



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Ambientales
Ingeniería Ambiental

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN VERMIFILTRO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS

Habilitación profesional para optar al Título de Ingeniero ambiental

Por: Emilio Benjamín Quezada Navarrete

Profesora Guía: Gladys Vidal

Concepción, Chile (2024)

“Evaluación de la actividad enzimática de un vermifiltro en el tratamiento de aguas servidas”

Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal Sáez



Profesor Comisión: Dra. Patricia González Sánchez



Profesor Comisión: Dr. Mauricio Aguayo Arias



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MÁXIMA

Conceptos que se indica en el Título

- ✓ Aprobado por Unanimidad : (En Escala de 4,0 a 4,9)
- ✓ Aprobado con Distinción (En Escala de 5,0 a 5,6)
- ✓ Aprobado con Distinción Máxima (En Escala de 5,7 a 7,0)

Concepción, marzo 2024



AGRADECIMIENTOS

Con esta tesis finaliza uno de los periodos más determinantes para mi persona. Durante 5 años de vida universitaria se han presentado numerosas situaciones, las cuales han formado mi carácter y visión tanto como ser humano y profesional. Digo con tranquilidad que, al culminar este capítulo, lo hago con las personas precisas a mi lado, a las cuales les deseo éxito y prosperidad.

En primer lugar, agradecer a Fabian, mi mejor amigo durante más de 10 años, quien se ha mantenido siempre a mi lado en cada etapa de mi vida desde que nos conocemos. No imagino un mundo en el que haya logrado sacar adelante esta carrera sin su contención. Le deseo siempre lo mejor.

A mi familia, por entregarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas personales y académicas, en especial a mi madre Betsabe, con quien choqué múltiples veces durante este periodo, sin embargo, estaré siempre inspirado por su espíritu y resiliencia.

A Luz, por *iluminar* la mayor parte de este viaje con su personalidad. Por siempre afortunado de haber coincidido con ella en esta carrera y haber prevalecido con su valiosa amistad hasta el final.

A mi profesora guía Gladys Vidal, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación, en el cual me sentí capaz, seguro y realizado, al desempeñarme durante un semestre en un área de mi interés. Por abrirme las puertas al grupo GIBA, un grupo lleno de profesionales e investigadores sumamente capaces, pero por sobre todo un grupo que brilla por su calidad humana. Gracias al grupo GIBA por acogerme durante este tiempo. Con agradecimientos especiales a Víctor, Gloria y Tihare; sin su ayuda este trabajo no hubiera visto la luz.

Agradecer al Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y Minería (CRHIAM) por el financiamiento entregado mediante la beca de tesis de pregrado a través del proyecto ANID/FONDAP/15130015 y ANID/FONDAP/1523A0001, el cual me proporcionó un aporte significativo durante el segundo semestre del 2023, aliviando mucho los gastos de alguien dedicado solo a sus estudios.

Para finalizar, agradezco a docentes y funcionarios de la Facultad de Ciencias Ambientales, por acompañarme en mi proceso de aprendizaje y formación profesional durante los últimos 5 años.



Índice General

RESUMEN	V
1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Las aguas servidas: Contextos, tratamientos e impactos	1
1.2 Soluciones basadas en la naturaleza	2
1.3 Vermifiltro	4
1.3.1 <i>Eisenia foetida</i> dentro del vermifiltro.....	6
1.3.2 Degradación de materia orgánica	7
1.3.3 Dinámicas de nutrientes en el sistema	9
1.3.4 Parámetros operacionales que afectan el rendimiento de vermifiltros (VF).....	12
1.4 Generación de la biopelícula	16
1.5 Actividad enzimática del vermifiltro	17
1.5.1 Amilasa.....	17
1.5.2 Proteasa	18
1.6 Relación del rendimiento de reactores en el tratamiento de aguas servidas y su actividad enzimática	20
2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS.....	24
2.1 Pregunta de investigación.....	24
2.2 Objetivos.....	24
2.2.1 Objetivo general	24
2.2.2 Objetivos específicos.....	24
3 METODOLOGÍA	25
3.1 Diseño y montaje del vermifiltro y biofiltro.....	25
3.2 Parámetros fisicoquímicos e <i>in situ</i>	26
3.3 Obtención de influente y medio filtrante	27
3.4 Monitoreo de parámetros.....	27
3.4.1 Determinación de la actividad de la amilasa	28
3.4.2 Determinación de la actividad de la proteasa:	29
3.5 Análisis Estadístico	30
4 APORTE A LOS ODS	31
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1 Caracterización del influente	32



5.1.1	Materia orgánica.....	34
5.1.2	Nutrientes	36
5.2	Actividad enzimática	42
5.2.1	Actividad enzimática de la amilasa	42
5.2.2	Actividad enzimática de la proteasa	43
6	CONCLUSIONES	45
7	BIBLIOGRAFÍA	46

Índice de Tablas

Tabla 1.	Eficiencia de distintos vermifiltros en la eliminación de materia orgánica y nutrientes.....	15
Tabla 2.	Parámetros de operación	25
Tabla 3.	Caracterización fisicoquímica del influente.....	33

Índice de Figuras

Figura 1.	Número de publicaciones asociadas a Soluciones Basadas en la Naturaleza en distintos países, donde ■ India; ■ China; ■ Estados Unidos; ■ Chile y ■ España.....	4
Figura 2.	a) Esquema del sistema digestivo de <i>Eisenia foetida</i> ; b) Ciclo de vida de <i>Eisenia foetida</i>	7
Figura 3.	Ciclo biológico del nitrógeno (Adaptado de: Mosquera, 1998).....	10
Figura 4.	Esquema del funcionamiento de un Vermifiltro.....	26
Figura 5.	Eficiencia de eliminación de DQO de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.	34
Figura 6.	Eficiencia de eliminación de $N-NH_4^+$ de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.	37
Figura 7.	Comparación de las concentraciones de $N-NO_2^-$ en todos los sistemas analizados a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF) y ■ influente. Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.....	38



Figura 8. Comparación de las concentraciones de $N-NO_3^-$ en todos los sistemas analizados a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF), ▲ biofiltro (BF) y ■ influente. Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente. 39

Figura 9. Eficiencia de eliminación de $P-PO_4^{3-}$ de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente. 40

Figura 10. Actividad enzimática de la amilasa en ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● representa la actividad de la amilasa registrada en el vermifiltro (VF) y ▲ representa la actividad de la amilasa en el biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente. 42

Figura 11. Actividad enzimática de la proteasa en ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● representa la actividad de la amilasa registrada en el vermifiltro (VF) y ▲ representa la actividad de la amilasa en el biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente. 44



RESUMEN

El vermifiltro (VF) está considerado como una solución basada en la naturaleza efectiva en el tratamiento de aguas servidas. Se sugiere que la efectividad del sistema eliminando nutrientes y materia orgánica es gracias a la actividad enzimática del reactor producida por la relación entre las bacterias y lombrices. Sin embargo, los estudios que investigan el potencial enzimático de estos sistemas son escasos. Debido a lo antes indicado, el objetivo de este estudio es evaluar el rendimiento de un VF y un biofiltro (BF) para eliminar materia orgánica, nutrientes y evaluando la actividad enzimática de la amilasa y proteasa, las cuales son enzimas especializadas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas. Se pretende profundizar sobre la influencia de la lombriz en el tratamiento de aguas servidas. El influente fue obtenido de una PTAS rural a la salida del tratamiento primario y las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría. Los resultados entre los sistemas durante la eliminación de demanda química de oxígeno (DQO) muestran eficiencias de $54,2 \pm 16,5\%$ y $51,9 \pm 18,5\%$ para VF y BF respectivamente. En cuanto a nutrientes, el estudio se centró en la eliminación de nitrógeno del amonio (N-NH_4^+), eliminando un $68,0 \pm 22,3\%$ y $77,5 \pm 22,9\%$ de N-NH_4^+ en el orden dado para VF y BF. Por otra parte, el fósforo del fosfato ($\text{P-PO}_4\text{-}^3$), para las eficiencias de eliminación de VF y BF se elimina un $58,0 \pm 45,6\%$ y $83,2 \pm 26,2\%$ de $\text{P-PO}_4\text{-}^3$ respectivamente. Por último, la actividad enzimática de los sistemas fue de $0,40 \pm 0,23$ U/mgSSV en VF y $0,22 \pm 0,17$ U/mgSSV en BF para la amilasa, mientras que la actividad de la proteasa en VF y BF fueron de $0,0021 \pm 0,0013$ y $0,0010 \pm 0,0007$ U/mg SSV en tal orden. Finalmente, los resultados sugieren que la presencia de la lombriz no influiría de manera significativa en el tratamiento de aguas servidas



1 MARCO TEÓRICO

1.1 Las aguas servidas: Contextos, tratamientos e impactos

Las aguas servidas son un aspecto ambiental de interés público, debido a que son emisiones que cargan múltiples contaminantes en su composición. Con el paso del tiempo, a medida que las actividades de los seres humanos han ido adquiriendo mayor complejidad, también lo han hecho los residuos que los seres humanos generan, y las aguas servidas no son la excepción. Las aguas servidas están compuestas por la mezcla de aguas negras provenientes de excretas y de aguas grises provenientes de tinajas, bañeras, lavamanos y lavaplatos, de acuerdo con la definición la Ley 21075 del Ministerio de Obras Públicas sobre regulación de aguas grises. Todos los asentamientos humanos deben enfrentarse a este aspecto, sin embargo, es sabido que no todas las localidades responden de la misma forma en materia de gestión y tratamiento de residuos. El manejo y gestión de las aguas servidas en Chile, está prácticamente cubierto en la totalidad de las zonas urbanas. Según cifras oficiales, la cobertura de aguas servidas urbanas alcanza el 99,98% (SISS, 2022); no obstante, el panorama resulta muy distinto cuando se considera la realidad de zonas rurales. Chile en materia de conexión a alcantarillado y tratamiento de aguas servidas rurales alcanza solo un 21 y 17% respectivamente, dejando una marcada brecha comparado con el sector urbano de Chile e incluso si se compara con la cobertura de alcantarillado y tratamiento de aguas servidas que posee Europa y Norteamérica, de un 50% y 47% (Banco Mundial, 2021). Este bajo porcentaje de cobertura en las comunidades descentralizadas se explica por 2 factores limitantes. Por un lado, está la mano de obra capacitada para operar sistemas de mediana complejidad (Ejemplo: Plantas de tratamiento de lodos activados) y, por otro lado, está el recurso



económico necesario para la continua operación del sistema, debido a la demanda energética (SUBDERE, 2019).

Los influentes de aguas servidas son dispuestos en instalaciones de tratamiento conocidas como Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas (PTAS). De forma resumida, el influente pasa por tres etapas de tratamiento antes de ser descargada a un cuerpo receptor. Estas etapas son: Tratamiento primario o físico químico, tratamiento secundario o biológico y por último el tratamiento terciario para contaminantes específicos. Cada tramo del proceso de descontaminación está pensado para disminuir o eliminar la carga de algún contaminante en el influente incorporando criterios técnicos y socioeconómicos para conseguir un tratamiento eficiente (Noyola et al., 2013). El tratamiento primario se encarga de la eliminación de sólidos totales en el influente además de grasas y aceites. Entre las técnicas más empleadas en esta etapa se pueden mencionar la floculación, coagulación, sedimentación y flotación. Por otro lado, el tratamiento secundario se encarga de parámetros relacionados al contenido de materia orgánica del influente como la demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO₅). Algunas de las tecnologías más utilizadas son los lodos activados, digestión anaeróbica, lagunas de estabilización, etc. Por último, el tratamiento terciario está relacionado a contaminantes más persistentes, como pueden ser algunas sales, metales, nutrientes, virus y demás componentes, por ende, las tecnologías que comprenden esta etapa llegan a ser muy variadas (Ramalho, 1990).

1.2 Soluciones basadas en la naturaleza

En un intento por resolver las necesidades de sectores descentralizados respecto al manejo de aguas servidas mediante vías no convencionales y con menos impactos negativos al medio ambiente, es que aparecen las Soluciones basadas en la Naturaleza (SbN).



La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) describe a las soluciones basadas en la naturaleza como: “acciones para proteger, gestionar de manera sostenible y restaurar los ecosistemas naturales y modificados que abordan los desafíos de la sociedad de manera efectiva y adaptativa, beneficiando simultáneamente a las personas y la naturaleza” (UICN, 2024).

Este tipo de tecnologías consumen menos reactivos químicos y recursos energéticos (Boano et al., 2020) y debido a su costo eficiencia están consideradas como una solución emergente para tratar aguas domiciliarias aplicable en zonas rurales (Cross et al., 2021). Estas tecnologías son parte de la estrategia para alcanzar un desarrollo sustentable debido a que poseen una baja demanda de recursos naturales, lo que resulta en menores repercusiones en el medio ambiente (Niknejad et al., 2022). Uno de los puntos que sustenta el planteamiento anterior es la capacidad que poseen estos sistemas para descontaminar influentes y cumplir con límites de calidad planteados en normas de emisión. Esto permite el retorno del agua desde influentes contaminados a cuerpos receptores sin ampliar la demanda de energía y recursos, reduciendo así, el impacto ambiental (Gómez et al., 2020).

El estudio e implementación de este tipo de tecnologías se extiende en diferentes países. La Figura 1 muestra datos del portal científico Web of Science (2023) donde se muestra el número de publicaciones científicas en diferentes soluciones basadas en la naturaleza por país.

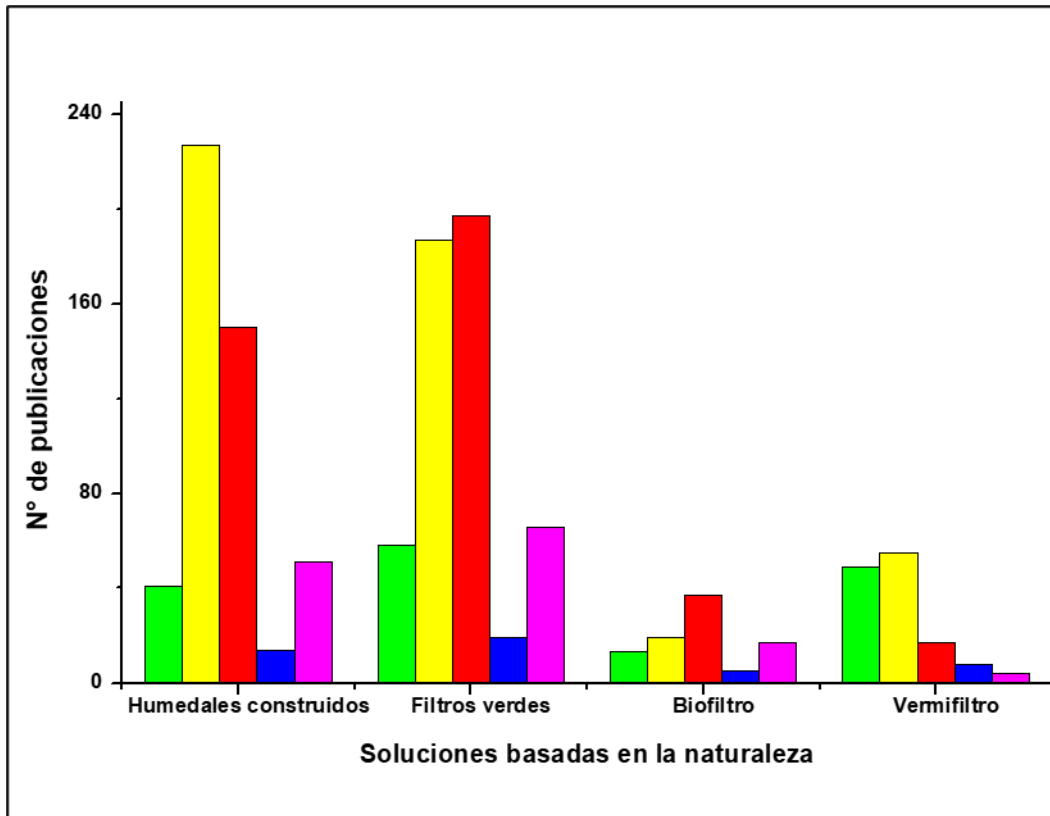


Figura 1. Número de publicaciones asociadas a Soluciones Basadas en la Naturaleza en distintos países, donde ■ India; ■ China; ■ Estados Unidos; ■ Chile y ■ España.

A comienzo de la década pasada en Chile, el 8% de las tecnologías de tratamiento biológicas empleadas como tratamiento secundario estaba siendo ocupado por el uso del vermifiltro (Vidal y Araya, 2014). Estos sistemas actualmente en uso están monitoreados por la Superintendencia de Servicios Sanitarios y se rigen por el DS 90/2000 del Ministerio de Medio Ambiente y por el DS 42/2002 del Ministerio de Medio Ambiente como las principales normas de emisión aplicables para su fiscalización.

1.3 Vermifiltro

Los vermifiltros son una SbN que consiste en el uso combinado de lombrices y bacterias, las cuales conviven entre distintos medios filtrantes. Se describe como un tratamiento biológico, el cual elimina la materia orgánica y nutrientes del influente, mediante un componente biótico el



cual consiste en la simbiosis lombrices-microorganismos y un componente abiótico el cual comprende los procesos de adsorción que ocurren en los medios filtrantes (Chicaiza et al., 2020). Los resultados de algunas investigaciones muestran que estos sistemas pueden tratar diferentes tipos de aguas residuales tales como aguas servidas (Liu et al., 2013), lodos de tratamiento primario (Hait et al., 2011), suero de queso (Merlín et al., 2009), entre otras. Estas aguas residuales pueden ser tratadas por medio del vermifiltro con bajos costos de operación e inversión (Chicaiza et al., 2020); sin embargo, requieren de grandes superficies para su puesta en marcha.

Este sistema es sensible a las variaciones de materia orgánica del influente, debido a que bajas tasas de carga orgánica (TOC) pueden limitar el alimento de las lombrices y microorganismos ($\text{TOC} < 0,2 \text{ kgDQO/m}^3\text{d}$ (Gutiérrez et al., 2023)). El rendimiento también puede verse afectado por cambios en el pH y temperatura; ya que el tratamiento está basado en la actividad de bacterias y lombrices, las cuales para un correcto rendimiento necesitan un clima adecuado que no interfiera en su desarrollo y reproducción. Respecto a los medios filtrantes, pueden usarse materiales orgánicos del suelo como la grava, arena, carbón, chip de madera, astillas y compost; los cuales usualmente se encuentran estratificados en el sistema. En cuanto a las dimensiones del reactor, los vermifiltros a escala real usualmente poseen un área unitaria de $0,75 \text{ m}^2/\text{hab}$, resistiendo caudales de hasta 600 L/día de aguas servidas (Vidal y Araya, 2014). Por otro lado, Singh et al. (2017) señala que los vermifiltros con alturas mayores a $0,61 \text{ m}$ poseen mayor capacidad de adsorción y distribución de contaminantes en los medios filtrantes.



1.3.1 *Eisenia foetida* dentro del vermifiltro

El vermifiltro se sustenta por la relación que ocurre entre las lombrices y las bacterias del sistema. Las lombrices son organismos que favorecen la biodegradación, biooxidación y bioacumulación de múltiples contaminantes incluyendo compuestos orgánicos, compuestos insolubles, pesticidas e incluso metales pesados. La literatura muestra que existe un alto grado de simbiosis en el sistema de vermifiltración, el cual relaciona a las lombrices con la microbiota presente en los medios filtrantes. Esta relación influye en la estabilización del contenido orgánico del influente, principalmente a raíz de la actividad enzimática que ocurre en el tratamiento. Las lombrices por si solas están facultadas para digerir y asimilar sólidos orgánicos y las más empleadas en el sistema son especies con altas tolerancias a estresores ambientales y con una alta capacidad reproductiva (Samal et al., 2017).

Eisenia foetida está catalogada como la especie idónea para implementar en un vermifiltro. Su presencia favorece la porosidad del suelo mediante excavación y desplazamiento entre los medios filtrantes, estimulando la aireación del sistema y además es capaz de mineralizar nutrientes disponibles como el nitrógeno y fósforo (Clause et al., 2014). Esta especie tiene un ciclo de vida corto de 4 años, tardan 21 días en eclosionar de sus capullos o cocones, luego permanecen en fase larval por 3 meses y alcanzan la madurez cuando desarrollan su clitelio, indicando que ya pueden reproducirse. La frecuencia de apareamiento de *Eisenia foetida* es de 1 vez por semana. Estos organismos son hermafroditas, sin embargo, necesitan fecundarse mutuamente con otro de su especie para reproducirse. *Eisenia foetida* deposita alrededor de 3 cocones o capullos por ciclo de apareamiento, sin embargo, pueden llegar hasta 10; por lo que se les considera una especie con alto nivel de proliferación. Las lombrices adultas pesan cerca de 1 gramo y son capaces de digerir el 100% de su peso en materia orgánica; sin embargo, solo un



40% es retenido y convertido en biomasa (Somarriba y Guzmán, 2004). *Eisenia foetida* posee además un intestino medio en el cual conviven microorganismos capaces de producir enzimas específicas para la degradación de materia orgánica. Algunas de estas enzimas son la proteasa, amilasa, xilanasas y celulasas. Dichas enzimas pueden degradar la materia orgánica y eliminar protozoos, bacterias, parásitos y hongos (Zhang et al., 2000). En la Figura 2 puede observarse el sistema digestivo de la *Eisenia foetida*, ilustrando sus órganos más esenciales y a la derecha se encuentra un esquema de su ciclo de vida.

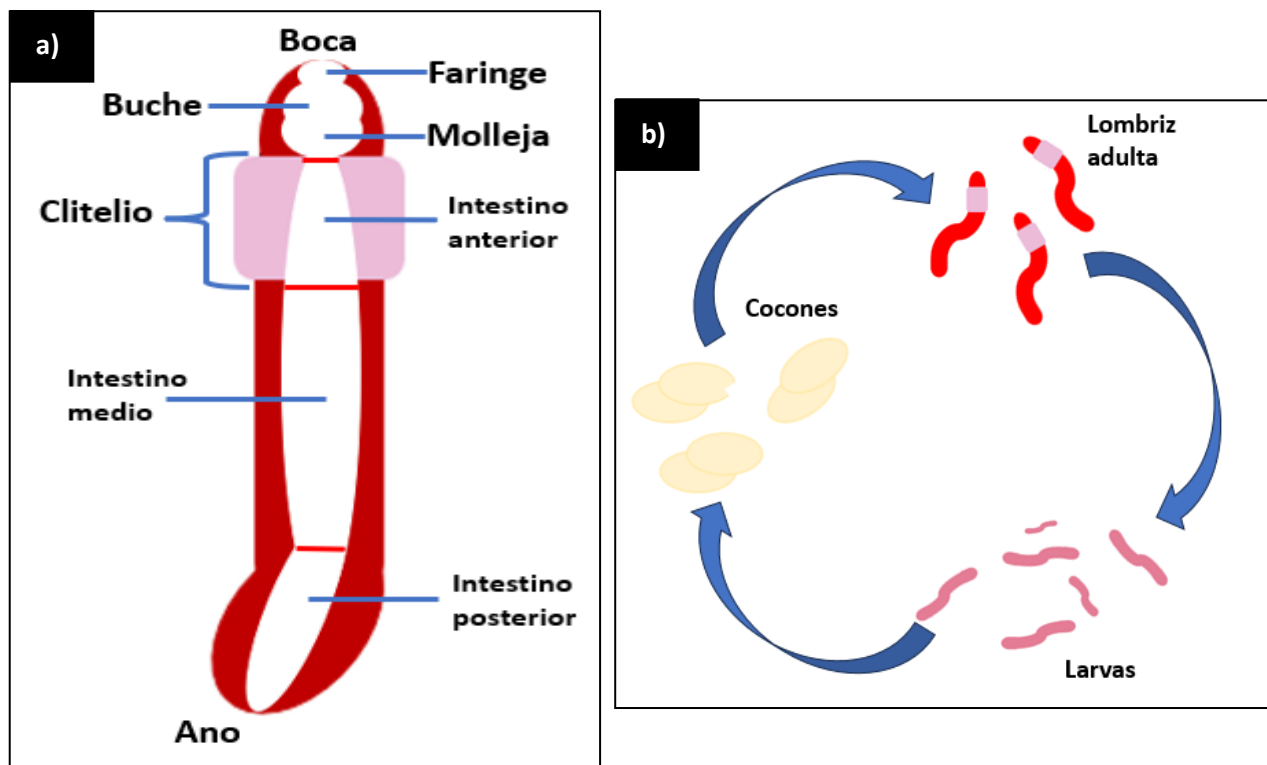


Figura 2. a) Esquema del sistema digestivo de *Eisenia foetida*; b) Ciclo de vida de *Eisenia foetida*

1.3.2 Degradación de materia orgánica

La degradación de la materia orgánica está impulsada por la acción de múltiples microorganismos tales como bacterias, hongos, y protozoos; los cuales rompen los enlaces que



constituyen a los distintos compuestos orgánicos encontrados en aguas servidas, moléculas como carbohidratos, proteínas y lípidos (Huang et al., 2010). Dependiendo de las características del reactor o sistema, es que se propiciara el desarrollo de especies diferentes de microorganismos, ya sean aeróbicos o anaeróbicos. El desarrollo de este proceso biológico ocurre a medida que los microorganismos del sistema entran en contacto con los compuestos orgánicos contenidos en un influente, de modo que puedan ser utilizados como alimento. Los microorganismos en el tratamiento trabajan para acelerar la descomposición biológica de materia orgánica bajo condiciones ambientales controladas, monitoreando rangos de pH, temperatura y tiempos de contacto para una óptima operación (Von Sperling, 2007).

Frente a la presencia de oxígeno es que ocurre la ruta metabólica aeróbica, en la que las enzimas producidas por microorganismos aerobios heterótrofos impulsan la oxidación de polisacáridos, grasas y proteínas utilizando el oxígeno para el intercambio de electrones, dando como resultado nueva biomasa al haber utilizado el carbono orgánico asimilable y por último la producción moléculas de CO_2 y H_2O (Ortega et al., 2022). Por otro lado, en condiciones exentas de oxígeno ocurren procesos de degradación anaeróbicos. La degradación anaeróbica consta de cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis; produciendo múltiples productos intermedios, culminando con la síntesis de CH_4 y CO_2 (Ortega et al., 2022)

Respecto al vermifiltro, siendo principalmente un tratamiento aeróbico (Miito et al., 2021); múltiples autores destacan el buen desempeño del sistema para eliminar la materia orgánica. Sinha et al. (2008) informa acerca de eficiencias del 90%, 80-90% y 90-95% para DBO_5 , DQO y sólidos suspendidos totales, respectivamente. Wang et al. (2015) obtuvo resultados similares en la eliminación del 94,2% de la DQO al trabajar con *Eisenia foetida* en aguas residuales

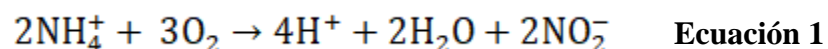


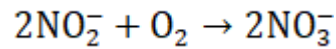
domésticas. Rajpal et al. (2014) por su parte reporta eficiencias mayores al 80% respecto a la eliminación de parámetros como DQO y hasta un 90% en la eliminación de sólidos suspendidos totales. Resultados de estudios afines pueden observarse resumidos en la Tabla 1.

1.3.3 Dinámicas de nutrientes en el sistema

Nitrógeno: El nitrógeno (N) es un nutriente de alta relevancia en términos de contaminación acuática, ya que en ciertas cantidades figura como agente tóxico frente distintos seres vivos y su abundancia permite que se provoque la eutroficación de cuerpos de agua, por ende, la eliminación de este nutriente es relevante para la protección del medio ambiente (Von Sperling, 2007).

Estudios sugieren que al interior del vermifiltro existen secciones o etapas a lo largo del medio filtrante que favorecen distintos procesos de transformación del nitrógeno pertenecientes al ciclo biológico del nutriente, el cual es abundante en efluentes como aguas servidas. Dicho ciclo comienza con la amonificación, etapa en la cual el nitrógeno orgánico disponible en el influente proveniente de la materia fecal y la urea se transforma en amonio (NH_4^+) (Ortega et al., 2022). Posteriormente ocurre la nitrificación, proceso aeróbico que consta de dos fases, la primera; donde el NH_4^+ es oxidado a nitrito (NO_2^-) denominada nitritación, la cual es impulsada por bacterias amonio oxidantes (BAO), y la segunda fase corresponde a la nitratación, donde los nitritos son oxidados a nitrato (NO_3^-) mediante la acción de bacterias nitrito oxidantes (BNO), siendo las bacterias del género *Nitrosomas* (BAO) y *Nitrobacter* (BNO) las más estudiadas y comúnmente encontradas (Jarpa et al., 2007). La Ecuación 1 representa la reacción de nitritación del amonio y la Ecuación 2 representa la nitratación del nitrito.





Ecuación 2

Seguido de la nitrificación ocurre la reducción del nitrato, dando como resultado final moléculas de nitrógeno gaseoso (N_2), el cual escapa a la atmósfera en un proceso llamado desnitrificación (Sánchez et al., 2008) que puede ser impulsado por bacterias desnitrificantes de carácter heterótrofas, siendo dependientes de la disponibilidad de materia orgánica en el sistema para llevar a cabo la desnitrificación en un medio anóxico o con poca aireación como ocurre en zonas más profundas del vermifiltro (Fang et al., 2011; Pu et al., 2014). En la Figura 3 se ilustra el ciclo biológico del nitrógeno, mostrando las formas más relevantes que adopta este nutriente en un sistema.

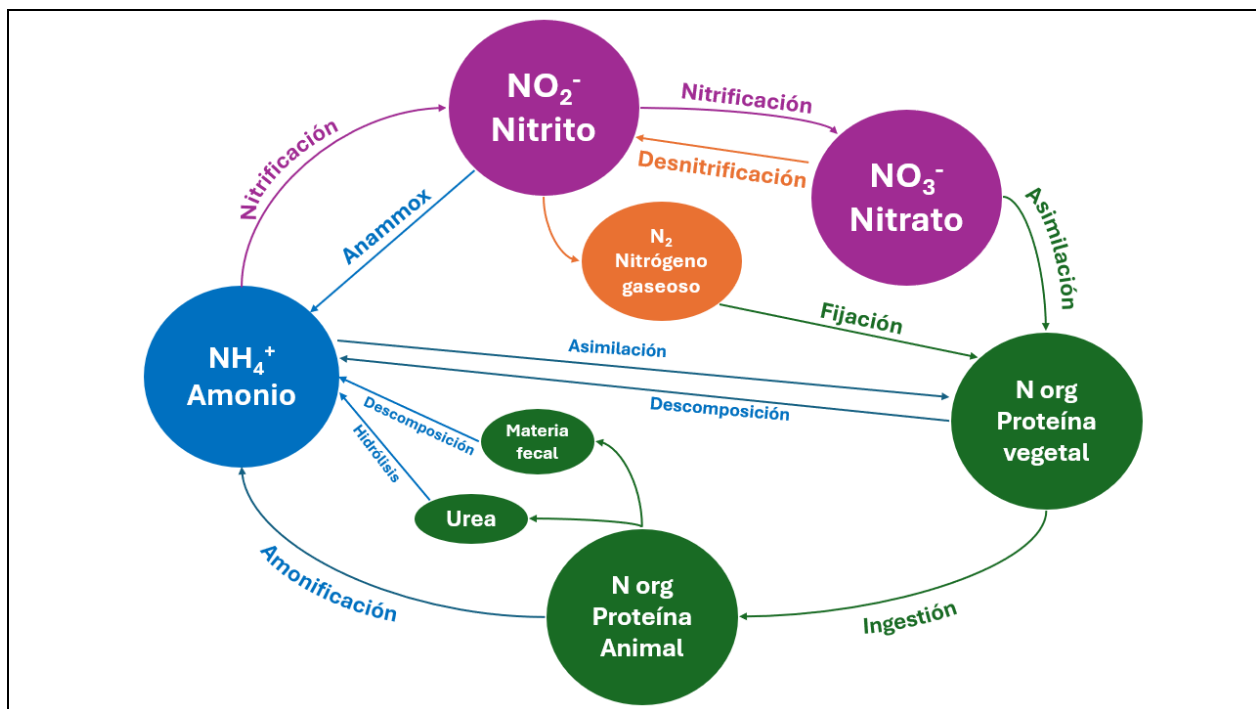


Figura 3. Ciclo biológico del nitrógeno (Adaptado de: Mosquera, 1998)

En cuanto a la eficiencia de eliminación del nitrógeno de aguas servidas mediante vermifiltros, estudios han reportado resultados por sobre el 90% de eliminación de amonio (N-NH_4^+) (Rajpal et al., 2014) y sobre un 50% en la eliminación de nitrógeno total (NT). Respecto a la



concentración de nitratos, Chowdhury et al. (2023) indica un aumento de 70 veces la concentración de N-NO_3^- en efluentes a la salida del vermifiltro, producto de la nitrificación del N-NH_4^+ en el sistema.

Fósforo: Otro nutriente presente en aguas residuales es el fósforo (P). Su presencia en los sistemas acuáticos genera el florecimiento de algas y plantas acuáticas, por ende, su control es vital para evitar eutroficación de los sistemas (López et al., 2023). En la naturaleza P se encuentra como fosfato (PO_4^{-3}) orgánico e inorgánico. El fosfato orgánico está presente en ácidos nucleicos, azúcares fosfatados, fosfolípidos, etc. Por otro lado, el fosfato inorgánico se encuentra principalmente en minerales. El ciclo biológico del fósforo consiste en la mineralización del fosfato orgánico a fosfato inorgánico, mientras que el fosfato inorgánico puede ser fijado o inmovilizado de vuelta a fosfato orgánico. Dichos procesos son impulsados por la acción de enzimas extracelulares secretadas por organismos vegetales y microbios (Carrillo et al., 2020).

En el vermifiltro y filtros percoladores en general, el fosfato del influente es eliminado por principios de adsorción iónica entre los cationes presentes en la superficie del medio filtrante y los aniones de fosfato (PO_4^{-3}) presentes en el influente. La capacidad de adsorción del fosfato dependerá del material y composición del medio filtrante, variando desde minerales metálicos como aluminio, hierro y calcio a materiales orgánicos como carbón, chip de madera y compost (Hua et al., 2016). Por último, la adsorción de fosfato y otros nutrientes disponibles en el sistema se verá favorecida por la proliferación de microorganismos en la superficie del medio filtrante (Li et al., 2015)

Respecto al comportamiento del fósforo en el sistema, estudios de Kumar et al. (2014) hablan de un incremento de 350% del fósforo total a la salida del tratamiento, atribuyéndolo a la acción de



las lombrices. Estas promueven una acelerada mineralización del fósforo disponible, ocasionando un aumento de la concentración del fósforo total en el efluente a la salida del vermifiltro, además de que las excretas de las lombrices están compuestas de alrededor de 1,22% de fósforo, factor que aumenta los rangos reportados de fósforo total (PT) en el efluente de salida (Arora et al., 2020; Kumar et al., 2015). Aportando en la discusión del fósforo en el sistema, Prabha et al. (2007) en su estudio comparativo de los tractos digestivos de *E. foetida* y *E. euginae*, concluye que la *Eisenia foetida* posee una alta actividad de enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en su organismo, a las cuales se le atribuyen la producción de fósforo inorgánico y fosforilación respectivamente.

1.3.4 Parámetros operacionales que afectan el rendimiento de vermifiltros (VF)

Los parámetros propios del diseño del sistema, tales como la densidad de lombrices (lombrices/m³) y la carga hidráulica administrada al VF poseen un profundo efecto en el rendimiento general del proceso, en donde altas tasas de carga hidráulica son favorables para la actividad de vermifiltración (Hait et al., 2011). La optimización del sistema se basa en condiciones ideales para el desarrollo de los organismos que conviven en el ambiente diseñado; considerando rangos óptimos de carga orgánica alimentada en valores de 0,1-0,6 kg DQO/m²d y flujos de carga hidráulica del orden de 0,3-3 m³/m²d (Arora et al., 2014; Kumar et al., 2014). Se requiere también un medio filtrante o combinación de medios filtrantes en los cuales los organismos puedan proliferar y desarrollar una biopelícula (biopelícula) a medida que van reteniendo y eliminando contaminantes del influente, donde materiales como la arena, grava, chip de madera o compost suelen ser opciones utilizadas para estructurar un medio filtrante en el diseño de vermifiltros (Xing et al., 2012). Generalmente se denomina a la capa superficial de estos medios filtrantes como la capa activa (10 cm), donde ocurren con mayor intensidad los



procesos metabólicos aeróbicos en el VF y pasado los 10 cm se encuentra la capa intermedia situándose entre los 10 y 50 cm de profundidad en el sistema (Arora et al., 2014). A su vez, el rendimiento de eliminación de los contaminantes presentes en aguas residuales como la materia orgánica y nutrientes depende de variables como el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno del sistema.

Efecto del pH y temperatura: Uno de los procesos que forma parte del tratamiento es la neutralización del pH, disminuyendo los valores de pH de 8,2 a valores de pH 7 (Arora et al., 2016). Esta acción se le atribuye a la capacidad neutralizadora de las lombrices. Los datos anteriores concuerdan con estudios de Barois y Lavelle (1986) que describen como el tracto intestinal de la lombriz mantiene un pH entre 6 y 8 y expulsa excretas con rangos similares de pH lo que ocasiona a su vez la neutralización del efluente a la salida del sistema.

Respecto a la temperatura, numerosos autores señalan que se debe mantener un ambiente templado de 15-28°C para no afectar la actividad microbiana del vermifiltro (Chicaiza et al., 2020). Además, bajas temperaturas pueden comprometer la actividad de las lombrices al inhibir su reproducción y movimiento, causando incluso la muerte. El rango óptimo de temperatura para las lombrices varía entre los 15 y 30°C (Samal et al., 2017).

Oxígeno disuelto: Los vermifiltros tienden a estar estratificados a lo largo de los medios filtrantes, separándose en zonas con mayor actividad metabólica en capas superficiales y zonas con menor actividad metabólica en capas más profundas (Huang et al., 2021). Estas diferencias son generadas por la infiltración de oxígeno al sistema que provoca el movimiento de las lombrices favoreciendo el crecimiento de microorganismos aeróbicos en las primeras capas (Yang et al., 2017). Por otro lado, la falta de disponibilidad de oxígeno favorece el crecimiento



de bacterias anaeróbicas que generan emisiones de metano (CH_4) debido a procesos metanogénicos (Le Meir et al., 2001) y así como también la proliferación de bacterias desnitrificantes. En algunos casos de estudio se detalla acerca de cómo el movimiento de las lombrices a través de los medios filtrantes se ve estimulado en sistemas con ventilación asistida lo cual se refleja en mayores porcentajes de eliminación de materia orgánica debido a un incremento de los procesos aeróbicos, procesos de nitrificación y de la actividad enzimática que ocurre en el vermifiltro (Huang et al., 2014). Las consecuencias de una pobre aireación resultan en condiciones anaeróbicas implicando una degradación más lenta de material orgánico debido a que las bacterias anaeróbicas poseen menor actividad que la microbiota aeróbica (Wang et al., 2021). Valores típicos de oxígeno disuelto para efluentes de biofiltros y vermifiltros van en rangos de 0,8-1,0 y 1,5-2,1 mg de oxígeno/L respectivamente (Singh et al., 2019).

La Tabla 1 muestra vermifiltros con distintas eficiencias de eliminación de materia orgánica y nutrientes, asociado a los parámetros de diseño y operación del sistema. Se destacan los sistemas contruidos con chip de madera como su medio filtrante principal debido a que poseen mayor desempeño eliminando dichos contaminantes.



Tabla 1. Eficiencia de distintos vermifiltros en la eliminación de materia orgánica y nutrientes

Capa activa		Parámetros de operación			%Eficiencia de Eliminación						Tipo de agua residual
Medio filtrante	Densidad (Lombriz/m ³)	H (m)	TCH (m ³ /m ² d)	TCO (kgDQO/m ² d)	DQO	SST	NT	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	PT	
Compost	8000-8500	0,1	2,5	1,49	56,6±20	-	-	42,7 ± 29	4,7 ± 38	16 ± 6	Aguas servidas
	7000-7500	0,35	1,3	0,9-1,8	68,0 ± 2	-	-	-	-	-	Lodos de tratamiento primario
Chip de madera	8000-9500	0,35-0,7	0,47-1,05	0,1-0,4	70,4 ± 9	65,5 ± 40	62,5 ± 3	61,9	-	-	Aguas servidas
	5000-6500	1-1,3	0,47-0,95	0,3-0,59	83,4 ± 4	84,6 ± 8	54,1 ± 9	96,6 ± 3	-	65 ± 11	Aguas servidas
Otro medio filtrante	16000-17000	0,3-0,35	0,2-4,2	0,05-0,39	70,7 ± 4	90,13	65,7	92,1	-	81	Aguas servidas
	200-300	0,33	0,08	0,07	66,5 ± 2	96,4 ± 1	47,5 ± 4	-	52,5 ± 2	44 ± 2	Aguas servidas

H: altura; TCH: Tiempo de carga hidráulica; TCO: Tasa de carga orgánica; DQO: Demanda química de oxígeno; SST: Sólidos suspendidos totales; NT: Nitrógeno total; N-NH₄⁺: Nitrógeno del Amonio; N-NO₃⁻: Nitrógeno del Nitrato; PT: Fósforo total. Fuente: adaptado de Gutiérrez et al. (2023).



1.4 Generación de la biopelícula

La biopelícula es una estructura compleja formada por aglomeraciones de distintas comunidades de microorganismos, tales como levaduras, hongos, bacterias y protozoos; cuya presencia resulta muchas veces perjudicial en el ámbito alimenticio, biomédico y medioambiental (Huang et al., 2019). No obstante, en este último campo, se ha visto que la biopelícula tiene beneficios en el tratamiento biológico de aguas servidas municipales, descontaminación de cuerpos de agua superficiales y aguas subterráneas (Boltz et al., 2017).

La biopelícula va edificándose a medida que los microorganismos van adhiriéndose a una estructura de soporte fija, como bio-carriers o en este caso un medio filtrante. De esta forma la biopelícula fijada genera estabilidad estructural y protección bacteriana además de formación, mantención y comunicación intercelular de la colonia de microorganismos, los cuales irán capturando y consumiendo nutrientes para su desarrollo (Huang et al., 2014). Sin embargo, eventualmente durante el tratamiento de aguas servidas, la biopelícula ira aumentando su grosor, indicando cierta madurez o vejes, lo que ocasiona el desprendimiento de la biopelícula de la estructura de soporte dejando espacio para la reproducción de nuevas bacterias y la proliferación de una nueva biopelícula (Paul et al., 2012; Tang et al., 2011). Si el proceso de desprendimiento no ocurre, se produce una acumulación de biopelícula envejecida, afectando la transferencia de nutrientes en el medio y, por ende, un decrecimiento en la actividad y eficiencia del sistema que puede provocar su colapso. (Huang et al., 2017). Actualmente, los reactores cuyo funcionamiento giran en torno a la formación de una biopelícula son ampliamente usados para descontaminar aguas servidas debido a su fuerte capacidad de adaptación a aumentos de carga orgánica, baja producción de lodos y la reducción de la concentración de compuestos orgánicos y agentes



tóxicos como el nitrógeno del amonio presentes en el influente gracias a la actividad de la biopelícula (Gonzales et al., 2009).

1.5 Actividad enzimática del vermifiltro

Un factor que afecta todos los procesos ocurriendo en el vermifiltro es la actividad enzimática, ya que influye en la protección y adaptación de la lombriz junto con la asimilación y metabolización de nutrientes y materia orgánica que pueda alcanzar el sistema en sí. Estudios realizados en vermifiltración de aguas servidas, señalan que las enzimas con mayor presencia en el reactor son las que participan en la degradación de grandes moléculas de polisacáridos, tales como la xilanasas, celulasa y amilasa (Prabha et al., 2007).

Debido a la secreción de numerosas enzimas como proteasas, celulasas y quitinasas es que las lombrices en el vermifiltro son capaces de acelerar la degradación bioquímica de los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales (Kumar, 2015). Wang et al. (2021), detalla otras especies de enzimas, que participan en la descomposición aeróbica de orgánicos, tales como la catalasa, ureasa y la deshidrogenasa; y sobre como la actividad de estas enzimas incrementa en condiciones de operación óptimas en un medio aeróbico para la obtención de mayores rendimientos en la eliminación de materia orgánica y nutrientes.

1.5.1 Amilasa

Con un enfoque puesto en el metabolismo de materia orgánica, la enzima con mayor importancia biotecnológica, cuyo uso se extiende en múltiples industrias tales como la farmacéutica, procesado de cuero, textiles y alimentos es la amilasa (Sanjai et al., 2015). La amilasa actúa a partir de la hidrólisis de las moléculas de almidón presentes en la materia orgánica produciendo carbohidratos más pequeños tales como unidades de glucosa, maltosa, maltotriosa, etc. (Rana et



al., 2013). La amilasa está presente en plantas, animales, hongos y bacterias, siendo estas últimas la fuente más relevante para la innovación biotecnológica debido a los cortos periodos de tiempo requeridos para su cultivo y la facilidad que presentan las bacterias para su manipulación a nivel genético, destacando al género de bacterias del género *Bacillus* (Prakasham et al, 2005). Estudios de Hasan et al. (2017) acerca de la degradación de desechos orgánicos de cocina, determina que la actividad enzimática de la amilasa analizada en bacterias del género *Bacillus* y *Chryseobacterium* alcanzo su máxima producción cercana a $3,5 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en ambas cepas a pH ácido entre 5 y 7 y temperaturas de 37°C .

La amilasa es una hidrolasa que forma parte de un grupo de enzimas llamadas carbohidrasas. Dicho grupo está involucrado principalmente en la hidrólisis de polisacáridos y oligosacáridos, destacando la amilasa, invertasa, celulasa y pectinasa. A su vez existen distintos tipos de amilasa, tales como la α -amilasa, β -amilasa y la glucoamilasa. El sustrato de estas enzimas es el almidón; uno de los polisacáridos más abundantes en los alimentos (Kuriki y Imanaka, 1999), y actúan sobre enlaces α -1,4-glucosídico, provocando distintas reacciones de hidrólisis dando como resultado unidades de maltosas, dextrinas y glucosas. La amilasa puede provenir de distintas fuentes, sin embargo, bajo el enfoque de esta investigación se destaca la amilasa fúngica producida por especies de hongos y bacterias. Por ejemplo, hongos como *Aspergillus oryzae*, productor de α -amilasa, y *Aspergillus niger* capaz de producir α -amilasa y glucoamilasa; además de especies de bacterias como *Bacillus subtilis*, capaz de producir α -amilasa (Carbonero, 1976).

1.5.2 Proteasa

Las proteasas son otras enzimas de alta relevancia en escalas industriales, siendo utilizadas en el área alimenticia, producción de detergentes, industria farmacéutica y cosmética, siendo las



proteasas de origen microbiano las más significativas debido a su abundancia (Orhan et al., 2005). Bacterias *Bacillus* como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* son conocidas productoras de proteasas extracelulares, sin embargo, otras bacterias que destacan en producción de las proteasas son las del género *Aeromonas*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, teniendo el potencial de ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas a escalas industriales. Componentes del ambiente de cultivo en que se desarrollen las bacterias influyen en la secreción y actividad de proteasas extracelulares, entre estos está la disponibilidad de fuentes asimilables carbono, nitrógeno y iones (Paredes et al., 2017).

Múltiples plantas, animales, hongos y bacterias son fuentes de proteasas, siendo estos últimos los productores más abundantes en la naturaleza. Estas enzimas son capaces de hidrolizar enlaces peptídicos de las proteínas y pueden encontrarse como proteasas ácidas o alcalinas dependiendo del pH de su medio. Las proteasas ácidas actúan de manera estable en un rango de pH de 2 a 8 (Ramírez et al., 2017). Sreelakshmi et al. (2013) evalúa la producción de proteasa ácida en cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis*, la cual superó los 600 U/ml·min a pH neutros de 6 a 7 respectivamente a 60°C de temperatura. Por otro lado, estudios acerca del desarrollo de proteasas en medio alcalino producidas por bacterias *Bacillus cereus* y hongos *Aspergillus niger*, mostraron estabilidad en rangos de pH de 6 a 12 teniendo como pH óptimo un valor de 9 y 8 para *Bacillus c.* y *Aspergillus n.* a temperaturas mesofílicas cercanas a los 32°C (Dubey et al., 2010; Kotlar et al., 2015).



1.6 Relación del rendimiento de reactores en el tratamiento de aguas servidas y su actividad enzimática

De acuerdo con la literatura, existe una relación directa entre la actividad enzimática de los procesos biológicos para el tratamiento de aguas servidas y el rendimiento que estos sistemas puedan alcanzar durante su operación. Poniendo énfasis al tratamiento de materia orgánica dentro del sistema, si bien es necesario reconocer el aporte de la lombriz en estos procesos metabólicos, se debe tener claro que los verdaderos protagonistas de la degradación de materia orgánica son los microorganismos que residen al interior del vermifiltro (Zhao et al, 2010). En ausencia de *Eisenia foetida* el sistema pasaría a adoptar un nombre distinto, conocido por Biofiltro (BF), el cual posee las mismas características operacionales de base que posee el vermifiltro, a excepción de las lombrices; puesto que estas figuran como un componente adicional que llega a catalizar la acción bacterias que componen la biopelícula y descomponen materia orgánica (Xing et al., 2010), por consiguiente, se entiende que las rutas metabólicas que degradan estos compuestos orgánicos del influente seguirán ocurriendo con o sin lombrices, la diferencia existe en el rendimiento que se pueda obtener utilizando un biofiltro o vermifiltro.

Frente a una correcta operación del proceso teniendo una población de lombrices desarrollándose en un ambiente óptimo, debería verse reflejado en un sistema aeróbico; a causa principalmente del aporte que genera la lombriz incrementando el oxígeno disponible mediante surcos y excavación en el medio filtrante (Singh et al., 2019), lo que también fortalecerá las comunidades de microorganismos aeróbicos en la biopelícula, los cuales son relevantes en la degradación y oxidación de compuestos orgánicos (Luth et al., 2011).



Investigaciones de Samal et al. (2017) exponen acerca del papel determinante que juega la biota intestinal de la *Eisenia foetida* al compartir ambiente con las comunidades de bacterias aeróbicas del vermifiltro, resaltando que esta unión favorece la secreción de las enzimas digestoras, las cuales son capaces de descomponer la materia orgánica que ingresa al sistema, considerando el desarrollo de la actividad enzimática a un pH óptimo con un rango de 6,3 a 7,3 (Wang et al., 2010).

Al desarrollarse un ambiente abundante en oxígeno dentro del sistema, la ruta metabólica dominante que marca el paso de las macromoléculas como carbohidratos, proteínas y lípidos hacia moléculas más pequeñas (dióxido de carbono y agua) es la ruta aeróbica. Por otro lado, la ruta metabólica anaeróbica posee un ciclo más largo para metabolizar estas macromoléculas y además entrega productos diferentes, considerando la metanogénesis como la fase final de la descomposición anaeróbica, resultando en moléculas de dióxido de carbono y metano, otro gas de efecto invernadero (Gutiérrez et al., 2023). Como el metabolismo aeróbico de materia orgánica es de llevarse a cabo más rápido que su contraparte anaeróbica, es que existe preferencia por la implementación de sistemas aeróbicos en vez de sistemas anaeróbicos al momento de tratar aguas servidas, ya que estos últimos tienden a desestabilizarse con mayor facilidad y demoran más tiempo en recuperarse de fallas operacionales (Singh et al., 2019).

Centrando el foco nuevamente en el ambiente aeróbico, es relevante el favorecer la presencia de bacterias aeróbicas secretoras de distintas enzimas que impulsen la descomposición de los principales constituyentes orgánicos encontrados en las aguas servidas. Dentro de estas macromoléculas se encuentran estructuras como la celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, múltiples proteínas y cadenas de lípidos; para los cuales existen múltiples familias de enzimas



cuya secreción desencadena la digestión y metabolismo de dichos constituyentes. La amilasa y proteasa destacan de entre otras enzimas, ya que su actividad se reporta ampliamente en los estudios relacionados al potencial enzimático de procesos bioquímicos como los que ocurren al interior de sistemas de tratamiento de aguas residuales como el vermifiltro, sustentado en que son enzimas que participan de forma activa en la degradación de materia orgánica particulada y disuelta; hidrolizando hidratos de carbono, lípidos y proteínas, por ende, la presencia de estas enzimas es interpretada como un indicador positivo en los sistemas, permitiendo ver a la actividad enzimática de un vermifiltro o biofiltro reflejada en términos de rendimiento operacional en la eficiencia de eliminación de materia orgánica (Samal et al., 2017; Xing et al, 2010; Xu, et al. 2016).

A raíz de lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad enzimática y el rendimiento de un vermifiltro en comparación a un biofiltro, empleados en el tratamiento de aguas servidas. Para cumplir con este objetivo se apuesta por tener dos sistemas de tratamiento a escala de laboratorio: un vermifiltro y un biofiltro. Este último se trata de una unidad de control similar al vermifiltro compuesta de los mismos medios filtrantes, pero sin lombrices. El enfoque de la investigación se tendrá puesto en la actividad de amilasas y proteasas, ya que es sabido que por literatura es sabido que su presencia da cuenta de un buen funcionamiento en la eliminación de materia orgánica. El monitoreo del biofiltro y el vermifiltro es justificado debido a que es interesante ver la evolución de estos sistemas en conjunto, ya que el resultado podrá resaltar el efecto de la actividad enzimática que aporta la presencia de la lombriz en el tratamiento de aguas servidas; por lo tanto, se apunta a generar información que aporte en el marco del tratamiento de aguas servidas en sectores descentralizados; específicamente en la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Si bien, existen diferentes investigaciones en vermifiltros, no está



claramente identificado como las bacterias y lombrices son capaces de transformar y eliminar diferentes tipos de contaminantes. Bajo este contexto, es posible que la actividad enzimática de cuenta de los efectos que tienen las lombrices en el sistema y nos entregue información relevante para mejorar la operación y rendimiento del VF.



2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Pregunta de investigación

Teniendo en cuenta que las lombrices intensifican los procesos metabólicos en un medio filtrante, ¿Es posible afirmar que la presencia de la lombriz influye significativamente en el tratamiento de aguas servidas?

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad enzimática y el rendimiento de un vermifiltro en comparación a un biofiltro, empleados en el tratamiento de aguas servidas.

2.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de eliminación de materia orgánica en un vermifiltro y un biofiltro utilizados para el tratamiento de aguas servidas.
- Comparar la eficiencia de eliminación de nutrientes en un vermifiltro y un biofiltro utilizados para el tratamiento de aguas servidas.
- Determinar la influencia de la lombriz sobre la actividad enzimática de un vermifiltro y biofiltro utilizados para el tratamiento de aguas servidas.



3 METODOLOGÍA

3.1 Diseño y montaje del vermifiltro y biofiltro

A escala de laboratorio se instalaron 2 unidades experimentales. Estos sistemas, están hechos de acrílico con las siguientes dimensiones: 0,15 m · 0,15 m · 0,50 m y constaron de 2 capas en el siguiente orden de arriba hacia abajo: 40 cm de chip de madera y 5 cm de grava. Los sistemas fueron montados en la Planta Piloto del Grupo de Ingeniería y Biotecnología Ambiental (GIBA-UDEC) de la Facultad de Ciencia Ambientales y fueron reubicados al inicio del periodo de verano a un laboratorio puertas adentro de dicha Facultad.

Tabla 2. Parámetros de operación

Parámetro	Unidad de medida	Valor o característica	
		Vermifiltro	Biofiltro
Dimensiones: (L x A x H)	cm x cm x cm	15 x 15 x 50	15 x 15 x 50
Medio de soporte (Grava)	cm	5	5
Medio filtrante (Chip de madera)	cm	40	40
TRH	h	24	24
Lombrices	No aplica	<i>Eisenia foetida</i>	-
Densidad de población	lombrices/m ³	6913	-
Q	L/d	0,5	0,5
TCO	Kg DQO/m ² d	0,01523	0,01523
TCH	m ³ /m ² d	0,022	0,022

L: Largo; A: Ancho; H: Altura; TRH: Tiempo de retención hidráulico; Q: caudal; TCO: Tasa de carga orgánica; TCH: Tasa de carga orgánica. Gutiérrez et al. (2023)



Cada contenedor posee un volumen de 11,25 L y serán alimentados por aspersión con 0,5 L de aguas servidas al día con un tiempo de residencia hidráulico de 24 h. El proceso anterior fue monitoreado con una bomba automática la cual alimentaba el influente una vez por día. En la Figura 4 se ilustra un esquema de ambos sistemas.

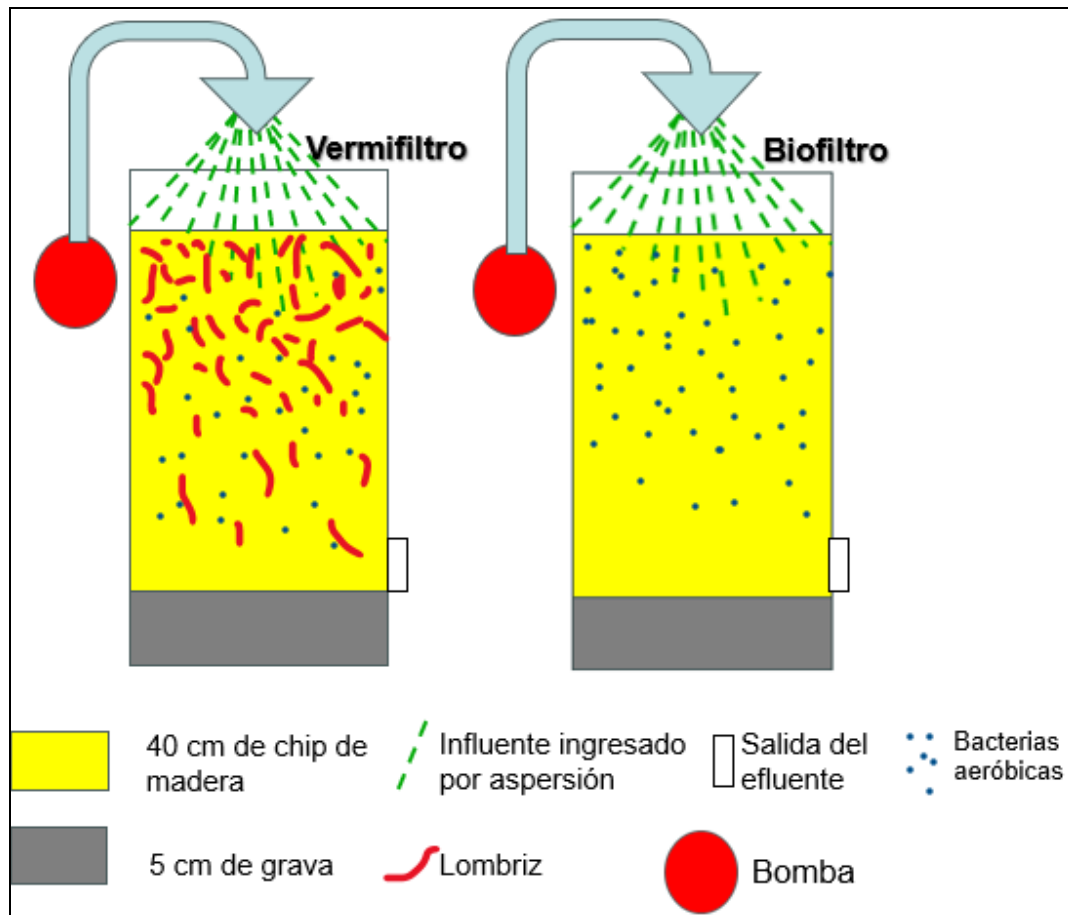


Figura 4. Esquema del funcionamiento de un Vermifiltro

3.2 Parámetros fisicoquímicos e *in situ*

Los parámetros *in situ* tales como el pH, OD, T°, potencial óxido reducción, y conductividad fueron medidos para el influente al inicio del tratamiento y para el efluente resultante al final del tratamiento para comprobar un correcto funcionamiento del proceso. De forma similar se realizó



el análisis de los siguientes parámetros fisicoquímicos: DQO, N-NH_4^+ , NT, N-NO_3^- , N-NO_2^- , PT, P-PO_4^{3-} , sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) debido a que se trata de compuestos de interés los cuales están presentes en el tratamiento de aguas servidas. Los parámetros mencionados en este apartado fueron analizados de acuerdo con métodos estandarizados de la Asociación Americana de Salud Pública (Baird et al., 2017).

3.3 Obtención de influente y medio filtrante

El influente que se utilizará para alimentar los sistemas se obtendrá de la PTAS municipales de la localidad rural de Copiulemu perteneciente a la Comuna de Florida. Esta planta se trata de un Vermifiltro a escala real el cual funciona con una tasa de carga hidráulica de $0,5 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{día}$ y la DQO del influente está en un rango de 800-900 mg/L.

De esta planta se extraerán 15 L de AS una vez cada 15 días para alimentar a ambos sistemas diariamente con 0,5 L/día. El influente se almacenará a 4°C en la cámara de frío hasta que sean utilizadas.

3.4 Monitoreo de parámetros

Para cada parámetro *in situ* se planea utilizar un medidor multiparámetro portátil OAKTON (PC650-480485) y un medidor de OD portátil (HANNA OXI 330i/set HI 9146-04) 1 vez por día. La determinación de DQO se realizará por el método colorimétrico de reflujos cerrados utilizando un espectrofotómetro a 660 nm (Thermo Spectronic - Genesis 10 UV). Por otro lado, la concentración N-NH_4^+ , N-NO_3^- , N-NO_2^- y P-PO_4^{3-} se determinarán mediante espectrofotometría. Las concentraciones de NT, y PT serán medidas utilizando Kits específicos de la línea Spectroquant-Nova 60 de Merck. En cuanto a los parámetros de SST y SSV se trabajarán por método gravimétrico depositando las muestras filtradas en cápsulas de porcelana y posterior secado en estufa a $103-105^\circ\text{C}$, para ser finalmente mufladas a 550°C (Baird et al., 2017). Por



último, para la metodología del tercer objetivo, se piensa muestrear en las capas superficiales de los sistemas ya que de acuerdo con la literatura citada en el marco teórico la mayor actividad enzimática toma lugar en los primeros 10 cm, zona conocida como la capa activa. La determinación de la actividad enzimática se realizará por métodos espectrofotométricos tanto en el vermifiltro como en el biofiltro, ya que las bacterias encargadas de secretar enzimas que degraden materia orgánica deberían encontrarse en ambos sistemas, sin embargo, esperamos tener una actividad enzimática mayor en el vermifiltro por la presencia de lombrices. El estudio estará enfocado en medir la actividad enzimática de la amilasa y proteasa, ya que su presencia podría estar relacionado a un correcto funcionamiento del sistema para eliminar el material orgánico (Samal et al., 2017).

3.4.1 Determinación de la actividad de la amilasa

El análisis consiste en un método colorimétrico, cuya medición se realiza en espectrofotómetro con longitud de onda $\lambda=540$ nm, con lo cual se pretende conocer la concentración de glucosa generada a raíz de la actividad de la amilasa. La reacción transcurre en 10 minutos a temperatura controlada de 50°C en una incubadora (Zhang, 2007). La actividad enzimática es determinada mediante la siguiente formula:

$$\frac{C_{glucosa}}{t_{reacción} * V_{enzima}} * V_{muestra} * FD = \left[\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzimas}} \right] = \frac{\text{mg glucosa}}{(\text{min} * \text{ml enzima})}$$

Donde:

$C_{glucosa}$: concentración de glucosa en la muestra, en mg/ml

$t_{reacción}$: tiempo que actúa la enzima en el sustrato. En este ensayo son 10 minutos.



V_{enzima} : volumen de disolución de muestra empleado. En este ensayo, 1 mL.

$V_{muestra}$: volumen de muestra usado en las cubetas de espectrofotómetro. En este ensayo, 4 ml.

FD : Factor de dilución empleado, en este caso 20 mL.

El resultado final de la actividad enzimática se expresa en:

Unidad de actividad enzimática/mg Sólidos Suspendidos Volátiles=U/mg SSV

Debido a que de esta forma se representa mejor la cantidad de enzima que cataliza el metabolismo de 1 μmol de sustrato por minuto, por miligramos de sólidos suspendidos volátiles, los cuales representan el componente analizado, en este caso la biopelícula del medio filtrante.

3.4.2 Determinación de la actividad de la proteasa:

El análisis consiste en un método colorimétrico cuya medición se ejecuta en espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda=660$ nm. Esta metodología pretende cuantificar la actividad de la proteasa a raíz de conocer la concentración de tirosina generada por la enzima. La reacción transcurre en 10 minutos a temperatura controlada de 37°C en una incubadora de acuerdo lo indica la metodología de Sigma-Aldrich (2023).

La actividad enzimática es determinada mediante la siguiente formula:

$$(1) \frac{C_{glucosa}}{t_{reacción} * V_{enzima}} * V_{muestra} * FD = \left[\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzimas}} \right] = \frac{\text{mg glucosa}}{(\text{min} * \text{ml enzima})}$$

Donde:

$C_{tirosina}$: concentración de tirosina en la muestra, en mg/ml

$t_{reacción}$: tiempo que actúa la enzima en el sustrato. En este ensayo son 10 minutos.



V_{enzima} : volumen de disolución de muestra empleado. En este ensayo, 1 mL.

$V_{muestra}$: volumen de muestra usado en las cubetas de espectrofotómetro. En este ensayo, 4 ml.

FD : Factor de dilución empleado, en este caso 11 mL.

El resultado final de la actividad enzimática se expresa en:

Unidad de actividad enzimática/mg Sólidos Suspendidos Volátiles=U/mg SSV

Debido a que de esta forma se representa mejor la cantidad de enzima que cataliza el metabolismo de 1 μmol de sustrato por minuto, por miligramos de sólidos suspendidos volátiles, los cuales representan el componente analizado, en este caso la biopelícula del medio filtrante.

3.5 Análisis Estadístico

El análisis estadístico será aplicado a los datos obtenidos para el tratamiento de ambos sistemas, donde previamente se aplicará una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos y dependiendo del resultado, ejecutar una prueba de t-student para datos con distribución normal y un test de Wilcoxon para datos sin distribución normal. Para este análisis, se consideró un coeficiente de significancia de $\alpha=0.05$, Por lo tanto, existirán diferencias estadísticamente significativas, si el parámetro resultante (P) de cada prueba es menor o igual a 0.05.



4 APORTE A LOS ODS

El objetivo de desarrollo sostenible (ODS) principal relacionado a esta investigación es el ODS número 6: Agua limpia y saneamiento. Ya que, a través de la optimización de tecnologías sustentables como pueden ser las soluciones basadas en la naturaleza, en este caso un vermifiltro, es posible progresar en materia ambiental al cubrir las necesidades de saneamiento de localidades rurales, mediante el tratamiento eficiente de aguas servidas para su posterior disposición en cuerpos receptores de forma segura para el medio ambiente y las comunidades humanas.



5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del influente

La Tabla 3 muestra los distintos rangos y promedios de los parámetros in situ y fisicoquímicos que presenta el influente extraído de la PTAS de Copiulemu posterior a un tratamiento primario. La DQO, presentó un valor promedio de $762,7 \pm 239,7$ mg/L. La variación se explica por una falla en el tratamiento primario de la PTAS de Copiulemu durante los meses de septiembre y octubre, por ende, el influente llegaba al laboratorio con grandes cantidades de sólidos. Esto aumento la DQO por sobre los 1000 mg/L.

El nutriente más abundante en el influente es el nitrógeno del amonio (N-NH_4^+), representando 98% de las formas de nitrógeno total presentes en el influente, con concentraciones promedio de $81,4 \pm 36,4$ mg/L. Le sigue muy por debajo el fósforo del fosfato (P-PO_4^{-3}), con concentraciones promedio de $8,1 \pm 3,1$ mg/L.



Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del influente

Parámetro		Unidad	Rango	Promedio ± DE
In situ	T	°C	13,6 – 25,0	19,0 ± 3,6
	pH	-	6,28 – 8,80	7,8 ± 0,6
	OD	mg/L	0,4 – 3,8	1,3 ± 0,8
	CE	mS/cm	1,138 – 4,155	2,994 ± 0,9
	POR	mV	-212,0 – 214,3	-26,0 ± 140,1
Materia orgánica	DQO	mg/L	397,6 - 1196,1	762,7 ± 239,7
	SST	mg/L	54,9 – 419,0	242,6 ± 169,0
	SSV	mg/L	38,5 - 391,3	200,8 ± 156,6
Nutrientes	NT	mg/L	46,0 – 140,0	82,7 ± 29,1
	PT	mg/L	6,3 - 11,7	9,0 ± 2,7
	N-NH ₄ ⁺	mg/L	25,2 - 168,8	81,4 ± 36,4
	N-NO ₂ ⁻	mg/L	0,019 - 0,118	0,04 ± 0,02
	N-NO ₃ ⁻	mg/L	0,14 - 2,2	1,1 ± 0,5
	P-PO ₄ ⁻³	mg/L	4,4 – 12,0	8,1 ± 3,1

T: Temperatura; pH: Potencial hidrógeno; OD: Oxígeno disuelto; CE: conductividad eléctrica; POR: Potencial óxido reducción; DQO: Demanda química de oxígeno; NT: Nitrógeno total; PT: Fósforo total; SST: Sólidos suspendidos totales; SSV: Sólidos suspendidos volátiles; N-NH₄⁺: Nitrógeno del amonio; N-NO₂⁻: Nitrógeno del nitrito; N-NO₃⁻: Nitrógeno del nitrato; P-PO₄⁻³: Fósforo del fosfato.



5.1.1 Materia orgánica

La Figura 5 muestra las eficiencias de eliminación de DQO en ambos sistemas a través del tiempo y a distintas temperaturas de operación.

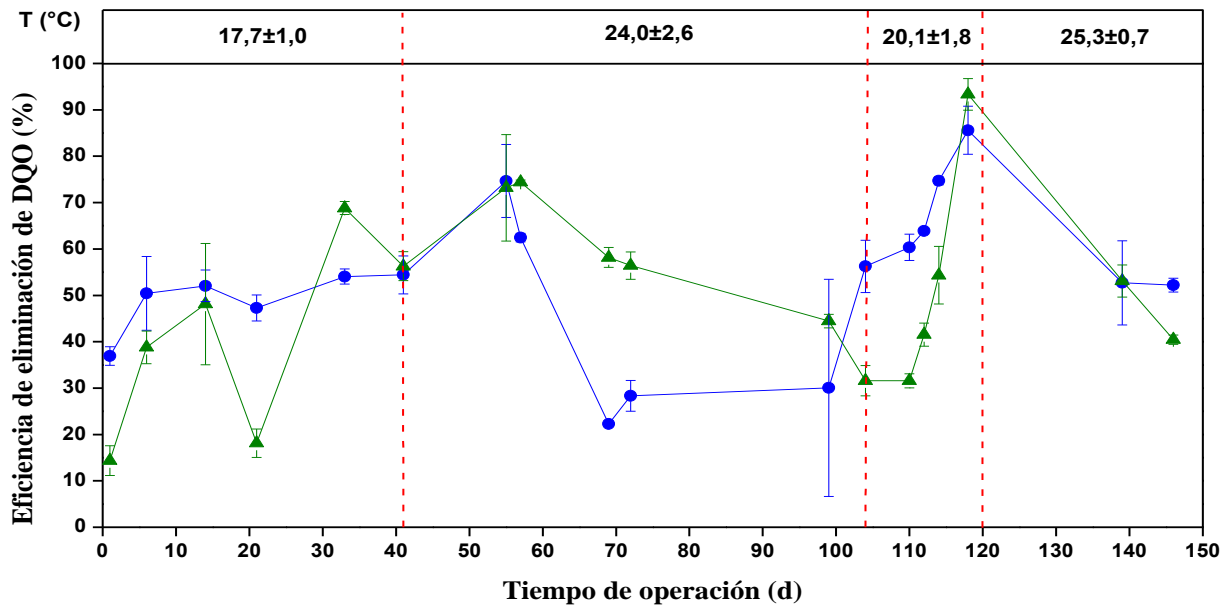


Figura 5. Eficiencia de eliminación de DQO de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

En la primera sección se opera a una temperatura de aproximadamente 18°C entre los meses de agosto y septiembre, seguido por un periodo de mayor temperatura de 24°C entre el mes de octubre hasta los primeros días de diciembre, tiempo en el cual se ven los puntos de menor eficiencia de eliminación del vermifiltro (VF) respecto a la sección anterior y respecto a la gráfica en general; decreciendo desde un peak de aproximadamente 75% de eficiencia de eliminación de DQO hasta un mínimo de un 20%. Es posible explicar esta disminución en la eficiencia de eliminación de la DQO, por el alza de temperatura que se dio en el invernadero en primavera. Este factor de estrés pudo haber inhibido la actividad de las lombrices. Sin embargo,



por otro lado Arora et al. (2016) presentó otra tendencia en su investigación, ya que por sobre los 25°C, obtuvo eficiencias de eliminación de DQO y SST mayores a 80 y 70% respectivamente, afirmando que el rango de temperatura óptimo de operación para el VF está entre los 25 y 27°C, sin embargo, cabe destacar que dicho experimento estaba diseñado con una tasa de carga hidráulica (TCH) de $1 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, alimentando un caudal de 50 litros por día para un sistema cuyas dimensiones eran de 25m · 20m · 30m, por ende, es posible que mayores tasas de carga hidráulica, incrementen la humedad y ayuden a compensar los efectos de la temperatura en el sistema. La tasa de carga hidráulica utilizada en esta investigación es de $0,022 \text{ m}^3 / \text{m}^2 \text{ d}$ (con un Q = 0,5 litros por día). Es probable que con las dimensiones del sistema (15cm · 15cm · 50cm) haya sido necesario una TCH mayor para evitar variaciones tan notorias en la eficiencia del sistema frente a aumentos de temperatura.

La tercera sección del gráfico representa 20 días del mes de diciembre, en los cuales los sistemas fueron reubicados del invernadero hasta el laboratorio. Durante este periodo, con una temperatura de 20°C, los sistemas presentaron una evolución positiva llegando a valores máximos de eliminación de la DQO de 80 y 90% para el VF y BF respectivamente. Durante el último periodo a una temperatura de 25°C, ambos sistemas nuevamente muestran una baja en la eficiencia para eliminar DQO, este decrecimiento se estabiliza en un 50% en el VF.

A lo largo del tiempo de operación, la eficiencia de eliminación promedio obtenidas en DQO, SST y SSV fueron de $54,2 \pm 16,5\%$, $63,1 \pm 13,0\%$ y $70,9 \pm 13,0\%$ respectivamente para VF, mientras que BF obtuvo eficiencias de $51,9 \pm 18,5\%$, $74,7 \pm 10,0\%$ y $78,1 \pm 13,0\%$ en la eliminación de DQO, SST y SSV. Existen diferencias entre los resultados de este experimento en comparación con los informados por Lourenco y Nunes (2017), donde para un vermifiltro se



obtienen eficiencias de eliminación de $79,7\pm 0,1\%$ y $98,4\pm 0,1\%$ para DQO y SST respectivamente y para un biofiltro se reporta eficiencias de eliminación de $77,6\pm 0,1\%$ para DQO y $98,4\pm 0,1\%$ para SST. En términos de eliminación de DQO los resultados se acercan más a los informados por Huang et al. (2013), donde sus reactores obtienen eficiencias de eliminación de DQO de $68,48\pm 9,1\%$ para un vermifiltro y $55,6\pm 5,1\%$ para un biofiltro, no obstante, el desempeño del VF sigue siendo menor que el informado por otros casos de estudio en la bibliografía, lo cual puede ser explicado por las condiciones de operación como la temperatura, el TCH o también por la lombriz, que por su presencia y comportamiento, retrase la estabilización del VF. Los resultados entre el VF y BF no obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P=0,55>0,05(\alpha)$).

5.1.2 Nutrientes

Nitrógeno: Los principales nutrientes en el influente son el nitrógeno del amonio ($N-NH_4^+$), fósforo del fosfato ($P-PO_4^{3-}$) y una menor concentración de nitritos y nitratos.

En la Figura 6 se muestra la eficiencia de eliminación de nitrógeno del amonio en ambos sistemas a través del tiempo de operación. En general, durante el tiempo de operación, el BF tuvo una eficiencia de eliminación mayor que el VF, sin embargo, se destaca que las eficiencias de ambos sistemas se mantienen por sobre el 70% a temperaturas sobre los $20^\circ C$.

A pesar de que el BF posee una eficiencia de eliminación promedio de $N-NH_4^+$ mayor que el VF, $77,5\pm 22,9\%$ y $68,0\pm 22,3\%$ respectivamente, no son diferencias estadísticamente significativas ($P=0,17>0,05(\alpha)$).

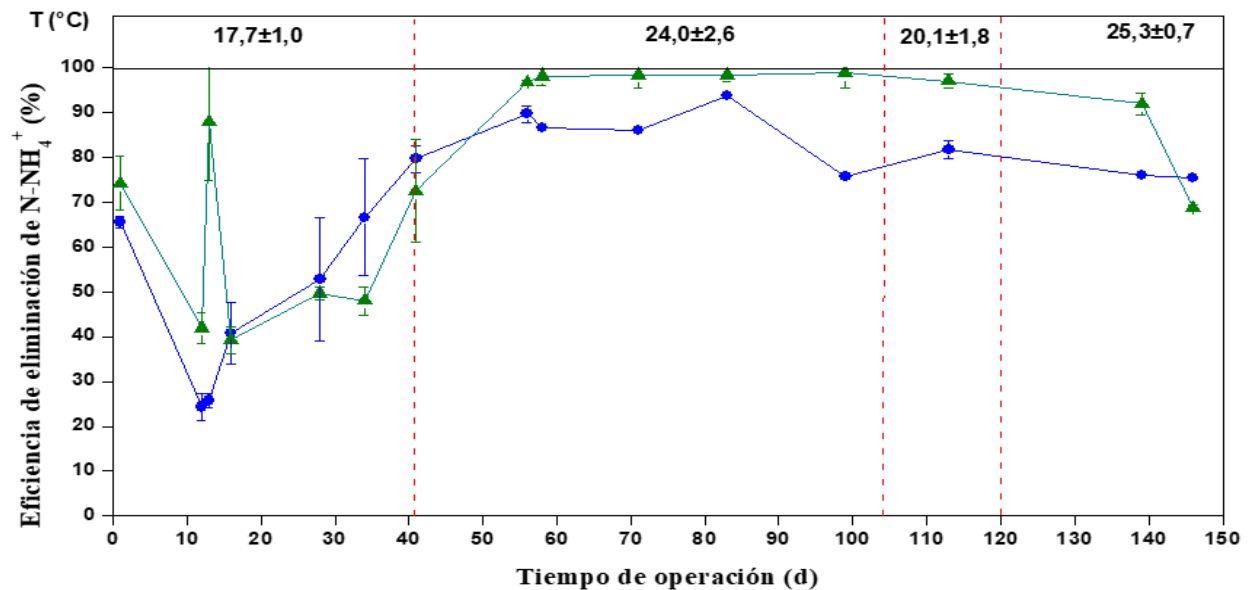


Figura 6. Eficiencia de eliminación de N-NH₄⁺ de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

La eficiencia de eliminación de nitrógeno del amonio en el vermifiltro es un 25% menor a lo que se reporta en otros casos de estudio encontrados en bibliografía. Por ejemplo, Wang et al. (2015) reporta una eficiencia de eliminación 93,3% de N-NH₄⁺.

A su vez, la eliminación de Nitrógeno total también es mayor en BF que en VF, donde el primero elimina 80,1±8,3% de NT y el último un 56,4±10,0%, sin embargo, los valores obtenidos en VF concuerdan con los valores que se encuentran en bibliografía, donde Rajpal et al. (2014) informa eficiencias de eliminación de Nitrógeno total de un 54,1±9,0%.

La brecha que existe entre el BF y VF respecto a la eliminación de NT puede atribuirse a los procesos de nitrificación y desnitrificación por los cuales puede eliminarse amonio, transformándolo en nitrito, luego a nitrato y por último de nitrato a nitrógeno gaseoso, provocando una disminución del nitrógeno total en el sistema relacionado al cambio de fase del nutriente (Ortega et al., 2022). En la Figura 7 y 8 puede observarse la generación de nitrito y



nitrito en los sistemas, donde se aprecia que tanto en VF y BF hubo un incremento de las concentraciones de nitrito y nitrato en relación con el influente, esto a raíz del proceso de nitrificación (Wang et al., 2015).

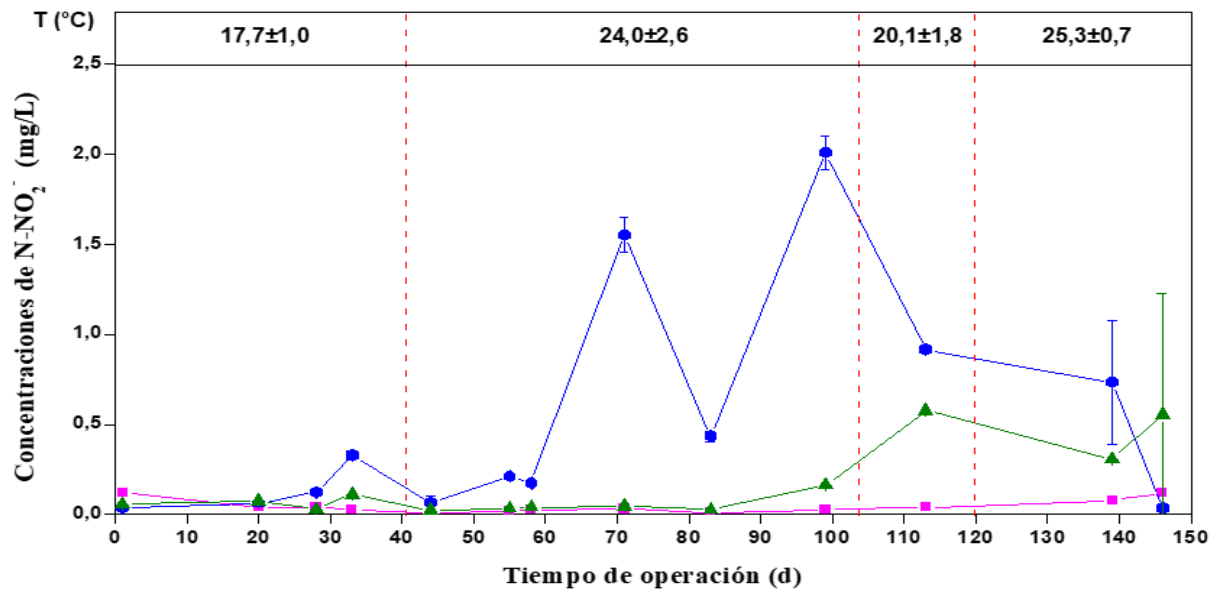


Figura 7. Comparación de las concentraciones de N-NO₂⁻ en todos los sistemas analizados a través del tiempo de operación; donde ● vermiculito (VF) y ▲ biofiltro (BF) y ■ influente. Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

La concentración de nitrógeno del nitrito (N-NO₂⁻) promedio en el influente es de 0,04±0,02 mg/L y aumentó a 0,55±0,63 y 0,17±0,19 mg/L en VF y BF respectivamente. Los valores promedio poseen altas desviaciones estándar dando a entender una alta dispersión de los datos en torno a la media, debido a que los valores del nitrito en el sistema eran bastante inestables como se ilustra en la Figura 7.



En la Figura 8 se muestra la generación de nitrógeno del nitrato (N-NO_3^-) en los sistemas, donde la concentración promedio del influente es de $1,1 \pm 0,5$ mg/L de N-NO_3^- la cual aumenta en los efluentes a $10,5 \pm 8,8$ y $5,6 \pm 4,1$ mg/L en VF y BF respectivamente.

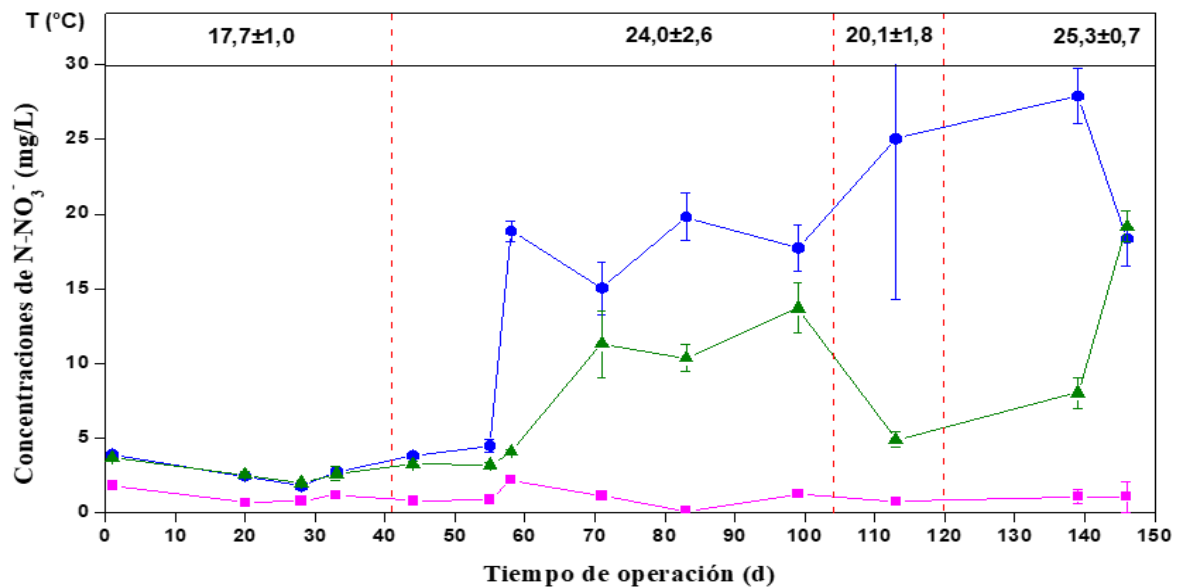


Figura 8. Comparación de las concentraciones de N-NO_3^- en todos los sistemas analizados a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF), ▲ biofiltro (BF) y ■ influente. Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

El aumento del nitrato es algo que ocurre comúnmente en estos reactores debido a la nitrificación del nitrógeno del amonio. Chowdhury et al. (2023) señala que el nitrato puede incrementar hasta 70 veces la concentración del influente después del tratamiento con vermifiltración debido a la actividad nitrificante del sistema. Una mayor concentración de nitrato en el VF que en BF puede atribuirse a que los procesos de desnitrificación ocurren en mayor magnitud en el último sistema. El nitrato residual en los efluentes del VF y BF conforma aproximadamente una tercera parte del Nitrógeno total de ambos sistemas, de esta forma, el que haya una menor desnitrificación en el vermifiltro podría explicar las concentraciones mayores de nitrato a la salida del tratamiento ya



que el nitrógeno estaría quedando dentro del sistema y no saliendo en forma de nitrógeno gaseoso, por donde se obtienen menores eficiencias de eliminación de nitrógeno total en comparación con el biofiltro (Wang et al., 2016). Uno de los factores que podría propiciar la desnitrificación en el BF es la ausencia de la lombriz, la cual aumenta la infiltración de oxígeno al reactor, efecto que ocurre en el VF mas no en el BF, de esta forma se genera un ambiente anóxico en el BF favoreciendo el proceso de desnitrificación (Fang et al., 2011).

Fósforo: Por último, en la Figura 9 se ilustra el comportamiento del fósforo del fosfato a lo largo del tiempo de operación.

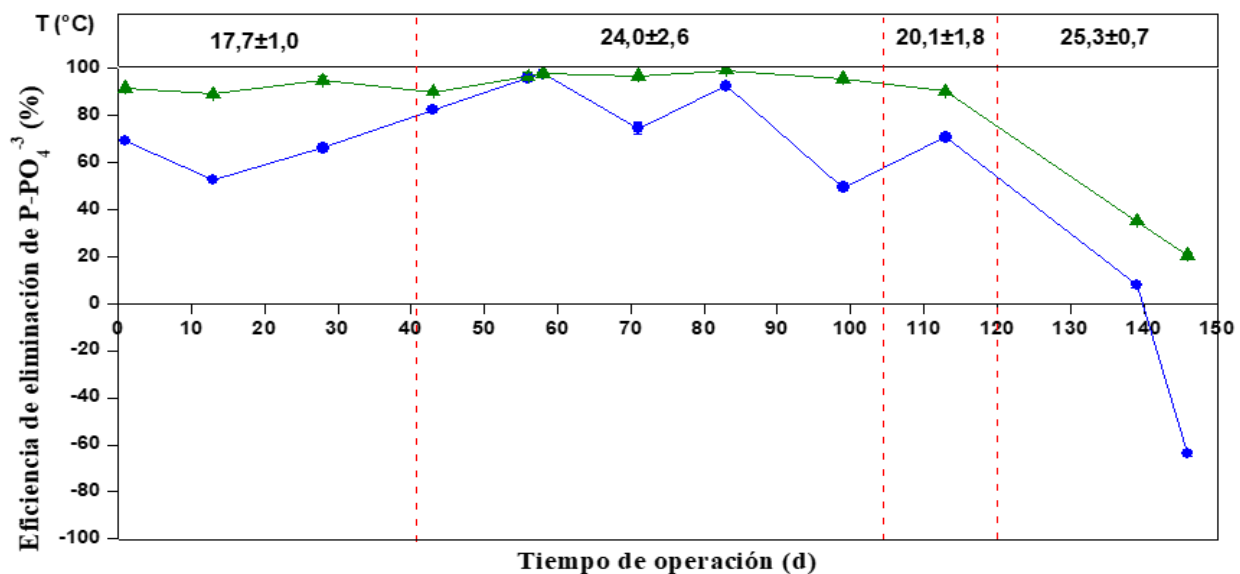


Figura 9. Eficiencia de eliminación de P-PO₄³⁻ de ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● vermifiltro (VF) y ▲ biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

Se destaca que el BF obtiene eficiencias de eliminación por sobre el 90% de este nutriente durante la mayor parte del funcionamiento de los reactores hasta decrecer a un 20% de eficiencia en la última medición. Por otro lado, en cuanto a la eficiencia de eliminación del VF, esta se



comporta de manera mucho más inestable, con varios mínimos y máximos a lo largo del tiempo de operación, obteniendo siempre un menor desempeño que el BF llegando incluso, a eficiencias de eliminación negativas.

Respecto al desempeño del BF en la eliminación de fósforo del fosfato ($P-PO_4^{-3}$), valores por sobre el 90% de eficiencia son debido a la alta capacidad de adsorción que posee el sistema gracias al medio filtrante (Carrillo et al., 2020), reteniendo el fosfato por la mayor parte del tiempo de operación reflejado en altas eficiencias, sin embargo, en las últimas mediciones se observa un decrecimiento considerable en el desempeño del BF, decreciendo desde un 90% hasta un 40% en la eficiencia de eliminación $P-PO_4^{-3}$. Esto podría explicarse por la disminución de los sitios activos disponibles para la adsorción del $P-PO_4^{-3}$. En el VF la tendencia es distinta, debido que a lo largo de la investigación este sistema mostro un desempeño inferior en la eliminación de fósforo del fosfato que el BF, siendo su eficiencia de eliminación promedio de $58,0 \pm 45,6\%$ y $83,2 \pm 26,2\%$ para VF y BF respectivamente, además para el parámetro de PT, las eficiencias de eliminación de VF y BF son de $62,1 \pm 8,9\%$ y $89,2 \pm 3,6\%$. De acuerdo con la bibliografía no es de extrañar un bajo desempeño en la eliminación de $P-PO_4^{-3}$ y de fósforo total (PT) en un vermifiltro. Algunos autores indican que este efecto lo causan las lombrices, al promover la mineralización del fosfato y generar excretas ricas en este nutriente (Arora et al., 2020). Por su parte Kumar et al. (2015) reportó un aumento de 350% de PT a la salida del tratamiento, tal y como lo muestra la Figura 8, en la cual se informa de una eficiencia de eliminación negativa del $63,7 \pm 1,2\%$, indicando que está ocurriendo un aumento del fosfato en el sistema. Por otro lado, Zhao et al. (2014), informa del efecto contrario en su investigación, ya que reporta una eficiencia



de eliminación del $87\pm 9\%$ de PT. En este apartado los resultados obtenidos en ambos sistemas para este nutriente si mostraron diferencias significativas ($P=0,04 < 0,05(\alpha)$).

5.2 Actividad enzimática

5.2.1 Actividad enzimática de la amilasa

En la Figura 10 se muestra el comportamiento de la actividad enzimática de la amilasa en el VF y BF medida en unidades de actividad sobre miligramos de sólidos suspendidos volátiles. Se puede apreciar que el VF posee mayor actividad en general comparado con el BF, obteniendo valores máximos de $0,78\pm 0,10$ y $0,63\pm 0,1$ U/mg SSV a temperaturas cercanas a los 25°C .

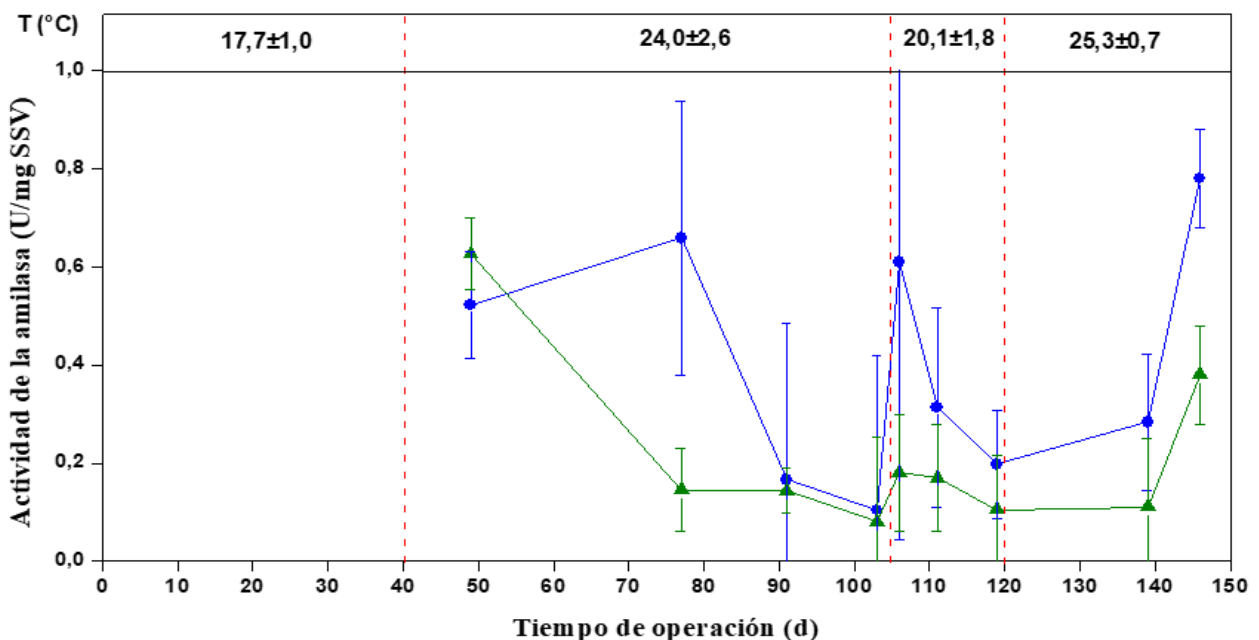


Figura 10. Actividad enzimática de la amilasa en ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● representa la actividad de la amilasa registrada en el vermifiltro (VF) y ▲ representa la actividad de la amilasa en el biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

La actividad de la amilasa promedio para VF y BF fue de $0,40\pm 0,23$ U/mg SSV y $0,22\pm 0,17$ U/mg SSV, lo cual concuerda con la tendencia vista en otros casos de estudio.



Por ejemplo, Li et al. (2013) informa la actividad de la amilasa analizada en un vermifiltro y biofiltro, con rangos de actividad entre los 2,00 y 2,78 mg/min·g SSV para VF y 1,48 y 2,48 mg/min·g SSV para BF, siendo este último sistema el que posee menor actividad, atribuyendo esta brecha al efecto que posee la lombriz sobre el biofilm y la secreción de enzimas microbianas, además del aporte enzimático que poseen las excretas de las lombrices. Los datos anteriores concuerdan con el caso de estudio de Ma et al. (2016) en la cual se le atribuye a la presencia de la lombriz un aumento del 123% en la actividad de la amilasa en un vermifiltro comparándolo con la actividad de un biofiltro. Sin embargo, a pesar de que en esta investigación la actividad de la amilasa en VF es mayor que en BF, las diferencias resultaron no ser estadísticamente significativas ($P=0,07>0,05(\alpha)$).

5.2.2 Actividad enzimática de la proteasa

Por último, la Figura 11 muestra el comportamiento de la actividad enzimática de la proteasa en el VF y BF, también medida U/mg SSV. Para este caso, nuevamente se obtiene una mayor actividad en el vermifiltro, y como se muestra en la figura, los valores máximos de $0,0044\pm 0,0014$ y $0,0027\pm 0,0009$ U/mg SSV para VF y BF respectivamente, fueron alcanzados a temperaturas de operación promedio de 20°C.

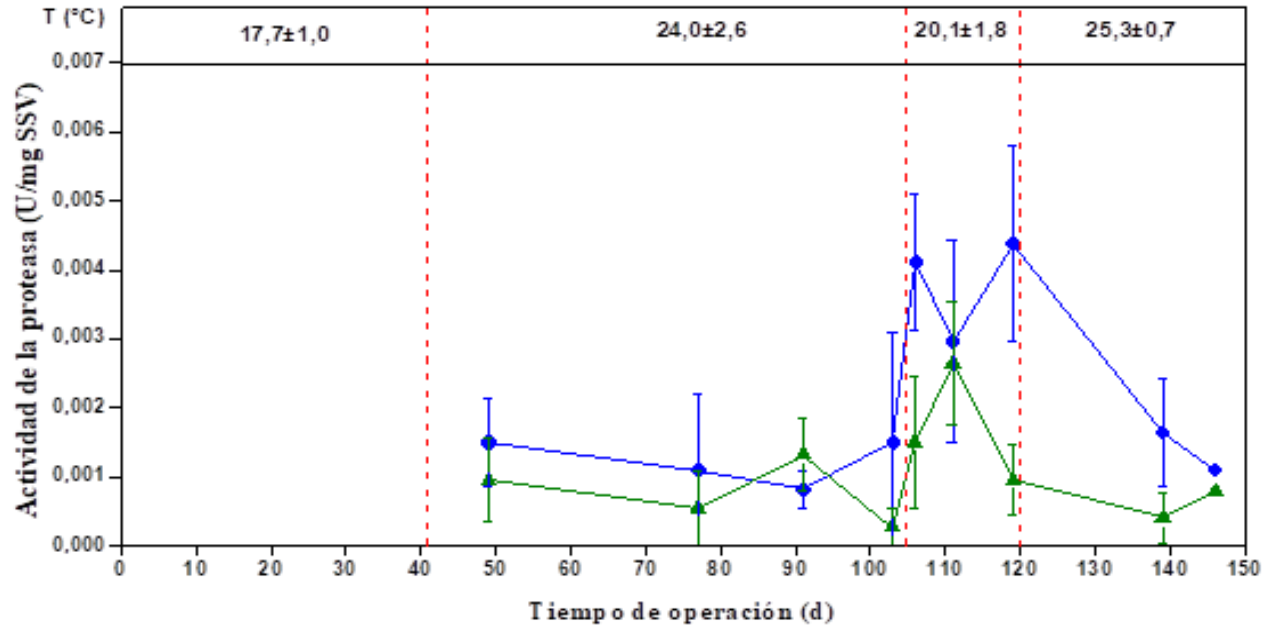


Figura 11. Actividad enzimática de la proteasa en ambos sistemas a través del tiempo de operación; donde ● representa la actividad de la amilasa registrada en el vermifiltro (VF) y ▲ representa la actividad de la amilasa en el biofiltro (BF). Las secciones delimitadas por las líneas rojas punteadas representan la temperatura de operación promedio en el intervalo de tiempo correspondiente.

La actividad enzimática de la proteasa en promedio durante el tiempo de operación fue de $0,0021 \pm 0,0013$ U/mg SSV y $0,0010 \pm 0,0007$ U/mg SSV para VF y BF respectivamente. Dichas cifras concuerdan con resultados de Xing et al. (2012), el cual informa la actividad de la proteasa medida en un vermifiltro y biofiltro, con actividad promedio de 0,95 y 0,69 mg/min·g SSV para VF y BF respectivamente, llegando a conclusiones similares a Li et al (2013) sobre el efecto que posee la lombriz sobre las comunidades de microorganismos y el incremento que esta supone en la actividad enzimática de los sistemas. Ma et al. (2016) también incluye en su investigación el estudio de la actividad de la proteasa en sistemas de vermifiltración, concluyendo que la presencia de la lombriz aumentó en un 130% la actividad de la proteasa en un vermifiltro en comparación con la actividad de un biofiltro. En esta investigación, las diferencias resultaron ser estadísticamente significativas ($P=0,02 < 0,05$).



6 CONCLUSIONES

- El desempeño promedio del VF es de $54,2 \pm 16,5\%$ en eficiencia de eliminación de materia orgánica, medida como DQO, alcanzando un máximo de $85,7 \pm 5,2\%$ a temperaturas de operación de 20°C . Respecto al BF, este posee un desempeño del $51,9 \pm 18,5\%$ en eliminación de DQO.
- En cuanto a los nutrientes, el VF elimina un $68,0 \pm 22,3\%$ de N-NH_4^+ mientras que el BF elimina un $77,5 \pm 22,9\%$. La eficiencia de eliminación promedio de P-PO_4^{3-} fue de $58,0 \pm 45,6\%$ y $83,2 \pm 26,2\%$, para VF y BF, respectivamente. Cabe destacar que, las concentraciones de P-PO_4^{3-} incrementaron hasta un $63,7 \pm 1,2\%$ en el VF llegando a un valor de $19,4 \pm 0,1 \text{ mg/L}$.
- Para la amilasa, las actividades promedio de VF y BF, fueron de $0,40 \pm 0,23$ y $0,22 \pm 0,17$ U/mg SSV respectivamente, con una actividad máxima de $0,78 \pm 0,10$ U/mg SSV para VF y $0,63 \pm 0,1$ U/mg SSV para BF, la cual se alcanzó a temperaturas de 25°C en ambos sistemas. Mientras que, para la proteasa, las actividades de VF y BF fueron de $0,0021 \pm 0,0013$ y $0,0010 \pm 0,0007$ U/mg SSV en el orden dado, con una actividad máxima de $0,0044 \pm 0,0014$ U/mg SSV en el VF y $0,0027 \pm 0,0009$ U/mg SSV para BF, alcanzado a los 20°C .
- Por tanto, la relación de la lombriz con la actividad enzimática resultó no ser una variable determinante en cuanto al rendimiento del sistema, por ende, no es posible afirmar que la presencia de la lombriz influya significativamente en el tratamiento de aguas servidas.



7 BIBLIOGRAFÍA

Arora, S., Rajpal, A., Bhargava, R., Pruthi, V., Bhatia, A., Kazmi, A.A. 2014. Antibacterial and enzymatic activity of microbial community during wastewater treatment by pilot scale vermifiltration system. *Bioresource Technology* 166, 132-141.

Arora, S., Rajpal, A., Kazmi, A.A. 2016. Antimicrobial activity of bacterial community for removal of pathogens during vermifiltration. *Journal of Environmental Engineering* 142, 1-10.

Arora, S., Saraswat, S., Mishra, R. 2020. Design, performance evaluation and investigation of the dynamic mechanisms of earthworm-microorganism's interactions for wastewater treatment through vermifiltration technology. *Bioresource Technology Reports* 12, 100603.

Baird, R., Bridgewater, L. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd edition. American Public Health Association.

Banco Mundial. 2021. Chile rural brief. World Bank Documents.

Barois, I., Lavelle, P. 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18, 539-541.

Boano, F., Caruso, A., Costamagna, E. 2020. A review of nature-based solutions for greywater treatment: Applications, hydraulic design, and environmental benefits. *Science of The Total Environment* 711, 134731.

Boltz, J.P., Smets, B.F., Rittmann, B.E., Van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Daiger, G.T. 2017. From biofilm ecology to reactors: a focused review. *Water Science and Technology* 75, 1753-1760.

Carbonero, P. 1976. Complementos de bioquímica: Industrias Agrícolas. Universidad Politécnica de Madrid, España. ISBN: 84-7401-006-3.

Carrillo, V., Fuentes, B., Gómez, G., Vidal, G. 2020. Characterization and recovery of phosphorus from wastewater by combined technologies. *Environmental Science Biotechnology* 19, 389-418.

Chicaiza, C., Huaraca, L., Almeida, C.E. 2020. Improvement of organic matter and nutrient removal from domestic wastewater by using intermittent hydraulic rates on earthworm-microorganism biofilters. *Water Science & Technology* 82, 281-291.

Chowdhury, S., Bhunia, P., Zhang, T., Surampalli, R. 2023. Nitrogen transformation dynamics in macrophyte-assisted high-rate vermifilter treating real domestic sewage. *Journal of Water Process Engineering* 55, 104171.



- Clause, J., Barot, S., Richard, B. 2014. The interactions between soil type and earthworm species determine the properties of earthworm casts. *Applied Soil Ecology* 83, 149–158.
- Cross, K., Tondera, K., Rizzo, A. Andrews, L., Pusher, B., Istenie, D., Karres, N., McDonald, R. 2021. Nature-Based Solutions for Wastewater Treatment. IWA Publishing. ISBN: 9781789062267, 333 p.
- Daelman, M., Van Woorthuizen, E., Van Dongen, U. 2012. Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Research* 46, 3657-3670.
- Dubey, R., Adhikary, S., Kumar, J., Sinha, N. 2010. Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Developmental Microbiology and Molecular Biology* 1, 75-94.
- Fang, C., Guo, F., Luo, X. 2011. Performance of a three-stage tower earthworm ecofilter for simultaneous removal of carbon and nutrients from domestic wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin* 20, 235-243.
- G. Merlin., Cottin, N. 2009. Performance of a compost biofilter containing earthworms to treat cheese whey. *Environmental Technology* 30, 995–1002.
- Gonzales, O., Esplugas, M., Sans., Torres, S., Esplugas, S. 2009. Performance of a Sequencing Batch Biofilm Reactor for the treatment of pre-oxidized sulfamethoxazole solutions. *Water Research* 43, 2149-2158.
- Gutierrez, V., Gómez, G., Rodríguez, D., Vidal, G. 2023. Critical analysis of wastewater treatment using vermifilters: Operating parameters, wastewater quality, and greenhouse gas emissions. *Journal of Environmental Engineering* 11, 109683.
- Habit, E., Parra, O., Valdovinos, C. 2005. Ictiofauna de un sistema fluvial receptor de aguas servidas: respuestas a una nueva planta de tratamiento (Rio Quilque, Chile central). *Gayana* 69, 94-103.
- Hait, S., Tare, V. 2011. Vermistabilization of primary sewage sludge. *Bioresource Technology* 102, 2812-2820.
- Hua, G., Salo, M. W., Schmit, C. G., Hay, C.H. 2016. Nitrate and phosphate removal from agricultural subsurface drainage using laboratory woodchip bioreactors and recycled steel byproduct filters. *Water Research* 102, 180-189.
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., Ren, H. 2019. Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 1115-1129.
- Huang, H., Ren, H., Lili, R., Geng, J., Xu, K., Zhang, Y. 2014. Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: Characterization and enzymatic treatment study. *Bioresource Technology* 154, 2012-130.



- Huang, H., Yu, Q., Ren, H., Geng, J., Xu, K., Zhang, Y., Ding, L. 2017. Towards physicochemical and biological effects on detachment and activity recovery of aging biofilm by enzyme and surfactant treatments. *Bioresource Technology* 247, 319-326.
- Huang, K., Sang, C., Guang, M. 2021. Performance and stratified microbial community of vermi-filter affected by *Acorus calamus* and *Epipremnum aureum* during recycling of concentrated excess sludge. *Chemosphere* 280, 130609.
- Huang, M., Li, Y., Gu, G. 2010. Chemical composition of organic matters in domestic wastewater. *Desalination* 262, 36-42.
- Huang, W., Zhao, Y., Zhang, J. 2014. Effects of different influent C/N ratios on the performance of various earthworm eco-filter systems: nutrient removal and greenhouse gas emission. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 109-118.
- Jarpa, M., Aguilar, A., Belmonte, M., Decap, J., Abarzúa, M., Vidal, G. 2007. Determinación de la capacidad nitrificante de un sedimento marino proveniente de un centro de cultivo de salmones. *Interciencia*, 32, 679-685.
- Kampschreur, M., Temmink, H., Kleerebesem, R. 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research* 43, 4093-4103.
- Kotlar, C., Ponce, A., Roura, S. 2015. Characterization of a novel protease from *Bacillus cereus* and evaluation of an eco-friendly hydrolysis of a brewery byproduct. *Journal of the Institute of Brewing* 121, 558-565.
- Kumar, T., Bhargava, R., Pruthi, V. 2015. Evaluation of vermifiltration process using natural ingredients for effective wastewater treatment. *Ecological Engineering* 75, 370-377.
- Kumar, T., Rajpal, A., Bhargava, R. 2014. Performance evaluation of vermifilter at different hydraulic loading rate using riverbed material. *Ecological Engineering* 62, 77-82.
- Kuriki, T., Imanaka, T. 1999. The Concept of the α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism. *Bioscience and Bioengineering* 87, 557-565.
- Le Mer, J., Roger, P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37, 25-50.
- Li, W., Zhang, H., Sheng, G., Yu, H. 2015. Roles of extracellular polymeric substances in enhanced biological phosphorus removal process. *Water Research* 81, 85-95.
- Li, X., Xing, M., Yang, J., Lu, Y. 2013. Properties of biofilm in a vermifiltration system for domestic wastewater sludge stabilization. *Chemical Engineering Journal* 223, 932-943.
- Li, Y., Zhang, F., Ai, X. 2015. Antioxidant and behavior responses of earthworms after introduction to a simulated vermifilter environment. *Ecological Engineering* 81, 218-227.



Lopez, C., Comeau, D., Oehmen, A. 2023. Enhanced biological phosphorus removal. En *Biological Wastewater Treatment: Examples and Exercises*. IWA Publishing.

Lourenco, N., Nunes, L. M. 2017. Optimization of a vermifiltration process for treating urban wastewater. *Ecological Engineering* 100, 138-146.

Luth, R.P., Germain, P., Lecomte, M., Landrain, B., Li, Y.S., Cluzeau, D., 2011. Earthworm effects on gaseous emissions during vermifiltration of pig fresh slurry. *Bioresource Technology* 102, 3679–3686.

Miito, G. J., Ndegwa, P., Alege, P. T., Coulibaly, S. S., Davis, R., Harrison, J. 2021. A vermifilter system for reducing nutrients and organic-strength of dairy wastewater. *Environmental Technology & Innovation* 23, 101648.

Ministerio de Obras Públicas. 2018. Ley 21075: Regula la recolección, reutilización y disposición de aguas grises. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1115066>

Mosquera-Corral, A. 1998. Eliminación biológica de carbono y nitrógeno de efluentes de la industria conservera de productos marinos. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (España).

Niknejad, N., Nazara, B., Foroutani, S. 2022. A bibliometric analysis of green technologies applied to water and wastewater treatment. *Environmental Science Pollution Research* 30, 1-15.

Orhan, E., Omay, D., Güvenilir, Y. 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121, 183-194.

Ortega, M. J., Campos, J. L., Vidal, G. 2022. Evaluación del Metabolismo Microbiano: Para el Monitoreo y la Optimización de Sistemas Biológicos de Tratamiento de Efluentes Industriales y Aguas Servidas. Ediciones Universidad de Concepción. ISBN:978-956-227-508-8.

Paredes, L., Flores, C., Zavaleta, A. 2017. Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas sp.* M211 en fermentación sumergida. *Sociedad Química del Perú* 83.

Paul, E., Ochoa, J. C., Pechaud, Y., Liu, Y., Liné, A. 2012. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research* 46, 5499-5508.

Prabha, M., Jayaraaj, I., Jeyaraaj, R. 2007. Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*. *Indian Journal of Biotechnology* 6, 567–569.



- Prakasham, R., Subba, C., Sreenivas, R., Sarma, P. 2005. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. *Biotechnology Progress* 21.
- Pu, J., Feng, C., Liu, Y., Li, R., Kong, K., Chen, N., Tong, S., Hao, C., Liu, Y. 2014. Pyrite-based autotrophic denitrification for remediation of nitrate contaminated groundwater. *Bioresource Technology* 173, 117-123.
- Rajpal, A., Arora, S., Bhatia, A. 2014. Co-treatment of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and sewage by vermireactor. *Ecological Engineering* 73, 154-161.
- Ramalho, R. 1990. Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverté. Barcelona. ES. ISBN: 978-84-291-7975-0, 716 p.
- Ramírez, F., Álvarez, C., Nolasco, G., Peña, E., Martínez, R., Camarillo, S., Conway, K., Pohlenz, C. 2017. Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiológica* 27, 419-427.
- Rana, N., Walia, A., Gaur, A. 2013. α -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *National Academy Science Letters* 36, 9-17.
- Samal, K., Roshan, R., Bhunia, P. 2017. Treatment of wastewater by vermifiltration integrated with macrophyte filter: A review. *Journal of Environmental Engineering* 5, 2274-2289.
- Sánchez, I., Fernández, N., Amils, R., Sans, J.L. 2008. Assessment of the addition of *Thiobacillus denitrificans* and *Thiomicrospira* to denitrificans to chemolithoautotrophic denitrifying bioreactors. *International Microbiology* 11, 179-184.
- Singh, R., Bhunia, P., Dash, R. 2019. Impact of Organic Loading Rate and Earthworms on Dissolved Oxygen and Vermifiltration. *Journal of Hazardous Toxic and Radioactive Waste* 23.
- Singh, R., Bhunia, P., Roshan, R. 2017. A mechanistic review on vermifiltration of wastewater: design, operation and performance. *Journal of Environmental Management* 197, 656-672.
- Sinha, R., Bharambe, G., Chaudhari, U. 2008. Sewage treatment by vermifiltration with synchronous treatment of sludge by earthworms: A low-cost sustainable technology over conventional systems with potential for decentralization. *The Environmentlist* 28, 409-420.
- Somarriba, R., Guzmán, Fidel. 2004. Guía de Lombricultura. Guía técnica. Universidad Nacional Agraria, Managua, NI. <https://repositorio.una.edu.ni/2409/1/nf04s693.pdf>
- Sreelakshmi, S., Vasanthi, N., Saravanan, D. 2013. Acidic bacterial proteases from *Bacillus* species as an alternative agent for scouring of cotton fabrics. *Journal of The Textile Institute* 104, 1118-1124.



Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). 2022. Informe de gestión del sector sanitario 2021. Gobierno de Chile. <https://www.siss.gob.cl/586/w3-propertyvalue-6415.html>

Tang, L., Pillai, S., Revsbech, N. P., Schramm, A., Bischoff, C., Meyer, R. L. 2011. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling* 27, 111-121.

Unidad de Saneamiento Sanitario, Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo (SUBDERE). 2018. Estudio de Soluciones Sanitarias para el Sector Rural Año 2018. ISBN: 978-956-8468-54-5.

https://www.subdere.gov.cl/sites/default/files/documentos/estudio_de_soluciones_sanitarias_para_el_sector_rural_1.pdf

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). 2024. Soluciones basadas en la naturaleza. <https://www.iucn.org/es/nuestro-trabajo/soluciones-basadas-en-la-naturaleza>

Vidal, G., Araya, F. 2014. Las Aguas Servidas y Su Depuración en Zonas Rurales: Situación Actual y Desafíos. Ediciones Universidad de Concepción, ISBN 978-956-227-378-7, 118 p.

Vidal, G., Gómez, G., Diez, M.C. 2021. Soluciones basadas en la naturaleza para la descontaminación de descargas puntuales y difusas. Ediciones Universidad de Concepción ISBN 978-956-227-465-4, 132 p

Vidal, G., Neumann, P., Hospido, A. 2022. Análisis de Ciclo de Vida: Fundamentos y Aplicaciones para la Gestión Sustentable de los Recursos hídricos. Ediciones Universidad de Concepción. ISBN 978-956-227-481-4, 130 p.

Von Sperling, M. 2007. Biological Wastewater Treatment. Volume 1: Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal. Biological Wastewater Treatment Series. IWA Publishing, London, England, 304 p.

Wang, D., Nie, E., Luo, X. 2015. Study of nitrogen removal performance in pilot-scale multi-stage vermi-biofilter: operating conditions impacts and nitrogen speciation transformation. *Environmental Earth Sciences* 74, 3815-3824.

Wang, L., Zhang, Y., Luo, X., Zhang, J., Zheng, Z. 2016. Effects of earthworms and substrate on diversity and abundance of denitrifying genes (nirS and nirK) and denitrifying rate during rural domestic wastewater treatment. *Bioresource Technology* 212, 174-181.

Wang, S., Yang, J., Lou, S.J., Yang, J. 2011. Wastewater treatment performance of a vermifilter enhancement by a converter slag-coal cinder filter. *Ecological Engineering* 36, 489-494.

Wang, X., Bai, J., Tian, Y., Wang, T., Zhou, X. Zhang, C. 2021. Synergistic effects of natural ventilation and animal disturbance on oxygen transfer, pollutants removal and microbial activity in constructed wetlands. *Chemosphere* 283, 1-12.



Xing, M., Li, X., Yang, J. 2010. Treatment performance of small-scale vermifilter for domestic wastewater and its relationship to earthworm growth, reproduction and enzymatic activity. *African Journal of Biotechnology* 9, 7513-7520.

Xing, M., Li, X., Yang, J., Lv, B., Lu, Y. 2012 Performance and mechanism of vermifiltration system for liquid-state sewage sludge treatment using molecular and stable isotopic techniques. *Chemical Engineering Journal* 197, 143–150.

Xu, D., Li, Y., Zhang, Y., Howard, A., Guan, Y., Li, J., Xu, H. 2016 Purifying capability, enzyme activity, and nitrification potentials in December in integrated vertical flow constructed wetland with earthworms and different substrates. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 273–281

Yang, G., Xing, M., Liu, J., Yang, J. 2017. Optimizing vermifilter depth by process performance collaborated with the evolutions of microbial characteristics during sewage sludge treatment. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 6688–6697.

Zhang, B., Li, G.T., Wuang, J.K. 2000. Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 2055–2062.