

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

Evaluación de la eficiencia del sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica (SATAR-UNA) en la remoción de contaminantes microbiológicos.

Proyecto de graduación como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.

**Nombre de la estudiante
Catalina Solís Calderón**

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2021**

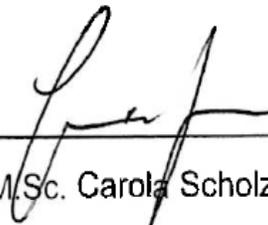
Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.



MPM. Abad Rodríguez Rodríguez
Representante, Decano, quién preside



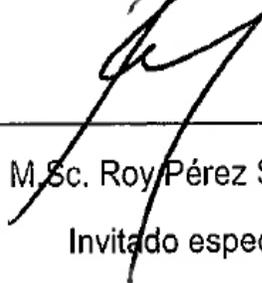
M.Sc. Alicia Fonseca Sánchez
Representante, Unidad Académica



M.Sc. Carola Scholz
Tutora



M.Sc. Carolina Alfaro Chinchilla
Asesora



M.Sc. Roy Pérez Salazar
Invitado especial

Agradecimiento

Me gustaría agradecer en estas primeras líneas la ayuda que muchas personas y compañeros de trabajo me han prestado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia por el apoyo incondicional.

A mi tutora la M.Sc. Carola Scholz (UNA-LAFITOTEC), mis asesoras la M.Sc. Carolina Alfaro Chinchilla (UNA-LAGEDE) y a la Ing. Maritza Marín Araya, (ACEPESA), por haber asumido junto a mí el reto del desarrollo de este proyecto, buscando siempre enriquecer y mejorar mi trabajo.

Al Ph.D. Junior Pérez Molina (UNA) y al Doctor Raúl Matamoros Suárez por su colaboración durante el proceso, el cual me ayudó a enriquecer mi trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio Nacional de Aguas: al Doctor Darner Mora Alvarado, M.Sc. Ilena Vega Guzmán, la Doctora Johanna Méndez Araya, el M.Sc. Ernesto Alfaro Arrieta, y a la Licda. Maribel Rodríguez Campos que de una u otra manera con su apoyo, guía y consejos hicieron posible la ejecución de este proyecto.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento al Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados y la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional por toda la colaboración, la orientación y conocimiento adquirido.

Finalmente, a todos (as) los que colaboraron de una u otra forma con aportes para la realización de este proyecto.

Dedicatorio

A Dios y a la Virgen, por las bendiciones recibidas siempre. A mis padres por su apoyo y por darme la oportunidad de estudiar. Sin ellos no sería lo que soy. A mi esposo por tenerme paciencia muchas veces y por confiar en mí, por aconsejarme, por estar ahí siempre. A mis hermanas, por su apoyo incondicional. Pero en especial a mi hija Jimena y mi hijo Mathias quienes son mi motor cada día para seguir adelante. A todos gracias por su apoyo.

Índice

Miembros del Comité	I
Agradecimiento.....	II
Dedicatorio.....	III
Índice.....	IV
Índice Cuadros	VI
Índice Figuras.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	5
1.3 Planteamiento del problema	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
2. Marco Teórico	8
2.1 Clasificación de las aguas residuales	8
2.2 Composición de las aguas residuales	8
2.3 Microbiología de aguas residuales	9
2.4 Tratamientos de las aguas residuales.....	12
2.5 Métodos convencionales y no convencionales para el tratamiento de aguas residuales.....	13
2.6 Humedales artificiales	13
2.6.1 Humedal artificial de flujo subsuperficial	14
2.6.2 Vegetación en los humedales artificiales	16
2.6.3 Mecanismos de remoción de contaminantes en los humedales artificiales.....	19
3. Marco Metodológico	24
3.1 Muestreo de las aguas residuales	25
3.2 Análisis microbiológicos	26
3.3 Análisis de datos.....	30
4. Resultados	31

4.1. Parámetros fisicoquímicos	31
4.2. Concentración y remoción microbiológica	32
4.3. Correlación de variables microbiológicas y fisicoquímicas.....	33
5. Discusión.....	35
6. Conclusiones	41
7. Recomendaciones.....	42
8. Referencias bibliográficas.....	43

Índice Cuadros

Cuadro 1. Composición de aguas residuales según los agentes contaminantes físicos, químicos y biológicos.....	9
Cuadro 2. Plantas utilizadas en los humedales artificiales alrededor de América Latina.....	17
Cuadro 3. Mecanismos de remoción de contaminantes en los humedales artificiales.	20
Cuadro 4. Métodos de referencia establecidos para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos en laboratorio.	25
Cuadro 5. Valores promedios de parámetros fisicoquímicos medidos entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA.....	31
Cuadro 6. Promedio de las concentraciones de Coliformes fecales, <i>Escherichia coli</i> y helmintos y detección de <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp., entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA.....	32

Índice Figuras

Figura 1. Clasificación de los humedales artificiales (Vymazal & Kröpfelová, 2008).....	14
Figura 2. a) Humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal; b) Humedal artificial de flujo subsuperficial vertical (Bakhshoodeh et al., 2020).....	15
Figura 3. Diagrama de bloques del sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales de la Escuela de Medicina Veterinaria (SATAR-UNA), ubicado en el campus Presbítero Benjamín Núñez de la Universidad Nacional.	24
Figura 4. Matriz de coeficientes de correlación de <i>Spearman</i> (r_p , $P<0.05$) entre todas las variables microbiológicas y fisicoquímicas para todos los sitios de muestreo (P1 a P7). Datos recolectados entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA. Cuadros en color blanco indican no correlación ($r_p= 0$; $P>0.05$).....	33
Figura 5. Relación entre el número más probable (NMP; Coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>) y el nitrógeno total Kjeldahl (NTK). Línea sólida señala el ajuste del modelo de regresión lineal. Criterio de información de Akaike (AIC) = 100.83.....	34

Abreviaturas

Agar ATS	Agar Trypticase Soya
Agar LIA	Agar Lisina Hierro
Agar SS	Agar Salmonella-Shigella
Agar TSI	Agar Triple Azúcar-Hierro
Agar XLD	Agar Xilosa, Lisina Desoxicolato
APB	Agua Peptonada Buferizada
BD	Becton Dickinson
COT	Carbono Orgánico Total
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
HA	Humedal artificial
HAs	Humedales artificiales
LAFITOTEC	Laboratorio de Fitotecnologías
LAGEDE	Laboratorio de Gestión de Desechos
NMP	Número Más Probable
NTK	Nitrógeno total Kjeldahl
OD	Oxígeno disuelto
SATAR	Sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales
S Sedim	Sólidos sedimentables
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Ulog	Unidades logarítmicas
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
UV	Ultravioleta

Resumen

Los humedales artificiales son tecnologías no convencionales para el tratamiento de las aguas residuales. En los últimos años, en el mundo se ha incrementado su implementación, debido a su desempeño en cuanto a la capacidad de reducción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos. Sin embargo, existen pocos estudios que han reportado la evaluación de la viabilidad técnica-económica y la eficiencia en regiones tropicales y subtropicales. En el caso de Costa Rica, los estudios realizados se han enfocado principalmente en la remoción de contaminantes fisicoquímicos. Esta investigación tuvo como propósito evaluar la eficiencia del sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (SATAR-UNA) en términos de la reducción de coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y huevecillos de helmintos como indicadores de inocuidad. La cuantificación de los coliformes fecales y *Escherichia coli* se realizó mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples (NMP), los huevecillos de helmintos por medio de la técnica de concentración, y en el caso de la identificación de patógenos bacterianos como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp se realizó mediante el uso de medios de cultivos selectivos e identificación bioquímica (API® bioMerieux Francia). Los resultados indican que el SATAR-UNA removió en promedio un 51.9% y 50.9% para coliformes fecales y *Escherichia coli*, respectivamente; *Shigella* spp. no fue detectada durante el periodo de estudio, mientras que *Salmonella* spp fue encontrada al menos una vez en los puntos de muestreo P1, P2 y P3. En el caso de los huevecillos de helmintos estos se encontraron en el rango de las dosis infecciosas en cinco puntos de muestreo. Se observó una correlación positiva entre el Nitrógeno Total Kjeldahl y los coliformes fecales, *Escherichia coli*. En conclusión, el sistema SATAR-UNA mostró una reducción significativa de los contaminantes microbiológicos y fisicoquímicos.

1. Introducción

El agua potable y el saneamiento forman parte de las necesidades básicas de la población, sin embargo, en la actualidad la disponibilidad del recurso hídrico se encuentra amenazado debido al uso desmedido del agua y a la inadecuada gestión de las aguas residuales (Almukhtar et al., 2018; Stefanakis et al., 2016). Dependiendo de su origen las aguas residuales crudas contienen grandes cantidades de contaminantes tanto fisicoquímicos y como microbiológicos, estos últimos pueden causar enfermedades relacionadas con la contaminación en el agua tales como diarrea, fiebre tifoidea, disentería, cholera, giardiasis y hepatitis (Boyd, 2015; Omondi et al., 2020; Organización Mundial de la Salud. et al., 2018). Por consiguiente, el saneamiento es esencial para la protección y conservación del agua, de ahí la importancia de aplicar el debido tratamiento a las aguas residuales, ya que de esta manera se previenen riesgos a la salud pública y contaminación de los cuerpos de agua (AyA et al., 2016; Wang et al., 2020). Ante este panorama, las entidades responsables deben fomentar la búsqueda de sistemas de tratamiento eficientes y adecuados, que sean evaluados desde un punto de vista ambiental, técnico, económico y social (Alfaro et al., 2013).

1.1 Antecedentes

Los primeros estudios científicos de humedales artificiales (HAs) para el tratamiento de aguas residuales iniciaron en la década de los 50, con el trabajo realizado por la Dra. Seidel del Instituto Max Planck en Plön, Alemania (Vymazal, 2018). Estos estudios consistían en diferentes experimentos utilizando humedales de flujo vertical y horizontal a escala piloto para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales incluyendo aguas con fenoles, domésticas y aguas provenientes de actividades ganaderas (Brix, 1994; Vymazal, 2005, 2010).

Debido a las experiencias exitosas obtenidas en las investigaciones anteriores a escala piloto, para finales de los sesenta se inicia la construcción de los primeros HAs a escala real, diseñados con el propósito de depurar aguas residuales municipales y domésticas; luego en la década de los 80 el uso se amplía al tratamiento de aguas procedentes de la agricultura, rellenos sanitarios y escorrentía (Vymazal, 2014). Más tarde con la intención de mejorar la eficiencia en el tratamiento

de todo tipo de aguas residuales se construyen los primeros sistemas híbridos que consisten en la combinación de varios tipos de tecnologías en especial combinaciones de sistemas de flujo vertical-horizontal (Kadlec & Wallace, 2009).

En la década de los 90 la implementación de HAs a escala real toma un rumbo acelerado alrededor de todo el mundo, debido a los altos niveles de remoción de contaminantes en relación con los reducidos costos de construcción y mantenimiento (Hoffman et al., 2011; Kadlec & Wallace, 2009; Vymazal, 2010). Desde entonces las principales investigaciones de estos sistemas se han enfocado en análisis fisicoquímicos para evaluar la eficiencia de remoción de materia orgánica (Demanda Bioquímica Oxígeno, Demanda Química Oxígeno, Carbono Orgánico Total), nutrientes y metales pesados presentes en diferentes tipos de aguas residuales (Liu et al., 2016; Stefanakis et al., 2016).

No obstante, aunque en 1970 se inician los primeros estudios relacionados con los mecanismos de remoción de microorganismos patógenos en los HAs (García et al., 2013), no es hasta en los últimos años que se ha visto un incremento de investigaciones enfocadas en los parámetros microbiológicos, debido a la capacidad que han demostrado estos sistemas para eliminar organismos patógenos presentes en aguas residuales (Arden & Ma, 2018).

En Alemania un estudio realizado por Vacca et al., (2005), evaluó el desempeño de un sistema a escala piloto, compuesto por seis HAs (flujo vertical y horizontal) plantados y no plantados, los autores reportaron porcentajes de remoción mayores al 99% para enterobacterias en los humedales con *Phragmites australis*, por lo que los autores concluyen que la eficiencia de remoción depende de la presencia de plantas, así como el material de filtración y las condiciones de operación.

Posteriormente, García et al., (2013) estudiaron un sistema a escala piloto con presencia y ausencia de vegetación, los resultados muestran niveles de reducción de 3 Unidades Logarítmicas (Ulog) para coliformes fecales y 4 Ulog *Escherichia coli* y un 90% para huevecillos de helmintos. En esta misma línea, Morató et al., (2014) reportaron el efecto del tamaño de las partículas, del nivel del agua y de la temperatura, sobre la eficiencia de remoción de microorganismos indicadores y patógenos en ocho humedales horizontales de flujo subsuperficial en paralelo a

escala piloto. Los resultados de inactivación microbiana para coliformes totales estuvieron en un rango de (1.2 a 2.2) Ulog y (1.4 a 2.3) Ulog para *E. coli*. En el caso de las bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas* sp. se encontraron en un rango de (1.4 a 2.1) Ulog y (0.4 a 1.9) Ulog, respectivamente. Asimismo, se observó un efecto positivo en la utilización de material de soporte de tamaño de 3.5 mm sobre la remoción de coliformes fecales y *E. coli*.

Toscano et al., (2015), monitorearon el desempeño de cinco HAs de flujo horizontal como tratamiento terciario de las aguas municipales provenientes de una planta de tratamiento convencional en Italia; los autores reportaron datos de reducción para *E. coli* con más de 2.5 Ulog en sistemas plantados con *P. australis*. Concluyeron que la combinación de diferentes sistemas, alto tiempo de retención hidráulica, así como el efecto de la época estacional incrementó las tasas de remoción de patógenos.

Shingare et al., (2017), compararon diferentes tamaños de material de soporte, así como la presencia y ausencia de vegetación. Los sistemas plantados con *Typha latifolia* y *Cyperus rotundus* obtuvieron mayor eficiencia de remoción de coliformes totales-fecales, *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Ascaris lumbricoides*, con respecto a los no plantados; en el caso de los diferentes tamaños del material de filtración utilizados, los resultados exponen que la arena con dimensiones menores a 2 mm fue la más efectiva para la filtración de coliformes totales-fecales, *E. coli* y *Shigella* spp.

Por otro lado, Calheiros et al., (2017), evaluaron un humedal artificial (HA) sembrado con plantas ornamentales y los mecanismos de remoción para *E. coli*, otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.). Dentro de los resultados, se detectó *L. monocytogenes* en las aguas residuales y asociada a las raíces de *Zantedeschia aethiopica* y *Coelogyne flaccida*, en el caso de *E. coli* se encontró asociada *C. flaccida* con un promedio de reducción de 2 Log₁₀ UFC/g, por su lado la familia de enterobacterias se encontró asociadas en las raíces de todas las plantas con una reducción de 3 Log₁₀ al final de tratamiento.

Se han estudiado otras combinaciones de sistemas convencionales y no convencionales, tal es el caso de Stefanakis et al. (2019), quienes evaluaron el desempeño de un sistema compuesto de un sedimentador, filtro de goteo y humedal vertical; los resultados mostraron altos valores de remoción en la salida del sistema: 3.47 Ulog para coliformes fecales, 3.58 Ulog para *E. coli* y 2.2 Ulog para virus. Aunado a esto los autores mencionan una fuerte asociación entre bacteria-virus, lo que sugiere el papel de estos últimos como depredadores de bacterias. Además, se concluyeron que esta combinación de tecnologías proporcionó efluentes que cumplen con los límites legales europeos para descarga y reúso.

Una investigación similar fue reportada en Italia por Russo et al. (2019), donde monitorearon durante 12 meses tres HAs de flujo horizontal subsuperficial, plantados con *P. australis* y *T. latifolia*; a uno de los humedales se le acopló paralelamente una laguna y un dispositivo ultravioleta (UV) para la desinfección. Los resultados muestran que el dispositivo UV fue la clave para lograr la eliminación de *E. coli* del efluente <1(Ulog) en dicho sistema, porque aunque la laguna presentó tasas de reducción de 5 Log₁₀ para coliformes totales-fecales en el agua de salida, esta no fue suficiente para cumplir con los límites de vertido establecidos. Además, los autores mencionaron que el desempeño del sistema se mantuvo constante durante todo el año, sin variaciones significativas. A diferencia de esta observación Tunçsiper et al., (2012), reportaron alta incidencia de la época de verano en la remoción de patógenos, como *E. coli* y coliformes totales, lo anterior sugiere que existe una influencia de la temperatura, intensidad solar y composición del agua en la sobrevivencia de estos organismos.

En Costa Rica, la investigación sobre la eficiencia de este tipo de sistemas inicio con el estudio de Dallas et al., (2004) donde monitorearon durante 12 meses dos HAs de flujo horizontal a escala real; los resultados obtenidos mostraron un promedio de 99.9% de remoción para coliformes fecales. En ese mismo año la Asociación Centroamericana para la Economía, Salud y Ambiente (ACEPESA), inició la implementación y construcción de HAs conocidos como “biojardineras” para el tratamiento de las aguas residuales, alrededor de todo el país (Mora-Aparicio et al., 2018).

Algunos de los sistemas construidos por ACEPESA han sido estudiados por el Laboratorio de Gestión de Desechos (LAGEDE) y Laboratorio de Fitotecnologías (LAFITOTEC), ambos de la

Universidad Nacional, y en una de las publicaciones más recientes, Pérez-Salazar et al., (2019) valoraron el desempeño de siete HAs de flujo horizontal subsuperficial plantados con *Heliconia* sp. y *Cyperus papyrus* entre el 2012 – 2017, en el tratamiento de las aguas residuales generadas en un hotel. Los autores reportaron la reducción de la DBO, DQO y Sólidos Suspendedos Totales con promedios de 80%, 66% y 72%, respectivamente, generando un efluente en cumplimiento a la legislación nacional en cuanto a parámetros fisicoquímicos; no obstante, en esta investigación no se realizaron análisis microbiológicos, por lo que no fue posible determinar si estas aguas cumplen con los valores máximos permitidos según la reglamentación costarricense.

1.2 Justificación

En Costa Rica se generan aproximadamente 967.000 m³ de aguas residuales por día, sin embargo, solamente un 15% se encuentra dirigido a un sistema centralizado de alcantarillado sanitario para su tratamiento (AyA et al., 2016). Lo anterior, es alarmante debido al gran porcentaje de aguas residuales que se vierten crudas a los cuerpos de agua, provocando serios problemas en los ecosistemas y riesgos para la salud (Winward et al., 2008; Wu et al., 2016).

Existen sistemas convencionales y no convencionales para el tratamiento de las aguas residuales. En el caso de los tratamientos convencionales estos son eficientes en la depuración de las aguas residuales pero dependientes del aporte de energía eléctrica y altos costos en construcción y mantenimiento (Almuktar et al., 2018), mientras que los sistemas no convencionales utilizan energía natural, donde el ahorro en ésta y los costos reducidos de mantenimiento compensan la necesidad de más superficie para su infraestructura o construcción (Mara, 2003; McMinn et al., 2019). Dentro de estas tecnologías se puede citar algunos ejemplos como filtros de turba, lagunas, lechos bacterianos y los HAs (Pérez-López et al., 2011; Salas et al., 2007).

En los últimos años en países desarrollados se han incrementado las investigaciones con respecto a los HAs y su desempeño en cuanto a la capacidad de remoción de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos (indicadores de contaminación fecal y patógenos) presentes en el agua residual (Wu et al., 2016). Sin embargo, de acuerdo con Zhang et al., (2015), existen pocos estudios que han reportado la evaluación de la viabilidad técnica-económica y la eficiencia de

remoción de microorganismos en los HAs en países de regiones tropicales y subtropicales. En el caso de Costa Rica los estudios realizados se han enfocado principalmente en la remoción de contaminantes fisicoquímicos (Dallas et al., 2004; Pérez-Salazar et al., 2013, 2019).

En este contexto, con el objetivo de generar información base que permita conocer el desempeño de los HAs en las condiciones climáticas de Costa Rica, desde el 2018 el LAFITOTEC y el LAGEDE iniciaron un proyecto para valorar el funcionamiento de un sistema de tratamiento, conformado por cuatro HAs subsuperficiales de flujo horizontal construido en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Este sistema trata el agua residual proveniente de los servicios sanitarios, baños, laboratorios, hospital veterinario, soda y los establos pertenecientes a dicha Escuela. Por ende, se esperaría que estas aguas contengan una cantidad y variedad importante de agentes microbiológicos.

Por lo anteriormente expuesto, el propósito de la presente investigación fue evaluar la eficiencia del sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (SATAR-UNA) en términos de la reducción de coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y huevecillos de helmintos dado a los efectos perjudiciales que causan estos microorganismos a la salud pública y el ambiente. Los resultados aportarán información base indispensable para determinar la capacidad y eficiencia del funcionamiento de los HAs a escala real bajo las condiciones climáticas de la región, asimismo su relación con los parámetros fisicoquímicos obtenidos del monitoreo operativo permitirá una valoración integral del sistema de humedales contribuyendo en la toma de decisiones de ecosaneamiento.

1.3 Planteamiento del problema

Debido a la escasez de estudios realizados en Costa Rica en cuanto a la eficiencia de los HAs para remover contaminantes microbiológicos presentes en las aguas residuales y a la necesidad de conocer la calidad de los efluentes de estos sistemas; se plantea la siguiente pregunta ¿Cuál es el nivel de remoción de los microorganismos: coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp. y huevecillos de helmintos, en el sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales construido en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la remoción de indicadores de inocuidad y patógenos bacterianos en el sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica (SATAR-UNA) mediante análisis microbiológicos para la valoración de la eficiencia del sistema.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar los coliformes fecales, *Escherichia coli* y los huevecillos de helmintos, como indicadores de inocuidad presentes en el agua de entrada y salida de los humedales artificiales mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples y técnicas de concentración, respectivamente.
2. Identificar la presencia de patógenos bacterianos como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en el agua de entrada y agua de salida de los humedales artificiales mediante el uso de medios de cultivos e identificación bioquímica (API® bioMerieux Francia).
3. Relacionar los resultados microbiológicos con las condiciones fisicoquímicos para la valoración integral de funcionamiento del sistema.

2. Marco Teórico

Las aguas residuales son todas aquellas que han recibido un uso y cuya calidad ha sido modificada por la incorporación de agentes contaminantes, deteriorando así las propiedades físicas, químicas y biológicas de la misma (Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud, 2007). Por su lado, Almuktar et al., (2018) define las aguas residuales como aquellas que por el uso de los seres humanos contienen materia orgánica (DBO y DQO), nutrientes (nitrógeno y fósforo), metales pesados, hidrocarburos, contaminantes farmacéuticos y microorganismos patógenos.

2.1 Clasificación de las aguas residuales

De acuerdo con el Reglamento Costarricense de Vertido y Reúso de Aguas Residuales estas se pueden clasificar según su procedencia en dos tipos: ordinarias y especiales (Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud, 2007). Las aguas ordinarias, también llamadas aguas domésticas, son aquellas que se generan en las actividades diarias provenientes de las viviendas (Von Sperling, 2015), se componen de aguas grises (duchas, lavamanos, cocinas, lavanderías) y aguas pardas (servicio sanitario) (Arden & Ma, 2018). Por su lado, las aguas especiales son producidas en la industria, por lo que poseen características específicas, según el tipo de proceso que las origine (Von Sperling, 2015). Adicionalmente, Marín & Osés, (2013) señalan las aguas provenientes de las lluvias (aguas pluviales) como un tercer tipo de aguas residuales.

2.2 Composición de las aguas residuales

Las aguas residuales contienen gran cantidad de agentes que son los responsables de la contaminación, estos agentes se clasifican en físicos, químicos o biológicos los cuales causan efectos estéticos o dañinos en la vida acuática y en los que consumen el agua (Boyd, 2015). En el cuadro 1, se observa la clasificación de las aguas residuales según la composición física, química y biológica.

Cuadro 1. Composición de aguas residuales según los agentes contaminantes físicos, químicos y biológicos.

Factores físicos	Factores químicos	Factores biológicos
Olor, color, presencia de sólidos y temperatura	Orgánicos: carbohidratos, grasas animales, aceites, pesticidas, fenoles, proteínas, contaminantes prioritarios, agentes tensoactivos, compuestos orgánicos volátiles, entre otros. Inorgánicos: alcalinidad, cloruros, metales pesados, nitrógeno, pH, fósforo, contaminantes prioritarios, azufre. Además de gases como sulfuro de hidrógeno, metano, oxígeno.	Animales, plantas, microorganismo: bacterias, hongos, algas, virus, protistas, protozoarios y helmintos.

Fuente: (Espigares & Pérez, 2002; Ryder, 2017; Von Sperling, 2015).

2.3 Microbiología de aguas residuales

Existe una gran cantidad y variedad de patógenos de origen biológico que se encuentran en las aguas residuales, entre los cuales se puede citar: bacterias, virus, hongos, protozoarios, helmintos, alérgenos y toxinas (Gerardi & Zimmerman, 2006). Los microorganismos presentes en estas aguas residuales colaboran con la eliminación de agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos, sin embargo, algunos de estos representan un riesgo para la salud de los seres vivos y por lo tanto deben ser eliminados durante el tratamiento (AyA et al., 2016). Algunos de los que pueden generar enfermedades en el ser humano, se encuentran: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* patogénica, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, virus de la Hepatitis A, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*, entre otros (Mara, 2003; Stefanakis et al., 2016; Wang et al., 2020).

La detección y cuantificación de todos estos microorganismos patógenos presentes en las aguas residuales es costosa y técnicamente difícil, es por ello que se utilizan indicadores de contaminación los cuales son microorganismos cuya presencia/ausencia o concentración en el agua residual indican la calidad microbiológica de la misma, dado que se correlacionan con la población de organismos patógenos en general y su monitoreo es más sencillo en términos de trabajo de laboratorio (Arden & Ma, 2018; Liu et al., 2016; Stefanakis et al., 2019; Vymazal, 2005).

Los organismos indicadores de inocuidad como los coliformes fecales y *E. coli* son los más utilizados para valorar el desempeño de las tecnologías que tratan aguas residuales con respecto a la presencia de microorganismos patógenos en general (Vymazal, 2005). Este grupo de bacterias corresponde al género de coliformes de contaminación fecal que se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, termotolerantes, no esporulantes, fermentan la glucosa y la lactosa con producción de gas, producen indol a través de triptófano, no utilizan el citrato como fuente de carbono y no producen acetoina (Zurita, Rojas, Carreón & Gutiérrez, 2015). Sin embargo, se ha visto que estos microorganismos indicadores no necesariamente se correlacionan de manera ideal con los patógenos, por lo que la búsqueda de nuevos indicadores o la detección directa de microorganismos importantes en términos de salud pública como el caso de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y huevecillos de helmintos se ha intensificado en los últimos años (Calheiros et al., 2017; López et al., 2019).

Salmonella spp. corresponde a un grupo de bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*, son Gram negativas, anaerobios facultativos, con morfología bacilar de (2-5) μm de longitud y (0,7-1,5) μm de diámetro, móviles o inmóviles, poseen flagelos peritricos, y no forman esporas (Andino & Hanning, 2015). Además, producen ácido y gas a partir de la glucosa y no fermentan lactosa, son oxidasa negativo y urea negativo y utilizan el citrato como fuente de carbono. Se multiplican a temperaturas que van desde los 7 °C a los 45 °C y pueden sobrevivir meses en sustratos orgánicos (Karkey et al., 2016; Percival et al., 2014). El género *Salmonella* spp. presenta más de 2.500 serovares diferentes, actualmente se acepta la existencia de dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, que puede ser subdividida en subespecies *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Dekker & Frank, 2015). Esta bacteria presenta una prevalencia y virulencia alta, además, es adaptable y resistente a muchos antibióticos, se le

considera como uno de los microorganismos causante de afecciones intestinales en humanos alrededor del mundo, lo cual genera un impacto significativo en la salud pública y en la economía (Pond, 2005). Las cepas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* se pueden clasificar en dos grandes grupos: tifoideas y no tifoideas las cuales pueden causar enfermedades como: fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis, bacteriemia y pueden infectar hospederos asintomáticos que diseminan la enfermedad (Andino & Hanning, 2015; Pond, 2005).

Por otro lado, *Shigella* spp. son bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*, Gram negativas, de morfología bacilar, son anaerobios facultativos no móviles y no fermentan la lactosa (Asbury et al., 2018; Bliven & Lampel, 2017). En la actualidad, el género *Shigella* spp. se divide en cuatro serogrupos: *Shigella dysenteriae* (serogroup A), *Shigella flexneri* (serogroup B), *Shigella boydii* (serogroup C) y *Shigella sonnei* (serogroup D); estas especies son un grupo invasivo que pueden infectar a los humanos provocando infecciones en el aparato digestivo las cuales pueden ocasionar afectaciones leves y graves, siendo la deshidratación su principal complicación y las heces su forma de transmisión (Bliven & Lampel, 2017).

Por último, los Helmintos son gusanos cilíndricos que abarcan un gran número de parásitos; se han reportado casi 150 especies en el ser humano entre los más importantes son las *Ascaris lumbricoides*, los anquilostomas *Ancylostoma duodenales* y *Necator americanus* junto a los tricocéfalos *Trichuris trichiura* (López et al., 2012). Estos gusanos son de sexo separado y su ciclo de vida consta de cinco estadios, cuatro larvarios y el adulto; muchos tienen un ciclo de vida directo en el que el estadio infectante se encuentra en el suelo, antes de que puedan causar infección en el ser humano (Lawrence & Orihel, 2010). Su presencia es típica en aguas residuales urbanas que no han recibido ningún tipo de tratamiento, pudiendo alcanzar concentraciones de 600 huevos/L (Jimenez, 2007). La Organización Mundial de la Salud, (2006) y el Reglamento Costarricense de Vertido y Reúso de Aguas Residuales (Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud, 2007) establecen como límite admisible la presencia de 1 huevecillo de helminto viable/L de agua residual tratada para riego de cultivos; valores superiores son considerados un riesgo para la salud pública debido a que los helmintos tienen la capacidad de provocar enfermedades como helmintiasis con solo la ingesta de cultivos irrigados con aguas residuales contaminadas (Campos et al., 2018).

2.4 Tratamientos de las aguas residuales

El propósito principal del proceso de tratamiento de aguas residuales es eliminar o reducir los diversos componentes de la carga contaminante: sólidos, material orgánico, nutrientes, sales inorgánicas, metales, patógenos, entre otros (Stefanakis et al., 2019; Topare et al., 2011). De acuerdo con Scholz & Lee, (2007), se debe conocer las características del agua y el uso final para la selección del sistema de tratamiento o diseño adecuado.

Los tratamientos se dividen en diferentes niveles: pretratamiento, primario, secundario y terciario. El pretratamiento consiste en la separación de los componentes de aguas residuales que pueden causar inconvenientes de operación y mantenimiento como por ejemplo sólidos de gran tamaño, esto ocurre por el cribado, eliminación de arena y grasa (Marín & Osés, 2013). En el caso del tratamiento primario, se eliminan la mayor parte de los sólidos suspendidos y la materia orgánica mediante el proceso de la sedimentación (Topare et al., 2011; Von Sperling, 2015). El tratamiento secundario consiste principalmente en un proceso biológico donde se eliminan sustancias orgánicas biodegradables y suspendidas, esta etapa comprende procesos aerobios y anaerobios por lo que las bacterias descompondrán la materia orgánica fina, para producir un efluente más claro, en el caso de los procesos aerobios estos fomentan una mayor degradación de materia orgánica pero con una producción mayor de lodos, los cuales aumentan los costos de operación en los sistemas de tratamiento; por el contrario los procesos anaerobios generan menos cantidad de lodos pero presentan tasas menores de degradación de la materia orgánica (Noyola et al., 2013). Finalmente, el tratamiento terciario tiene como objetivo eliminar los nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, componentes tóxicos, materiales orgánicos residual y reducir la cantidad de bacterias patógenas (Salas et al., 2007).

2.5 Métodos convencionales y no convencionales para el tratamiento de aguas residuales

Como se ha analizado, las aguas residuales contienen diferentes elementos físicos, químicos y biológicos lo que ha generado la utilización de diferentes métodos para su eliminación (Boyd, 2015). Los sistemas convencionales conocidos como tecnologías tradicionales se caracterizan por ser eficientes en la depuración, pero son intensivas en el uso de energía y altos costes de construcción y mantenimiento (Almukhtar et al., 2018). Entre los que se pueden citar el reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) (Hoffman & Winker, 2011) y el reactor anaerobio de lecho expandido (EGSB) (Noyola et al., 2013).

Los métodos no convencionales son conocidos como tecnologías blandas o alternativas que consisten en la eliminación de contaminantes a partir de componentes naturales como el suelo, el agua y las plantas, los cuales son utilizados para alcanzar los objetivos de tratamiento, sin necesidad de adicionar sustancias químicas o de utilizar energía artificial; este tipo de tecnologías son una opción sostenible dada su alta eficiencia en relación con los costes de construcción y consumo de energía durante la operación (Avellán & Gremillion, 2019), entre los cuales se puede citar lagunas de oxidación, filtros verdes y HAs (García et al., 2013).

2.6 Humedales artificiales

Los HAs, conocidos también como humedales construidos, son ambientes acuáticos-terrestres que utilizan los procesos de autolimpieza que ocurren de manera natural, con el propósito de remover residuos y contaminantes presentes en los diferentes tipos de aguas residuales, tales como: bacterias, enterovirus, sólidos suspendidos y disueltos, materia orgánica, metales pesados, nitrógeno, fósforo y sustancias emergentes (Hoffman et al., 2011; Scholz & Lee, 2005; Vymazal, 2014, 2018). Estos sistemas funcionan como un biorreactor que consiste en una excavación impermeabilizada, lleno de material granular el cual sirve de soporte para la vegetación plantada (Pérez-Salazar et al., 2019).

En general la clasificación de los humedales artificiales se da por tres factores principales: la vegetación, el nivel del agua y la dirección del flujo del agua (Almuktar et al., 2018). No obstante, en la literatura la clasificación más utilizada está dada por la dirección del flujo del agua (fig. 1) (Fitch, 2014; Hoffman et al., 2011; Vymazal & Kröpfelová, 2008).

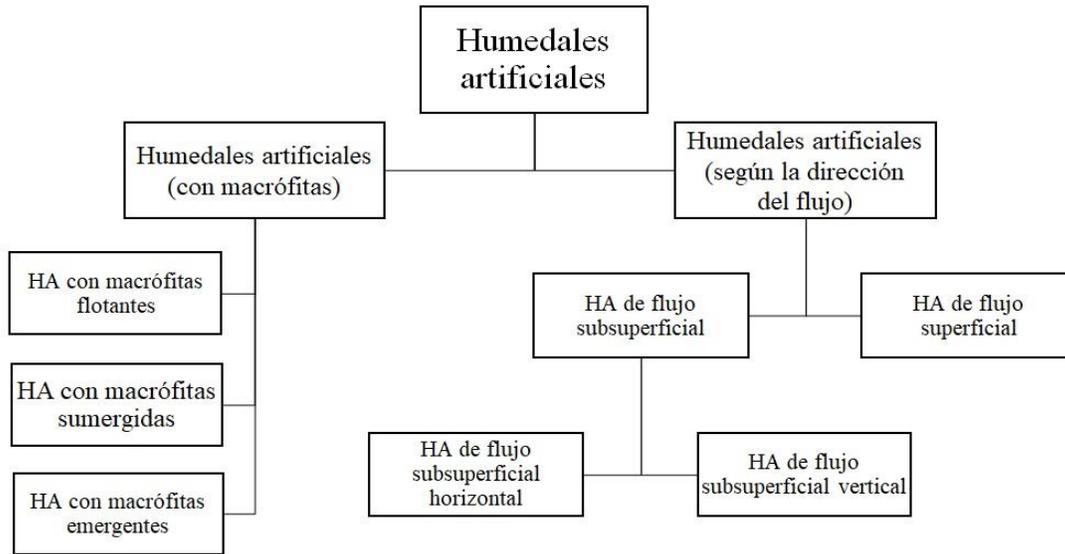


Figura 1. Clasificación de los humedales artificiales (Vymazal & Kröpfelová, 2008).

2.6.1 Humedal artificial de flujo subsuperficial

Son humedales cuyo flujo es subsuperficial, es decir, el agua pasa por debajo de la superficie del sistema, de manera que no está en contacto con la superficie, evitando la exposición a patógenos y criaderos de mosquitos (Kadlec & Wallace, 2009). Se divide en dos tipos: flujo horizontal y de flujo vertical (Fitch, 2014). En el primero, el agua del afluente fluye de forma horizontal a través del medio granular y las raíces de las plantas, hasta llegar a la salida del sistema, el cual se mantiene permanentemente inundado (fig. 2a), por consecuente se generan zonas anaerobias que favorecen los procesos de desnitrificación (Hoffman et al., 2011; Vymazal, 2014) y zonas aerobias que facilitan el crecimiento bacteriano para la degradación de materia orgánica (Noyola et al., 2013). De acuerdo con Brix, (1994) la aeración en estos sistemas se debe principalmente a la transferencia de oxígeno a través de las raíces y rizomas de las plantas. Los humedales de flujo horizontal están diseñados para el tratamiento de muchos tipos de aguas residuales, como por ejemplo aguas municipales, domésticas, aguas industriales y aguas

provenientes de agricultura, también han demostrado ser eficientes con agua de escorrentía, lixiviados de rellenos sanitarios (Vymazal, 2018).

En el caso del humedal vertical (fig. 2b), el agua ingresa desde arriba en forma de pulsos, el medio granular (arena o/y grava que incrementa el tamaño hasta al fondo) se inunda de manera temporal hasta que el agua fluya por gravedad, lo que permite mayor transferencia de oxígeno favoreciendo los procesos de nitrificación, siendo esta la configuración más usada en los países europeos (Vymazal & Kröpfelová, 2008). Los humedales de flujo vertical han resultado ser muy eficientes en la remoción de contaminantes orgánicos, sólidos suspendidos totales y amonio; debido a la oxigenación del sistema favorecen el proceso de nitrificación, por lo que son muy utilizados para aguas residuales municipales y domésticas (Almuktar et al., 2018; Vymazal, 2014, 2018).

Vymazal (2018), menciona que la combinación de los diferentes diseños de humedales artificiales es una opción para mejorar el desempeño de reducción de contaminantes debido a la combinación de condiciones aerobias y anaerobias, por lo que estas combinaciones se han utilizado para aguas que son difíciles de tratar por la variedad de contaminantes. La configuración más utilizada es el flujo vertical y horizontal con el objetivo de remover nitrógeno de las aguas residuales.

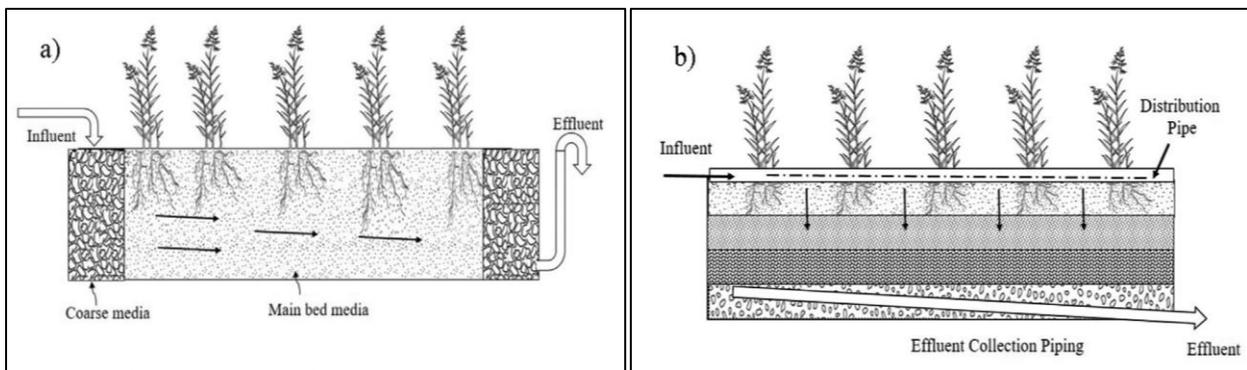


Figura 2. a) Humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal; b) Humedal artificial de flujo subsuperficial vertical (Bakhshoodeh et al., 2020).

2.6.2 Vegetación en los humedales artificiales

Las plantas son consideradas un componente esencial en los HAs, se dice que su rol en estos sistemas se encuentra muy bien establecido debido a que son uno de los factores más estudiados (Alufasi et al., 2017; Brisson & Chazarenc, 2009). Muchas de las investigaciones llevadas a cabo están dirigidas en cuanto a la eficiencia de reducción en parámetros como DBO, DQO, sólidos suspendidos, nitratos, fosfatos y en menor cantidad estudios relacionados con la capacidad de remoción de bacterias entéricas (Lekeufack et al., 2012; Quiñonez-Díaz et al., 2001; Scholz & Lee, 2005; Vymazal, 2018).

Existe una serie de funciones principales relacionadas con las plantas en los humedales, por ejemplo, se conoce que las raíces y rizosfera absorben nutrientes presentes en el agua, liberan pequeñas cantidades de oxígeno al agua y sirven de soporte para la adhesión de los microorganismos (biopelículas) y atrapamiento de partículas, además su presencia mejora la conductividad hidráulica e incrementa los tiempos de retención hidráulico (Brisson & Chazarenc, 2009; Kansime & Vann-Bruggen, 2001). Por lo anterior, las plantas son el eje central en los humedales debido a los beneficios que aporta su presencia en cuanto al mejoramiento en la calidad del agua (Fitch, 2014; Scholz & Lee, 2005).

En cuanto a la selección de plantas en los HAs, estas deben ser especies vasculares de tejidos vegetales blandos y arenquimatosos para facilitar el transporte de gases desde el vástago hacia las raíces a través de este tejido especializado para proporcionar una zona radicular aireada (Kadlec & Wallace, 2009). Según Scholz & Lee, (2007) las plantas utilizadas deben ser especies adaptadas a las condiciones locales de clima, plagas y enfermedades, de crecimiento rápido y fáciles de reproducir, además tolerantes a los contaminantes incluyendo altas concentraciones de nutrientes. Por lo anterior, Charris & Caselles-Osorio, (2016) y Guittony-Philippe et al., (2015) resaltan la importancia de utilizar en estudios de investigación especies nativas que crezcan en sitios cercanos donde se viertan aguas residuales.

Por otro lado, algunos estudios han reportado la internalización de microorganismos como *E.coli*, *Salmonella* spp. y especies de *Mycobacterias* en los tejidos de las plantas, por lo que se

recomienda que las plantas utilizadas en los HAs sean ornamentales y no plantas para consumo (Alufasi et al., 2017; Calheiros et al., 2017). De acuerdo con Vymazal, (2018) hoy en día entre las especies de plantas ornamentales más comúnmente utilizadas en los HAs se encuentran *Typha* spp., *Phragmites australis*, *Scirpus* spp. y *Juncus* spp.; en el caso de Latinoamérica se destaca el uso de especies como *Heliconia* sp. y *Cyperus* sp. entre otras (cuadro 2). Brisson & Chazarenc, (2009) afirman que la selección de las especies de macrófitas no debe generalizarse debido a que cada especie responde de manera diferente a los lugares donde se lleva a cabo la construcción del sistema de tratamiento. Por lo que en Costa Rica, país con clima tropical, se utilizan frecuentemente especies de la familia Zingiberaceae como *Alpinia purpurata* conocida como ginger o *Alpinia zerumbet* también llamada lágrimas de San Juan, *Hedychium coronarium*, lirio blanco las cuales son originarias de regiones (sub)tropicales del continente asiático, asimismo especies del género *Heliconia* comúnmente conocidas como platanillas y plantas nativas de las zonas tropicales desde Centroamérica a Sur América (Rojas-Rodríguez et al., 2016).

A continuación, en el cuadro 2 se muestra las principales especies de plantas utilizadas en los humedales artificiales:

Cuadro 2. Plantas utilizadas en los humedales artificiales alrededor de América Latina.

País	Tipo de agua residual	Planta	Tipo de Humedal	Referencias
Argentina	Industrial	<i>Typha dominguen-sis</i> <i>Eichhornia crassi-pes</i>	Superficial a escala real	(Maine et al., 2007)
Argentina	Aguas residuales	<i>Typha</i> sp.	Superficial a escala real	(Calzetta-Bloise, 2016)
Argentina	Aguas agrícolas	<i>Iris pseudacorus</i> <i>Typha dominguen-sis</i> <i>Canna indica</i>	Híbrido a escala piloto	(Sachez et al., 2016)
Argentina	Aguas rurales	<i>Zizaniopsis bonariensis</i>	Subsuperficial vertical a escala real	(Mariñelarena & Di Giorgia, 2016)
Argentina	Aguas de lixiviados	<i>Typha domingensis</i> <i>Iris pseudacorus</i>	Subsuperficial vertical a escala laboratorio	(Camaño-Silvestrini et al., 2016)

Argentina	Aguas de granja	<i>Typha domingensis</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Canna indica</i>	Subsuperficial horizontal a escala laboratorio	(Schierano et al., 2016)
Brasil	Aguas urbanas	<i>Typha subulata</i> <i>Zizaniopsis bonariensis</i>	Subsuperficial horizontal a escala laboratorio	(Da Motta Marques et al., 2001)
Brasil	Aguas urbanas	<i>Cyperus isocladius</i>	Subsuperficial horizontal a escala laboratorio	(Martinsa et al., 2016)
Brasil	Aguas urbanas	<i>Typha domingensis</i>	Hibrido a escala real	(Rouso et al., 2016)
Brasil	Aguas carbono y nitrógeno	<i>Typha domingensis</i>	Subsuperficial verticala escala piloto	(Santos et al., 2016)
Costa Rica	Aguas grises	<i>Cois lacryma-jobi</i>	Subsuperficial horizontal a escala real	(Dallas et al., 2004)
Costa Rica	Aguas domésticas	<i>Cyperus papyrus</i> <i>Heliconia</i> sp.	Subsuperficial horizontal a escala real	(Pérez-Salazar et al., 2019)
Costa Rica	Aguas pardas	<i>Cyperus papyrus</i>	Subsuperficial horizontal a escala real	(Pérez-Salazar et al., 2019)
Colombia	Aguas de productos farmacéuticos	<i>Heliconia psittacorum</i> , <i>Cyperus haspan</i> <i>Gynerium sagittatum</i>	Hibrido a escala real	(Arredondo et al., 2016)
Colombia	Aguas domésticas	<i>Cyperus papyrus</i>	Híbrido a escala piloto	(García et al., 2013)
Colombia	Aguas industriales	<i>Cyperus alternifolius</i> <i>Heliconia burleana</i> <i>Zantedeschia aethiopica</i>	Subsuperficial horizontal a escala piloto	(Corzo & Sanabria, 2016)
Colombia	Aguas de esorrentía	<i>Cyperus</i> sp.	Subsuperficial horizontal a escala piloto	(Rodríguez & Corrales, 2016)
Colombia	Aguas domésticas	<i>Cyperus ligularis</i> <i>Echinochloa colonum</i>	Subsuperficial horizontal a escala laboratorio	(Charris & Caselles-Osorio, 2016)

Chile	Aguas urbanas	<i>Agapanthus africanus</i>	Subsuperficial verticala escala laboratorio	(Leiva et al., 2016)
Chile	Aguas rurales	<i>Phragmites australis</i> <i>Schoenoplectus californicus</i>	Subsuperficial horizontal a escala real	(Acevedo et al., 2016)
El Salvador	Municipal	<i>Typha angustifolia</i>	Superficial a escala real	(Katsenovich et al., 2009)
		<i>Phragmites australis</i>	Subsuperficial horizontal a escala real	
México	Municipal	<i>Phragmites communis</i>	Hibrido a escala real	(Belmont et al., 2004)
México	Municipal	<i>Typha latifolia</i> <i>Phragmites australis</i>	Hibrido a escala real	(Brix et al., 2011)
México	Agua nitrogenada	<i>Zantedeschia aethiopica</i> <i>Strelitzia reginae</i> <i>Canna indica</i>	Hibrido a escala piloto	(Torres-Bojorges & Zurita, 2016)
México	Aguas urbanas	<i>Strelitzia reginae</i>	Subsuperficial verticala escala laboratorio	(Martínez et al., 2016)
Paraguay	Aguas urbanas	<i>Cyperus giganteus</i> <i>Typha domingensis</i>	Subsuperficial horizontal a escala piloto	(López et al., 2016)
Paraguay	Aguas domésticas	<i>Typha domingensis</i>	Superficial a escala real	(Cardozo et al., 2016)

2.6.3 Mecanismos de remoción de contaminantes en los humedales artificiales

La presencia de microorganismos en los HAs está dada por dos grupos, uno interno el cual es parte del sistema y contribuye a la reducción de contaminantes, mientras que el grupo externo son patógenos que están presentes en el agua residual y por ende entran al sistema (Vymazal, 2005). De acuerdo con diversos autores, la remoción de contaminantes microbiológicos en los HAs se da a través de procesos químicos, físicos y biológicos, que involucran diferentes mecanismos de remoción tales como filtración, sedimentación y procesos de absorción por la vegetación entre otros (cuadro 3) (Alufasi et al., 2017; López et al., 2019; Wu et al., 2016). Además, factores como la configuración de los HAs, tipo de agua residual, temperatura, pH, tamaño del soporte y el

régimen hidráulico están estrechamente relacionados con la eficiencia de remoción de los contaminantes presentes en las aguas residuales (García et al., 2013; McMinn et al., 2019; Wu et al., 2016).

Cuadro 3. Mecanismos de remoción de contaminantes en los humedales artificiales.

Contaminante	Mecanismo
Materia orgánica (DBO₅ y DQO)	Las partículas de materia orgánica son reducidas por la sedimentación y filtración. La materia orgánica soluble es fijada y adsorbida por la biopelícula y degradadas por las bacterias adheridas en este.
Sólidos suspendidos totales (SST)	Sedimentación y filtración. Descomposición durante los tiempos de retención por las bacterias especializadas en el soporte de arena.
Nitrógeno	Nitrificación / Desnitrificación
	Absorción por las plantas
	Retención en el soporte de arena (adsorción)
Fósforo	Precipitación con aluminio, hierro y calcio
	Absorción por las plantas
Metales pesados	Precipitación y adsorción. Absorción por las plantas
	Adsorción por la biopelícula y partículas de arena
Contaminantes orgánicos	Descomposición por el tiempo de retención y a las bacterias especializadas
	Sedimentación, filtración y Absorción
Patógenos	Depredación por otros organismos.
	Muerte natural por condiciones ambientales desfavorables (temperatura, tiempo de retención, radiación solar y pH)

Fuente: tomado de (Hoffman et al., 2011).

2.6.3.1 Mecanismos físicos

Autores como Alufasi et al., (2017); Boutilier et al., (2010); Kansime & Vann- Bruggen, (2001), indican que la sedimentación y filtración están señalados como los mecanismos más efectivos para remover coliformes totales-fecales, algunas bacterias patógenas y parásitos. La sedimentación es un proceso en el cual las partículas presentes en el agua se asientan por el efecto de la gravedad y en este paso algunos microorganismos como bacterias y parásitos se asocian a estas partículas formando lo que se conoce como flóculos, las velocidades de sedimentación de estos grumos dependerán del tipo de microorganismo (López et al., 2019). Por ejemplo, algunos autores como Karathanasis et al., (2003); Vacca et al., (2005) mencionan en sus estudios que los coliformes fecales y los huevecillos de helmintos presentaron altas velocidades de sedimentación, mientras que protozoarios como los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y los quistes de *Giardia intestinalis* presentan velocidades menores, no obstante, en cualquiera de los casos según indica Quiñonez-Díaz et al., (2001) estos patógenos solamente pueden ser eficientemente eliminados a través del mecanismo de sedimentación.

El mecanismo de adsorción se presenta particularmente a través de la filtración y es causada por la interacción entre los microorganismos, las raíces de las plantas y el material de soporte, dicha interacción depende de la composición iónica del medio y la carga electroquímica (Wu et al., 2016). La filtración es un proceso en el cual se eliminan las partículas en suspensión en el agua y tiene un rol importante en los humedales de flujo subsuperficial, Kansime & Vann- Bruggen (2001), en su estudio encontraron un alto número de coliformes fecales adheridos en las raíces de *C. papyrus* y en menor cantidad en las raíces de *Mascanthidium violaceum* lo anterior debido a que esta última presente más compactación y menos cantidad de raíces lo que resulta en menor superficie disponible para la filtración.

De acuerdo con Morató et al., (2014) la eficiencia en el proceso de filtración está dada por el tamaño en el soporte grava, una granulometría de aproximadamente entre (3 a 7) mm presenta mejor rendimiento para capturar organismos. Por ende, la cantidad de bacterias que son retenidas es inversamente proporcional a la granulometría de las piedras utilizadas como soporte actuando como filtros en los humedales (Alufasi et al., 2017; López et al., 2019).

2.6.3.2 Mecanismos biológicos

El mecanismo o las acciones de predación según Vymazal, (2014) son el principal mecanismo de remoción biológico, este proceso implica la ingestión de microorganismos por otros, lo cual depende de la densidad de bacterias y de las especies presentes de protozoarios, nematodos, rotíferos y bacteriófagos. Se conoce que protozoarios ciliados de vida libre como *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis* y *Halteria grandinella* son predadores de bacterias como *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, presentando porcentajes mayores de un 90% de ingestión (Ali & Saleh, 2014). Autores como García et al., (2013) resaltan que la muerte de los microorganismos por depredación fue el principal mecanismo de remoción en su estudio. Aunado a estos procesos como la muerte natural está influenciada por parámetros como TRH, pH y temperatura (Stefanakis et al., 2016; Wu et al., 2016).

El efecto de la vegetación sobre la remoción de contaminantes microbiológicos es en su mayoría indirecto, debido que su función principal es proporcionar un área superficial para atraer y almacenar contaminantes como materia orgánica, nutrientes y metales pesados, sin embargo, se conoce que las plantas liberan pequeñas cantidades de oxígeno al agua a través de sus raíces, lo que esta reportado como un efecto indeseable para ciertas bacterias entéricas que son facultativas o anaerobias (Wu et al., 2016).

2.6.3.3 Mecanismos químicos

Con respecto a los procesos químicos, la liberación de exudados por las raíces de algunas plantas es un mecanismo que influye en la reducción de la contaminación por medio de la liberación de sustancias que contienen aminoácidos, polisacáridos y metabolitos secundarios que tienen función antimicrobiana (Chen et al., 2016). Exudados de especies como *P. communis*, *T. latifolia*, *Arundo donax*, *Polygonum hydropiper* y *Polygonum orientale*, han demostrado ser eficientes para la reducción de virus y colifagos (Li et al., 2014) y exudados de *E. pyramidalis* para la remoción de *E.*

coli (Lekeufack et al., 2012). Mientras que especies como *Leptospermum continentale*, *Palmetto buffalo* y *Carex appressa* no presentaron inhibición en el crecimiento sobre la bacteria *E. coli* (Chandrasena et al., 2017).

Otros factores como el tiempo de retención hidráulico (TRH) y temperatura influyen en el rendimiento de eliminación de microorganismos en los humedales artificiales. El TRH es el tiempo necesario que debe permanecer el agua residual dentro del sistema, se conoce que un aumento en estos tiempos puede favorecer la exposición de los microorganismos a los procesos físicos como filtración, sedimentación y predación (Quiñonez-Díaz et al., 2001; Tunçsiper et al., 2012). Estos tiempos de retención depende a su vez de la vegetación y del sustrato (Kansiime & Vann- Bruggen, 2001). Por su lado, la temperatura por influencia de la época estacional tiene un aporte en la eficiencia de remoción de los contaminantes (Stefanakis et al., 2016). Se conocen que temperaturas por encima de los 15 grados mejoran el desempeño de remoción, mientras que temperaturas bajas provocan la inactivación de los microorganismos. Algunos estudios sugieren que la reducción de microorganismos incrementa durante el verano y disminuye en el invierno, lo anterior debido a que a un aumento en la temperatura tiene efectos favorables sobre los procesos biológicos, como por ejemplo el metabolismo de bacterias y protozoarios, aumento de la depredación, incremento en la producción de enzimas por parte de las plantas, hongos y bacterias que podrían estar relacionado con la degradación de la cápside de los virus o daño en su material genético (ADN o ARN) (Lekeufack et al., 2012; Morató et al., 2014).

3. Marco Metodológico

El objeto de estudio de esta investigación fue el sistema de tratamiento alternativo para aguas residuales (SATAR-UNA), el cual se encuentra ubicado en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Este sistema cuenta con una extensión de 2050 m² y depura las aguas residuales provenientes de los laboratorios, los servicios sanitarios, baños, hospital veterinario, soda y los establos pertenecientes a dicha Escuela. En la figura 3, se ilustra el esquema del SATAR-UNA el cual consiste en un conjunto de rejillas, un tanque Imhoff, cuatro unidades correspondientes a HAs de flujo subsuperficial horizontal, un lecho de secado para los lodos y una unidad de desinfección. En el momento de la investigación los humedales se encontraban operando en paralelo, lo que significa que cada unidad recibe la misma cantidad de agua residual. En total el sistema tiene una capacidad hidráulica para tratar un caudal de 40 m³/día y con un área superficial de 800 m².

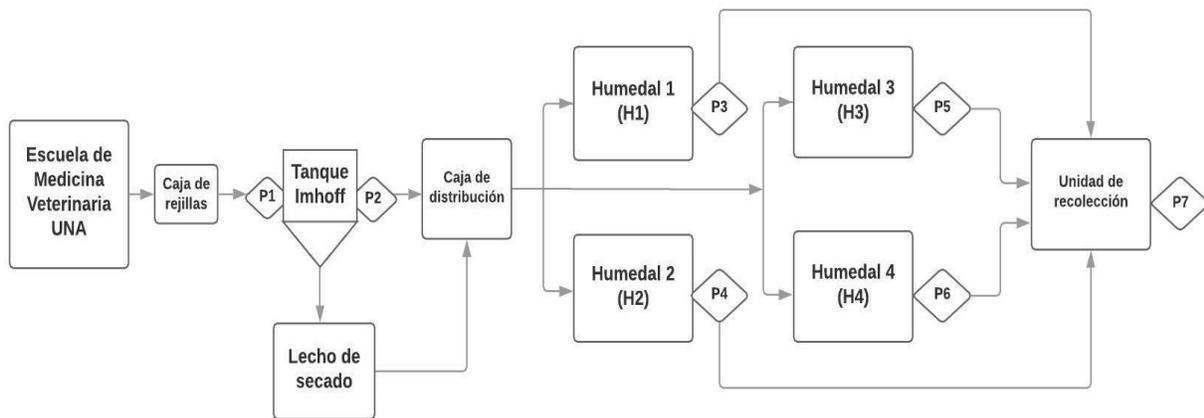


Figura 3. Diagrama de bloques del sistema alternativo de tratamiento de aguas residuales de la Escuela de Medicina Veterinaria (SATAR-UNA), ubicado en el campus Presbítero Benjamín Núñez de la Universidad Nacional.

El sustrato (piedra) de tres humedales fue plantado en marzo del 2018, cada uno consiste en un monocultivo de una especie de planta. El humedal H1 fue plantada con la especie *Heliconia psittacorum* L.F. comúnmente conocida como “avecilla”; el humedal H2, con *Molinieria capitulata* (Lour.) Herb. también llamada “coquito” y el humedal H4, con *Pennisetum alopecuroides*, conocida como “cola de zorro”. El humedal H3 se encuentra sin vegetación con la finalidad de que actúe como una unidad de control.

3.1 Muestreo de las aguas residuales

Se recolectaron muestras mensuales durante el periodo de octubre del 2019 a febrero del 2020. Las estructuras designadas como Pn en la figura 3 fueron los puntos donde se tomaron las muestras de agua residual. Específicamente, los puntos P1 y P2 corresponden al influente y efluente del tanque Imhoff, respectivamente; los puntos P3, P4, P5 y P6 son los efluentes de los respectivos humedales artificiales y finalmente el punto P7, que es la salida de todo el sistema.

El desempeño en la remoción de los contaminantes microbiológicos de cada humedal fue valorado por la determinación de coliformes fecales y *E. coli*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp. y huevecillos de Helminths; los análisis de estos parámetros se realizaron según los Métodos Estandarizados para la Examinación de Agua y Agua Residual (Baird et al., 2017). La cuantificación de los huevecillos de helmintos se realizó según el protocolo establecido en la Norma Mexicana NOM-004 (cuadro 4). Se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos *in situ* con el medidor multiparámetro marca WTW (pH, T °C, OD). Los parámetros de DQO, DBO, Sólidos Sedimentables (S Sedim), compuestos nitrogenados (NTK, N-org y N-NH₄⁺) y fosfato (P-PO₄³⁻), fueron analizados por el LAGEDE con el fin de conocer la eficiencia en cuanto a remoción de parámetros fisicoquímicos.

Cuadro 4. Métodos de referencia establecidos para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos en laboratorio.

Análisis	Método de referencia
Determinación de Coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> (NMP)	9221C, 9221E, 9223B, 9221F
Determinación cualitativa de <i>Salmonella</i> spp.	9260D
Determinación cualitativa de <i>Shigella</i> spp.	9260E
Determinación y Cuantificación de Huevecillos de Helminths	NOM-004-SEMARNAT-2002
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	5220-D
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	5210-B
Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)	4500
Nitrógeno Amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	4500A
Nitrógeno orgánico (Norg)	4500-N _{org} C
Fósforo (P-PO ₄ ³⁻)	4500P-D
Sólidos sedimentables	2540 F

Fuente: (al Ambiente, P. F. D. P., 2003; Baird et al., 2017).

Las muestras para los análisis microbiológicos (coliformes fecales y *E.coli*) se recolectaron en botellas de vidrio de 250 mL previamente esterilizadas. Al llenar el recipiente con la muestra, se procuró llegar hasta un volumen de 200 mL, con la finalidad de dejar un espacio o “burbuja de aire” que permitiera la homogeneización de la muestra. En el caso de los microorganismos tales como *Samonella* spp. y *Shigella* spp., 72 horas previo a la recolección de las muestras se colocaron hisopos de Moore (dispositivo formado por gaza de algodón que se amarra con cinta de nylon) en cada caja de los puntos de muestreo. Finalmente, para la determinación de los huevecillos de helmintos se recolectaron muestras en recipientes de plástico de 4000 mL. Todos los recipientes con las muestras se depositaron en un contenedor con hielo para su traslado y posterior análisis en el Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados en un tiempo menor a las 24 horas desde su recolecta.

3.2 Análisis microbiológicos

Se tomaron varios microorganismos como indicadores para ser analizados:

a. **Coliformes fecales y *Escherichia coli***

Se utilizó la técnica de tubos múltiples (NMP) con una serie de 5 tubos con caldo lauril triptosa concentrado y simple (Becton Dickinson™ 224150), con diluciones decimales tomando 1 mL a partir de la muestra y transfiriendo el volumen a un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada estéril al 0.1% (BD™ 211677) homogenizando adecuadamente entre cada dilución, hasta realizar una dilución de 10^{-8} . Específicamente en la serie de 5 tubos con el caldo lauril triptosa concentrado, se inoculó cada tubo con 10 mL de la muestra, en el caso de la serie de 5 tubos con caldo lauril simple se inoculó cada tubo con 1 mL de la muestra y en las siguientes series 1 mL de la dilución decimal, tal como se mencionó anteriormente.

Las gradillas con los tubos inoculados se colocaron en una incubadora a temperatura de (35 ± 1) °C, por (48 ± 2) horas; pasado el periodo de incubación, los tubos donde se observó la presencia de gas y turbiedad, se consideraron como una prueba presuntiva positiva, subsecuentemente, se

inoculó 100 µL de cada tubo positivo en medio EC-MUG (BD™ 222200), posteriormente, se incubaron en baño maría a $(44,5 \pm 0,2)$ por (24 ± 2) horas. Al finalizar el periodo de incubación, se tomaron como positivos para coliformes fecales los tubos con turbiedad y producción de gas. Para la confirmación de *E. coli* los tubos positivos del caldo EC-MUG se expusieron a luz UV, donde la presencia de fluorescencia resultó una prueba confirmativa para *E. coli*. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo en paralelo con tres controles para las lecturas (control positivo con la cepa *E. coli* ATCC® 25922™, control negativo con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ y el control sin inculo).

b. ***Salmonella* spp.**

Para el pre-enriquecimiento, el hisopo Moore se colocó en una botella plástica de 1000 mL con agua peptonada buferizada (APB) (BD™ 218105), con cantidad suficiente que cubriera toda la superficie del hisopo. Posteriormente se incubó a (35 ± 1) °C por (24 ± 2) horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió 10 mL del pre-enriquecimiento de cada muestra en un erlenmeyer con 90 mL de Caldo Selenito Cistina (BD™ 268740) y otro erlenmeyer con 90 mL de Caldo Gram Negativa con modificación Hajna (BD™ 250561), y se incubaron por (48 ± 2) horas a (35 ± 1) °C, este paso constituyó al enriquecimiento.

A las 48 horas de incubación, se procedió a inocular una asada del enriquecimiento en el medio de cultivo Agar salmonela-shigella (SS) (BD™ 250929) y Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (BD™ 278850), realizando un rayado con el objetivo de aislar colonias (UFC); se preparó el control positivo rayando una asada de un cultivo de *Salmonella enterica* ATCC® 14028™, se procedió de la misma manera para preparar el control negativo rayando un cultivo de *E. coli* ATCC® 25922™ y un control del medio sin inculo. Se incubaron las placas de Agar SS y Agar XLD a (35 ± 1) °C por (24 ± 2) horas. De las placas inoculadas, se seleccionaron las colonias típicas de *Salmonella* spp. en Agar SS y Agar XLD, las cuales presentaron color rojo brillante y con el centro negro (producción de H₂S), sin embargo, se procedió a identificar las colonias atípicas las cuales presentaba una morfología diferente: colonias transparentes, blanquecinas y sin presencia de H₂S (ausencia del pigmento negro en el agar).

Posteriormente se procedió con la identificación de las colonias, para lo cual las colonias sospechosas por *Salmonella* spp. se inocularon en tubos de: Agar triple azúcar-hierro (TSI) (BD™ 254458), Agar lisina-hierro (LIA) (BD™ 284920), Agar tripticasa de soya (ATS) (BD™ 236950) y Agar Motilidad. Se incubaron a (35 ± 1) °C por (18-24) h. A partir del cultivo en ATS se realizó la prueba de oxidasa y la tinción de Gram (reactivo modificación Kopeloff-Beerman). Si los resultados de estas pruebas (morfología de bacilos, oxidasa negativa y Gram-negativos) sugerían la presencia de *Salmonella* spp. se procedió a montar las galerías de reacciones bioquímicas API®-20E (bioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se incubaron a (35 ± 1) °C por (18-24) h. Transcurrido este tiempo se anotó el bionúmero y se buscó el resultado en la base de datos proporcionada en la página web de bioMérieux (<https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/apiwebtm>), para la identificación de enterobacterias.

c. ***Shigella* spp.**

Para el pre-enriquecimiento y enriquecimiento se realizó el mismo procedimiento de *Salmonella* spp. A las 48 horas de incubación, se procedió a inocular una asada del enriquecimiento en el medio de cultivo Agar SS y Agar XLD, realizando un rayado con el objetivo de aislar colonias (UFC), se preparó el control positivo rayando una asada de un cultivo de *Shigella sonnei* ATCC® 25931™, se procedió de la misma manera para preparar el control negativo rayando un cultivo de *E. coli* ATCC® 25922™ y un control del medio sin inóculo. Se incubaron las placas de Agar SS y Agar XLD a (35 ± 1) °C por (24 ± 2) horas. De las placas inoculadas, se seleccionaron las colonias con la morfología típica de colonias de *Shigella* spp. en Agar XLD y Agar SS: transparentes u opacas, lisas y sin producción de H₂S, ausencia del pigmento negro en el agar.

Luego se procedió con la identificación de las colonias, para lo cual las colonias sospechosas de ser *Shigella* spp. se inocularon en tubos de: Agar TSI, Agar LIA, ATS y Agar Motilidad, posteriormente se incubaron a (35 ± 1) °C por (18-24) h. A partir del cultivo en ATS se realizó la prueba de oxidasa y tinción de Gram (reactivo modificación Kopeloff-Beerman). Si los resultados de estas pruebas (morfología de bacilos, oxidasa negativa y Gram-negativos) sugerían la presencia de *Shigella* spp. se procedió a montar las galerías de reacciones bioquímicas API®-20E (bioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se incubaron a (35 ± 1) °C

por (18-24) h. Transcurrido este tiempo se anotó el bionúmero y se buscó el resultado en la base de datos proporcionada en la página web de bioMérieux (<https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/apiwebtm>), para la identificación de enterobacterias.

d. **Huevecillos de Helminetos**

Se realizó un filtrado de los 4000 mL de la muestra a través de un tamiz de 150 micras y se depositó en un recipiente de 5 L, luego se dejó sedimentar durante 24 horas. Una vez sedimentada la muestra, se aspiró el sobrenadante mediante una bomba de vacío marca Sartorius y se depositó el sedimento en una botella de centrifuga de 250 mL, incluyendo de 2 a 3 enjuagues del recipiente de 5 litros y se centrifugó a 400 g por 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante por vacío y se resuspendió el sedimento en 150 mL de Sulfato de Zinc al 33% ($ZnSO_4$, JT™ 4382-01). Se homogenizó el sedimento con agitación y se centrifugó a 400 g por 5 minutos. En seguida, se recuperó el sobrenadante vertiéndolo en un frasco de 2 litros y se dejó sedimentar durante 24 horas.

Posteriormente, se aspiró el sobrenadante por vacío y luego se resuspendió el sedimento agitándolo, se vertió el líquido resultante en tubos de centrifuga y se lavó de 2 a 3 veces con agua destilada el recipiente de 2 litros. Se centrifugaron a 480 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se reagruparon los sedimentos en tubos de centrifuga. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4,5 mL de solución de alcohol-acido (H_2SO_4 0.1 N) + C_2H_5OH a 33-35% y se adicionaron 3 mL de éter etílico. Posteriormente se centrifugaron a 660 g por 5 minutos; finalizado este tiempo se aspiró la mayor cantidad del sobrenadante dejando aproximadamente 1 mL de líquido y luego se procedió a cuantificar.

Para la cuantificación se procedió a distribuir todo el sedimento en una celda de Sedgwick-Rafter y se realizó un barrido del total de la muestra con un microscopio de luz óptica, marca Olympus BX43. Los resultados se expresaron en número de huevecillos/Litro dividiendo la cantidad de huevecillos encontrados entre el volumen inicial de muestra.

3.3 Análisis de datos

Se calculó el porcentaje de remoción promedio mensual del NMP de coliformes fecales y *E. coli* mediante la siguiente fórmula: $Rm = (C_a - C_i)/C_a \times 100$, donde Rm : es el porcentaje de remoción; C_a : es la concentración del afluente de los HAs; y C_i : es la concentración de salida de los humedales, por ejemplo: *Heliconia psittacorum* (P3), *Molinaria capitulata* (P4), Control (P5), *Pennisetum alopecuroides* (P6) y efluente del sistema (P7).

Para los análisis estadísticos, los valores microbiológicos correspondientes a los coliformes fecales y *E. coli* se transformaron a logaritmo natural con el objetivo de buscar una Distribución normal o Gaussiana. Todos los sitios de muestreo (P1 a P7) fueron comparados mediante análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y prueba *a posteriori* de *Tukey HSD*. Todos los supuestos estadísticos fueron verificados. La relación de todas las pares de variables microbiológicas y fisicoquímicas para todos los sitios de muestreo (P1 a P7), se analizaron mediante correlaciones de *Spearman* (r_p). Finalmente, la relación entre el NMP (coliformes fecales y *E. coli*) y la cantidad de nitrógeno total Kjeldahl (NTK), se evaluó a través de un ajuste de regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se ejecutaron en el lenguaje de programación *R*, versión 3.6.3 (RcoreTeam, 2020) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

4. Resultados

4.1. Parámetros fisicoquímicos

En el cuadro 5, se muestran los resultados promedios de los parámetros fisicoquímicos analizados en el SATAR-UNA como medida complementaria a la evaluación microbiológica realizada en este estudio. Los valores de temperatura y pH se mantuvieron estables durante todo el período de muestreo cumpliendo, el primero con valores entre 15°C a 40°C (el rango establecido en la normativa nacional), mientras que el pH mantuvo valores entre 5 a 9 (Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud, 2007). Los parámetros que presentaron mayores porcentajes de remoción en la salida del sistema (P7), fueron 95.37% y 90.11%, para SSedim y Norg, respectivamente y el valor más bajo fue 63.09% P-PO₄³⁻. En la salida del HA (P3) se observó el mayor porcentaje de remoción de DBO₅ (81.60 %), no obstante, se registró el valor más bajo del cociente DBO₅/DQO (0.27) y en la salida del HA (P2) este valor fue el más alto (0.48).

Cuadro 5. Valores promedios de parámetros fisicoquímicos medidos entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA.

Parámetro (abb. Unit)	Salidas de los puntos de muestreo						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH	7.28 ± 0.47	7.38 ± 0.44	7.23 ± 0.67	7.28 ± 0.39	7.23 ± 0.38	7.30 ± 0.26	7.43 ± 0.42
Temperatura (°C)	24.62 ± 1.15	24.93 ± 1.27	25.05 ± 1.27	25.38 ± 1.36	27.88 ± 1.09	23.78 ± 1.30	25.33 ± 1.41
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO, mg/L)	107.25 ± 49.06	53.00 ± 26.44	9.75 ± 1.71	11.50 ± 1.91	11.00 ± 2.94	12.00 ± 5.10	12.25 ± 3.95
Porcentaje remoción DBO (%)	NA	50.60	81.60	78.30	79.20	77.40	88.60
Demanda química de oxígeno (DQO, mg/L)	246.00 ± 161.07	111.00 ± 87.89	36.00 ± 13.98	30.75 ± 18.82	35.50 ± 15.80	29.50 ± 14.15	41.25 ± 28.80
Porcentaje remoción DQO (%)	NA	54.88	67.56	72.29	68.01	73.42	83.23
DBO/DQO	0.44	0.48	0.27	0.37	0.31	0.41	0.29
Nitrógeno total Kjeldahl (NTK, mg/L)	24.83 ± 9.87	18.85 ± 8.07	2.98 ± 1.36	5.00 ± 2.25	3.25 ± 1.58	2.61 ± 0.71	3.88 ± 1.25
Porcentaje de remoción NTK (%)	NA	23.99	84.19	73.47	82.75	86.15	84.35
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄ ⁺ , mg/L)	14.62 ± 6.47	13.65 ± 4.01	2.02 ± 1.35	3.76 ± 2.65	2.47 ± 2.03	1.69 ± 1.37	2.87 ± 1.01
Porcentaje remoción Nitrógeno amoniacal (%)	NA	6.63	85.20	72.45	81.90	87.61	80.36
Nitrógeno orgánico (Norg, mg/L)	10.21 ± 8.09	5.20 ± 5.91	0.96 ± 0.45	1.24 ± 1.12	0.78 ± 0.50	0.92 ± 1.53	1.01 ± 0.83
Porcentaje remoción Nitrógeno orgánico (%)	NA	49.07	81.53	76.15	85.00	82.30	90.11
Fósforo (P-PO ₄ ³⁻ , mg/L)	4.66 ± 5.23	4.21 ± 4.93	1.68 ± 1.00	1.37 ± 1.13	1.23 ± 0.81	1.08 ± 2.06	1.72 ± 1.78
Porcentaje remoción Fósforo (%)	NA	9.66	60.09	67.45	70.78	74.35	63.09
S Sedim (mg/L)	1.08 ± 1.03	0.33 ± 0.24	0.00	0.05 ± 0.00	0.00	0.13 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Porcentaje remoción S Sedim (%)	NA	69.44	100.00	84.85	100.00	60.60	95.37

P1: afluente del sistema, P2: salida del tanque Imhoff, P3: salida del humedal H. psittacorum, P4: salida del humedal M. capitulata, P5: salida del control, P6: salida del humedal P. alopecuroides. Media ± Error estándar

4.2. Concentración y remoción microbiológica

Se encontró una reducción estadísticamente significativa entre la concentración del NMP para coliformes fecales y *E. coli* en todas las salidas de los humedales (P3 a P6), además en el efluente del sistema (P7) con respecto a la carga inicial del afluente del sistema (P1) (Cuadro 6); no obstante, los resultados obtenidos en los puntos P3, P4, P5 y P6 correspondientes a las salidas de los cuatro humedales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Con respecto a la remoción global se obtuvo una eficiencia entre los 51.9 % y 50.9 % de coliformes fecales y *E. coli* (NMP), respectivamente, en la salida del sistema (Cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de las concentraciones de Coliformes fecales, *Escherichia coli* y helmintos y detección de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA.

Sitios de muestreo	Abbr	Coliformes fecales log(NMP 100 mL-1)	<i>E.coli</i> log(NMP 100 mL-1)	Remoción (%) Coliformes fecales	Remoción (%) <i>E.coli</i>	Helmintos (Huevos 1000 mL-1)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
Afluente del sistema	P1	5.57 ± 0.468 a	5.47 ± 0.485 a	---	---	4	Presencia	Ausencia
Salida del Imhoff	P2	5.33 ± 0.449 a	5.28 ± 0.413 a	3.2 ± 6.86 b	2.2 ± 6.94 b	4	Presencia	Ausencia
<i>H. psittacorum</i>	P3	2.50 ± 0.493 b	2.46 ± 0.504 b	56.4 ± 5.76 a	56.6 ± 5.60 a	1	Presencia	Ausencia
<i>M. capitulata</i>	P4	2.45 ± 0.429 b	2.45 ± 0.429 b	56.7 ± 4.57 a	55.8 ± 4.44 a	2	Ausencia	Ausencia
Control	P5	3.09 ± 0.506 b	2.60 ± 0.529 b	44.4 ± 8.86 a	53.5 ± 7.16 a	0	Ausencia	Ausencia
<i>P. alopecuroides</i>	P6	2.92 ± 0.391 b	2.83 ± 0.414 b	47.6 ± 6.48 a	47.4 ± 7.95 a	1	Ausencia	Ausencia
Efluente del sistema	P7	2.73 ± 0.383 b	2.73 ± 0.383 b	51.9 ± 3.45 a	50.9 ± 3.76 a	0	Ausencia	Ausencia
$F_{(6, 28)} =$		9	8.9	10.5	11.6	---	---	---
$R^2 =$		0.66	0.66	0.69	0.71	---	---	---
$P =$		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	---	---	---

ANDEVA (factor: sitio de muestreo); F : valor de Fisher; R^2 : coeficiente de determinación; P : probabilidad del modelo; Media ± Error estándar; Letras iguales indican no diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de muestreo, *Tukey HSD* ($P > 0.05$).

4.3. Correlación de variables microbiológicas y fisicoquímicas

En general, todas las variables fisicoquímicas estuvieron correlacionadas de manera positiva con las variables microbiológicas, a excepción del oxígeno disuelto (OD) que mostró una correlación negativa con estas (Figura 4); asimismo el cociente DBO:DQO y la cantidad de log (*E. coli*) no tuvo correlación significativa entre sí ($P>0.05$). Adicionalmente, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre las variables fisicoquímicas ($P<0.05$) (Figura 4).

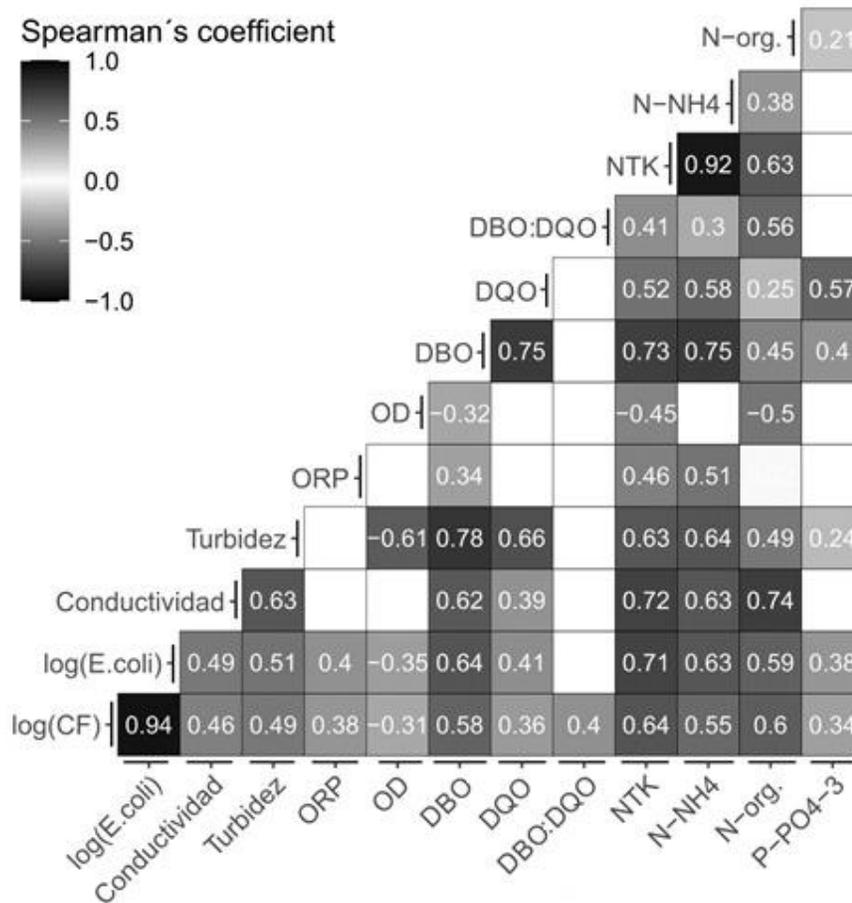
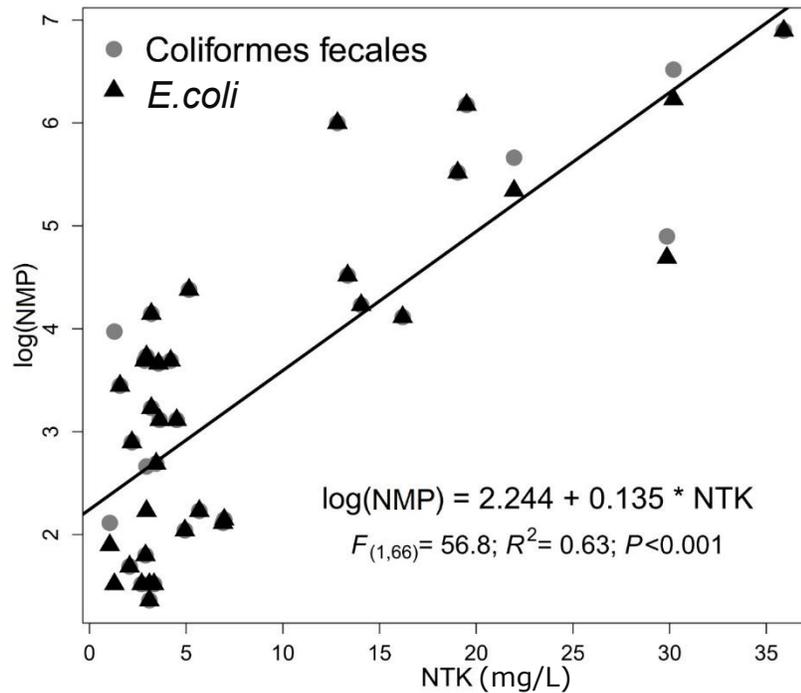


Figura 4. Matriz de coeficientes de correlación de *Spearman* (r_p , $P<0.05$) entre todas las variables microbiológicas y fisicoquímicas para todos los sitios de muestreo (P1 a P7). Datos recolectados entre octubre 2019 y febrero 2020 en el SATAR-UNA. Cuadros en color blanco indican no correlación ($r_p=0$; $P>0.05$).

Finalmente, debido a la fuerte correlación positiva entre el NTK y el NMP de coliformes fecales y *E. coli*, se estableció un modelo de regresión lineal, donde la variabilidad del NMP se ajustó con un $R^2 = 0.63$ (criterio de información de Akaike (AIC)= 100.83; $P < 0.001$; Figura 5).



5. Discusión

Se estudió la presencia del grupo de coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp y huevecillos de helmintos, como indicadores de inocuidad dado su importancia como agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales. El control de estos patógenos en la salida de la planta de tratamiento de aguas residuales (SATAR-UNA) es un factor crucial para el buen estado de salud de los cuerpos de agua receptores y, por consiguiente, la protección a la salud humana (Alufasi et al., 2017; Calheiros et al., 2017; Stefanakis et al., 2019).

En referencia a los parámetros fisicoquímicos su análisis se realizó de forma complementaria con la evaluación microbiológica. Con respecto al tanque Imhoff (P2) al ser un sistema de tratamiento anaerobio el control del pH en la salida es fundamental para conocer el desempeño de esta tecnología. Se puede afirmar que los valores promedios de pH obtenidos en este estudio, son los adecuados para el desarrollo de los microorganismos anaerobios, los cuales son los responsables de degradar la materia orgánica y de realizar los procesos de conversión del nitrógeno en estos sistemas, además permiten deducir que no se están dando proceso de acidificación debido a la producción de AGVs (ácidos grasos volátiles) (Gray, 2004); altos valores de estas sustancias podrían afectar las funciones de los microorganismos y plantas en los HAs. La remoción de patógenos y nutrientes en este sistema fue baja, lo cual era de esperar ya que la función principal en estos sistemas es la remoción de sólidos sedimentables y materia orgánica (Fernández-Polaco & Seghezzi, 2015). No obstante, el porcentaje promedio de DBO obtenido en la salida de este sistema fue superior a los valores que se reportan (25 a 35%) para esta tecnología (Marín & Osés, 2013), por ende no cumplen con el valor máximo permisible para vertido o descarga a los cuerpos de agua receptores de acuerdo al Decreto N° 33601 (2007), por lo tanto es necesario la implementación de un tratamiento secundario adicional. Dado que los valores del cociente DBO₅/DQO en el efluente del tanque Imhoff fueron mayores a 0.40, se afirma que las aguas residuales recibidas en el SATAR-UNA son altamente biodegradable (Ryder, 2017) por lo que su tratamiento mediante HAs es el adecuado.

Con respecto a los valores de pH y temperatura reportados en las salidas de los HAs, estos se encontraron en un rango óptimo para el crecimiento de los microorganismos responsables de la

descomposición de la materia orgánica y nutrientes, promoviendo así el buen desempeño del sistema en cuanto a la disminución de la carga orgánica en las aguas residuales que recibe el SATAR-UNA. Los porcentajes obtenidos de remoción para DBO y DQO son característicos en sistemas que se ubican en regiones climáticas similares a Costa Rica (Alfaro et al., 2013; Pérez-Salazar et al., 2019; Zhang et al., 2015), por lo que demuestra que el sistema fue efectivo para remover los contaminantes orgánicos permitiendo obtener a la salida del sistema valores menores a lo que establece la normativa nacional vigente de 50 mg/L DBO y 150 mg/L DQO (Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud, 2007). Con respecto al valor del cociente DBO₅/DQO en el punto P7, la baja biodegradabilidad era de esperarse debido a que el agua residual ya ha pasado a través de un proceso de tratamiento biológico, por ende, este efluente ya no es susceptible para ser dirigido a otro tratamiento biológico; además, el bajo valor del parámetro DQO permite la suposición de que no existe una gran cantidad de constituyentes tóxicos en los efluentes del sistema que pueda afectar el cuerpo receptor de estas aguas residuales (Ryder, 2017).

En referencia a la remoción de los nutrientes como nitrógeno y fósforo, los valores reportados fueron similares en todos los puntos de salidas de los HAs. En el caso del nitrógeno se obtuvo porcentajes de remoción superiores al 70%, específicamente los humedales plantados con *H. psittacorum* y *P. alopecuroides* presentaron un mejor desempeño con respecto al humedal control; Autores como Quintero et al., (2021) en su estudio utilizando la especie *H. psittacorum*, reportan datos similares de transformación del nitrógeno y lo asocian a los procesos de asimilación, nitrificación y desnitrificación y a los pH óptimos del agua residual (6.5 y 7.5) que permiten el crecimiento de las bacterias. El nitrógeno en las aguas residuales puede estar presente en diferentes formas y una vez que ingresa en los HAs es transformado por las bacterias responsables de los procesos de nitrificación y desnitrificación, convirtiéndolo en formas disponibles (NO_3^- , NH_4^+) para ser asimilado por las plantas y microorganismos (Marín & Osés, 2013; Souza & de Aguiar Junior, 2020). Otra manera de eliminación es la absorción del amoníaco sobre el material de soporte (Bakhshoodeh et al., 2020); en el caso de los humedales de flujo subsuperficial como los presentes en el SATAR-UNA al predominar las condiciones anaerobias se favorecen los procesos de desnitrificación que promueven la liberación del nitrógeno a la atmósfera en forma de gas (Salas, 2007), lo anteriormente expuesto en conjunto podría justificar los resultados obtenidos en este estudio.

En cuanto a la remoción de fósforo se observaron porcentajes superiores a los reportados en la literatura para HAs de flujo subsuperficial horizontal (31 a 60)% (Bakhshoodeh et al., 2020; Zhang et al., 2015). Los procesos que mayormente contribuyen en la reducción de este nutriente en los HAs son mediante la precipitación y la adsorción por el material de soporte, unión con sedimentos y una pequeña parte es tomado por las plantas (Nandakumar et al., 2019); sin embargo, el alcance de los procesos basados en mecanismos de separación con el tiempo se ve limitado debido a la saturación del material de soporte, por tanto los valores de reducción del fósforo son más altos durante los primeros años de funcionamiento de los HAs, y posteriormente van disminuyendo (Stefanakis et al., 2019), lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en el SATAR UNA, sin embargo, no se puede descartar la participación de las plantas dado que el humedal P6 fue el que presentó mayor porcentaje de remoción de fósforo; observaciones similares fueron reportadas por Udom et al., (2018) donde los humedales plantados con *Pennisetum* sp. obtuvieron porcentajes ligeramente mayores con respecto al humedal control, no obstante comparado con lo observado en el presente estudio, los autores reportaron valores muy bajos de remoción y lo explican a que el TRH fue insuficiente para proporcionar el adecuado contacto entre el agua residual y los procesos responsables en los HAs de la remoción de este nutriente.

Cabe mencionar que aunque el SATAR-UNA fue diseñado según la carga orgánica de DBO, los valores de remoción de NTK y PO₄, observados en los HAs, mostraron valores inferiores a los esperados según el criterio de diseño para los humedales artificiales de flujo subsuperficial horizontal (10 mg/L NTK y PO₄ 5 mg/L) (Romero, 2004). Además, aunque la legislación nacional no estable el análisis de estos parámetros como obligatorio en aguas residuales de tipo ordinario, son parámetros complementarios de análisis obligatorio en aguas residuales provenientes de actividades de tipo ganadera, criaderos de animales (vacas, ovejas, cabras, caballos, entre otros) y manufactura de fertilizantes, con valores máximos admisibles de 50 mg/L de nitrógeno y 25 mg/L de fosfatos (N° 33601-MINAE-S, 2007); su vigilancia es importante debido a que son los responsables de los procesos de eutrofización en los cuerpos de agua receptores (Nandakumar et al., 2019; Ryder, 2017). Por lo anterior, las concentraciones de los nutrientes en las salidas de los HAs cumplen como parámetro complementario presentando un adecuado porcentaje de remoción, similar a los valores promedio de remoción de (70% P y 86%NT) que presenta la PTAR André Challé y (68% P y 95% NT) en el caso de Montelindo, ambas plantas de tratamiento

convencionales operando con la tecnología de lodos activos, el sistema más común en Costa Rica (Ilena Vega Guzmán, comunicación personal, 23 de junio 2021).

Los valores de reducción obtenidos en coliformes fecales y *E. coli* (NMP) en el P7 con respecto a la carga inicial del afluente (P1), son los esperados en sistemas de tratamiento como el estudiado que se encuentran operando bajo condiciones ambientales estables (Vymazal, 2011; Rodríguez-García & Cárdena-Mijangos, 2014; López et al., 2019). Durante el paso del agua residual a través del lecho, los microorganismos se adhieren al medio soporte (piedra) y a las raíces de las plantas, formando biopelículas las cuales son las principales responsables de la degradación de componentes orgánicas y nutrientes, además estas estructuras contribuyen a la adsorción de los microorganismos patógenos (Kansiime & Vann-Bruggen, 2001; Winward et al., 2008; Stefanakis et al., 2016). Resultados similares de reducción fueron reportados por Calheiros et al., (2017), García et al., (2013), y Toscano et al., (2015), donde los autores resaltan el papel de la vegetación como un factor para mejorar la disminución de contaminantes microbiológicos con respecto al humedal control. Así mismo, Shingare et al., (2017) asociaron la eficiencia de reducción de coliformes fecales, *E.coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Ascaris lumbricoides*, a las plantas utilizadas que formaron un área densa de raíces y rizomas proporcionando una superficie para la unión de los microorganismos, resultando en el mejoramiento de la calidad de los efluentes.

No obstante, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la remoción del NMP de coliformes fecales y *E. coli* en las salidas de los humedales con respecto al humedal no plantado (control). Resultados similares fueron reportados por Manios, Stentiford, & Millner (2002) y Headley et al., (2013); lo anterior podría atribuirse a que los mecanismos de remoción en estos sistemas no solamente se pueden explicar por la presencia de vegetación (López et al., 2019). Algunos autores mencionan que la remoción de patógenos en los humedales artificiales se da principalmente por los mecanismos de filtración y sedimentación, de ahí que el medio de soporte tiene un rol importante en la reducción de contaminantes microbiológicos (Alufasi et al., 2017; Parde et al., 2020; Wang et al., 2020; Wu et al., 2016). En sus investigaciones, Morató et al., (2014) y Shingare et al., (2017) reportaron que los medios de soporte con granulometría fina como la arena con tamaños de 2 mm a 10 mm han demostrado ser eficientes en la remoción de contaminantes microbiológicos debido a que proporcionan una mayor superficie de contacto para

la adherencia de las bacterias al soporte quedando retenidas a este. Además, se conoce que los microorganismos se adhieren a los sedimentos en el agua y estos luego por el efecto de gravedad sedimentan; específicamente *E. coli* se asocia a partículas inorgánicas grandes y densas formando agregados, así que, al promover la remoción de sólidos suspendidos en los HAs, se logra también la disminución eficiente de los microorganismos, por ende, la sedimentación es un mecanismo que tiene gran significancia en la reducción de contaminantes patógenos en las aguas residuales (Boutilier et al., 2009; Karim et al., 2004; Quiñonez-Díaz et al., 2001).

En cuanto a *Shigella* spp., esta bacteria no fue detectada en ninguno de los puntos durante todo el muestreo, mientras que *Salmonella* spp. fue encontrada al menos una vez en los puntos P1, P2 y P3, pero no en los otros puntos del sistema; esta ausencia podría estar asociada a que estas bacterias se ven desplazadas por las poblaciones de otros microorganismos que se encuentran en mayor cantidad como es el caso de los coliformes fecales y *E. coli*, por ende, una vez en el agua residual estas bacterias mueren rápidamente debido a la competencia (Morató et al., 2014; Ottoson & Stenström, 2003). De igual manera, así como en el grupo de los coliformes fecales y *E. coli*, las bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. son el alimento de protozoarios ciliados, controlando así las poblaciones de coliformes en los tratamientos de aguas residuales (Ali & Saleh, 2014; Andreo et al., 2017; Shingare et al., 2017). No obstante, no es posible afirmar que la ausencia de estos microorganismos se debe a los factores mencionados anteriormente, debido a que los resultados no mostraron una tendencia durante el período de muestreo. Esto podría estar asociado a la disminución del caudal global de entrada al sistema, tanto por una baja en la ocupación como por el mantenimiento irregular.

Con respecto a las cantidades de huevecillos de helmintos encontradas en las muestras de los puntos P1 a P4 y P6, estas se ubican en el rango de la dosis mínima efectiva, la cual es de 1-10 huevecillos por Litro representando un riesgo para la salud humana y el ambiente si estas aguas residuales no son tratadas previamente antes de ser dirigidas al cuerpo de agua receptor (Jimenez, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por García et al., (2013) donde no lograron obtener el total de remoción para huevecillos de helmintos en las salidas de los humedales y lo asociaron a que el tamaño del material granular (1 cm) utilizado era relativamente grande. Investigaciones previas exponen que los humedales que contienen arena como material de soporte alcanzan

mejores desempeños en la remoción de estos patógenos, debido a que los procesos de filtración y sedimentación para la eliminación de estos microorganismos son más eficientes (Andreo et al., 2017; Vacca et al., 2005). En el caso de los HAs del SATAR-UNA el material soporte utilizado es piedra cuarta (3.8 cm) siendo está mucho más grande que arena, por lo que los procesos anteriormente mencionados son menos efectivos para la remoción de los huevecillos. No obstante, tal como ya se mencionó anteriormente para *Salmonella* spp. debido a que los resultados obtenidos fueron irregulares o variables, no es posible afirmar que la ausencia de estos microorganismos se deba a los factores mencionados anteriormente, puesto que los resultados no mostraron una tendencia durante el período de muestreo.

En cuanto a los resultados de correlación obtenidos, en el caso de la materia orgánica presente en el agua residual, se encontró una correlación positiva entre el cociente DBO - DQO y los valores de coliformes fecales (CF); de acuerdo con los resultados reportados por Burgos et al., (2017) se puede confirmar que la tasa de carga orgánica tiene un efecto sobre la reducción de bacterias coliformes. La correlación positiva entre coliformes fecales y *E. coli* y las concentraciones de nitrógeno en las aguas residuales, concuerdan con estudios previos reportados por Wu et al., (2016), esto debido a que estos microorganismos indicadores utilizan el nitrógeno, como fuente de nutriente para su metabolismo (Boyd, 2015; Díaz et al., 2010). También Russo et al., (2019) reportaron datos similares encontrando una correlación positiva entre los microorganismos indicadores y los valores de nitrógeno total.

La correlación negativa débil encontrada en esta investigación entre la concentración de oxígeno disuelto y los coliformes fecales y *E.coli*, podría atribuirse a que la cantidad de OD presente en el sistema proporcionó condiciones desfavorables para estas bacterias entéricas anaerobias facultativas provocando la muerte natural en ambientes acuáticos como los presentes en los humedales de flujo subsuperficial horizontal (Alufasi et al., 2017; Stefanakis et al., 2016; Headley et al., 2013; Vymazal, 2005). Sin embargo, la correlación débil sugiere que el parámetro de oxígeno disuelto se encontraba en un rango permitiendo la supervivencia de cierta cantidad de estos microorganismos (Ruso et al, 2019).

6. Conclusiones

- El sistema SATAR-UNA, bajo las condiciones climáticas en las que se encuentra ubicado, logro niveles significativos de remoción de coliformes fecales y *E. coli*. No obstante, los niveles de estas bacterias fecales en los efluentes del sistema aún son más altos que las normas reglamentarias del país para la reutilización de este tipo de aguas; por ende, es importante incrementar la eficiencia del sistema con un mantenimiento regular, para lograr una mayor reducción de estos microorganismos indicadores.
- A pesar de que el SATAR-UNA es un sistema estable, el mantenimiento irregular durante el periodo de muestreo, pudo haber producido una distribución desigual de las aguas residuales debido al atascamiento de sólidos que implicaría valores variables de TRH en los puntos de muestreo repercutiendo en los resultados obtenidos para *Salmonella* spp. y los huevecillos de helmintos.
- Aunque la especie *Molineria capitulata* (Lour.), no está descrita en la literatura consultada para el uso en HA, no mostró diferencias significativas con respecto a los demás humedales en cuanto a la reducción de los parámetros microbiológicos y presentó porcentajes de remoción mayores al 90% para los parámetros fisicoquímicos realizados.
- Debido a que el valor del cociente de DBO/DQO de las aguas residuales de la salida del tratamiento primario presentó un valor mayor a 0.3, se puede concluir que son aguas residuales que permiten ser tratadas mediante procesos biológicos predominantes en sistemas como los HAs.

7. Recomendaciones

- Se recomienda el uso rutinario de microorganismos indicadores de inocuidad como los coliformes fecales y *E. coli* para la evaluación en la eficacia de remoción de microorganismo en los humedales artificiales.
- Es importante realizar un mantenimiento regular de todos los componentes del SATAR -UNA, de manera que se garantiza el buen funcionamiento de todas sus partes para evitar atascamientos que provocan una distribución desigual del agua residual. A su vez es recomendable habilitar adecuadamente el sistema de cloración instalado.
- Es necesario realizar muestreos puntuales con frecuencias mayores para determinar con certeza la presencia o ausencia de bacterias como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., si como los huevecillos de helmintos en los puntos de salida.
- Es necesario realizar estudios fisiológicos que documenten el rol de las plantas utilizadas en el SATAR- UNA, no solamente en términos de la absorción de nutrientes, sino también su aporte en la remoción de microorganismos patógenos.
- Debido a los procesos de remoción de los huevecillos de helmintos, es importante realizar el análisis de sólidos sedimentables en el tanque Imhoff y en las demás salidas de los humedales para cuantificar la presencia.

8. Referencias bibliográficas

- Acevedo, L., Baeza, A. C., López, D., & Vidal, G. (2016). Evaluación de procesos de desinfección (Cloro y UV) para tratamiento de aguas servidas provenientes de humedales construidos. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 109–110).
- al Ambiente, P. F. D. P. (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Protección ambiental. Lodos y Biosólidos.- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. *Diario Oficial de La Federación*, 66. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NormasOficialesMexicanas.pdf> http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997
- Alfaro, C., Pérez, R., & Solano, M. (2013). Saneamiento de aguas residuales mediante humedales artificiales en el Museo de Cultura Popular de la Universidad Nacional. *Revista de Ciencias Ambientales*, 45(1), 63–71. <https://doi.org/10.15359/rca.45-1.6>
- Ali, T. H., & Saleh, D. S. (2014). A simplified experimental model for clearance of some pathogenic bacteria using common bacterivorous ciliated spp. in Tigris river [Modelo experimental para la eliminación de algunas bacterias patógenas utilizando especies bacterívoras ciliados spp.]. *Applied Water Science*, 4(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s13201-013-0130-1>
- Almuktar, S. A., Abed, S. N., & Scholz, M. (2018). Wetlands for wastewater treatment and subsequent recycling of treated effluent: a review [Humedales para el tratamiento de aguas residuales y su posterior reciclaje de efluentes tratados: revisión]. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23595–23623. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2629-3>
- Alufasi, R., Gere, J., Chakauya, E., Lebea, P., Parawira, W., & Chingwaru, W. (2017). Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands [Mecanismos de eliminación de patógenos por macrófitas en humedales artificiales]. *Environmental Technology Reviews*, 6(1), 135–144. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1325940>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars [Salmonella spp. enterica: diferencias de supervivencia,

- colonización y virulencia entre serovares]. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Andreo, P., García, N., Quesada, J., & Almela, L. (2017). Domestic wastewaters reuse reclaimed by an improved horizontal subsurface-flow constructed wetland: A case study in the southeast of Spain [Reutilización de aguas residuales domésticas de un humedal artificial de flujo sub-superficial horizontal]. *Bioresource Technology*, 233, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.123>
- Arden, S., & Ma, X. (2018). Constructed wetlands for greywater recycle and reuse: A review [Humedales construidos para el reciclaje y la reutilización de aguas grises: revisión]. *Science of the Total Environment*, 630, 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.218>
- Arredondo, J. A., Cubillos, J. A., Arrubla, J. P., Morales, T., & Paredes, D. (2016). Eliminación de productos farmacéuticos mediante humedales construidos: caso de estudio eje cafetero colombiano. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 75–76).
- Asbury, K., Seville, M. T., & Moran, C. (2018). Encyclopedia of Gastroenterology Shigella spp. [Enciclopedia de Gastroenterología Shigella spp.]. In *Biomedical Sciences* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65971-8>
- Avellán, T., & Gremillion, P. (2019). Constructed wetlands for resource recovery in developing countries [Humedales construidos para la recuperación de recursos en países en desarrollo]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 99, 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.09.024>
- AyA, MINAE, & MS. (2016). *Política Nacional de Saneamiento en Aguas Residuales 2016-2045*. (1st ed.). <https://doi.org/10.2165/00003495-198224060-00002>
- Baird, R. B., Rice, E. W., & Eaton, A. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [Métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales]*. (23rd ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Bakhshoodeh, R., Alavi, N., Oldham, C., Santos, R. M., Babaei, A. A., Vymazal, J., & Paydary, P. (2020). Constructed wetlands for landfill leachate treatment: A review [Humedales construidos para el tratamiento de lixiviados de vertederos: una revisión]. *Ecological Engineering*, 146(January). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105725>

- Belmont, M. A., Cantellano, E., Thompson, S., Williamson, M., Sánchez, A., & Metcalfe, C. D. (2004). Treatment of domestic wastewater in a pilot-scale natural treatment system in central Mexico. [Tratamiento de aguas residuales domésticas en un sistema a escala natural en México]. *Ecological Engineering*, 23(4–5), 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2004.11.003>
- Bliven, K., & Lampel, K. A. (2017). *Shigella* spp. In *Foodborne Diseases* (Third Edit, pp. 171–188). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00006-1>
- Boutilier, L., Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C., & Hart, W. (2009). Adsorption, sedimentation, and inactivation of *E. coli* within wastewater treatment wetlands L. [Evaluación de la adsorción, sedimentación e inactivación de *Escherichia coli* dentro de los humedales de tratamiento de aguas residuales]. *Water Research*, 43(17), 4370–4380. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.039>
- Boutilier, Leah, Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C., & Hart, W. (2010). Performance of Surface-Flow Domestic Wastewater Treatment Wetlands [Desempeño de humedales de tratamiento de aguas residuales domésticas de flujo superficial]. *Wetlands*, 30(4), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s13157-010-0067-1>
- Boyd, C. . (2015). *Water Quality: an Introduction [Introducción a la Calidad de Agua]* (Second). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17446-4>
- Brisson, J., & Chazarenc, F. (2009). Maximizing Pollutant Removal in Constructed Wetlands: Should We Pay More Attention to Macrophyte Species Selection? [Maximizar la remoción de contaminantes en humedales artificiales: ¿Deberíamos prestar más atención a la selección de macrófitas]. *Science of the Total Environment*, 407(13), 3923–3930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.047>
- Brix, H. (1994). Use of constructed wetlands in water pollution control: historical development, present status, and future perspectives [Uso de humedales construidos en el control de agua contaminada: Desarrollo histórico, estatus presente y futuras perspectivas]. *Water Science and Technology*, 30(8), 209–223.
- Brix, H., Koottatep, T., Fryd, O., & Laugesen, C. H. (2011). The flower and the butterfly constructed wetland system at Koh Phi Phi-System design and lessons learned during implementation and operation. [Humedales construidos, lecciones durante la implementación y operación]. *Ecological Engineering*, 37(5), 729–735.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.06.035>

- Burgos, V., Araya, F., Reyes-Contreras, C., Vera, I., & Vidal, G. (2017). Performance of ornamental plants in mesocosm subsurface constructed wetlands under different organic sewage loading [Rendimiento de plantas ornamentales en humedales construidos sub-superficial, diferentes cargas orgánicas de aguas residuales]. *Ecological Engineering*, *99*, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.058>
- Calheiros, C. S. C., Ferreira, V., Magalhães, R., Teixeira, P., & Castro, P. M. L. (2017). Presence of microbial pathogens and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in a constructed wetland system [Presencia de microorganismos patógenos y diversidad genética de *Listeria monocytogenes* en un sistema de humedales artificiales]. *Ecological Engineering*, *102*, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.02.013>
- Calzetta-Bloise, P. A. (2016). Sistemas con plantas macrófitas como alternativa a instalaciones convencionales de tratamiento de aguas servidas en la provincia de Mendoza. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 101–102).
- Camaño-Silvestrini, N., Maine, M. A., Hadad, H. R., Sanchez, G. C., Campagnoli, M., Cafarrati, S., & Pedro, M. C. (2016). Remoción de especies nitrogenadas de un lixiviado de relleno sanitario de acuerdo a la carga hidráulica en wetlands verticales. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 81–82).
- Campos, M. C., Beltrán, M., Fuentes, N., & Moreno, G. (2018). Huevecillos de helmintos como indicadores de contaminación de origen fecal en aguas de riego agrícola, biosólidos, suelos y pastos. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *38*(1). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3352>
- Cardozo, C., Peralta, I., Benítez, G., Samudio, A., & Ávalos, C. (2016). Uso de *typha domingensis* en flotación para el tratamiento de aguas residuales de viviendas unifamiliares. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 33–34).
- Chandrasena, G. I., Shirdashtzadeh, M., Li, Y. L., Deletic, A., Hathaway, J. M., & McCarthy, D. T. (2017). Retention and survival of *E. coli* in stormwater biofilters: Role of vegetation, rhizosphere microorganisms and antimicrobial filter media [Retención y supervivencia de *E.*

- coli en biofiltros: papel de la vegetación, microorganismos de la rizosfera]. *Ecological Engineering*, 102, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.02.009>
- Charris, J. C., & Caselles-Osorio, A. (2016). Eficiencia de eliminación de contaminantes del agua residual doméstica con humedales construidos experimentales plantados con *Cyperus ligularis* (Cyperaceae) y *Echinochloa colonum* (Poaceae)]. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 7(6), 93–103.
- Chen, Z. J., Tian, Y. H., Zhang, Y., Song, B. R., Li, H. C., & Chen, Z. H. (2016). Effects of root organic exudates on rhizosphere microbes and nutrient removal in the constructed wetlands [Efectos de los exudados orgánicos de las raíces sobre los microbios de la rizosfera y la eliminación de nutrientes en los humedales artificiales]. *Ecological Engineering*, 92, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.04.001>
- Corzo, A., & Sanabria, O. A. (2016). Adaptación de macrófitas tropicales en humedales artificiales de alta tasa rellenos con medio de soporte plástico. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 147–148).
- Da Motta Marques, D. M. L., Leite, G. R., & Giovannini, S. G. T. (2001). Performance of two macrophyte species in experimental wetlands receiving variable loads of anaerobically treated municipal wastewater. [Desempeño de dos macrófitas en un tratamiento anaerobio]. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 311–316. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0845>
- Dallas, S., Scheffe, B., & Ho, G. (2004). Reedbeds for greywater treatment—case study in Santa Elena-Monteverde, Costa Rica, Central America [Tratamiento de aguas grises cañaverales - Estudio de caso en Santa Elena-Monteverde, Costa Rica, Centroamérica]. *Ecological Engineering*, 23(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2004.07.002>
- Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). Salmonella, Shigella, and Yersinia [Salmonella spp., Shigella spp., y Yersinia spp.]. *Clinics in Laboratory Medicine W.B. Saunders*, 35(2), 225–246. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>
- Díaz, F. J., O’Geen, A. T., & Dahlgren, R. A. (2010). Efficacy of constructed wetlands for removal of bacterial contamination from agricultural return flows [Eficacia de los humedales artificiales para eliminar la contaminación bacteriana de los flujos de retorno agrícolas]. *Agricultural Water Management*, 97(11), 1813–1821. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.06.015>

- Espigares, M., & Pérez, J. A. (2002). *Composición de las Aguas Residuales*. (p. 22). http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf
- Fernández-Polaco, F., & Seghezzo, L. (2015). *Diseño de Reactores: Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
- Fitch, M. W. (2014). Constructed Wetlands [Humedales Construidos]. In *Comprehensive Water Quality and Purification* (Vol. 3, pp. 268–295). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00053-0>
- García, J. A., Paredes, D., & Cubillos, J. A. (2013). Effect of plants and the combination of wetland treatment type systems on pathogen removal in tropical climate conditions [Efecto de las plantas y la combinación de humedales artificiales, sobre la eliminación de patógenos en clima tropical]. *Ecological Engineering*, 58, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.010>
- Gerardi, M. H., & Zimmerman, M. C. (2006). Waste Management [Manejo de Residuos]. *Waste Management*, 26(1), 105–106. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.05.001>
- Gray, N. F. (2004). *BIOLOGY OF WASTEWATER TREATMENT*. [Biología del Tratamiento de Aguas Residuales]. (2nd ed., Vol. 4). World Scientific.
- Guittouy-Philippe, A., Petit, M. E., Masotti, V., Monnier, Y., Malleret, L., Coulomb, B., Combroux, I., Baumberger, T., Viglione, J., & Laffont-Schwob, I. (2015). Selection of wild macrophytes for use in constructed wetlands for phytoremediation of contaminant mixtures [Selección de macrófitas para su uso en humedales artificiales para la fitorremediación de mezclas contaminantes]. *Journal of Environmental Management*, 147, 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.09.009>
- Headley, T., Nivala, J., Kassa, K., Olsson, L., Wallace, S., Brix, H., van Afferden, M., & Müller, R. (2013). Escherichia coli removal and internal dynamics in subsurface flow ecotechnologies: Effects of design and plants [Eliminación de Escherichia coli y dinámica interna en ecotecnologías de flujo sub-superficial: efectos del diseño y las plantas]. *Ecological Engineering*, 61, 564–574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.062>
- Hoffman, H., Platzer, C., Winker, M., & Von Muench, E. (2011). *Revisión Técnica de Humedales Artificiales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas grises y aguas domésticas*. Eschborn, Alemania. Agencia de Cooperación Internacional de Alemania, GIZ Programa de

Saneamiento Sostenible ECOSAN.

- Jimenez, B. (2007). Helminth ova removal from wastewater for agriculture and aquaculture reuse [Eliminación de huevecillos de helmintos de las aguas residuales, para la reutilización en la agricultura y la acuicultura]. *Water Science and Technology*, 55(1–2), 485–493. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.046>
- Kadlec, R., & Wallace, S. (2009). *Treatment Wetlands [Humedales para tratamiento]*. (2nd ed.). Taylor & Francis Group, LLC. <https://doi.org/10.1201/9781420012514>
- Kansiime, F., & Vann-Bruggen, J. J. . (2001). Distribution and retention of faecal coliforms in the Nakivubo wetland in Kampala, Uganda. [Distribución y retención de coliformes fecales en un humedal construido en Nakivubo Kampala, Uganda]. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 199–206.
- Karathanasis, A. D., Potter, C. L., & Coyne, M. S. (2003). Vegetation effects on fecal bacteria, BOD, and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater [Efectos de la vegetación sobre bacterias fecales, la DBO y la eliminación de SS en humedales artificiales]. *Ecological Engineering*, 20(2), 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(03)00011-9)
- Karim, M. R., Manshadi, F. D., Karpiscak, M. M., & Gerba, C. P. (2004). The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands [Persistencia y remoción de patógenos entéricos en humedales construidos]. *Water Research*, 38(7), 1831–1837. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.029>
- Karkey, A., Jombart, T., Walker, A. W., Thompson, C. N., Torres, A., Dongol, S., Tran Vu Thieu, N., Pham Thanh, D., Tran Thi Ngoc, D., Voong Vinh, P., Singer, A. C., Parkhill, J., Thwaites, G., Basnyat, B., Ferguson, N., & Baker, S. (2016). The Ecological Dynamics of Fecal Contamination and Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A in Municipal Kathmandu Drinking Water [Dinámica de la contaminación fecal y Salmonella Typhi y Salmonella Paratyphi A en el agua potable municipal de Katmand]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004346>
- Katsenovich, Y. P., Hummel-Batista, A., Ravinet, A. J., & Miller, J. F. (2009). Performance evaluation of constructed wetlands in a tropical region. [Evaluación de un humedal construido en la región tropical]. *Ecological Engineering*, 35(10), 1529–1537. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.07.003>

- Lawrence, R., & Orihel, T. H. O. M. A. S. (2010). *Atlas de Parasitología Humana* (Quinta). Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Leiva, A. M., Reyes-Contreras, C., & Vidal, G. (2016). Eliminación de nitrógeno de aguas servidas mediante humedales construidos de flujo subsuperficial vertical. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 41–42).
- Lekeufack, M., Fonkou, T., Pamo Tedonkeng, E., & Amougou, A. (2012). Removal of faecal bacteria and nutrients from domestic wastewater in a horizontal surface flow wetland vegetated with *Echinochloa pyramidalis* [Eliminación de bacterias fecales y nutrientes de aguas residuales domésticas en un humedal de flujo superficial]. *African Journal of Environmental Science and Technology*, *6*(9), 337–345. <https://doi.org/10.5897/ajest12.126>
- Li, F., Shi, M., Zheng, X., Zhang, N., Zheng, H., & Gao, C. (2014). A novel method of rural sewage disinfection via root extracts of hydrophytes [Un método novedoso de desinfección de aguas residuales rurales mediante extractos de raíces de hidrófitas]. *Ecological Engineering*, *64*, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.01.006>
- Liu, J. J., Dong, B., Guo, C. Q., Liu, F. P., Brown, L., & Li, Q. (2016). Variations of effective volume and removal rate under different water levels of constructed wetland [Variaciones del volumen efectivo y la tasa de remoción bajo diferentes niveles de agua del humedal artificial]. *Ecological Engineering*, *95*, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.122>
- López, D., Leiva, A. M., Arismendi, W., & Vidal, G. (2019). Influence of design and operational parameters on the pathogens reduction in constructed wetland under the climate change scenario [Influencia del diseño y los parámetros operativos en la reducción de patógenos en humedales artificiales]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *18*(1), 101–125. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09493-1>
- López, M., Corredor, A., Nicholls, R., Duque, S., Moncada, L., Reyes, P., & Rodríguez, G. (2012). *Atlas de Parasitología* (Second, Issue Mm). Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V.
- López, T. R., G.M., D., Doldán, M. T., Galeano, E. F., & Marín, D. (2016). Eficiencia de humedales artificiales construidos a escala piloto para el tratamiento de aguas residuales urbanas de baja carga utilizando *Cyperus giganteus* y *Typha domingensis*. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 103–104).

- Maine, M. A., Suñe, N., Hadad, H., & Sánchez, G. (2007). Temporal and spatial variation of phosphate distribution in the sediment of a free water surface constructed wetland. [Variación temporal y espacial de la distribución del Fosfato en un Humedal construido]. *Science of the Total Environment*, 380(1–3), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.036>
- Manios, T., Stentiford, E. I., & Millner, P. A. (2002). The Removal of Indicator Microorganisms from Primary Treated Wastewater in Subsurface Reed Beds using Different Substrates [Remoción de microorganismos provenientes de un tratamiento primario de aguas residuales, con humedales subsuperficiales]. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 23(7), 767–774. <https://doi.org/10.1080/09593332408618367>
- Mara, D. (2003). Low-cost treatment systems [Sistemas de tratamientos de Aguas Residuales de bajo costo]. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. London: Elsevier, 441–448. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50027-3>
- Marín, A., & Osés, M. (2013). *Operación y Mantenimiento de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales con el Proceso de Lodos Activados* (A. Nelson & M. Nelson (eds.)).
- Mariñelarena, A. J., & Di Giorgia, H. . (2016). Humedales construidos de flujo vertical ascendente para la depuración de aguas residuales de una escuela rural. In Hernan Ricardo Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 35–36).
- Martínez, N. B., Sánchez, M. P., Del Toro, A., Tejada, A., & Zurita, F. (2016). Tratamiento de aguas residuales pre-tratadas, en humedales verticales de una sola etapa con saturación parcial. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 57–58).
- Martinsa, J. T., Mourão, J. R., Ribeiro, L. C. L., & Pires, M. S. G. (2016). Evaluation of a constructed wetland with horizontal flow for sanitary wastewater treatment. [Evaluación de un humedal construido de flujo horizontal en el tratamiento de las aguas residuales]. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 105–106).
- McMinn, B. R., Klemm, S., Korajkic, A., Wyatt, K. M., Herrmann, M. P., Haugland, R. A., Lu, J., Villegas, E. N., & Frye, C. (2019). A constructed wetland for treatment of an impacted waterway and the influence of native waterfowl on its perceived effectiveness [Efectividad

- de un humedal construido para el tratamiento de una vía fluvial y la influencia de las aves acuáticas nativas]. *Ecological Engineering*, 128, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.11.026>
- Ministerio de Ambiente y Energía & Ministerio de Salud. (2007). Decreto Ejecutivo 33601 Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales. Costa Rica. In *Diario Oficial La Gaceta* (Vol. 55, Issue 8).
- Mora-Aparicio, C., Mesén-Mora, L., Alfaro-Chinchilla, C., Pérez-Salazar, R., & Marín-Araya, M. (2018). *Uso y Distribución de Humedales Artificiales en Costa Rica* (p. 1). CONARE.
- Morató, J., Codony, F., Sánchez, O., Pérez, L. M., García, J., & Mas, J. (2014). Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands [Factores que afectan la composición microbiana y la remoción de organismos patógenos en HA subsuperficiales]. *Science of the Total Environment*, 481(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.068>
- Nandakumar, S., Pipil, H., Ray, S., & Haritash, A. K. (2019). Removal of phosphorous and nitrogen from wastewater in Brachiaria-based constructed wetland [Remoción de fósforo y nitrógeno de aguas residuales en un humedal construido plantado con Brachiaria]. *Chemosphere*, 233, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.240>
- Noyola, A., Morgan, J. M., & Guereca, L. P. (2013). Selección de tecnologías para el Tratamiento de Aguas Residuales Municipales. In *Instituto de Ingeniería-UNAM, Ciudad de México*. Instituto de Ingeniería-UNAM, Ciudad de México. <http://es.slideshare.net/EdwinMamaniVilcapaza/seleccion-de-tecnologias-para-el-tratamiento-de-aguas-residuales-municipales>
- Omondi, O. O., Makindi, S. M., Tian, C., Tian, Y., Hong, P., Cai, Q., Yang, T., Wang, C., Wu, X., & Xiao, B. (2020). A novel integrative performance evaluation of constructed wetland on removal of viable bacterial cells and related pathogenic, virulent and multi- drug resistant genes from wastewater systems [Evaluación del desempeño de un humedal artificial en la elimin. *Journal of Water Process Engineering*, 33, 101060. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101060>
- Organización Mundial de la Salud., UN-Water., & ONU-Hábitat. (2018). *Progresos en el tratamiento y el uso de las aguas residuales de manera adecuada: Prueba piloto de la metodología de monitoreo y primeras constataciones sobre el indicador 6.3.1 de los ODS* (p.

- 40). <http://apps.who.int/iris>
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *WHO guidelines for the safe use of wastewater excreta and greywater. [Guías para el uso seguro de aguas residuales]*. (Vol. 1). World Health Organization.
- Ottoson, J., & Stenström, T. A. (2003). Faecal contamination of greywater and associated microbial risks [Contaminación fecal en aguas grises y los riesgos microbiológicos asociados]. *Water Research*, 37(3), 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00352-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00352-4)
- Parde, D., Patwa, A., Shukla, A., Vijay, R., Killedar, D. J., & Kumar, R. (2020). A review of constructed wetland on type, treatment and technology of wastewater [Revisión de los tipos de humedales contruidos, tratamientos y tecnología para aguas residuales]. *Environmental Technology and Innovation*, 21, 23. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101261>
- Percival, S. L., Yates, M. V., Williams, D. W., Chalmersr, R. M., & Gray, N. F. (2014). *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks [Microbiología de las enfermedades transmitidas por el agua: aspectos y riesgos de la microbiología]*. (Second). Elsevier academic press.
- Pére-López, M. E., González MA, G., & Mtz-Prado, A. (2011). *Selección de plantas acuáticas para establecer humedales artificiales*. (Académica).
- Pérez-Salazar, R., Alfaro-Chinchilla, C., Sasa-Marín, J., & Agüero Pérez, J. (2013). Dempeño de Evaluación de un Sistema Alternativo de Humedales Artificiales para el Tratamiento de Aguas Residuales. *UNICIENCIA*, 27(1), 332–340. www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/4958
- Pérez-Salazar, R., Mora-Aparicio, C., Alfaro-Chinchilla, C., Sasa-Marín, J., Scholz, C., & Rodríguez-Corrales, J. Á. (2019). Biogardens as constructed wetlands in tropical climate: A case study in the Central Pacific Coast of Costa Rica [Humedales construidos en clima tropical: caso de estudio en la costa pacífica, Costa Rica]. *Science of The Total Environment*, 658, 1023–1028. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.259>
- Pond, K. (2005). *Water Recreation and Disease- Plausibility of associated infections: Acute effects, sequelae and mortality [Recreación de agua y enfermedades: plausibilidad de infecciones asociadas: efectos agudos, secuelas y mortalidad]*. World Health Organization by IWA Publishing. <https://doi.org/10.1007/s10669-006-8666-3>
- Quiñonez-Díaz, M. D. J., Karpiscak, M. M., Ellman, E. D., & Gerba, C. P. (2001). Removal of

- pathogenic and indicator microorganisms by a constructed wetland receiving untreated domestic wastewater [Remoción de patógenos y microorganismos indicadores por un humedal construido recibiendo agua residual domestica sin tratar]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental*, 36(7), 1311–1320. <https://doi.org/10.1081/ESE-100104880>
- Quintero, K. L., Rodríguez, D. P., González, M. E., & Arroyave, J. A. (2021). Evaluación de la remoción de nitrógeno y materia orgánica a través de humedales artificiales de flujo subsuperficial , acoplados a reactores de lecho fijo con microalgas en la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. *Ingeniería y Región*, 25, 82–94. <https://doi.org/10.25054/22161325.2921>
- RcoreTeam. (2020). *R: A language and environment for statistical computing [R: lenguaje y entorno para la computación estadística]*. recuperado de: <https://www.r-project.org/>.
- Rodríguez-García, A., & Cárdena-Mijangos, J. (2014). *El uso de humedales artificiales en la depuración de aguas residuales*.
- Rodríguez, L. C., & Corrales, A. (2016). Remoción de patógenos con humedales construidos para aprovechamiento de aguas lluvias en la Pontificia Universidad Javeriana. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 159–160).
- Rojas-Rodríguez, F. E., Bermúdez-Cruz, G., & Jiménez-Madrigal, Q. (2016). *Plantas ornamentales del trópico* (Segunda ed). Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- Romero, J. A. (2004). *Tratamiento de Aguas Residuales* (3rd ed.). Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Rouso, B. Z., Santosa, M. O., Freitas, M. N., Pelissaria, C., Sancheza, G. C., & Sezerinoa, P. . (2016). Performance of a hybrid constructed wetland employed as sanitary wastewater treatment solution during its operational starting period. [Desempeño de un humedal construido híbrido empleado en el tratamiento de aguas residuales de alcantarillado durante el. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 37–38).
- Russo, N., Marzo, A., Randazzo, C., Caggia, C., Toscano, A., & Cirelli, G. L. (2019). Constructed wetlands combined with disinfection systems for removal of urban wastewater contaminants

- [Humedales construidos combinados con sistemas de desinfección para la eliminación de contaminantes de aguas residuales urbanas]. *Science of the Total Environment*, 656, 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.417>
- Ryder, G. (2017). Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos, 2017. Aguas residuales: el recurso no explotado. In *Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura* (Vol. 3). UNESCO. http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf
- Sachez, G. C., Maine, M. A., Hadad, H. R., Caffaratti, S., Pedro, M. C., Mufarrege, M. M., Di, L., & Camaño Silvestrini, N. (2016). Wetlands híbridos para remoción de amonio en efluentes industriales. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 117–118).
- Salas, J. J., Pidre, J. R., & Sánchez, L. (2007). *Manual de Tecnologías No Convencionales Para La Depuración De Aguas Residuales*. Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua, (CENTA).
- Santos, M. O., Freitas, M. ., Pelissari, C., Sánchez, G., Rousso, B. Z., & Sezerino, P. H. (2016). Remoción de carbono y nitrógeno en un humedal construido de flujo vertical con fondo saturado aplicado en el tratamiento de aguas residuales de alcantarillado. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 51–52).
- Schierano, M. C., Maine, M. A., Panigatti, M. C., Griffa, C., Ercole, P., & Gaggiotti, M. (2016). Evaluación de macrófitas y sustratos para el tratamiento de efluentes de tambo utilizando wetlands de flujo subsuperficial horizontal. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 77–78).
- Scholz, M., & Lee, B. H. (2005). Constructed wetlands: a review [Humedales Construidos: revisión. *International Journal of Environmental Studies*, 62(4), 421–447. <https://doi.org/10.1080/00207230500119783>
- Shingare, R. P., Nanekar, S. V., Thawale, P. R., Karthik, R., & Juwarkar, A. A. (2017). Comparative study on removal of enteric pathogens from domestic wastewater using *Typha latifolia* and *Cyperus rotundus* along with different substrates [Estudio de la remoción de patógenos

- entéricos de aguas residuales domésticas con *Cyperus rotundus*]. *International Journal of Phytoremediation*, 19(10), 899–908. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303809>
- Souza, J., & de Aguiar Junior, T. R. (2020). Efficiency of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in Removing Micropollutants in Water Samples [Eficiencia de nitrificación y desnitrificación de bacterias en la remoción de contraminantes en muestras de agua]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(4), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04523-z>
- Stefanakis, A. I., Bardiau, M., Trajano, D., Couceiro, F., Williams, J. B., & Taylor, H. (2019). Presence of bacteria and bacteriophages in full-scale trickling filters and an aerated constructed wetland [Presencia de bacterias y bacteriófagos en filtros percoladores a gran escala y un humedal artificial aireado]. *Science of the Total Environment*, 659, 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.415>
- Stefanakis, A. I., Seeger, E., Dorer, C., Sinke, A., & Thullner, M. (2016). Performance of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands treating groundwater contaminated with phenols and petroleum derivatives [Desempeño de humedales construidos subsuperficial horizontal a escala piloto que tratan aguas con fenoles]. *Ecological Engineering*, 95, 514–526. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.105>
- Topare, N., Attar, S., & Manfe, M. (2011). Sewagwe/Wastewater Treatment Technologies : A Review [Tecnologías de tratamiento de aguas residuales: revisión]. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 1(1), 18–24.
- Torres-Bojorges, A. X., & Zurita, F. (2016). Evaluación de humedales híbridos para la remoción de nitrógeno total. In H.R. Hadad & M. A. Maine (Eds.), *Memorias de la III Conferencia Panamericana de Sistemas de Humedales para el Tratamiento y Mejoramiento de la Calidad del Agua* (pp. 49–50).
- Toscano, A., Marzo, A., Milani, M., Cirelli, G. L., & Barbagallo, S. (2015). Comparison of removal efficiencies in Mediterranean pilot constructed wetlands vegetated with different plant species [Comparación de la eficiencia de la remoción en humedales plantados y sin plantar]. *Ecological Engineering*, 75, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.12.005>
- Tunçsiper, B., Ayaz, S. Ç., & Akça, L. (2012). Coliform bacteria removal from septic wastewater in a pilot-scale combined constructed wetland system [Eliminación de bacterias coliformes de aguas residuales sépticas en un sistema combinado de humedales artificiales a escala piloto]. *Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ)*, 11(10), 1873–1879.

<https://doi.org/10.30638/eemj.2012.233>

- Udom, I. J., Mbajjorgu, C. C., & Oboho, E. O. (2018). Development and evaluation of a constructed pilot-scale horizontal subsurface flow wetland treating piggery wastewater. [Evaluación de un humedal de flujo subsuperficial horizontal a escala piloto para el tratamiento de aguas residuales]. *Ain Shams Engineering Journal*, 9(4), 3179–3185. <https://doi.org/10.1016/j.asej.2018.04.002>
- Vacca, G., Wand, H., Nikolausz, M., Kuschik, P., & Kästner, M. (2005). Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale [Efecto de las plantas y los materiales filtrantes en la eliminación de bacterias en humedales artificiales a escala piloto]. *Water Research*, 39(7), 1361–1373. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.005>
- Von Sperling, M. (2015). Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal [Características del Agua residual, Tratamiento y Disposición]. In *Water Intelligence Online* (Vol. 6, Issue 0). <https://doi.org/10.2166/9781780402086>
- Vymazal, J. (2005). Removal of enteric bacteria in constructed treatment wetlands with emergent macrophytes: a review [Remoción de bacterias entericas en humedales de tratamiento construido con macrófitas emergentes: revisión]. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 40, 1355–1367. <https://doi.org/10.1081/ESE-200055851>
- Vymazal, J. (2010). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment [Humedales Construidos para el Tratamiento de Aguas Residuales]. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2, 530–549. <https://doi.org/10.3390/w2030530>
- Vymazal, J. (2011). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review [Plantas utilizadas en humedales construidos con flujo horizontal sub-superficial: revisión]. *Hydrobiologia*, 674(1), 133–156. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0738-9>
- Vymazal, J. (2014). Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review [Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales industriales: revisión]. *Ecological Engineering*, 73, 724–751. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.034>
- Vymazal, J. (2018). Constructed wetlands for wastewater treatment [Humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales]. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (2nd ed., Vol. 31, Issue 4). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1080/20016491089253>
- Vymazal, J., & Kröpfelová, L. (2008). Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with

- Horizontal Sub-Surface Flow [Tratamiento de aguas residuales mediante la implementación de humedales artificiales de flujo sub-superficial horizontal]. In B. J. Alloway & J. T. Trevors (Eds.), *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 14). Springer, Dordrecht. <https://doi.org/DOI> <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8580-2>
- Wang, Y., Cai, Z., Sheng, S., Pan, F., Chen, F., & Fu, J. (2020). Comprehensive evaluation of substrate materials for contaminants removal in constructed wetlands [Evaluación integral de los materiales del sustrato para la eliminación de contaminantes en humedales artificiales]. *Science of the Total Environment*, *701*, 134736. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134736>
- Winward, G. P., Avery, L. M., Frazer-Williams, R., Pidou, M., Jeffrey, P., Stephenson, T., & Jefferson, B. (2008). A study of the microbial quality of grey water and an evaluation of treatment technologies for reuse [Un estudio de la calidad microbiana de las aguas grises y una evaluación de las tecnologías de tratamiento para su reutilización]. *Ecological Engineering*, *32*(2), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.001>
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Manoj, V. R., & Dong, R. (2016). Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators [Saneamiento en humedales artificiales: una revisión sobre la eliminación de patógenos humanos e indicadores fecales]. *Science of the Total Environment*, *541*, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Zhang, D. Q., Jinadasa, K. B. S. N., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2015). Application of constructed wetlands for wastewater treatment in tropical and subtropical regions (2000-2013) [Aplicación de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales en regiones tropicales y subtropicales (2000-2013)]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *30*, 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.10.013>
- Zurita, F., Rojas, D., Carreón, A., & Gutiérrez, M. (2015). Desinfección de aguas residuales en tres sistemas de humedales construidos híbridos. *Interciencia*, *40*(6), 409–415.