

INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS OPERACIONAIS SOBRE AS POPULAÇÕES OXIDANTES DE AMÔNIA E DESNITRIFICANTES EM WETLAND CONSTRUÍDO VERTICAL

Catiane Pelissari¹, Miriam Guivernau², Cristina Ávila³, Marc Viñas², Joan García³, Pablo Heleno Sezerino^{1*}

¹ Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado (GESAD), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, Brasil.

² Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias - IRTA, Barcelona, España.

³ Grupo de Pesquisa em Engenharia Ambiental e Microbiologia (GEMMA), Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.

*E-mail: pablo.sezerino@ufsc.br

Recebido em: 11/08/2017

Aceito em: 23/11/2017

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica das populações oxidantes de amônia e desnitrificante em um *wetland* construído vertical (WCV) operado com distintas condições operacionais. O WCV possuía uma área superficial de 3 m², dividida em duas células (1,5 m² cada) interconectadas, preenchido com areia e brita como material filtrante e plantado com *Phragmites australis*. Durante o a realização do estudo (jun/15-jul/16), as condições operacionais do WCV variaram em função de três períodos operacionais: Período I (130 g DQO m⁻² d⁻¹; 375 mm d⁻¹; ciclos de alimentação e repouso de 3,5 dias), Período II (80 g DQO m⁻² d⁻¹; 375 mm d⁻¹; ciclos de alimentação e repouso de 3,5 dias) e Período III (40 g DQO m⁻² d⁻¹; 133 mm d⁻¹; alimentação diária). Ao término de cada período foram coletadas amostras do maciço filtrante na superfície e no fundo, de uma das células do WCV, bem como foi empregada a técnica de qPCR (em nível de DNA e RNA) para identificar a abundância e atividade de *amoA* de bactérias oxidantes de amônia (AOB), *amoA* de arqueas oxidantes de amônia (AOA) e *nosZ* de bactérias desnitrificantes. Indiferente das condições operacionais do WCV, AOB sempre foram mais abundantes que AOA. Contudo, em nível de expressão gênica, AOA foram mais ativas que AOB, sendo populações chave no processo de oxidação da amônia. Bactérias desnitrificantes foram identificadas mais ativas na superfície, quando o WCV operou com alta carga orgânica. Com menor carga orgânica aplicada, uma maior atividade desnitrificante passou a ser identificada no fundo do *wetland*.

Palavras-chave: *Wetland* Construído Vertical. Carga orgânica aplicada. Taxa hidráulica aplicada. Nitrogênio. Populações metabolicamente ativas.

1 Introdução

Os *wetlands* construídos verticais (WCV) são considerados uma ecotecnologia mundialmente consolidada para o tratamento de efluentes, atuando principalmente para a remoção de carbono em conjunto com a promoção da oxidação do nitrogênio amoniacal. A carga orgânica e a taxa hidráulica (TH) aplicada sobre a área superficial dessas unidades são os principais parâmetros vinculados ao dimensionamento dos WCV [1-3]

Atualmente, existem inúmeras recomendações de carregamentos orgânicos e hidráulicos para os WCV, inclusive com o intuito de promover transformações no nitrogênio amoniacal afluente [3]. Contudo, os estudos voltados para a compreensão do comportamento de micro-organismos nitrificantes e desnitrificantes nesses módulos ainda se encontram em fase de desenvolvimento. Além disso, recentemente, descobriu-se que o processo de oxidação da amônia não se limita apenas as bactérias oxidantes de amônia (AOB) as arqueas, conhecidas como arqueas oxidantes de amônia (AOA), também desempenham esse mecanismo [4-5].

De fato, as inter-relações entre as populações atuantes nas transformações do nitrogênio que ocorrem no interior de um biofilme são altamente complexas, e pouco se sabe sobre os agentes-chaves microbianos metabolicamente ativos atuantes

nas diferentes etapas da transformação do nitrogênio e suas relações com o meio [5]. Deste modo, não se tem, uma clara relação entre os comportamentos microbianos envolvidos nas transformações do nitrogênio, associando-os com as condições operacionais dos WCV.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a dinâmica de populações oxidantes de amônia e desnitrificantes presentes no maciço filtrante de um *wetland* construído vertical operado sobre diferentes condições operacionais.

2 Materiais e métodos

2.1 Descrição do sistema de tratamento

Esse estudo foi conduzido nas dependências do Grupo de Estudos em Engenharia Ambiental e Microbiologia (GEMMA) da Universitat Politècnica de Catalunya – Barcelona Tech, em Barcelona/ES. O sistema de tratamento era composto por um tanque Imhoff, que operou como tratamento primário, seguido de um WCV. O esgoto sanitário utilizado para o tratamento era coletado em uma rede coletora municipal, de um dos bairros de Barcelona e armazenado em um tanque de equalização. Posteriormente, o esgoto era bombeado para o tanque Imhoff (0,2 m³) e em seguida, para o WCV (Figura 1).

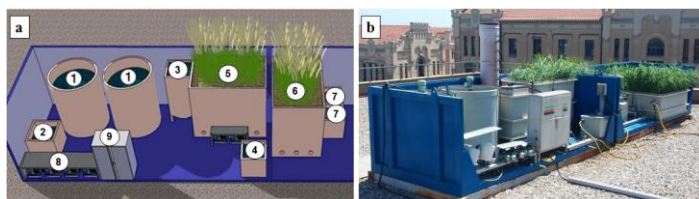


Figura 1 – Estação de tratamento de estudo. A) Esquema demonstrado as unidades de tratamento. B) Vista geral da estação de tratamento.

Nota: 1- Tanques de armazenamento do esgoto bruto; 2- Ponto de amostragem esgoto bruto; 3- Tanque Imhoff; 4- Ponto de amostragem afluyente WCV; 5- WCV célula 1; 6- WCV célula 2; 7- Ponto de amostragem efluente WCV; 8- Estação de bombas; 9- Painel de controle.

O WCV possuía uma área superficial de 3 m² dividida em duas células interconectadas (Figura 1). Cada célula possuía uma área superficial de 1,5 m² e uma profundidade de 80 cm. O material filtrante foi composto inicialmente por uma camada de 10 cm de areia (Ø 1-2 mm), seguido de uma camada de 70 cm de brita (Ø 3-8 mm). A macrófita empregada foi a *Phragmites australis*. Durante a realização do estudo (junho/2015 – julho/2016), o WCV operou sob diferentes períodos operacionais, vinculados a uma variação de carga orgânica, hidráulica aplicada, e regime hidráulico operado (Tabela 1).

A caracterização do afluyente e efluente do WCV, em termos de demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total (NT), nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) e nitrogênio oxidado (N-NO_x) foi realizada duas vezes por semana, conforme recomendações de [6].

Tabela 1 – Condições operacionais do *wetland* construído vertical para cada período avaliado.

Períodos Operacionais	Tempo operacional (meses)	Vazão (L d ⁻¹)	Taxa hidráulica (mm d ⁻¹)	Carga orgânica (g m ⁻² d ⁻¹)	Regime Hidráulico	Pulsos dia
Período I ^a	5			130 ± 39	Ciclos de 3,5 dias de alimentação e repouso	22
Período II ^b	3	1.125	375	80 ± 8	Alimentação diária	8
Período III ^c	6	200	133	40 ± 11		

^{a, b} Calculado considerando a área superficial das duas células do WCV (3 m²);

^c Calculado considerando a área superficial de uma célula do WCV (1,5 m²);

2.2 Quantificação de populações oxidantes de amônia e desnitrificantes

Para avaliar a influência das variações operacionais do WCV sobre as populações oxidantes da amônia (AOA e AOB) e desnitrificantes, em uma das células do WCV foram coletadas amostras do maciço filtrante, no final dos três períodos operacionais (Tabela 1). As amostras foram coletadas na camada da superfície do WCV (0 a 15 cm de profundidade) e na camada do fundo (70 a 80 cm de profundidade) em triplicatas para cada camada e período avaliado.

Após a coleta, 2 mL de LifeGuard reagente (MoBio Laboratories, EUA) foram adicionados nas amostras para prevenir a degradação do RNA. Posteriormente, foi realizada a extração de RNA e DNA utilizando o kit de extração de RNA

PowerMicrobiome™ RNA Isolation kit (Mobio Laboratories Inc, EUA).

Para identificar a abundância de cópias de genes (abundância total) e a abundância de genes ativos (abundância ativa) foi realizado uma reação de transcrição reversa seguida da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Essa técnica foi direcionada para quantificar a abundância de cópias de genes (baseado no DNA), e a abundância de genes ativos (baseado no cDNA), de eubactéria e de genes expressos durante o processo da oxidação da amônia (para arqueas e bactérias) e desnitrificação. A quantificação de eubactéria foi realizada baseada no 16S rRNA da região v3-v4 [7]. AOB e AOA foram quantificadas por meio da expressão do gene *amoA* [8-9]. Bactérias desnitrificantes foram quantificadas pela expressão do gene *nosZ* (*clade I*), responsável pela redução do N₂O a N₂ [10]. As reações foram realizadas em triplicada (considerando 3 amostras independentes de DNA/cDNA de cada amostra coletada).

3 Resultados e discussões

3.1 Desempenho de tratamento do wetland construído vertical

O WCV apresentou maior taxa de remoção de DQO no período I (54 g DQO m⁻² d⁻¹), que coincidiu com a maior carga orgânica aplicada do estudo (130 g DQO m⁻² d⁻¹). Nos períodos II e III, a carga orgânica aplicada diminuiu (80 e 40 g DQO m⁻² d⁻¹, respectivamente), e as taxas de remoções decaíram nos dois períodos (32 e 26 g DQO m⁻² d⁻¹, respectivamente) (Tabela 2). Maior carga orgânica aplicada coincide com a maior taxa de remoção de carbono [10]. Contudo, cabe ressaltar que o decaimento da remoção de DQO no período III, também, pode estar associado com o regime hidráulico adotado, com ausência de períodos de repouso. Períodos de repouso são benéficos para o processo de mineralização da matéria orgânica [12]. Dessa forma, a alimentação diária pode ter influenciado na remoção de DQO.

A remoção de N-NH₄⁺ foi de 4 g m⁻² d⁻¹ nos períodos I e II, e 2 g m⁻² d⁻¹ no período III. Nitrificação foi o principal mecanismo associado à remoção de N-NH₄⁺, com uma produção média de 10 ± 4, 15 ± 3 e 27 ± 6 mg L⁻¹ de N-NO_x, nos períodos I, II e III, respectivamente. A maior produção de N-NO_x no período III, pode estar associada com a redução da carga orgânica aplicada e também com temperaturas mais altas, o que favorece a atividade de populações nitrificantes.

Devido à alta capacidade de nitrificação dos WCV, a remoção de NT foi limitada (cerca de 2 g NT m⁻² d⁻¹) para todos os períodos. Esses valores estão de acordo com [13] que reportou uma remoção na ordem de 0,68 e 1,7 g NT m⁻² d⁻¹ para essa modalidade de *wetland*.

Tabela 2 – Cargas médias aplicadas e removidas do *wetland* construído vertical referente aos períodos I, II e III.

Parâmetros	Período I (jun-out 2015)			Período II (nov 2015- jan 2016)			Período III (fev-jul 2016)		
	Carga aplicada (g m ⁻² d ⁻¹)	Carga removida (g m ⁻² d ⁻¹)	Remoção (%)	Carga aplicada (g m ⁻² d ⁻¹)	Carga removida (g m ⁻² d ⁻¹)	Remoção (%)	Carga aplicada (g m ⁻² d ⁻¹)	Carga removida (g m ⁻² d ⁻¹)	Remoção (%)
DQO	130 ± 39	54 ± 36	42 ± 24	80 ± 8	32 ± 9	40 ± 10	40 ± 11	26 ± 12	65 ± 9
NT	17 ± 4	2 ± 2	12 ± 7	19 ± 5	2 ± 2	10 ± 6	8 ± 2	2,5 ± 1	31 ± 11
N-NH ₄ ⁺	7 ± 2	4 ± 2	57 ± 8	6 ± 1	4 ± 1	67 ± 7	3 ± 6	2 ± 0,8	67 ± 14

3.2 Dinâmica das populações oxidantes de amônia e desnitrificantes

A atividade da comunidade bacteriana presente no maciço filtrante do WCV variou em função da profundidade do *wetland* e das condições operacionais da unidade (Figura 2 a). No período I, que o WCV operou com maior carga orgânica (130 g DQO m⁻² d⁻¹), a comunidade bacteriana estava mais ativa na camada da superfície (10¹² transcritos de 16S rRNA g⁻¹) que na camada do fundo (10¹⁰ transcritos de 16S rRNA g⁻¹). Opostamente, com a redução da carga orgânica aplicada nos períodos II e III (80 e 40 g DQO m⁻² d⁻¹, respectivamente), a comunidade bacteriana passou a apresentar maior atividade no fundo (10¹² transcritos de 16S rRNA g⁻¹) que na superfície (10¹¹ transcritos de 16S rRNA g⁻¹). Essa mudança na estratificação bacteriana pode estar associada com maior disponibilidade de oxigênio ao longo do perfil vertical do *wetland*, devido à diminuição da carga orgânica aplicada nos períodos II e III [05].

A oxidação da amônia ocorreu tanto na camada da superfície, quanto na camada de fundo do *wetland*, sendo realizada por arqueas e bactérias. Indiferente das condições operacionais do WCV, as AOB sempre foram mais abundantes que as AOA, com valores na ordem de 10⁶, 10⁷ e 10⁵ *amoA* cópias de AOB g⁻¹ em ambas as camadas, para os períodos I, II e III, respectivamente, e 10⁵ *amoA* cópias de AOA g⁻¹ em ambas as camadas e períodos (Figura 2 b, c). Maior abundância de AOB em relação à AOA, já foi reportada em outras modalidades de *wetlands*, como em *wetland* construído horizontal [14] e em *wetland* construído superficial [15].

Contudo, considerando a biomassa ativa em nível de expressão gênica (transcritos de *amoA*), as populações oxidantes de amônia apresentaram uma dinâmica diferente da abundância total (cópias de *amoA*) identificada. No período I, que o WCV operou com maior carga orgânica, foi identificada uma abundância ativa similar entre AOB e AOA. Além disso, essas populações estavam mais ativas na camada da superfície (10⁶ transcritos de *amoA* g⁻¹) do que no fundo (10⁵ transcritos de *amoA* g⁻¹) do WCV (Figura 2 b,c). Esse comportamento populacional é reflexo de um ambiente, onde o oxigênio pode ter sido consumido principalmente nas primeiras camadas do maciço filtrante (devido à alta carga orgânica aplicada), resultando na maior atividade dessas populações na camada da superfície.

Entretanto, no período II que a carga orgânica aplicada diminuiu, a atividade de AOB decaiu na superfície (10⁵ transcritos

de *amoA* g⁻¹) e aumentou no fundo (10⁶ transcritos de *amoA* g⁻¹). Enquanto isso, a atividade de AOA permaneceu estável nas duas camadas (10⁶ transcritos de *amoA* g⁻¹) (Figura 2 b,c). Esses resultados mostraram que com maior disponibilidade de oxigênio no maciço filtrante (devido a menor carga orgânica aplicada) e maior disponibilidade de carbono na camada da superfície em relação à camada do fundo do WCV, AOB apresentaram maior atividade na camada do fundo. Diferentemente, AOA metabolicamente ativas apresentaram maior estabilidade ao longo do perfil vertical da unidade de tratamento.

No período III, AOA continuaram sendo identificadas como as principais populações oxidantes de amônia metabolicamente ativas (10⁶ e 10⁵ transcritos de *amoA* g⁻¹ na camada da superfície e do fundo, respectivamente). AOB nesse período, apresentaram menor atividade (10² e 10³ transcritos de *amoA* g⁻¹ na camada da superfície e fundo, respectivamente), exibindo um menor papel no processo de oxidação da amônia. O decaimento de AOB sobre essas condições operacionais pode estar associado principalmente, com a menor disponibilidade de oxigênio, devido à redução da TH (de 375 para 133 mm d⁻¹), a qual está vinculada com o arraste de oxigênio para o interior da unidade [16]. E como reportado por [17], as AOB são mais sensíveis à variação de oxigênio que as AOA.

Em relação à desnitrificação (*nosZ*), a abundância de bactérias desnitrificantes foi similar em ambas as camadas para todos os períodos avaliados (10⁷ genes de *nosZ* g⁻¹). No entanto, *nosZ* gene sempre foi mais abundante que *nosZ* transcritos, ou seja, sempre foi identificado maior abundância que atividade dessas populações (Figura 2 d). No período I, maior atividade desnitrificante foi identificada na camada da superfície (10⁶ transcritos de *nosZ* g⁻¹) que na camada do fundo (10⁴ transcritos de *nosZ* g⁻¹). Ao passo que no período II, bactérias desnitrificantes diminuíram a atividade na superfície (10⁵ transcritos de *nosZ* g⁻¹) e aumentaram no fundo (10⁶ transcritos de *nosZ* g⁻¹). Já no período III, a atividade de bactérias desnitrificantes diminuiu uma ordem de magnitude em relação ao período II, em ambas as camadas (10⁴ e 10⁵ transcritos de *nosZ* g⁻¹, na camada da superfície e do fundo, respectivamente), sendo mais ativas no fundo, que na superfície. Esses resultados mostraram que sobre altas concentrações de carbono a desnitrificação pode ocorrer, sobretudo, na camada da superfície do WCV. Com a diminuição da carga orgânica aplicada, provavelmente ocorreu um aumento na transferência de oxigênio no interior do maciço filtrante, gerando um deslocamento das

populações desnitrificantes ativas para a camada do fundo do WCV [05].

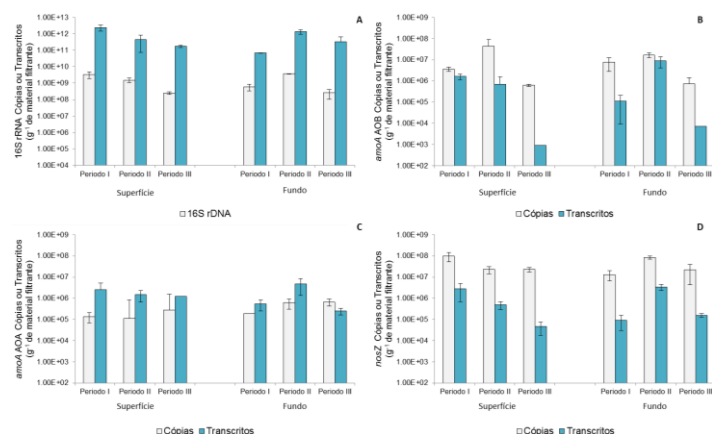


Figura 2 – Valores médios de genes funcionais identificados na camada da superfície e do fundo do *wetland* construído vertical, referente a três campanhas amostrais conduzidas no final do período I, II e III. A) Abundância de cópias de genes e transcritos de 16S rRNA. B) Abundância de cópias de genes e transcritos de *amoA* de AOB. C) Abundância de cópias de genes e transcritos de *amoA* de AOA. D) Abundância de cópias de genes e transcritos de *nosZ*.

4 Conclusões

Baseado na avaliação microbiológica (em nível de DNA e RNA) realizada em um *wetland* construído vertical (WCV) operado sobre distintas condições operacionais, conclui-se que:

- parâmetros operacionais promoveram mudanças populacionais no biofilme presente no maciço filtrante do WCV. Independente das condições operacionais e profundidade do WCV, AOA foram mais estáveis e ativas ao longo do estudo, indicando maior resiliência em relação às mudanças operacionais do WCV, sendo populações chave no processo de oxidação da amônia;

- AOB mostraram ser populações influenciadas pela disponibilidade de carbono e oxigênio, sendo sensíveis às variações operacionais do WCV;

- bactérias desnitrificantes apresentaram maior atividade na camada da superfície do *wetland* sobre alta carga orgânica. Com a diminuição da carga orgânica aplicada, essa comunidade passou a apresentar maior atividade no fundo da unidade de tratamento.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq e à CAPES.

OPERATIONAL PARAMETERS INFLUENCE ON AMMONIA OXIDIZING AND DENITRIFYING POPULATIONS IN THE VERTICAL FLOW CONSTRUCTED WETLAND

ABSTRACT: The aims of this study was to evaluate the ammonia oxidizing and denitrifying populations dynamics in a vertical flow constructed wetland (VF) operated under different conditions. The VF had a surface area of 3 m², divided into two interconnected cells (1.5 m² each). Sand and gravel were utilized as bed media and the selected macrophyte was *Phragmites australis*. During the study (Jul/16 to Jul/15), the VF operated under three operational periods: Period I (130 g COD m⁻² d⁻¹; 375 mm d⁻¹; cycles of 3.5 days of rest and feeding periods), Period II (80 g COD m⁻² d⁻¹; 375 mm d⁻¹; cycles of 3.5 days of rest and feeding periods) and Period III (40 g COD m⁻² d⁻¹; 133 mm d⁻¹; constant feeding). At the end of each period, samples from bed media were collected at the top and bottom layers of the one cells from VF. qPCR (at RNA and DNA level) was employed for identifying activity and abundance of *amoA* of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and *amoA* of ammonia oxidizing archaea (AOA), as well as, denitrifying bacteria (*nosZ*). Regardless of the operational periods of VF AOB were more abundant than AOA. However at the expression gene level, AOA were more active than AOB. In this way, AOA were key populations in ammonia oxidation process. Denitrifying bacteria were identified more active in the top layer under higher organic load rate. On the other hand, with lower organic load applied in the VF wetland, greater denitrifying activity was identified at the bottom layer.

Keywords: Vertical flow constructed wetlands. Organic loading rate. Hydraulic loading rate. Nitrogen. Active metabolic populations

Referências

- [1] COOPER, P.F.; JOB, G.D.; GREEN, M.B.; SHUTES, R.B.E. Reed Beds and constructed wetlands for wastewater treatment. Swindon: WRcplc. 1996. 184p.
- [2] PLATZER, C. Design recommendation for subsurface flow constructed wetlands for nitrification and denitrification. Water Science and Technology, v.40, n.3, p.257-263, 1999.
- [3] SEZERINO, P.H. et al. Constructed wetlands and sand filter applied as onsite post-treatment of anaerobic effluent. Water Practice Technology, v. 7, p.1-9, 2012.
- [4] KONNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature Reviews Microbiology, v.6, p437:543, 2005.
- [5] PELISSARI, C. et al. Unraveling the active microbial populations involved in nitrogen utilization in a vertical subsurface flow constructed wetlands treating urban wastewater. Science of the Total Environment, 584, 642-650, 2017.
- [6] APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. 2012.
- [7] PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Fungal/bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas

biofilters operated under xerophilic conditions. FEMS Microbiology Ecology, v.80, p.722-734, 2012.

[8] ROTHHAUWE, J.H. et al. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Applied Environmental Microbiology, v.63, p.4704-4712, 1997.

[9] PESTER, M. et al. *AmoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. Environmental Microbiology, v.14, p.525-539, 2012.

[10] CALDERER, M. et al. Effects of enhanced denitrification on hydrodynamics and microbial community structure in a soil column system. Chemosphere, v.111, p.112-119, 2014.

[11] CALHEIROS, C.S.C. et al. Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. Water Research, v.41, p.1790-1798, 2007.

[12] MOLLE, P. et al. Potential for total nitrogen removal by combining vertical flow and horizontal flow constructed wetlands: A full-scale experiment study. Ecological Engineering, v.34, p.23-29, 2008.

[13] VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. Science of the Total Environment, v.380, p.48-65, 2007.

[14] PARANYCHIANAKIS, N. et al. Pathways regulating the removal of nitrogen in planted and unplanted subsurface flow constructed wetlands. Water Research, v.102, p.321-329, 2016.

[15] WANG, S. et al. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China. Applied Microbiology and Biotechnology, v.90, p.779-787, 2011.

[16] KAYSER, K.; KUNST, S. Processes in vertical-flow reed beds: nitrification, oxygen transfer, and soil clogging. Water Science Technology, v.51, n.9, p.177-184, 2005.

[17] ERGUDER, T.H. et al. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing Archaea. FEMS Microbiology Reviews, v.33, n.5, p.855-869, 2009.