experimento (Figura 12). Por otro lado, el primer hijo se desarrolló a una velocidad de crecimiento promedio de 0.13 m semana⁻¹, menor que la planta originaria y similar a la velocidad en la cual esta estabiliza su crecimiento después de recibir la carga orgánica inicial proveniente del agua a tratar; alcanzando una altura de 1.35 m, con 8 hojas de un ancho promedio de 0.009 m en un período de dos meses.

Al concluir el experimento, en el biorreactor R1 alimentado con las diferentes fuentes de agua estudiadas, se obtuvo una cobertura de 3 plantas, en un área de 0.025 m² del biorreactor. Según los criterios propuestos por Martin (1989), y validados por González (2000), ambos autores recomiendan que para las condiciones de humedales artificiales de flujo subsuperficial, una cobertura óptima se obtiene cuando se tienen 4 plantas por cada metro cuadrado de superficie del humedal (0.25 m² x planta); por lo que la geometría del biorreactor construido y la limitación de espacio, afectó más el desarrollo vegetativo, que su capacidad para colonizar el material soporte y filtrante.

No obstante tener una alta densidad de plantas en el biorreactor, no se observó colmatación en el filtro, y éste mantuvo la capacidad de asimilar las cargas hidráulicas impuestas de 0.25 y 0.5 m³ m⁻² h⁻¹ durante el experimento. El sistema radicular alcanzó una profundidad de 0.35 m y al finalizar el estudio, el peso húmedo de las plantas promedio (cada planta) fue de 250 ± 25 g. Tanto en la planta principal como en el primer hijo se marchitaron 8 hojas y estas no espigaron.

Por tanto, y con motivos de estudiar el comportamiento vegetativo de la *Typha domingensis* como material vegetal en HAs tratando aguas de piscinas naturales, se utilizó un segundo biorreactor de mayor escala (1 m²), con características de composición del medio filtrante similares al biorreactor R1 y se escogió como fuente del agua a tratar, la proveniente de la finca “El Porvenir” por resultar la única piscina natural (biotipo) que existe en el territorio y posiblemente en el país.

Se aplicó una carga hidráulica superficial de 0.25 m³ m⁻² h⁻¹, el de mejores resultados en el experimento anterior, funcionando como humedal durante 1 hora al día por 12 meses. Como parámetros de control se tabularon los valores de velocidad de crecimiento de la vegetación, cantidad y ancho de las hojas, cobertura vegetal y el peso húmedo de cada planta. En esta etapa, se sembraron 4 rizomas en el biorreactor para cumplir criterios de diseños anteriormente referidos por González (2000); y al transcurrir los primeros 8 días comenzaron los brotes.

Al concluir el primer mes las plantas tuvieron un crecimiento constante a razón de $0.35 \text{ m semana}^{-1}$ siendo superior al $0.24 \text{ m semana}^{-1}$ del primer experimento (Figura 12). Luego brotaron los primeros hijos en tres de las plantas iniciales, y en este punto la velocidad de crecimiento disminuyó hasta $0,05 \text{ m semana}^{-1}$; este comportamiento se mantuvo hasta el tercer mes y medio donde ocurrió el segundo brote en los cuatros plantas iniciales. A partir de ese momento, la velocidad de crecimiento disminuyó hasta valores de $0,007 \text{ m semana}^{-1}$ influenciada esta etapa por una mayor demanda de nutrientes para su crecimiento y favorecer que surjan nuevos brotes. El comportamiento de los parámetros de desarrollo vegetativo evaluados, de la *Typha domingensis*, en ambos biorreactores (R1 y el HAs), durante los tres primeros meses fueron similares.

Al concluir los 12 meses que duro el monitoreo del crecimiento en las plantas de *Typha domingensis*, estas alcanzaron la altura máxima de 1.75 m y una altura promedio de $1.65 \text{ m} > 0.95 \text{ m}$, del anterior. Cada planta sembrada inicialmente obtuvo un promedio de 6 hijos y estas no espigaron, obteniéndose una cobertura total de 20 plantas por metro cuadrado, al terminar la experimentación. Sin embargo, con la cobertura alcanzada no se observó ninguna alteración del flujo, por colmatación del filtro o por interferencia del sistema radicular de la vegetación.

Las plantas en el HAs, comparando con los resultados de R1, desarrollaron un promedio de 16 hojas, con un ancho promedio de 0.015 m, de estas se marchitaron un promedio de 5 hojas las cuales son retiradas para no incorporar material orgánico al biorreactor. Cada planta promedió un peso húmedo de $275 \pm 21 \text{ g}$ vs $250 \pm 25 \text{ g}$, respectivamente, y el sistema radicular obtuvo una longitud promedio de 0.55 m vs 0.35 m, acercándose a los valores reportados por Martin (1989). Estos resultados pueden verse favorecido por el mayor contenido de MO, medido indirectamente como DBO/DQO, y de los compuestos nitrogenados; los cuales se describen en la caracterización referida en la Tabla 6.

A modo de establecer un estudio más completo, los valores de crecimiento vegetativo obtenidos de la *Typha* en este experimento, se compararon con los valores de crecimiento vegetativo promedio de esta planta en un ambiente natural

sin contaminación. Para tal propósito, se escogió la presa Chalón, donde las plantas alcanzan una altura promedio de 1.8 m, un peso húmedo promedio de 285 ± 5 y una cobertura de 28 plantas por metro cuadrado los cuáles son similares al observado en el biorreactor HAs.

No siendo así en lugares muy contaminados por el vertimiento de agua residual urbana, como en el poblado del Caney, donde las plantas han alcanzado alturas de hasta los 2.15 m, con un ancho de hojas de 0.02 m y una cobertura promedio de 64 plantas por metro cuadrado. Por lo que el desarrollo vegetativo y la cantidad de plantas, pueden indicar el grado de contaminación presente en un acuatorio, por simple observación.

Las condiciones climáticas de Cuba son muy favorables para el crecimiento de las plantas acuáticas emergentes, tales como la *Typha domingensis*. En esta evaluación se obtuvo $5,5 \text{ kg m}^{-2}$ (55 t ha^{-1} anual) de peso húmedo aproximadamente, superiores a los obtenidos por Gomes *et al.* (2013) con fuentes de aguas más limpias. También resultan superiores a los obtenidos por Martin (1989) tratando aguas residuales en otras latitudes. Sin embargo, este valor es muy inferior a los reportados en nuestro país por González (2000), ya que éste autor reportó rendimientos de 268 t ha^{-1} anual de peso húmedo. Los bajos resultados comparados con éste autor, se atribuyen dos razones: a las características del agua que se utilizó en el experimento, la cual contenía bajas concentraciones de nutrientes y MO; y a las características del sustrato utilizado en el reactor (arena fina lavada), el cual podría no ser propicio para el desarrollo de estas las plantas, siendo los más favorables los suelos con contenidos de arcillas y materia orgánica. Esto último ha de manejarse apropiadamente, ya que puede ser contraproducente para los fines de uso y el funcionamiento del filtro/fitodepuración.

Los resultados obtenidos demuestran que la elección de *Typha domingensis* es apropiada para su uso en HAs, para la fitoremediación de las aguas de las piscinas naturales que se pretenden construir en el territorio santiaguero; ya que

está disponible en fuentes de aguas cercanas y evidencia una buena adaptación al clima, al agua y al material filtrante utilizado.

La *Thypha domingensis* es una planta acuática emergente, que crece en todas las regiones climáticas tropicales y templadas, y presenta un vigoroso crecimiento vegetativo y un perenne crecimiento rizosomal de su tallo sumergido (Eid *et al.*, 2012). No obstante, se recomienda como resultado de este trabajo, la cosecha anual de este cultivo y la poda de forma sistemática.

IV.5 Calidad microbiológica del agua tratada.

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las mediciones de coliformes totales y fecales, en función de la variación de la carga hidráulica y la fuente de procedencia del agua. Se estudiaron en 2 biorreactores de flujo vertical sub-superficial, con y sin vegetación respectivamente. El análisis de varianza para el experimento realizado mostró que todas las variables seleccionadas (carga hidráulica aplicada, fuente de procedencia) mostraron diferencias significativas, indicando que ellas influyen en la eficiencia de remoción de microorganismos en el proceso de fitodepuración; también se detectaron interacciones significativas entre ellas, Tabla 8.

No obstante, en este experimento la presencia de vegetación no mostró diferencia significativa en la remoción de coliformes totales y fecales; al menos para el tiempo que duró el tratamiento. Es probable que se requieran extender el periodo de evaluación para garantizar un estado más maduro del desarrollo de la *Typha domingensis*. Para establecerse un humedal, se requiere como mínimo de 6 meses a un año, para llegar a la madurez de la fase vegetativa que se establece, propiciando el desarrollo de mecanismo radiculares y de metabolismo de la planta, que propicia la depuración de contaminantes principalmente patógenos (Kadlec y Wallace, 2009).

Interesante es que varios estudios han demostrado que las presencia de plantas en humedales de flujo subsuperficial, permite efectos benéficos en la reducción de microorganismos patógenos (Arroyave, 2010); sin embargo, aún no es claro si esto es debido al efecto de las plantas sobre el sistema hidráulico o a otras

causas, como la presencia de exudados de antibióticos en la rizósfera, a la densidad y diversidad microbiana que se mejoran en los rizomas de las plantas que faciliten el proceso de depredación bacteriana, entre otras (Brix y Arias, 2005; Faulwetter *et al.*, 2009; Kadlec y Wallace, 2009; Truu *et al.*, 2009).

Por lo que, los resultados obtenidos en este estudio y atendiendo a las variables con significación en el efecto de reducción de contaminantes (Tabla 8), pudieran considerarse relacionados principalmente con los mecanismos de adsorción-filtración y depredación, las cuales se presentan con el uso de filtros lentos de arena para la desinfección de agua para el consumo humano, los cuales están estrechamente relacionados con criterios de diseño como el medio filtrante (áridos finos) y la carga hidráulica ($0.25 - 0.5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) (Kadlec y Wallace, 2009).

La Tabla 8 muestra la relación entre los factores significativos que influyeron en la remoción de los coliformes totales y fecales. Al incrementar las cargas hidráulicas aplicadas en ambos biorreactores se observó una disminución en la eficiencia de remoción de éstos (Fig. 13a); es posible que el incremento de la carga hidráulica conlleva a una baja interacción con el medio y a su vez afectaría a largo plazo en la eficiencia de la fitodepuración.

En el reactor con vegetación, para una carga hidráulica superficial de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, en el efluente se observaron valores de coliformes totales inferiores a 8 NMP/100mL con eficiencias de remoción de 92.5 %; mientras, los coliformes fecales estuvieron valores por debajo de 13 NMP/100mL, representando una eficiencia de remoción de 90 %. Ambos valores se encuentran muy por debajo de los requeridos por la norma NC-22 (1999) para aguas con fines recreativos. La remoción de microorganismos patógenos representa uno de los principales objetivos en los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), por tanto, un sistema por fitodepuración adecuado debe ser suficiente para reducir la carga de patógenos que garantice un riesgo microbiológico aceptable para los bañistas.

Es conocida que las bacterias y hongos son responsables de la degradación de la MO; por eso, la presencia de ellas en un humedal se asocia como indicadores

microbiológicos de la calidad del agua. La materia fecal es una fuente indirecta de MO descompuesta, ya que los sólidos son solubilizados durante la degradación microbiana. De hecho, las bacterias heterotróficas asimilan la MO disuelta y los compuestos nitrogenados, tales como el amonio, el cual es necesario para la síntesis de las proteínas (Lacroix y Gregoire, 2002). El efecto de algunas plantas acuáticas en la reducción bacteriana ha sido reportada por Hamouri *et al.* (2007), los cuáles evaluaron la influencia de lechos filtrantes plantados y comprobaron las plantas son más eficientes en la remoción de coliformes fecales que los sistemas que no han sido plantados.

Las concentraciones máximas observadas en los efluentes de los biorreactores alimentados con agua de las diferentes fuentes (Figura 13b) estuvieron muy por debajo de los 100 NMP/100 mL requeridos por la norma de calidad NC-22 (1999). Los valores mínimos de remoción de 72.7 % y 50 % para coliformes totales y fecales, respectivamente, corresponden con las dos primeras semanas después del tiempo de aclimatación.

En una investigación realizada Casanovas-Massana y Blanch (2013), se caracterizaron las poblaciones microbianas asociadas a las piscinas ecológicas. Los autores evaluaron cuatro piscinas ecológicas, utilizaron técnicas microbiológicas para identificar y aislar las poblaciones microbianas a la contaminación fecal en el agua, para predecir el comportamiento de éstas comunidades durante un largo período de tiempo. Para este propósito identificaron y enumeraron las poblaciones de coliformes fecales, *E. coli*, enterococos, bacterias heterótrofas aerobias y *P. aeruginosa*. Tres de las cuatro piscinas evaluadas excedieron los límites establecidos para *E. coli* y enterococos; mientras, la concentración de *P. aeruginosa* y las bacterias heterótrofas aerobias estuvieron en un rango aceptable. Los investigadores concluyeron que la vida salvaje aledañas a las piscinas son la principal fuente de contaminación fecal. Por otro lado, ellos recomiendan la necesidad de investigar y establecer parámetros y regulaciones para aumentar la seguridad de los bañistas en estas piscinas.

Algunos estudios han mostrado que existe una significativa tendencia de agrupamiento entre las poblaciones de *E. coli* y enterococos (Wade *et al.*, 2006; Marion, 2010); sin embargo, otros autores han reportado correlaciones entre bacterias gastrointestinales y el número de bañistas, pero no se encontraron relaciones entre las bacterias gastrointestinales y las bacterias indicadoras de fecales, indicador importante entre la transmisión de bañista a bañista en las piscinas (Colford *et al.*, 2007). Por ese motivo, la relación entre el riesgo de la salud y las concentraciones de los indicadores fecales se encuentra actualmente en discusión. Asimismo, los autores comprobaron que existe suficiente evidencia que los microorganismos presentes en las piscinas ecológicas no provienen solamente del material fecal humano.

Varios autores también han comprobado estas conclusiones, de que la vida salvaje que rodea a las piscinas naturales también contribuye a la contaminación fecal de las aguas de las piscinas ecológicas (Grant *et al.*, 2001; Wither *et al.*, 2005; Edge y Hill, 2007; Wright *et al.*, 2009). No obstante, todas esas consideraciones deben de tenerse en cuenta en el diseño de una PEs, particularmente en el control de los parámetros microbiológicos.

Aunque el riesgo sanitario puede ser mayor en este tipo de piscinas, comparados con las piscinas convencionales, los indicadores de contaminación fecal permanecieron por debajo de los límites permisibles para la seguridad del bañista; lo que sugiere cierta seguridad en la implementación de estas áreas de recreación, siempre que se monitorea sistemáticamente estos indicadores.

El uso de las piscinas, tanto en ambientes convencionales como naturales, son beneficiosos tanto para la salud como para la recreación. Sin embargo, ambas presentan determinados riesgos para la seguridad para ciertos grupos de personas. Por ejemplo: los niños pasan más tiempo en las lagunas recreativas que los adultos, además están expuestos a la ingestión accidental de agua. Los individuos inmunodeprimidos son susceptibles a infecciones severas de diversos tipos (WHO, 2006). Varios son los factores que aumentan el riesgo de contraer enfermedades infecciosas en este tipo de ambiente. El tiempo de duración del

bañista con el agua influye en la exposición a los microorganismos en las aguas contaminadas. Una población alta de bañistas tiende a incrementar la transmisión de enfermedades; también, las altas temperaturas ambientales promueven el crecimiento de varios tipos de microorganismos. No obstante, Bardgett *et al.* (1999) indicaron que las temperaturas atmosféricas elevadas tienen poco efecto en las comunidades microbianas y su actividad tampoco influye en la biomasa de las raíces de las plantas o en la disponibilidad de carbono en los HAs. Los autores plantearon que cuando las temperaturas son cálidas, el crecimiento microbiano se limita principalmente cuando la disponibilidad de nutrientes en el sistema es pobre.

IV.6 Evaluación de una biopiscina a escala real.

Una vez concluido los experimentos de laboratorio, se evaluaron condiciones de operación obtenidas en una biopiscina a mayor escala y con fines recreativos. La construcción de la biopiscina formó parte de un proyecto de rehabilitación del *Parque de Los Sueños* ubicado en el municipio de Santiago de Cuba, aprobado por la dirección del Gobierno Provincial de Santiago de Cuba.

Su ejecución estuvo a cargo de la empresa UEB Agua Turquino y su diseño por el Departamento Técnico de la Oficina del Conservador de la Ciudad, de conjunto con profesores de la Facultad de Construcciones de la Universidad de Oriente, donde el autor es parte de este colectivo.

Esta piscina es la única de su tipo en el país, se considera según la clasificación dada por Littlewood (2005) del Tipo II, con capacidad para 150 niños. La zona de baño ocupa un área de 350 m² y una profundidad promedio de 0.7 m. El área destinada para la fitodepuración es de 120 m², sembradas con *Typha domingensis*, sobre un lecho filtrante con características de operación similares al biorreactor R1. Después de estar terminada la piscina se decidió realizar una comprobación para evaluar la estanqueidad del depósito y la acción del medio filtrante. En el Anexo 6 se muestra una imagen de la piscina.

No obstante, por situaciones de tiempo para concluir esta investigación, no se esperó que se completara el desarrollo de la vegetación, pues se habían

sembrado recientemente los rizomas de las *Typha domingensis*. Por lo que se validó el arranque de dicha piscina, tomando como referencia para monitoreo uno de los días de mayor afluencia de público.

La prueba se realizó en dos sesiones: un primer horario de apertura, entre las 10:00 am y las 12:00 pm con 250 niños; y la sección tarde en el horario comprendido entre las 2:00 pm hasta las 5:00 pm con 150 niños (Tabla 9). En la primera sección se midieron algunos parámetros, tales como: pH, transparencia y cloro libre residual. Al concluir el día se tabularon los valores de pH, transparencia, turbiedad, cloro libre residual, nitratos y amonios. Su determinación se realizó usando un paquete de kits rápidos (Medidor portátil multiparamétrico de Calidad del Agua + GPS - HI 9829-00042).

En la sesión matutina, el pH tuvo un valor promedio de 7.5; mientras, en la sesión tarde el valor promedio se incrementó hasta un valor de 7.74 (Tabla 10). Ambos parámetros no tuvieron diferencia significativa, que decidiera tomar medidas correctivas, además los valores estuvieron dentro del rango considerado como aceptable (6.5 – 8.0), establecido por la norma NC-22 (1999); por tanto, califican con la calidad requerida para un baño seguro. Estos valores de pH son menores y con tendencia a la neutralidad, comparado a los valores reportado por Geraldés y Boavida (2004), donde se estudiaron tres biopiscinas de Portugal en con el objetivo de determinar el comportamiento del crecimiento de las comunidades de zooplancton y algas filamentosas en tres meses diferentes del año. Según estos autores, las biopiscinas tuvieron un valor promedio de 8.77 de pH, lo cual representa un alto valor alcalino, que propicia e crecimiento de algas en los sistemas acuáticos. Estos valores igualmente son similares a los determinados durante la caracterización de diferentes sistemas de piscinas o áreas de baños naturales. De ahí la importancia del control de pH para mantener un equilibrio de la microbiota responsable de procesos de depuración, anteriormente discutidos.

El pH permanece casi constante a menos que la calidad del agua cambie debido a las influencias de tipo natural o antropogénicas, aumentando la acidez o la alcalinidad. La acidez del agua en la zona de baño puede estar condicionada a la

presencia de CO₂ y ácidos minerales fuertes. El CO₂ puede ser producido en el agua debido a la oxidación biológica de la materia orgánica. Por otra parte, el aumento de la alcalinidad de las aguas naturales se debe, principalmente, al aporte de las bases fuertes y débiles presentes en el sistema. También, el aporte de alcalinidad en las aguas naturales puede deberse a la presencia de las sales del ácido carbónico (bicarbonatos y carbonatos) y de los hidróxidos, por desbalance del proceso de alcalinización que no llega a neutralizar estas especies iónicas (Yang *et al.*, 2016).

Asimismo, el pH es un factor importante causante de irritación de piel y mucosas, así como la membrana conjuntival en las personas; por eso, mantener el pH del agua dentro del intervalo de neutralidad permite, por tanto disminuir la acción irritante sobre los bañistas (Hansen *et al.*, 2012). También el pH influye en la turbidez del agua, pues valores superiores de 8.0 conllevan a la falta de transparencia del agua en las piscinas, debido a la presencia de partículas en suspensión.

La transparencia en una piscina se le puede atribuir además a la presencia de polvo, hojas y sólidos en suspensión y sedimentados en el fondo de la piscina, por acciones naturales y antrópicas; también otros aspectos influyen, tales como el viento, la vegetación aledaña, la adición de compuestos químicos, las lluvias o el crecimiento de microalgas y fitoplancton, así como la acción de los bañistas (Orts *et al.*, 2012).

La norma cubana NC 22:1999, al igual que la NC 441:2006, establecen que una piscina presenta condiciones adecuadas de turbiedad cuando durante su tiempo de servicio, y a una profundidad de un metro, se debe observar el sumidero de fondo de la piscina o un círculo negro de un centímetro de diámetro (NC-22, 1999; NC-441, 2006) (Tabla 9).

En el monitoreo de esta biopiscina, en la sesión matutina, se cumplió con esta especificación en las 2 horas de operación; sin embargo, al finalizar la sección vespertina se detectó una disminución la visibilidad del sumidero de fondo. Ésta condición se le atribuyó a la incorporación de sólidos totales y suspendidos por la

acción antrópica de los bañistas, las cuales en esa etapa no pudieron ser completamente removidas por el sistema de fitodepuración debido a la sobrecarga del sistema y la falta de maduración del humedal.

En la biopiscina se utilizó agua procedente del acueducto San Juan, el cual presentó una concentración promedio de cloro residual libre de 1.5 mg L^{-1} , valor característico de un agua procedente del acueducto, pero inferiores a las usadas regularmente para la desinfección de las piscinas artificiales. Al concluir la evaluación de la sesión vespertina, las concentraciones de cloro disminuyeron hasta 0.25 mg L^{-1} (Tabla 9), valor muy por debajo del rango $0.4 - 1.5 \text{ mg L}^{-1}$, establecido como permisible por la NC 441:2006. Esta disminución del cloro residual libre se consideró a la acción del aumento de la temperatura del agua en la zona de baño y a la degradación de éste por efecto de la luz solar, pues las condiciones ambientales fueron favorables con cielo despejado y temperaturas superiores a los $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, propiciando un calentamiento del agua en la zona de baño.

Las concentraciones de nitrato y amonio observadas en la biopiscina piloto mostraron valores de 15.5 y 0.45 mg L^{-1} ; ambas muestras se colectaron al finalizar la sección de la tarde (Tabla 9). La concentración de nitrato cumplió con el criterio establecido por la norma NC 22:1999; mientras, el valor del amonio estuvo por encima del límite permitido. Esta norma establece que los valores límite no deben exceder las concentraciones de 20 y 0.3 mg L^{-1} , respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente, en las piscinas naturales, la remoción de nutrientes ocurre en la zona de filtración (humedal); en nuestro caso, la zona de filtración no había alcanzado la óptima maduración, capaz de asumir el incremento de las cargas de nitratos y amonio impuestas durante la explotación. Este control se deberá extender por un tiempo más prolongado, la cual permita ajustar las cargas hidráulicas aplicadas al sistema, así como una mayor maduración del humedal y el desarrollo de la vegetación.

Los compuestos nitrogenados presentes en la zona de baño de una piscina provienen principalmente de tres fuentes: procedencia del agua, el aporte de los bañistas y el uso de productos químicos para la desinfección. En general, una

piscina utiliza agua del suministro público, las cuáles puede contener precursores nitrogenados como el ácido húmico y los productos derivados de su propio tratamiento de potabilización y desinfección (fosfatos, monoclóraminas, etcétera). Asimismo, las piscinas que usan agua de origen subterráneo pueden recibir agua con concentraciones importantes de nitratos, según las características del terreno en que se originan o del uso agrícola de la tierra superficial (Geraldés *et al.*, 2014).

Otro origen se debe al aporte por los bañistas, debido a la variedad de compuestos nitrogenados se incorporan procedentes de la orina, el sudor, los aceites y lociones para protección solar, entre otros, los cuáles aportan principalmente urea, pero también amoníaco, aminoácidos y creatinina. En el caso de las piscinas convencionales, un tercer origen es el resultado del empleo de productos de tratamiento, tales como, subproductos de la desinfección (THM, cloraminas y cloratos), detergentes y limpiadores usados en el entorno, así como abonos y fitosanitarios usados en las zonas ajardinadas adyacentes (Orts *et al.*, 2012).

Las concentraciones de nitratos y amonio obtenidos a escala piloto son significativamente más elevados con respecto a los promedios reportados por (Geraldés *et al.*, 2014), el cual reportó valores de 1.12 y 0.04 mg L⁻¹, respectivamente. En este estudio el autor realizó una comparación entre tres piscinas biológicas, para tres meses diferentes del año: febrero, abril y junio. En el mismo, el autor reporta que la densidad de las algas filamentosas y fitoplancton disminuyó al alcanzar en las piscinas el equilibrio ecológico con un buen desarrollo de las plantas, junto con la aparición del zooplancton herbívoro. También, las microfitas permitieron la existencia de hábitats adecuados para el zooplancton herbívoro, por tanto, se redujo la cantidad de nutrientes y la luz disponible, reduciendo las sustancias alelopáticas, y limitando así el desarrollo de las poblaciones de fitoplancton y algunas algas filamentosas.

Se determinó la presencia de coliformes totales y fecales en muestras de la biopiscina, al final del día escogido para su monitoreo; encontrándose ambos valores por debajo de 200 NMP/100 mL, no sobrepasando los límites establecidos

por la NC-22 (1999) a pesar de la alta carga de bañistas establecidos en su diseño; estando en concordancia con la procedencia del agua, de un recurso considerado potable. Estos resultados refieren la seguridad del sistema, a pesar de aportes sistemáticos de contaminantes orgánicos, previendo una evolución favorable con la maduración de la zona vegetal del humedal artificial construido

El presente estudio sugiere que la fitodepuración realizada por los HAs para el tratamiento de las aguas contaminadas, logra una apropiada eficiencia en la remoción de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos; pues el uso de éstos sistemas en la depuración de las aguas en las biopiscinas permite alcanzar parámetros de calidad apto para un baño seguro, sin deterioro de la estética, los cuáles cumplen con los niveles establecidos por las normas cubanas.

Con esta investigación se demostró que el uso de las biopiscinas es una alternativa adecuada y sostenible para diversificar las opciones recreativas en las condiciones cubanas, promoviendo una eliminación del uso de compuestos químicos para la desinfección del agua, así como un aumento en los beneficios e impactos económicos, ambientales y sociales.

IV. CONCLUSIONES

Con el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación se llegan a las siguientes conclusiones:

- Las aguas de las tres fuentes seleccionadas por su uso con fines recreativos en Santiago de Cuba, presentan bajos valores de contaminantes orgánicos, con variabilidad en sus calidades microbiológicas, sujetas a amplias variaciones ambientales y antrópicas; las cuáles no califican muchas veces con los requisitos establecidos para la seguridad de los bañistas.
- La arena de la cantera de Juraguá y los áridos de la cantera Los Guao, cumplen con los requisitos de calidad para su uso como medios filtrantes para el tratamiento de aguas/aguas residuales, por tanto, presentan condiciones adecuadas como medio soporte para el crecimiento de las plantas y como mecanismo de filtración y de adherencia microbiana en humedales artificiales.
- La remoción de contaminantes orgánicos en los humedales artificiales ensayados, depende significativamente de la carga hidráulica aplicada al sistema y de la presencia o no de vegetación, y el poder depurativo del sistema permite obtener valores de concentración permisibles por normativas que cumplen con la calidad del baño en las biopiscinas.
- En la zona de fitodepuración del humedal artificial subsuperficial se alcanzan eficiencias de remoción de coliformes fecales y totales superiores al 90 %, y hasta 25.7 % de remoción de la DBO₅, cuando se aplica una adecuada carga hidráulica $< 0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; donde las concentraciones máximas observadas de estos parámetros en su efluente, estuvieron muy por debajo de los límites requeridos por la norma de calidad NC-22:1999 y sugiriendo múltiples oxidaciones por vía biológica.
- La elección de *Typha domingensis* es apropiada para su uso en humedales artificiales construidas en las condiciones climáticas de Cuba, con marcos de plantación de 4 plantas x m², por períodos de manejo de cosechas anuales y podas sistemáticas.

- Un humedal artificial construido en las condiciones climáticas de Cuba y utilizando la especie *Typha domingensis* permite mantener en valores permisibles la contaminación orgánica y microbiológica en la biopiscina simulada y construida, cuando se aplica una carga hidráulica de $0.25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y en la zona de depuración se utilizan varias granulometrías de arena procedente de la cantera de Juraguá, cumpliendo con las condiciones establecidas para el baño seguro.

V. RECOMENDACIONES

La temática abordada es novedosa, no se encontraron reportes de investigaciones similares en Cuba, por lo que se proponen las siguientes recomendaciones.

- Evaluar el efecto depurador, principalmente en la remoción de patógenos de un humedal artificial subsuperficial con valores de cargas hidráulicas superficial y tiempo de retención hidráulica mayores que los utilizados en este estudio.
- Determinar el aporte per cápita de nutrientes por los bañistas en el bazo de una piscina biológica y los valores de área de zona de baño requerida para un bañista.
- Medir la biomasa en la raíz y las partes aéreas de las coberturas vegetales logradas para correlacionar con la remoción de nutrientes u otros compuestos presentes en las aguas; y, así mismo, relacionar con otros parámetros de interés.
- Continuar las investigaciones sobre el diseño de estas variantes de piscinas y su metodología de construcción, lo cual permita ampliar las zonas de recreación para la población citadina de nuestro país.
- Escribir un Manual de Operaciones para la Piscina construida en el parque de Los Sueños de Santiago de Cuba, para el respeto de la disciplina tecnológica del personal encargado de su trabajo.

VI. REFERENCIAS

- ABDEL-GHANI, N. T.; HEGAZY, A. K.; EL-CHAGHABY, G. A. y LIMA, E. C.: "Factorial experimental design for biosorption of iron and zinc using *Typha domingensis* phytomass", *Desalination*, 249: 343-347, 2009.
- ÁLVAREZ, J. A.; RUÍZ, I. y SOTO, M.: "Anaerobic digesters as a pretreatment for constructed wetlands", *Ecological Engineering*, 33(54-67): 2008.
- ANONYMOUS: Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC., pp. 37-51. 2006.
- APHA: *Standard methods for examination of water and wastewater*, American Public Health Association (APHA-AWWA-WEF), 19th ed. Washington D.C., USA., pp., 1995.
- ARIAS, C. A.; DEL_BUBBA, M. y BRIX, H.: "Phosphorus removal by sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds", *Water Research*, 35: 1159-1168, 2001.
- ARROYAVE, A.: *Efectos del tipo de vegetación y de las variaciones de profundidad en la eficiencia de remoción de patógenos en humedales construidos de flujo subsuperficial*, Tesis de Maestría, Unversidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales, Brasil, Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2115/333918A779.pdf>, 2010.
- ARROYO, P.; SÁENZ_DE_MIERA, L. y ANSOLA, G.: "Influence of environmental variables on the structure and composition of soil bacterial communities in natural and constructed wetlands", *Science of the Total Environment*, 506-507: 380-390, 2015.
- ASKELAND, R.: *Ciencia e ingeniería de materiales*, Cengage Learning, México D. F., pp. 223-226, 2011.
- ASLAM, M. M.; MURTAZA, M.; BAIGA, M. A.; QAZI, I. A. y JAVED, I.: "Treatment performances of compostbased and gravel-based vertical flow wetlands operated identically for refinery wastewater treatment in Pakistan", *Ecological Engineering*, 30: 34-42, 2007.
- AUSTIN, D.: "Influence of cation exchange capacity (CEC) in a tidal flow, flood and drain wastewater treatment wetland", *Ecological Engineering*, 28: 35-43, 2006.
- BADHE, N.; SAHA, S.; BISWAS, R. y NANDY, T.: "Role of algal biofilm in improving the performance of free surface, up-flow constructed wetland", *Bioresource Technology*, 169: 596-604, 2014.
- BARDGETT, R. D.; KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; HOBBS, P. J.; BEZEMER, T. M.; JONES, T. H. y THOMPSON, L. J.: " Below-ground microbial community development in a high temperature world", *Oikos*, 85: 193-203, 1999.
- BELLAVANCE, M. E. y BRISSON, J.: "Spatial dynamics and morphological plasticity of common reed (*Phragmites australis*) and cattails (*Typha* sp.) in

- freshwater marshes and roadside ditches", *Aquatic Botany*, 93: 129-134, 2010.
- BOERS, A. M.; VELTMAN, R. L. D. y ZEDLER, J. B.: "Typhaxglauca dominance and extended hydroperiod constrain restoration of wetland diversity", *Ecological Engineering*, 29: 232-244, 2007.
- BRIX, H. y ARIAS, C. A.: "Danish guidelines for small-scale constructed wetland system for onsite treatment of domestic sewage", *Water Science & Technology*, 51: 1-9, 2005.
- BROTHERHOOD, M.: A viabilidade da implantação de piscinas biológicas no Brasil. Memórias de IX Congresso Nacional de Excelencia Em Gestão, 2013, pp., Rio de Janeiro, Brasil. 2013.
- CASANOVAS-MASSANA, A. y BLANCH, A. R.: "Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216: 132-137, 2013.
- CASELLES-OSORIO, A.; PUIGAGUT, J.; SEGU, E.; VAELLO, N.; GRANES, F.; GARCÍA, D. y GARCÍA, J.: "Solid accumulation in six full-scale subsurface flow constructed wetlands", *Water Research*, 41: 1388-1389, 2007.
- CDC: *Shigellosis outbreak associated with an unchlorinated fill-and-drain wading pool* MMWR, Iowa, 797-800.pp. 2001.
- CDC: *An outbreak of norovirus gastroenteritis at a swimming club* MMWR, Vermont, 793-795pp. 2004.
- COLFORD, J.; WADE, T. J.; SCHIFF, K. C.; WRIGHT, C. C.; GRIFFITH, J. F.; SANDHU, S. K.; BURNS, S.; SOBSEY, M.; LOVELACE, G. y WEISBERG, S. B.: "Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination", *Epidemiology*, 18: 27-35, 2007.
- COVENEY, M. F.; STITES, D. L.; LOWE, E. F.; BATTOE, L. E. y CONROW, R.: "Nutrient removal from eutrophic lake by wetland filtration", *Ecological Engineering*, 19: 141-159, 2002.
- CRAUN, G. F.; BERGER, P. S. y CALDERON, R. L.: "Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks", *Journal of American Water Works Association*, 99: 96-104, 1997.
- CUI, L.; OUYANG, Y.; LOU, Q.; YANG, F.; CHEN, Y.; ZHU, W. y LUO, S.: "Removal of nutrients from wastewater with *Canna indica* L. under different vertical-flow constructed wetland conditions.", *Ecological Engineering*, 36: 1083-1088, 2010.
- CUI, L. H.; OUYANG, Y.; GU, W. J.; YANG, W. Z. y XU, Q. L.: "Evaluation of nutrient removal efficiency and microbial enzyme activity in a baffled subsurface-flow constructed wetland system", *Bioresource Technology*, 146: 656-662, 2013.
- CHANTON, J. P.; WHITING, G. J.; HAPPELL, J. D. y GERARD, G.: "Contrasting rates and diurnal patterns of methane emission from emergent aquatic macrophytes", *Aquatic Botany*, 46: 111-128, 1993.
- CHEN, Y.; HONG, X.; HE, H.; LUO, H.; QIAN, T.; LI, R.; JIANG, H. y YU, H.: "Biosorption of Cr (VI) by *Typha angustifolia*: mechanism and responses to heavy metal stress", *Bioresource Technology*, 160: 89-92, 2014.

- CHOWDHURY, S.; AL-HOOSHANI, K. y KARANFIL, T.: "Disinfection by-products in swimming pool: occurrences, implications and future needs", *Water Research*, 53: 68-109, 2014.
- DEBUSK, W. F.: *Wastewater Treatment Wetlands: Applications and Treatment Efficiency* University of Florida, Soil and Water Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, 1999.
- DICKERMAN, J. A. y WETZEL, R. G.: "Clonal growth in *Typha latifolia*: Population dynamics and demography of the ramets", *Journal of Ecology*, 73: 535-552, 1985.
- DORDIO, A.; CARVALHO, A. J. P.; TEIXEIRA, D. M.; DIAS, C. B. y PINTO, A. P.: "Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA", *Bioresource Technology*, 101: 886-892, 2010.
- DORDIO, A. V. y CARVALHO, A. J. P.: "Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix", *Journal of Hazardous Materials*, 252-253: 272-292, 2013.
- DORDIO, A. V.; DUARTE, C.; BARREIROS, M.; CARVALHO, A. J. P.; PINTO, A. P. y DA_COSTA, C. T.: "Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha* spp. – potential use for phytoremediation?", *Bioresource Technology*, 100: 1156-1161, 2009.
- DUNBABIN, J.; POKORNY, J. y BOWMER, K.: "Rhizosphere oxygenation by *typha domingensis* pers. in miniature artificial wetland filters used for metal removal from wastewaters", *Aquatic Botany*, 29: 303-317, 1988.
- EDGE, T. A. y HILL, S.: "Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario", *Water Research*, 41: 3585-3594, 2007.
- EID, E. M.; SHALTOUT, K. H. y ASAEDA, T.: "Modeling growth dynamics of *Typha domingensis* (Pers.) Poir. ex Steud. in Lake Burullus, Egypt", *Ecological Engineering*, 243: 63-72, 2012.
- FAULWETTER, J. L.; GAGNON, V.; SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M. D.; BRISSON, J.; CAMPER, A. K. y STEIN, O. R.: "Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review", *Ecological Engineering*, 35: 987-1004, 2009.
- FIALA, K.: "Underground organs of *Typha angustifolia* and *Typha latifolia*, their growth, propagation and production", *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno*, 12: 1-43, 1978.
- FIORILLO, L.; ZUCKER, M.; SAWYER, D. y LIN, A. N.: "The *Pseudomonas* hot-foot syndrome", *N. Engl. Journal Medical*, 345: 335-338, 2001.
- FLORENTIN, A.; HAUTEMANIÈRE, A. y HARTEMANN, P.: "Health effects of disinfection by-products in chlorinated swimming pools", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6): 461-469, 2011.
- FRENCH_AGENCY_FOR_ENVIRONMENTAL_AND_OCCUPATIONAL_HEALTH _SAFETY: Opinion: Concerning the assessment of health risks from artificial bathing waters 2006/SA/011.: French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, pp. 2009.

- GARVER; E.G., D., D.R., PRATT, D.C., 1988. SEASONAL PATTERNS IN ACCUMULATION AND; PARTITIONING OF BIOMASS AND MACRONUTRIENTS IN TYPHA SPP. *AQUATIC BOTANY* 32 y 115–127.: "Seasonal patterns in accumulation and partitioning of biomass and macronutrients in Typha spp.", *Aquatic Botany*, 32: 115-127, 1988.
- GERALDES, A. M. y BOAVIDA, M. J.: "How important are emergent macrophytes to crustacean zooplankton in a meso-eutrophic reservoir?", *Limnetica*, 23: 57-64, 2004.
- GERALDES, A. M.; SCHWARZER, C. y SCHWARZER, U.: "Piscinas biológicas e serviços ecosistémicos: Que relação?", *Ciência e ambiente para todos*, 5(2): 27-36, 2014.
- GOMES, M. V. T.; SOUZA, R. R. D.; TELES, V. S. y MENDES, É. A.: "Phytoremediation of water contaminated with mercury using Typha domingensis in constructed wetland", *Chemosphere*, xx: xx-xx, 2013.
- GONZÁLEZ-DÍAZ, O. y DEAS-VALDÉS, G.: "Metodología para el diseño de humedales con flujo subsuperficial horizontal", *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 32(1): 61-70, 2011.
- GONZÁLEZ, O.: *Estudio del comportamiento de humedales con flujo subsuperficial horizontal en el tratamiento de aguas residuales*, CUJAE, 2000.
- GONZÁLEZ, O.: "Remoción de nitrógeno y fósforo en humedales con flujo subsuperficial horizontal", *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 17(1): 26-31, 2006.
- GRACE, J. B. y WETZEL, R. G.: "Long-term dynamics of Typha populations", *Aquatic Botany*, 61: 137-146, 1998.
- GRANT, S. B.; SANDERS, B. F.; BOEHM, A. B.; REDMAN, J. A.; KIM, J. H.; MRSE, R. D.; CHU, A. K.; GOULDIN, M.; MCGEE, C. D.; GARDINER, N. A.; JONES, B. H.; SVEJKOVSKY, J.; LEIPZIG, G. V. y BROWN, A.: "Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surf zone water quality", *Environmental Science and Technology*, 35(2407-2416): 2001.
- GROSS, M. F.; HARDISKY, M. A.; WOLF, P. L. y KLEMAS, V.: "Relationships among Typha biomass, pore water methane, and reflectance in a Delaware (USA) brackish marsh.", *Journal of Coastal Research*, 9: 339-355, 1993.
- GUIDA, M.; GALLÈ, F.; MATTEI, M. L.; ANASTASI, D. y LIGUORI, G.: "Microbiological quality of the water of recreational and rehabilitation pools: a 2-year survey in Naples, Italy", *Public Health*, 123(6): 448-451, 2009.
- GUITTONNY-PHILIPPE, A.; MASOTTI, V.; HÖHENER, P.; BOUDENNE, J.-L.; VIGLIONE, J. y LAFFONT-SCHWOB, I.: "Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions", *Environment International*, 64: 1-16, 2014.
- HAMOURI, B. E.; NAZIH, J. y LAHJOUJ, J.: "Subsurfacehorizontal flow constructed wetland for sewage treatment under Moroccan climate conditions", *Desalination*, 215: 153-158, 2007.

- HANSEN, K. M. S.; WILLACH, S.; ANTONIOU, M. G.; MOSBÆK, H.; ALBRECHTSEN, H.-J. y ANDERSEN, H. R.: "Effect of pH on the formation of disinfection byproducts in swimming pool water - Is less THM better?", *Water Research*, 46: 6399-6409, 2012.
- HARRINGTON, C. y SCHOLZ, M.: "Assessment of pre-digested piggery wastewater treatment operations with surface flow integrated constructed wetland systems", *Bioresource Technology*, 101: 7713-7723, 2010.
- HEGAZY, A. K.; ABDEL-GHANI, N. T. y EL-CHAGHABY, G. A.: "Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*", *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8: 639-648, 2011.
- HILDEBRAND, J. M.; MAGUIRE, H. C.; HOLLIMAN, R. E. y KANGESU, E.: "An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to paddling pools", *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.*, 6(2): 33-36, 1996.
- HILL, B. H.: "Typha productivity in a Texas pond: Implications for energy and nutrient dynamics in freshwater wetlands", *Aquatic Botany*, 27: 385-394, 1987.
- HUANG, L.; GAO, X.; LIU, M.; DU, G.; GUO, J. y NTAKIRUTIMANA, T.: "Correlation among soil microorganisms, soil enzyme activities, and removal rates of pollutants in three constructed wetlands purifying micro-polluted river water", *Ecological Engineering*, 46: 98-106, 2012.
- KADLEC, R. H. y WALLACE, S. D.: *Treatment Wetlands*, Ed. CRC Press , Boca Raton, FL, 2nd Edition ed, pp., 2009.
- KAMIHAMA, T.; KIMURA, T.; HOSOKAWA, J.; UEJI, M.; TAKASE, T. y TAGAMI, K.: "Tinea pedis outbreak in swimming pools in Japan", *Public Health*, 111: 249-253, 1997.
- KNOWLES, P.; DOTROB, G.; NIVALA, J. y GARCÍA, J.: "Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: occurrence and contributing factors", *Ecological Engineering*, 37: 99-112, 2011.
- KORBOULEWSKY, N.; WANG, R. Y. y BALDY, V.: "Purification processes involved in sludge treatment by a vertical flow wetland system: focus on the role of the substrate and plants on N and P removal", *Bioresource Technology*, 105: 9-14, 2012.
- KOUKIA, S.; M'HIRIB, F.; SAIDIA, N.; BELAÏDB, S. y HASSENA, A.: "Performances of a constructed wetland treating domestic wastewaters during a macrophytes life cycle", *Desalination*, 246: 452-467, 2009.
- KRAMER, M. H.; HERWALDT, B. L.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L. y JURANEK, D. D.: *Surveillance for waterborne-disease outbreaks* MMWR, United States, 1-33pp. 1996.
- LACROIX, G. y GREGOIRE, M.: "Revisited ecosystem model (MODECOGeL) of the Ligurian Sea", *J. Mar. Syst.*, 37: 229-258, 2002.
- LANGERGRABER, G.; HABERL, R.; LABER, J. y PRESSL, A.: "Evaluation of substrate clogging processes in vertical flow constructed wetlands", *Water Science & Technology*, 48(5): 25-34, 2003.
- LANGERGRABER, G.; LEROCH, K.; PRESSL, A.; ROHRHOFER, R. y HABER, R.: "A two-stage subsurface vertical flow constructed wetland for high-rate nitrogen removal", *Water Science & Technology*, 57: 1881-1887, 2008.

- LEVY, D. A.; BENS, M. S.; CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L. y HERWALDT, B. L.: *Surveillance for waterborne-disease outbreaks* MMWR, United States, 1-34pp. 1998.
- LI, J.; WEN, Y.; ZHOU, Q.; XINGJIE, Z.; LI, X.; YANG, S. y LIN, T.: "Influence of vegetation and substrate on the removal and transformation of dissolved organic matter in horizontal subsurface-flow constructed wetlands", *Bioresource Technology*, 99: 4990-4996, 2008.
- LITTLEWOOD, M.: *Natural Swimming Pools: An Inspirational Guide for Construction and Maintenance* Schiffer Publishing, Pennsylvania., 2005.
- LIU, M.; WU, S.; CHEN, L. y DONG, R.: "How substrate influences nitrogen transformations in tidal flow constructed wetlands treating high ammonium wastewater?", *Ecological Engineering*, 73: 478-486, 2014.
- LOMINCHAR, M. A.; SIERRA, M. J. y MILLÁN, R.: "Accumulation of mercury in *Typha domingensis* under field conditions", *Chemosphere*, 119: 994-999, 2015.
- LUCA, G. A. D.; MAINE, M. A.; MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R. y BONETTO, C. A.: "Influence of *Typha domingensis* in the removal of high P concentrations from water", *Chemosphere*, 138: 405-411, 2015.
- LUTZ, J. K. y LEE, J.: "Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs", *International Journal of Environmental Research Public Health*, 8: 554-564, 2011.
- MAKVANA, K. S. y SHARMA, M. K.: "Assessment of Pathogen Removal Potential of Root Zone Technology from Domestic Wastewater", *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 3: 401-406, 2013.
- MARION, J. W.; LEE, J.; LEMESHOW, S. y BUCKLEY, T. J.: " Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach", *Water Research*, 44: 4796-4804, 2010.
- MARION, J. W., LEE, J., LEMESHOW, S., BUCKLEY, T.J.: "Association of gastrointestinal illness and recreational water exposure at an inland U.S. beach", *Water Research*, 44: 4796-4804, 2010.
- MARTIN, M. I.: *Depuración de aguas con plantas emergentes*, 1989.
- MASON, C. E. y BRYANT, R. J.: "Production, nutrient content and decomposition of *Phragmites communis* Trin. and *Typha angustifolia* L.", *Journal of Ecology*, 63: 71-95, 1975.
- MCCRADY, M. H.: "The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube", *The Journal of Infectious Diseases*, 17(1): 183-212, 1915.
- MENG, P.; PEI, H.; HU, W.; SHAO, Y. y LI, Z.: "How to increase microbial degradation in constructed wetlands: Influencing factors and improvement measures", *Bioresource Technology*, 157: 316-326, 2014.
- MONTES DE OCA-RISCO, A. y ULLOA-CARCASSÉS, M.: "Recuperación de áreas dañadas por la minería en la Cantera Los Guaos, Santiago de Cuba, Cuba", *Revista Luna Azul*, 37: 74-88, 2013.
- MONTES DE OCA RISCO, A. y ULLOA CARCASSÉS, M.: "Recuperación de áreas dañadas por la minería en la Cantera Los Guaos, Santiago de Cuba, Cuba.", *Revista Luna Azul*, 37: 74-88, 2013.

- MUNZ, G.; SZOKE, N. y OLESZKIEWIC, J. A.: "Effect of ammonia oxidizing bacteria (AOB) kinetics on bioaugmentation.", *Bioresource Technology*, 125: 88-69, 2012.
- NC-22: Lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénico sanitarios. NC 22. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-15. 1999.
- NC-177: Áridos: Determinación del porcentaje de huecos. Método de ensayo. NC-177. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-12. 2002.
- NC-178: Áridos: Análisis granulométrico. NC-178. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-13. 2002.
- NC-179: Áridos. Determinación del contenido de partículas de arcilla. Método de ensayo. NC-179. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-10. 2002.
- NC-185: Arena: Determinación de impurezas orgánicas. Método de ensayo. NC-185. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-12. 2002.
- NC-186: Áridos: Determinación del material más fino que el tamiz de 0.074 mm (No. 200). Método de ensayo. NC-186. Ciudad de la Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, pp. 1-14. 2002.
- Salud ambiental Piscinas Requisitos higiénico sanitarios y de seguridad, NC 441, Oficina Nacional de Normalización, Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba, pp. 2006.
- NEWMAN, S.; GRACE, J. B. y KOEBEL, J. W.: "Effects of nutrient and hydroperiod on Typha, Cladium and Eleocharis: implications for everglades restoration.", *Ecological Applications*, 6: 774-783, 1996.
- OFICE_FÉDÉRAL_DE_LA_SANTÉ_PUBLIQUE: Recommandations pour l'évaluation hygiénique des étangs de baignade publique aménagés artificiellement. Ofice Fédéral de la Santé Publique, pp. 2004.
- ORTS, A.; PUERTA, P. y BALLESTERO, V.: *Diseño, mantenimiento y uso de piscinas: Seguridad e higiene* Guía, Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía (OSMAN), Andalucía, España, *Disponible en: www.osman.es/contenido/profesionales/piscinas_osman.pdf*, 2012.
- PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T. S. A.; STANGE, F.; MULLER, R. A. y KÖSER, H.: "New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review", *Eng. Life Science*, 7: 13-25, 2007.
- PARK, N.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A.; SARP, S.; KIM, S. D. y CHO, J.: "Effective controls of micropollutants included in wastewater effluent using constructed wetlands under anoxic condition", *Ecological Engineering*, 35: 418-423, 2009.
- PESTER, M.; RATTEI, T.; FLECHL, S.; GRÖNGRÖFT, A.; RICHTER, A.; OVERMANN, J.; REINHOLD-HUREK, B.; LOY, A. y WAGNER, M.: "AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions.", *Environmental Microbiology*, 14: 525-539, 2012.

- RICHARDSON, S. D.: "Environmental mass Spectrometry: emerging contaminants and current issues", *Analytical Chemical*, 82(12): 4742-4774, 2010.
- RICHARDSON, S. D.; DEMARINI, D. M.; KOGEVINAS, M.; FERNANDEZ, P.; MARCO, E.; LOURENCETTI, C.; BALLESTÉ, C.; HEEDERIK, D.; MELIEFSTE, K. y MCKAGUE, A. B.: "What's in the pool? A comprehensive identification of disinfection by-products and assessment of mutagenicity of chlorinated and brominated swimming poolwater", *Environ. Health Perspect.*, 118(11): 1523-1530, 2010.
- SAEED, T. y SUN, G.: "A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media", *Journal of Environmental Management*, 112: 429-448, 2012.
- SAEED, T. y SUN, G.: "A lab-scale study of constructed wetlands with sugarcane bagasse and sand media for the treatment of textile wastewater.", *Bioresource Technology*, 128: 438-447, 2013.
- SALVATO, M.; BORIN, M.; DONI, S.; MACCI, C.; CECCANTI, B.; MARINARI, S. y MASCIANDARO, G.: "Wetland plants, microorganisms and enzymatic activities interrelations in treating N polluted water", *Ecological Engineering*, 47: 36-43, 2012.
- SCHETS, F. M.; DE_RODA_HUSMAN, A. M. y HAVELAAR, A. H.: "Disease outbreaks associated with untreated recreational water use", *Epidemiological Infections.*: 1-12, 2010.
- SCHRODER, P.; NEUSTIFTER, J.; PEIS, S. y HUBER, B.: Perspectives for the use of cattail (*Typha* spp.) in phytoremediation. Memorias de Proceeding of International Congress Crop Science and Technology (BCPC), 2003, pp. 405-410. 2003.
- SHARMA, P.; ASAEDA, T.; MANATUNGE, J. y FUJINO, T.: "Nutrient cycling in a natural stand of *Typha angustifolia*", *Journal of Freshwater Ecology*, 21: 431-438, 2006.
- SHUTES, R. B. E.: "Artificial wetlands and water quality improvement", *Environment International*, 26: 441-447, 2001.
- SINCLAIR, R. G.; JONES, E. L. y GERBA, C. P.: "Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review", *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1769-1780, 2009.
- SMITH, C. S.; ADAMS, M. S. y GUSTAFSON, T. D.: "The importance of belowground mineral element stores in cattail (*Typha latifolia* L.)", *Aquatic Botany*, 30: 343-352, 1988.
- SULTANA, M.-Y.; AKRATOS, C. S.; PAVLOU, S. y VAYENAS, D. V.: "Chromium removal in constructed wetlands: A review", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96: 181-190, 2014.
- SURRENCY, D.: *Evaluation of aquatic plants for constructed wetland*, Ed. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 349-357, 1993.
- TEO, T. L. L.; COLEMAN, H. M. y KHAN, S. J.: "Chemical contaminants in swimming pools: Occurrence, implications and control", *Environment International*, 76: 16-31, 2015.

- THE_LANDSCAPING_AND_LANDSCAPE_DEVELOPMENT_RESEARCH_SOCIETY: Recommendations for the planning, construction and maintenance of private swimming and natural pools. pp. 2006.
- TIRODIMOS, I.; ARVANITIDOU, M.; DARDAVASSIS, L.; BISIKLIS, A. y ALEXIOU-DANIIL, S.: "Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece", *Eastern Mediterranean Health Journal.*, 16: 783-787, 2010.
- TRUU, M.; JUHANSON, J. y TRUU, J.: "Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands", *Science of the Total Environment*, 407: 3958-3971, 2009.
- USEPA: *Design Manual Constructed Wetlands for Municipal Wastewater Treatment* U. S. Environmental Protection Agency (USEPA), Cincinnati, Ohio, USA, 2000.
- VAILLANT, N.; MONNET, F.; SALLANON, H.; COUDRET, A. y HITMI, A.: "Use of commercial plant species in a hydroponic system to treat domestic wastewaters", *J. Environ. Qual.*, 33: 695-702, 2004.
- VYMAZAL, J.: "Removal of nutrients in various types of constructed wetlands", *Science of the Total Environment*, 380: 48-65, 2007.
- VYMAZAL, J.: "Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience", *Environmental Science and Technology*, 45(1): 61-69, 2011.
- VYMAZAL, J.: "Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review", *Ecological Engineering*, 61: 582-592, 2013a.
- VYMAZAL, J.: "The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: A review of a recent development", *Water Research*, 47: 4795-4811, 2013b.
- VYMAZAL, J.: "Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review", *Ecological Engineering*, 73: 724-751, 2014.
- WADE, T. J.; CALDERON, R. L.; SAMS, E.; BEACH, M.; BRENNER, K. P.; WILLIAMS, A. H. y DUFOUR, A. P.: "Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness", *Environ. Health Perspect.*, 114: 24-28, 2006.
- WANG, R.; KORBOULEWSKY, N.; PRUDENT, P.; DOMEIZEL, M.; ROLANDO, C. y BONIN, G.: "Feasibility of using an organic substrate in a wetland system treating sewage sludge: Impact of plant species", *Bioresource Technology*, 101: 51-57, 2010.
- WEIHE, P. E. y NEELY, R. K.: "The effects of shading on competition between purple loosestrife and broad-leaved cattail", *Aquatic Botany*, 59: 127-138, 1997.
- WHO: *Water recreation and disease. Plausibility of associated infections: acute effects, sequelae and mortality by Kathy Pond*. Londres, 2005.
- WHO: *Microbial hazards* (Guidelines for safe recreational water environments. Swimming pools and similar environments), Génova, 26-59pp. 2006.
- WILLIS, C. y MITSCH, W. J.: "Effects of hydrology and nutrients on seedling emergence and biomass of aquatic macrophytes from natural and artificial seed banks", *Ecological Engineering*, 4: 65-76, 1995.

- WITHER, A.; REHFISCH, M. y AUSTIN, G.: "The impact of bird populations on the microbiological quality of bathing waters", *Water Science & Technology*, 51: 199-207, 2005.
- WRIGHT, M. E.; SOLO-GABRIELE, H. M.; ELMIR, S. y FLEMING, L. E.: "Microbial load from animal feces at a recreational beach", *Marine Pollution Bulletin*, 58: 1649-656, 2009.
- WU, H.; ZHANG, J.; NGO, H. H.; GUO, W.; HU, Z.; LIANG, S.; FAN, J. y LIU, H.: "A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation", *Bioresource Technology*, 175: 594-601, 2015.
- WU, S.; KUSCHK, P.; BRIX, H.; VYMAZAL, J. y DONG, R.: "Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review.", *Water Research*, 57C: 40-55, 2014.
- XI, X.; WANG, L.; TANG, Y.; FU, X. y LE, Y.: "Response of soil microbial respiration of tidal wetlands in the Yangtze River Estuary to increasing temperature and sea level: A simulative study", *Ecological Engineering*, 49: 104-111, 2012.
- YALCUK, A. y UGURLU, A.: "Comparison of horizontal and vertical constructed wetland systems for landfill leachate treatment", *Bioresource Technology*, 100: 2521-2526, 2009.
- YANG, L.; SCHMALZ, C.; ZHOU, J.; ZWIENER, C.; CHANG, V. W.-C.; GE, L. y WAN, M. P.: "An insight of disinfection by-product (DBP) formation by alternative disinfectants for swimming pool disinfection under tropical conditions", *Water Research*, 101: 535-546, 2016.
- YODER, J. S.; BLACKBURN, B. G.; CRAUN, G. F.; HILL, V.; LEVY, D. A.; CHEN, N.; LEE, S. H.; CALDERON, R. L. y BEACH, M. J.: *Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water 2001-2002* MMWR, United States, 1-22pp. 2004.
- YOUNG, T. C.; COLLINS, A. G. y THEIS, T. L.: *Subsurface flow wetland for wastewater treatment at Minoa* Clarkson University, NY, Reporte de NYSERDA y USEPA, 2000.
- ZWIENER, C.; RICHARDSON, S. D.; DEMARINI, D. M.; GRUMMT, T.; GLAUNER, T. y FRIMMEL, F. H.: "Drowning in disinfection byproducts? Assessing swimming pool water.", *Environmental Science and Technology*, 41(2): 363-372, 2007.