

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Catiane Pelissari

**DINÂMICA MICROBIANA NITRIFICANTE E
DESNITRIFICANTE EM *WETLAND* CONSTRUÍDO VERTICAL**

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pelissari, Catiane

Dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante em wetland construído vertical / Catiane Pelissari ; orientador, Pablo Heleno Sezerino ; coorientador, Rafael Dutra de Armas, coorientador, Joan Garcia. - Florianópolis, SC, 2017.
213 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Wetlands construídos. 3. Nitrogênio. 4. Populações nitrificantes e desnitrificantes ativas. 5. Parâmetros de projeto. I. Sezerino, Pablo Heleno . II. Dutra de Armas, Rafael. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Catiane Pelissari

**DINÂMICA MICROBIANA NITRIFICANTE E
DESNITRIFICANTE EM *WETLAND* CONSTRUÍDO VERTICAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Heleno Sezerino

Co-orientadores: Prof. Dr. Rafael Dutra de Armas e Prof. Dr. Joan García

Florianópolis

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

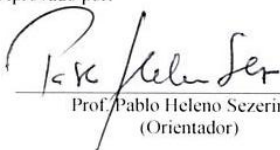
“Dinâmica Microbiana Nitrificante e Desnitrificante em Wetland Construído Vertical”

Catiane Pelissari

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOCTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:


Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.
(Orientador)


Joan Garcia, Dr.
(Coorientador)


Rafael Dutra de Armas, Dr.
(Coorientador)


Prof.ª Maria Elza Nagel Hassemer, Dr.ª


Prof.ª Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr.ª


Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.


Prof.ª Juliana Calábria de Araújo, Dr.ª


Prof. Marcos von Sperling, Dr.


Prof.ª Maria Elza Nagel Hassemer, Dr.ª
(Coordenadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

A Universidade Federal de Santa Catarina e a Universidade Politécnica da Catalunha por terem me proporcionado essa oportunidade única de crescimento e aprendizagem. Juntamente, agradeço a FUNASA, CNPq e CAPES, pelo financiamento do projeto de pesquisa, e pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche, tornando possível a realização desse estudo.

Ao meu orientador, professor Pablo Sezerino, por toda a transpiração, os “empurrões”, a paciência, e as conquistas que ocorreram ao longo desses 8 anos trabalhando juntos. Foi um prazer trabalhar com você, professor. Obrigado por ter me acolhido em sua família, muitas vezes mais que um orientador, como um paião.

Ao professor Rafael Dutra de Armas, por ter incorporado a minha pesquisa no dia-a-dia do seu laboratório, por ter me mostrado que paciência e perseverança são fundamentais para obter resultados com biológica molecular, e também, por toda a ajuda oferecida ao longo desta pesquisa.

À minha família, sobretudo, a minha mãe Sônia, e minhas irmãs Daniela e Camila, por todo o carinho, amor e paciência que sempre tiveram comigo. Apesar da minha ausência e do meu jeito torto, vocês foram essenciais nesse caminho. Está aí mãe, conseguimos!

Às meninas da sala 62, Mayara, Giovanna e Monique, formamos um super time juntos. Obrigado por toda ajuda em campo, por tornarem os dias mais leves, e também, pela paciência e carinho que sempre tiveram comigo. Foi maravilhoso trabalhar com vocês!

Ao Benny, por toda ajuda, discussões, e aprendizado que tivemos juntos, além da amizade que formamos por meio dos *wetlands*. Aprendi muito com você, e com seu coração cheio de bondade.

A querida Lorena, que é a tranquilidade e a paz em pessoa. Obrigada por todos os ensinamentos de biologia molecular, e pelo amadurecimento que conviver com você me proporcionou.

A todos os bolsistas de iniciação científica, em especial a Alena, que colaboraram para a realização desse trabalho.

À minha amiga de longa data Alcione, por sempre estar por perto em todos os momentos, por vibrar comigo com cada conquista, e por tranquilizar-me nos momentos de agonias (que foram muitos!), além de todo o carinho incondicional que sempre demonstrou ter comigo.

À Samara por todo o companheirismo, apoio, incentivos, e os puxões de orelhas. Muito obrigado, Sá, foi muito mais fácil com você por perto!

À Marília e Carol, pela dose diária de apoio e força. Se não fosse por vocês, com certeza essa tese seria escrita no hospício! Obrigada pelo companheirismo, as risadas, e, sobretudo, pela paciência.

A Rotária do Brasil pelo suporte fornecido, permitindo a realização de alguns de nossos estudos, nas unidades de tratamento de sua empresa.

Aos professores, Rejane H. da Costa Ribeiro, Maria Eliza N. Hassemer, Hugo M. Soares, Juliana C. de Araújo e Marcos von Sperling, pela disponibilidade, pela leitura em plenas férias, e também, por melhorarem essa tese.

E por fim, percebi que todo esse “processo” necessário para chegar até nesse momento, composto por obstáculos, alegrias, superações e algumas tristezas, proporcionou-me uma evolução indescritível como pessoa. Dessa forma, não tem como não ser grata, ao universo e principalmente a Deus.

Agora, que venha o novo começo. E que ele seja tão evolutivo quanto.

Parte en castellano:

Al profesor Joan García por haberme recibido de brazos abiertos en su equipazo de investigación, y por enseñarme a vender el pescado o pez! como él decía.

A los profesores Ivet y Jauma por todas las "discusiones" que tuvimos juntos para desarrollar este trabajo, y por las oportunidades que me ofrecieron durante mi estancia en la UPC.

A Cristina Ávila por re-enseñarme a investigar, por vibrar conmigo en cada logro y por todos los "baños de mierda" que llevamos juntas.

A Marc Viñas y principalmente a Miriam Guivernau por todo el apoyo y su enseñanza en los análisis de microbiología, por emocionarse conmigo con cada bicho encontrado en nuestras muestras.

A las chicas del GEMMA: Raquel, Clara, Dulce, Fatine y Maria quienes hicieron mis días mejores. Gracias por su paciencia para enseñarme catalán, voy a extrañar nuestras cenas con comidas mundiales.

RESUMO

Maximizar a remoção do nitrogênio presente em esgoto sanitário submetido ao tratamento em *wetlands* construídos verticais descendentes (WCVD) e verticais de fundo saturado (WCVD-FS) é um parâmetro chave para o desenvolvimento desta ecotecnologia, sendo primordial o entendimento do comportamento da comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante, vinculado aos parâmetros operacionais destas unidades. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a dinâmica microbiana associada às transformações do nitrogênio, e sua relação com parâmetros operacionais em *wetlands* construídos verticais descendentes. Foram utilizados três procedimentos experimentais (PE) distintos, todos operados com esgoto sanitário. No PE I, por meio da técnica FISH, foi avaliada a interferência de períodos de alimentação e repouso de 30 dias, na comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante, em microcosmos que simularam o perfil vertical de WCVD (colunas DN 150 mm), e, também, em um WCVD-FS em escala real (área superficial de 3.144 m²), ambos preenchidos com areia como material filtrante. Os períodos de repouso de 30 dias promoveram um decaimento na abundância de bactérias nitrificantes. Contudo, com a retomada da alimentação, as mesmas restabeleceram-se no meio, e não afetaram a nitrificação. Por outro lado, bactérias desnitrificantes não foram influenciadas pelos períodos de repouso. No PE II, foi avaliado um WCVD em escala piloto (3 m² de área superficial) preenchido com areia e brita como material filtrante, operado sob uma taxa hidráulica (TH) de 375 mm d⁻¹ e duas cargas orgânicas distintas: período I: com 6 meses de operação e aplicação de 130 g DQO m⁻² d⁻¹ e período II: com 3 meses de operação e aplicação de 80 g DQO m⁻² d⁻¹. Ao final de cada período, foram coletadas amostras do maciço filtrante na camada da superfície e do fundo do WCVD, e foi empregada a técnica de qPCR (em nível de DNA e RNA) para identificar a abundância e atividade de genes expressos no processo de transformação do nitrogênio, tais como, *amoA* de bactérias oxidantes de amônia (AOB), *amoA* de arqueas oxidantes de amônia (AOA) e *nosZ* de bactérias desnitrificantes. Além disso, com as amostras do período II, foi realizado o sequenciamento de nova geração do 16S rRNA para eubactérias e arqueas (em nível de RNA). Os resultados do PE II demonstraram que a nitrificação foi realizada por AOB (*Nitrosospira*), AOA (*Nitrososphaeraceae*) e NOB (*Nitrobacter*). AOB foram mais abundantes que as AOA nos dois períodos. Contudo, AOA em ambas as camadas e períodos (10⁶ transcritos *amoA* g⁻¹) apresentaram maior atividade que AOB (variando entre 10⁵ e 10⁶ transcritos *amoA* g⁻¹). AOA mostraram ser mais estáveis e menos afetadas pelas variações operacionais. Bactérias desnitrificantes foram identificadas em maior atividade (10⁶ transcritos *nosZ* g⁻¹) na camada da superfície, quando aplicada uma carga orgânica de 130 g

DQO $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Já quando a carga orgânica baixou para $80 \text{ g DQO m}^{-2} \text{d}^{-1}$, maior atividade desnitrificante (10^6 transcritos *nosZ* g^{-1}) passou a ser identificada na camada do fundo. No PE III, foi avaliado um WCVD e um WCVD-FS (ambos com $1,5 \text{ m}^2$ de área superficial, com areia e brita como material filtrante), operados em paralelo, sob as mesmas condições operacionais ($40 \text{ g DQO m}^{-2} \text{d}^{-1}$ e TH de 133 mm d^{-1}). Após 6 meses de operação, foi coletada uma amostra do maciço filtrante na camada da superfície e do fundo nos dois *wetlands*, e foram realizadas as mesmas análises microbiológicas conduzidas no PE II. No WCVD a atividade de AOA (*Nitrososphaeraceae* e *Nitrosopumilaceae*) foi de 10^6 e 10^5 transcritos *amoA* g^{-1} na camada da superfície e do fundo, respectivamente, enquanto que a atividade de AOB (*Nitrosomonadaceae*) diminuiu (10^2 e 10^3 transcritos *amoA* g^{-1} na camada da superfície e do fundo, respectivamente). Já no WCVD-FS, um comportamento oposto ao WCVD foi identificado. A atividade de AOA (*Nitrososphaeraceae*) diminuiu na camada saturada três ordens de grandeza (de 10^7 para 10^4 transcritos *amoA* g^{-1}) e a de AOB (*Nitrosomonadaceae*) nessa camada, apresentou maior estabilidade (de 10^5 para 10^4 transcritos *amoA* g^{-1}). Apesar disso, AOA permaneceram sendo mais ativas que AOB em ambos os *wetlands*. Nos dois *wetlands*, a oxidação do nitrito foi conduzida pelas bactérias oxidantes de nitrito (NOB) *Nitrobacter* e *Nitrospira*. Além disso, identificou-se uma relação de simbiose entre AOA e NOB na região oxidativa dos *wetlands*. A atividade de bactérias desnitrificantes (10^5 transcritos *nosZ* g^{-1}) foi claramente enriquecida na camada saturada do WCVD-FS. De forma geral, nitrificação e desnitrificação simultâneas foram identificadas em todos os PE. Alta atividade de AOA, AOB, e bactérias desnitrificantes foram identificadas ao longo do perfil vertical do WCVD operado sob uma carga orgânica de $80 \text{ g DQO m}^{-2} \text{d}^{-1}$ e TH de 375 mm d^{-1} , com ciclos de alimentação e repouso de 3,5 dias. Estas condições operacionais em conjunto com a saturação da camada de fundo do maciço filtrante, apresentam-se como alternativas promissoras na maximização da remoção do nitrogênio em *wetlands* construídos verticais.

Palavras-chave: esgoto sanitário, nitrogênio, *wetland* construído, carga orgânica, taxa hidráulica, bactérias oxidantes de amônia, arqueas oxidantes de amônia, populações metabolicamente ativas.

ABSTRACT

To enhance the nitrogen removal present in urban wastewater submitted to treatment in unsaturated vertical flow constructed wetlands (UVF) and partially saturated vertical flow constructed wetlands (SVF) is a key parameter for the development of this ecotechnology. It is essential, therefore, to understand the behavior of the nitrifying and denitrifying microbial communities linked to the operational parameters of these wetlands. In this context, the aim of this study was to evaluate the microbial dynamics associated with nitrogen transformations and their relation with operational parameters in vertical subsurface flow constructed wetland. Three different experimental procedures (EP) were used and all of them were conducted using urban wastewater. In the EP I, it was evaluated the interference of feeding and rest periods of 30 days in the nitrifying and denitrifying bacteria through the use of the FISH technique, in microcosms that simulated the vertical profile of UVF (columns Ø 150 mm) and full scale SVF wetland (surface area of 3,144 m²). Both units were filled with sand as bed media. Rest periods of 30 days promoted decay in the nitrifying bacteria abundance. However, with the resumption of feeding, nitrifying bacteria reestablished in the bed media and did not affect nitrification. On the other hand, denitrifying bacteria were not influenced by the rest periods. In the EP II, it was evaluated a UVF wetland in pilot scale (surface area of 3 m²) with sand and gravel as bed media, which was operated under hydraulic loading rate (HLR) of 375 mm d⁻¹ and two different organic loading rates (OLR): (i) period I: 6 months of operation with OLR of 130 g COD m⁻² d⁻¹; and (ii) period II: 3 months of operation with OLR of 80 g COD m⁻² d⁻¹. At the end of each period, samples were collected from the bed media, in the top and bottom layers of the UVF wetland. qPCR (at DNA and RNA level) was performed to identify abundance and activity of expressed gens in nitrogen transformation processes, such as *amoA* of ammonia oxidizing bacteria (AOB), *amoA* of ammonia oxidizing archaea (AOA) and *nosZ* of denitrifying bacteria. Moreover, with samples from period II, it was conducted the high throughput sequencing of 16S rRNA for eubacteria and archaeal (at RNA level). The results from EP II showed that nitrification was performed by AOB (*Nitrosospira*), AOA (*Nitrososphaeraceae*) e NOB (*Nitrobacter*). AOB were more abundant than AOA in both periods. However, AOA in both layers and periods (10⁶ *amoA* transcripts g⁻¹) presented more activity than AOB (which ranged between 10⁵ and 10⁶ *amoA* transcripts g⁻¹). AOA showed to be more stable and less affected by the operational variations. Denitrifying bacteria were identified more active in the top layer (10⁶ *nosZ* transcripts g⁻¹) with OLR of 130 g COD m⁻² d⁻¹. When the OLR decreased for 80 g COD m⁻² d⁻¹, more denitrifying activity became identified in the bottom layer (10⁶ *nosZ* transcripts g⁻¹). In the EP III,

it was evaluated a UVF and a SVF wetlands (surface area of 1.5 m² for each unit, with sand and gravel of bed media), operated in parallel, under de same conditions (OLR of 40 g COD m⁻² d⁻¹ and HLR of 133 mm d⁻¹). After 6 months of operation, samples from the top and bottom layers of the bed media were collected from both wetlands. The same microbiology analyses performed in EP II were conducted in these samples. In the UVF wetland the AOA activity (*Nitrososphaeraceae* and *Nitrosopumilaceae*) was of 10⁶ and 10⁵ *amoA* transcripts g⁻¹ in the top and bottom layers, respectively. While the activity of AOB (*Nitrosomonadaceae*) decreased (10² and 10³ *amoA* g⁻¹ transcripts in the top and bottom layers, respectively), the SVF wetland showed the opposite behavior. AOA (*Nitrososphaeraceae*) activity decreased three orders of magnitude in the bottom layer (from 10⁷ to 10⁴ *amoA* transcripts g⁻¹), and AOB (*Nitrosomonadaceae*) showed more stability (from 10⁵ to 10⁴ *amoA* transcripts g⁻¹). Despite this, AOA remained more active than AOB in both wetlands. Nitrite oxidation in UVF and SVF wetlands was conducted by nitrite oxidizing bacteria (NOB) such as *Nitrobacter* and *Nitrospira*. Furthermore, a symbiosis relationship between AOA and NOB was identified in the oxidative layer from both wetlands. Denitrifying bacteria activity (10⁵ transcripts *nosZ* g⁻¹) was clearly enriched at the saturated layer in the SVF wetland. In general, simultaneous nitrification and denitrification were identified in all EP. High AOA, AOB and denitrifying bacteria activity were identified along the vertical profile of the UVF wetland operated under OLR of 80 g COD m⁻² d⁻¹ and HLR of 375 mm d⁻¹, with cycles of feeding and rest of 3.5 days. These operational conditions together with bottom layer saturation in the bed media are presented as promising alternatives in the maximization of the nitrogen removal in vertical subsurface flow constructed wetlands.

Keywords: urban wastewater, nitrogen, constructed wetland, organic loading rate, hydraulic load rate, ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, metabolically active populations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos <i>wetlands</i> construídos.	30
Figura 2 – Esquema representando o <i>wetland</i> construído vertical descendente.	31
Figura 3 – Esquema representando o <i>wetland</i> construído vertical descendente de fundo saturado.	36
Figura 4 – Vias de transformação do nitrogênio destacadas na literatura, passíveis de ocorrer em <i>wetland</i> construído vertical descendente e vertical de fundo saturado.	38
Figura 5 – C/N e sua relação com nitrificação autotrófica e heterotrófica.	49
Figura 6 – Diagrama estrutural dos procedimentos experimentais.	61
Figura 7 – Condições operacionais de cada procedimento experimental.	62
Figura 8 – Microcosmos simulando o perfil vertical de <i>wetland</i> construído vertical descendente. a) esquema representando as condições operacionais de cada microcosmo; b) unidades de tratamento utilizadas no estudo.	63
Figura 9 – <i>Wetland</i> construído vertical descendente de fundo saturado empregado para tratamento de esgoto sanitário de um condomínio residencial.	65
Figura 10 – Coletas de amostras do maciço filtrante do <i>wetland</i> em diferentes profundidades do perfil vertical. a) amostrador de solo; b) perfil coletado.	66
Figura 11 – Sistema híbrido de <i>wetlands</i> do procedimento experimental II.	73
Figura 12 – <i>Wetland</i> construído vertical descendente estudado no procedimento experimental II.	73
Figura 13 – Coleta de amostras no maciço filtrante do <i>wetland</i> construído vertical descendente.	75
Figura 14 – Amostragens realizadas e análises microbiológicas empregadas no período I e II do procedimento experimental II.	76
Figura 15 – <i>Wetland</i> construído vertical descendente de fundo saturado e <i>wetland</i> construído vertical descendente do procedimento experimental III.	82
Figura 16 – Amostragens realizadas e análises microbiológicas empregadas no WCVD e WCVD-FS do procedimento experimental III.	84

Figure 17 – Microcosms used to simulate vertical profile of vertical flow constructed wetland. a) Scheme of the microcosms. b) Hydraulic regime adopted during monitoring.....	89
Figure 18 – Proportion of EUB mix probe stained bacteria against stained cells using DAPI.....	93
Figure 19 – Proportion of the nitrifying and denitrifying bacterial community in relation to EUB probe at the end of each feeding and rest period. a) Microcosm 1; b) Microcosm 2.....	95
Figure 20 – Canonical correlation between NH ₄ -N and COD removal and the NO ₃ -N and NO ₂ -N formation with identified bacteria using the FISH technique.....	97
Figure 21 – Relative abundance in phylum rank identified in surface and bottom layers of microcosms 1 and 2.....	98
Figure 22 – Relative abundance of surface and bottom samples at the family taxonomic rank.....	100
Figure 23 – Diagram of the partially saturated vertical subsurface flow wetland.....	105
Figure 24 – Representation of the sampling cores points within the bed media of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 at different depths and at different locations along the length of the unit.....	106
Figure 25 – Mean (\pm SD) relative abundance of bacteria in partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 in feed and rest periods.....	109
Figure 26 – Mean (\pm SD) relative abundance of studied bacteria in different layers of partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 during feed and rest periods. A) Relative abundance of eubacteria in feed and rest periods at different layers. B) Nitrifying and denitrifying bacteria in different layers during feed periods. C) Nitrifying and denitrifying bacteria in different layers during rest periods.....	113
Figure 27 – Average relative abundance of bacteria in the four layers of partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 at the different seasons.....	117
Figure 28 – Pilot treatment plant. a) Diagram of the treatment system indicating sampling points of influent and effluent wastewater. b) Detail of the vertical subsurface flow constructed wetland indicating bed media sampling points.....	123
Figure 29 – Nitrogen transformation in the vertical subsurface flow constructed wetland in Period I (130 g COD m ⁻² d ⁻¹) and II (80 g COD m ⁻² d ⁻¹).....	131

Figure 30 – Average of nitrogen functional genes identified in top (0–15 cm) and bottom (70–80 cm) layers of the bed media of the vertical subsurface flow constructed wetland in the two microbiological sampling campaigns: Period I (ORL = 130 g COD m ⁻² d ⁻¹) and Period II (ORL = 80 g COD m ⁻² d ⁻¹), and in influent and effluent wastewater from Period II. a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial <i>amoA</i> copy numbers and transcripts; c) Abundance of archaeal <i>amoA</i> copy numbers and transcripts; d) Abundance of <i>nosZ</i> copy numbers and transcripts.....	132
Figure 31 – Ratio of gene transcripts and gene copies of bacterial and archaeal <i>amoA</i> and <i>nosZ</i> in top (0-15 cm) and bottom layers (70-80 cm) of the vertical flow wetland at the two microbiological sampling campaigns: Period I (ORL= 130 g COD m ⁻² d ⁻¹) and Period II (ORL= 80 g COD m ⁻² d ⁻¹) and in influent and effluent wastewater from Period II.	135
Figure 32 – Taxonomic assignment of sequencing reads (MiSeq) from the active eubacterial community (16S rRNA based cDNA) of influent wastewater, and bed media from top and bottom layers of Period II at order level.....	136
Figure 33 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active archaeal community (16S rRNA based cDNA) of influent wastewater, and bed media from top and bottom layers of Period II at family level.	137
Figure 34 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active eubacterial community (16S rRNA-based cDNA) of influent wastewater, and filter media from top and bottom layers of Period II. A) Class level; B) Family level; C) Genus level.	139
Figure 35 – Diagram of the experimental CW treatment system. A) Sampling collected from influent and effluent of constructed wetlands; B) Sampling collects from bed media of unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.....	145
Figure 36 – Nitrogen load rate removal and NO _x -N production in an unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland.	153
Figure 37– Average of nitrogen functional genes identified in influent (at the initial and end periods), and in the top (0-15 cm) and bottom (70-80 cm) layers of the bed media of the unsaturated vertical subsurface flow constructed wetland (at the end period). a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial <i>amoA</i> genes and transcripts; c) Abundance of archaeal <i>amoA</i> genes and transcripts; d) Abundance of <i>nosZ</i> genes and transcripts.	156

Figure 38 – Ratio between transcripts/16S rDNA and transcripts/genes copies identified in top and bottom layers of the unsaturated vertical subsurface flow constructed wetlands at the end period (after 6 months of operation).	157
Figure 39 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active bacterial and archaeal communities (16S rRNA based cDNA) of the influent, and bed media from top and bottom layers of the unsaturated and the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands. A) Bacterial community at order level; B) Archaeal community at family level.	159
Figure 40 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active bacterial communities (16S rRNA based cDNA) at class level of influent, and bed media from top and bottom layers of the unsaturated and the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.	161
Figure 41 – Average of nitrogen functional genes identified in influent (at the initial and end periods), and in the top (0-15 cm) and bottom (70-80 cm) layers of the bed media of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland (at the initial and end periods). a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial <i>amoA</i> genes and transcripts; c) Abundance of archaeal <i>amoA</i> genes and transcripts; d) Abundance of <i>nosZ</i> genes and transcripts.....	162
Figure 42 – Ratio between transcripts/16S rDNA and transcripts /genes copies identified in top and bottom layers of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands in the initial and end period of operation.....	164
Figura 43 – Abundância de genes funcionais envolvidos nas transformações do nitrogênio identificados na camada da superfície e do fundo do WCVD e WCVD-FS. A) número de cópias de genes (abundância total). B) número de transcritos (atividade).....	169
Figura 44 – Relação entre transcritos/16S rDNA e relação entre transcritos/cópias de genes identificados na camada da superfície e na camada do fundo do WCVD e WCVD-FS em diferentes condições operacionais.	174
Figura 45 – Desempenho de tratamento dos WCVD e WCVD-FS operados sob as condições operacionais avaliadas no procedimento experimental II e III, associado com a abundância de transcritos (abundância ativa) de <i>amoA</i> de AOB e AOA e <i>nosZ</i> (bactérias densitrificantes) identificado na camada da superfície e do fundo de cada <i>wetlands</i>	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros avaliados no afluente e efluente de cada unidade avaliada no procedimento experimental I, e a respectiva metodologia empregada.	67
Tabela 2 – Descrição de sondas de oligonucleotídeos empregadas na técnica FISH.	69
Tabela 3 – Parâmetros avaliados no afluente e efluente dos <i>wetland</i> construído vertical descendente e metodologia empregada no procedimento experimental II	74
Tabela 4 – <i>Primers</i> empregados na análise de qPCR e suas respectivas condições de amplificação.	78
Table 5 – Mean, (\pm SD) concentrations, mean organic and inorganic applied loading rates, mean applied hydraulic rate and mean removal efficiencies of influent and effluent for microcosm 1 (M1) and microcosm 2 (M2).	92
Table 6 – Mean, median and standard deviation of wastewater quality parameters at the influent and effluent wastewater of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland.	108
Table 7 – Operational conditions of the vertical subsurface flow constructed wetland in Periods I and II.	125
Table 8 – Average (\pm SD) concentration and loads of water quality parameters at the influent and effluent of the vertical subsurface flow constructed wetland in Periods I and II.	130
Table 9 – Samples collected and analyses employed in unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.	148
Table 10 – Average (\pm SD) concentration, loading rates and removal efficiencies of water quality parameters at the influent and effluent of the unsaturated (UVF) and partially saturated (SVF) vertical subsurface flow constructed wetland.	152
Table 11 – AOB abundance identified in the influent sample and in both layers of the unsaturated and the partially saturated vertical flow constructed wetlands.	160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Anammox - Oxidação anaeróbia da amônia (*Anaerobic ammonium oxidation*)
- AO - Oxidantes de amônia (*Ammonia oxidizer*)
- AOA - Arqueas oxidantes de amônia (*Ammonium oxidizing archaeal*)
- AOB - Bactérias oxidantes de amônia (*Ammonium oxidizing bacteria*)
- APHA - *American Public Health Association*
- Canon - Completa remoção de nitrogênio autotrófica a partir de nitrito (*Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*)
- Commamox - Oxidação completa da amônia (*Complete ammonium oxidizer*)
- Cu - Coeficiente de uniformidade
- d_{10} - Diâmetro efetivo referente a 10 % do material
- DGGE - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturation gradient gel electrophoresis*)
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- EP - Procedimento experimental (*Experimental procedure*)
- FISH - Hibridação *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization*)
- FWS - *Wetland* construído de lamina livre (*Free flow constructed wetland*)
- GEMMA - Grupo de Estudos em Engenharia Ambiental e Microbiologia (*Environmental Engineering and Microbiology Research Group*)
- GESAD - Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado
- HF - *Wetland* construído horizontal (*Horizontal flow constructed wetland*)
- HLR - Taxa hidráulica (*Hydraulic loading rate*)
- Ks - Condutividade hidráulica saturada
- LIMA - Laboratório Integrado do Meio Ambiente
- M1 - Microcosmo 1 (*Microcosm 1*)
- M2 - Microcosmo 2 (*Microcosm 2*)
- NGS - Sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing techniques*)
- NOB - Bactérias oxidantes de nitrito (*Nitrite oxidizing bacteria*)
- OLR - Carga orgânica aplicada (*Organic loading rate*)
- OTUs - Unidades taxonômicas operacionais (*Operational taxonomic units*)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
- PE - Procedimento experimental

PPGEA - Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental
NCBI - Centro Internacional de Informações Biotecnológicas (*National Center for Biotechnology Information*)
qPCR - Reação da polimerase em cadeia em tempo real (*Real time polymerase chain reaction*)
RA - Abundância relativa (*Relative abundance*)
RAC - Reator anaeróbico compartimentado
RPM - Rotações por minuto
RT - Transcrição reversa (*Reverse transcription*)
RNA - Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
SRA - Arquivos de leitura de sequência (*Sequence read archive*)
SND - Nitrificação e desnitrificação simultâneas (*Simultaneous nitrification and denitrification*)
SVF - Wetland construído vertical de fundo saturado (*Partially saturated vertical flow constructed wetland*)
TDH - Tempo de detenção hidráulica
TH - Taxa hidráulica
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UPC - Universidade Politècnica da Catalunha (*Universitat Politècnica da Catalunya*)
UVF - Wetland construído vertical (*Unsaturation vertical flow constructed wetland*)
VF - Wetland construído vertical (*Vertical flow constructed wetland*)
WC - *Wetland* construído
WCH - *Wetland* construído horizontal
WCV - *Wetland* construído vertical
WCVD - *Wetland* construído vertical descendente
WCVD-FS - *Wetland* construído vertical descendente de fundo saturado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	JUSTIFICATIVA.....	25
1.2	HIPÓTESE.....	26
1.3	OBJETIVOS	27
1.3.1	Objetivo geral	27
1.3.2	Objetivos específicos	27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1	WETLANDS CONSTRUÍDOS (WC).....	29
2.1.1	Wetland construído vertical descendente (WCVD)	30
2.1.2	Wetland construído vertical descendente de fundo saturado (WCVD –FS)	36
2.2	REMOÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DO NITROGÊNIO EM WCVD E WCVD-FS.....	37
2.2.1	Adsorção no material filtrante	38
2.2.2	Assimilação pelas macrófitas	39
2.2.3	Assimilação microbiana.....	40
2.2.4	Volatilização do nitrogênio amoniacal	41
2.2.5	Amonificação	41
2.2.6	Nitrificação	41
2.2.7	Desnitrificação.....	45
2.2.8	Nitrificação e desnitrificação simultâneas.....	47
2.2.9	Nitrificação - desnitrificação parcial	47
2.2.10	Nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia.....	48
2.2.11	Anammox.....	50
2.2.12	Canon	51
2.3	AVANÇOS DA ENGENHARIA NA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM WCVD E WCVD-FS	52
2.4	AVANÇOS DA MICROBIOLOGIA NA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM WCVD E WCVD-FS	55
3	MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL I.....	62
3.1.1	Sistema I	62
3.1.2	Sistema II	64
3.1.3	Monitoramento dos sistemas I e II	66
3.1.4	Análises estatísticas	70
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL II.....	71
3.2.1	Monitoramento do sistema III	74
3.2.2	Análises estatísticas	81
3.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL III	81

3.3.1	Monitoramento do sistema IV	82
3.3.2	Análises estatísticas.....	84
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1	ARTIGO 1	85
4.1.1	Relevance and objective	86
4.1.2	Materials and methods	88
4.1.3	Results and discussion	91
4.1.4	Conclusions.....	100
4.2	ARTIGO 2	102
4.2.1	Relevance and objective	103
4.2.2	Materials and methods	104
4.2.3	Results and discussion	107
4.2.4	Conclusions.....	118
4.3	ARTIGO 3	120
4.3.1	Relevance and objective	121
4.3.2	Materials and methods	122
4.3.3	Results and discussion	129
4.3.4	Conclusions.....	140
4.4	ARTIGO 4	142
4.4.1	Relevance and objective	143
4.4.2	Materials and methods	145
4.4.3	Results and discussion	151
4.4.4	Conclusions.....	166
4.5	SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS	168
5	CONCLUSÕES.....	177
6	RECOMENDAÇÕES.....	179
	REFERÊNCIAS.....	181

1 INTRODUÇÃO

Os *wetlands* construídos na modalidade vertical descendente (WCVD) são considerados uma ecotecnologia mundialmente consolidada para o tratamento de efluentes, atuando tanto em nível primário, tais como os módulos de primeiro estágio do sistema francês, quanto secundário e terciário. Assim, diferentes tipos de poluentes presentes nas águas residuárias, tais como matéria orgânica, sólidos, nutrientes, metais pesados, disruptores endócrinos e organismos patogênicos podem ser transformados e/ou removidos nesses sistemas.

Atualmente os WCVD vêm sendo empregados para a remoção de carbono em conjunto com a promoção da oxidação do nitrogênio amoniacal, alcançando desempenho na ordem de 70 a 80 % de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e efetiva nitrificação (COOPER et al., 1996; PLATZER, 1999; SEZERINO et al., 2012). Contudo, a remoção do nitrogênio nessa modalidade de *wetland* ainda é limitada. Um dos principais fatores associados com a baixa remoção do nitrogênio é o restrito potencial de desnitrificação, devido à ausência de condições anóxicas/anaeróbias no meio (SAEED; SUN, 2012; VYMAZAL, 2013).

A fim de promover a remoção do nitrogênio total nessas unidades, muitas inovações e adaptações vêm sendo empregadas, destacando-se: (i) a recirculação do efluente final (AYAZ et al., 2012); (ii) a aeração intermitente junto do material filtrante do *wetland* (FOLADORI et al., 2013); (iii) o emprego de sistemas híbridos (VYMAZAL, 2013) e sistemas em batelada tipo *tidal flow* (HU et al., 2014a; AUSTIN et al., 2003); (iv) a utilização de um material filtrante que promova maior adsorção desse nutriente (SAEED; SUN, 2011a) e (v) a poda das macrófitas em curtos períodos de tempo, a fim de estimular a capacidade extratora do nitrogênio pela planta (SAWAITTAYOTHIN; POLPRASERT, 2007). No entanto, essas estratégias demandam requerimento energético ou extensas áreas territoriais.

Além dessas estratégias, a utilização de duas zonas distintas (uma aeróbia e a outra anaeróbia/anóxica) em uma mesma unidade de WCVD vem sendo empregada, principalmente no modelo francês (DONG; SUN, 2007; PRIGENT et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015). Essa modificação é conhecida como *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado (WCVD-FS).

O WCVD-FS consiste em um módulo de WCVD com uma camada superior insaturada (aeróbia) e uma camada inferior saturada (anaeróbia/anóxica) com o próprio efluente submetido ao tratamento. Estas condições permitem remoções satisfatórias de nitrogênio, devido à potencialidade de nitrificação seguida de desnitrificação na mesma unidade (SILVEIRA et al., 2015).

Com as evoluções propostas pela engenharia, no âmbito das modificações e estratégias de operação desses reatores, juntamente com os avanços obtidos pela microbiologia, no campo da biologia molecular, foi demonstrado que a via clássica de nitrificação e desnitrificação, apesar de ser constante, não é a única rota bioquímica de transformação do nitrogênio nesses *wetlands* (DONG; SUN, 2007; AUSTIN et al., 2006a; HU et al., 2014b; ZHI; JI, 2014; FU et al., 2016).

As diferentes transformações do nitrogênio, tanto em WCVD, quanto em WCVD-FS, são resultados, sobretudo, das condições operacionais de cada unidade, as quais refletem diretamente na comunidade microbiana atuante no processo. Segundo Meng et al. (2014), a estrutura da comunidade microbiana em *wetlands* construídos (WC) está relacionada com os fatores ambientais em que esses módulos de tratamento são submetidos, às propriedades do afluente, o tipo de material filtrante e às condições operacionais.

A importância de elucidar a inter-relação dos ecossistemas formados no interior dos WC, com os parâmetros chaves de dimensionamento, como carga orgânica, taxa hidráulica e regime hidráulico aplicado, é fundamental para a maximização da remoção do nitrogênio, baseando-se, principalmente, na estrutura da comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante.

Nesse contexto, esse trabalho buscou melhor compreender a dinâmica microbiana associada às transformações do nitrogênio, e sua relação com parâmetros operacionais em WCVD e WCVD-FS. O estudo foi realizado no Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado (GESAD), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em cooperação com a Universidade Politécnica da Catalunha (*Universitat Politècnica de Catalunya - Barcelona-Tech - UPC*). Foram empregados três procedimentos experimentais distintos, onde o foco principal foi avaliar a comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante em WCVD e WCVD-FS, operados sobre variadas condições operacionais.

Apresenta-se essa tese em quatro partes. Na parte inicial é apresentada a hipótese, onde esse estudo foi embasado, bem como, os

objetivos propostos, e o referencial teórico. Posteriormente, é apresentada a metodologia dos procedimentos experimentais adotados, conduzidos no Brasil e também na Espanha. Consecutivamente, na terceira parte, são apresentados os resultados, através de quatro artigos vinculados aos objetivos específicos. E por fim, na última parte apresenta-se uma discussão integrando todos os resultados do estudo, as conclusões e recomendações futuras.

1.1 JUSTIFICATIVA

A carga orgânica e a taxa hidráulica (TH) aplicadas sobre a área superficial são os principais parâmetros vinculados ao dimensionamento dos WCVD e WCVD-FS (COOPER et al., 1996; PLATZER, 1999; WINTER; GOETZ, 2003; SEZERINO et al., 2012). Mesmo existindo uma ampla variação de recomendações desses valores, já se conhece um comportamento de tratamento associando eficiências de remoções de poluentes com os carregamentos aplicados.

Em relação às transformações do nitrogênio, altas cargas orgânicas podem influenciar na nitrificação, pois a taxa de crescimento de organismos heterotróficos é superior dos autotróficos, promovendo rápida depleção de oxigênio dissolvido no ambiente, podendo limitar ou reduzir a atividade de organismos autotróficos (PAREDES et al., 2007a; SAEED; SUN, 2011b). Enquanto que, altas TH podem promover maior disponibilidade de oxigênio no maciço filtrante (PLATZER, 1999). Por outro lado, baixa carga orgânica pode limitar a desnitrificação heterotrófica, devido à insuficiência de carbono orgânico disponível (HEADLY et al., 2005), e menores TH podem restringir a disponibilidade de oxigênio para o processo de nitrificação (PLATZER, 1999).

Atualmente, existem inúmeras recomendações de carregamentos orgânicos e hidráulicos em WCVD e WCVD-FS, inclusive com o intuito de promover transformações no nitrogênio amoniacal afluente. Contudo, pouco são os estudos abrangendo técnicas de biologia molecular voltados para a compreensão do comportamento de microorganismos nitrificantes e desnitrificantes nesses módulos. Deste modo, não se tem, ainda, uma clara relação entre os comportamentos microbianos envolvidos nas transformações do nitrogênio, associando-os com as condições operacionais dos *wetlands* construídos.

Além disso, recentemente, estudos mostraram que o processo de oxidação da amônia não limita-se apenas ao domínio bactéria, as arqueas também desempenham esse mecanismo (KONNEKE et al., 2005; HANSEL et al., 2008; TOURNA et al., 2008).

De fato, as inter-relações entre micro-organismos oxidantes de amônia, nitrito-oxidantes e desnitrificantes que ocorrem no interior de um biofilme ou em células planctônicas 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.

Entender como ocorre a dinâmica entre as populações envolvidas nas transformações do nitrogênio, e como os fatores operacionais podem interferir nessa relação, favorecendo populações nitrificantes e desnitrificantes, é fundamental para maximizar a remoção do nitrogênio em WCVD e WCVD-FS.

Desta forma, a presente pesquisa justifica-se ao buscar contribuir na elucidação da dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante ativa presente no maciço filtrante de *wetland* construído vertical descendente, e sua relação com parâmetros operacionais.

1.2 HIPÓTESE

O delineamento da pesquisa foi baseado na seguinte hipótese: *É possível obter nitrificação e desnitrificação sequenciais em wetlands construídos verticais, devido à operação com condições que favoreçam a atividade da comunidade microbiana associada.*

A partir da hipótese acima, foram formuladas as seguintes questões norteadoras:

- (i) Elevada carga orgânica aplicada em *wetland* construído vertical descendente ($> 40 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) interfere na nitrificação do nitrogênio amoniacal afluente?
- (ii) Carga orgânica e taxa hidráulica aplicadas acima de $40 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e 100 mm d^{-1} respectivamente, podem favorecer a desnitrificação em *wetland* construído vertical descendente?

- (iii) Ciclos intercalados de períodos de alimentação do afluente e repouso interferem na dinâmica da comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante presentes no maciço filtrante de *wetland* construído vertical?
- (iv) Como as condições operacionais de um *wetland* construído vertical descendente podem ser adaptadas para maximizar a remoção do nitrogênio baseado na dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica microbiana associada às transformações do nitrogênio e sua relação com parâmetros operacionais em *wetland* construído vertical descendente empregado no tratamento de esgoto sanitário.

1.3.2 Objetivos específicos

Para responder ao objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- (i) Identificar a interferência dos períodos de repouso (sem alimentação de esgoto afluente) na comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante presentes no maciço filtrante de *wetland* construído vertical descendente, operado sob distintas condições operacionais;
- (ii) Avaliar a influência de elevada carga orgânica aplicada em *wetland* construído vertical descendente na dinâmica microbiana envolvida nas transformações do nitrogênio;
- (iii) Indicar parâmetros operacionais que maximizem a remoção do nitrogênio, baseado na dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante em *wetland* construído vertical descendente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste item descrevem-se os pressupostos teóricos em relação às variáveis que influenciam as transformações e remoções do nitrogênio presentes em esgotos submetidos ao tratamento em unidades tipo *wetlands* construídos verticais descendente, destacando-se as principais estratégias operacionais empregadas, vias biológicas e a dinâmica microbiológica associada.

2.1 WETLANDS CONSTRUÍDOS (WC)

Os *wetlands* construídos (WC) são sistemas naturais de tratamento de efluentes. Estes sistemas podem ser considerados como uma ecotecnologia capaz de promover a conversão da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, tais como ocorrem naturalmente nos banhados e áreas alagadas, onde agentes como o solo, a vegetação e a luz solar interagem entre si, continuamente.

Diferentemente dos ambientes naturais, os WC possuem a vantagem de serem projetados, podendo assim ter flexibilidade quanto à seleção de local de implantação, dimensionamento e, sobretudo, o controle hidráulico, otimizando o desempenho do tratamento.

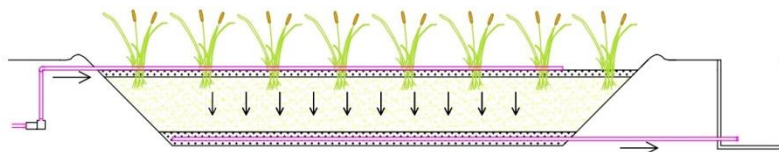
Essa tecnologia vem se desenvolvendo rapidamente nas últimas três décadas. Atualmente, com a difusão da utilização no Brasil e no mundo, bem como, com os avanços das pesquisas científicas, os WC têm sido empregados no tratamento dos mais variados tipos de águas residuárias, tanto orgânicas quanto inorgânicas, destacando-se a aplicação no tratamento de efluentes domésticos, industriais e agrícolas. São capazes ainda, de se adequar aos mais variados cenários e arranjos tecnológicos, proporcionando um bom desempenho no controle da poluição hídrica.

Os WC são classificados em dois grupos de acordo com seu regime hidráulico, sendo: (i) sistema de lâmina livre ou de escoamento superficial; (ii) sistema de escoamento subsuperficial. Os WC de escoamento subsuperficial são dimensionados a fim de proporcionar a percolação do efluente no material filtrante, diferentemente dos módulos de escoamento superficial, os quais não possuem um material filtrante, permanecendo uma lâmina de água na superfície.

Para os WC de escoamento subsuperficial a literatura aponta uma subclassificação quanto ao sentido do seu escoamento hidráulico,

bombejamento, por meio de pulsos sob toda a área superficial da unidade de tratamento (KADLEC; WALLACE, 2009).

Figura 2 – Esquema representando o *wetland* construído vertical descendente.



Fonte: Acervo GESAD.

As primeiras pesquisas com esses sistemas foram desenvolvidas em 1960, na Alemanha, e inicialmente foram denominados como *Max Planck Institute Process*, porém, a denominação mais aceita foi *Vertical Constructed Wetland* (IWA, 2000).

Os WCVD são idealizados para promover a remoção de matéria orgânica, retenção de sólidos e, sobretudo, para promover a conversão do nitrogênio amoniacal a nitrato, ou seja, a nitrificação, devido principalmente pela aeração do maciço filtrante resultante da alimentação intermitente, sendo esta uma particularidade desses módulos.

A alimentação intermitente do esgoto afluyente no WCVD promove um grande arraste de oxigênio atmosférico para o material filtrante, através da convecção atmosférica e difusão. Quando uma nova alimentação é realizada, nova quantidade de oxigênio se adiciona ao oxigênio já disposto na massa sólida (COOPER et al. 1996; PLATZER 1999) promovendo assim, maior disponibilidade de oxigênio no interior da unidade.

As remoções e transformações de poluentes (matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e patógenos) nos WCVD são processos complexos e dependem de uma variedade de mecanismos, incluindo sedimentação, filtração, precipitação, volatilização, assimilação pelas macrófitas e, principalmente, processos dependentes unicamente de micro-organismos (KADLEC; WALLACE, 2009).

Os processos de remoção de poluentes estão diretamente influenciados por taxas de carregamento, tanto hidráulico, quanto orgânicos e inorgânicos, estratégias operacionais, temperatura e o potencial redox do meio (ALLEN et al., 2002; WU et al., 2014). Além

desses, elementos como o material filtrante, a comunidade microbiana, e as macrófitas estão diretamente vinculados ao processo de depuração das águas residuárias a serem tratadas no WCVD.

(i) Material filtrante

O material filtrante é um dos elementos primordiais, pois, além de promover a retenção física de partículas presentes no efluente a ser tratado, serve de suporte para o desenvolvimento das macrófitas e do biofilme, propiciando a ocorrência de reações bioquímicas de depuração do efluente.

Em geral, procura-se um material filtrante que mantenha boa condutividade hidráulica e promova a adsorção de íons de fósforo e amônio. Grande variedade de elementos vêm sendo empregados como material filtrante em WCVD, tais como brita (LANA et al., 2013), serragem proveniente de madeira de eucalipto (SAEED; SUN, 2011a), areia (PLATZER, 1999; SEZERINO et al., 2012), zeólitas (SAEED; SUN, 2011c), agregado leve derivado de cinzas (BIALOWIEC et al., 2011), escória (CUI et al., 2010), turfa (GUNES, 2007), entre outros. No caso da utilização de areia, recomenda-se um diâmetro efetivo (d_{10}) superior ou igual a 0,20 mm; coeficiente de uniformidade (Cu) menor ou igual a 5 unidades; coeficiente de permeabilidade, ou condutividade hidráulica saturada (Ks), maior ou igual a 10^{-4} m s^{-1} ou $\geq 0,36 \text{ m h}^{-1}$ (PLATZER, 1999; ARIAS et al., 2001; BRIX; ARIAS 2005).

A desvantagem da utilização de materiais alternativos é o emprego dos mesmos com características desconhecidas, sendo difícil afirmar se estes são adequados para o uso em sistemas de filtração. Além disso, o material filtrante apresenta influência direta na comunidade microbiana, tanto no estabelecimento do biofilme, quanto na localização específica da atividade microbiana (TRUU et al., 2009; WU et al., 2014). As propriedades físicas e químicas do material filtrante, incluindo tamanho da partícula, área superficial, porosidade, condutividade hidráulica, pH e teor de matéria orgânica são determinantes para os processos mediados por micro-organismos (BRIX; ARIAS, 2005).

(ii) Macrófitas

As macrófitas emergentes utilizadas nos WC crescem diretamente no material filtrante, sob condições adversas como baixas

concentrações de oxigênio, pouca umidade disponível no meio, e na presença de compostos poluentes. As espécies amplamente utilizadas são *Phragmites australis* (espécie não nativa do Brasil), *Typha* spp. e *Juncus* spp, todavia, principalmente no Brasil vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com as mais variadas espécies, destacando-se a *Pennisetum purpureum schum*, *Cynodon*, *Eleocharis* spp, *Brachiaria* spp., *Mentha aquatica* entre outras (MATOS et al., 2010; 2009: 2008).

De fato, o papel das macrófitas como um componente essencial nos WC está bem estabelecido, pois as mesmas estão relacionadas com a ocorrência de mecanismos de remoção dos poluentes (BRIX, 1997). Apesar disso, na comunidade acadêmica vinculam-se discussões quanto à magnitude da capacidade de transferência de oxigênio pelas macrófitas para o material filtrante, que variam em uma grandeza na ordem de 0,005 a 12 g O₂ m⁻² d⁻¹ (NIVALA et al., 2013). Dan et al. (2011) relataram que a taxa de transferência de oxigênio pelas macrófitas em WC subsuperficial não é suficiente para atender à demanda completa de oxigênio dentro do material filtrante. No entanto, esse processo pode afetar principalmente a comunidade microbiana presente no meio (KANTAWANICHKUL et al., 2009; PENG et al., 2014). Por outro lado, Tietz et. al. (2007a) não mostraram influência das plantas na comunidade microbiana em WCVD.

Outra questão recentemente abordada é a influência das macrófitas no processo da desnitrificação, por meio da liberação de carbono pelos exsudados radiculares. Zhai et al. (2013) quantificaram a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) liberados pelas raízes de três macrófitas, *Phragmite*, *Iris* e *Juncus*. As taxas de liberação de COD foram diferentes entre as espécies. As taxas de liberação de COD totalizaram 0,6 e 4,8 % do carbono fixado por fotossíntese líquida, sugerindo assim, que os exsudatos radiculares das macrófitas podem ter um potencial para uma taxa de desnitrificação de 94 a 267 kg N ha⁻¹ ano⁻¹.

(iii) Micro-organismos

O reconhecimento de que a remoção da maioria dos poluentes nos WC ocorre via atividade microbiana vem sendo cada vez mais difundido e discutido. Considerando a ecologia do solo, tal como ocorre no maciço filtrante dos WCVD, as atividades microbianas e enzimáticas são indicadoras do estado do solo, visto que as mesmas podem ser

altamente variáveis, dependendo da disponibilidade de nutrientes, teor de umidade e temperatura (TRUU et. al., 2008).

Os procariotos e os fungos são os pioneiros na colonização dos WC, sendo os principais transformadores da maioria dos poluentes. Todavia, com o aumento do tempo de operação das unidades de tratamento, forma-se um ecossistema complexo com múltiplos grupos em vários níveis da cadeia alimentar, incluindo protozoários e micrometazóários que contribuem no processo de tratamento (KADLEC; WALLACE, 2009).

Segundo Pace (1996), somente 1 % dos micro-organismos presentes no meio ambiente podem ser cultivados por meio de técnicas-padrão de cultivo e de plaqueamento. Além disso, as contagens de células por microscopia refletem apenas uma avaliação quantitativa da população microbiana, sendo pouco informativas sobre a diversidade dos organismos de uma amostra (PICKUP, 1991). Dessa forma, como uma alternativa aos métodos convencionais, a biologia molecular surge para contornar as limitações intrínsecas às técnicas convencionais, permitindo elucidar questões sobre a diversidade e identidade dos micro-organismos atuantes nos WCVD.

Com os avanços no campo da biologia molecular, muitas descobertas em relação à comunidade microbiana foram elucidadas nos WC, proporcionando melhor compreensão das dinâmicas populacionais presentes nos maciços filtrantes dessas unidades de tratamento.

Liang et al. (2003) contabilizaram 10^5 UFC de fungos por g^{-1} de areia e 10^9 UFC de bactérias heterotróficas aeróbias por g^{-1} de areia com 5 cm de profundidade, em um WCVD tratando água poluída de um lago na China. A estratificação da biomassa microbiana poderia estar relacionada com a distribuição do oxigênio no módulo, pois os fungos do solo são conhecidos como organismos aeróbios e ocupam os 10 primeiros cm da cobertura do solo. A partir do momento que os autores aeraram o material filtrante, não foi constatada diferença significativa na estratificação microbiana.

Ragusa et al. (2004) desenvolveram experimentos em escala de bancada, com colunas simulando um WCVD para avaliar a quantidade de proteínas, polissacarídeo, células viáveis do biofilme e a ação das enzimas desidrogenase. Os autores comprovaram um tempo superior a 100 dias para o estabelecimento da comunidade microbiana nesses sistemas, ficando evidente a alta atividade microbiana no primeiro centímetro do material filtrante, e a grande diminuição em uma profundidade de 4,5 cm.

Tietz et al. (2007a) através da determinação da abundância da biomassa bacteriana por contagem direta por microscopia e medição de volume celular, em um WCVD utilizando areia como material filtrante, verificaram que aproximadamente 50 % da atividade microbiana estava concentrada no primeiro centímetro da areia e 95 % da microbiota concentrava-se nos demais 10 cm da areia. Contudo, os autores concluíram que a atividade bacteriana do módulo nos 10 primeiros cm foi responsável por apenas 15 a 23 % da atividade microbiana total, o que demonstra a insuficiência de conhecimento e esclarecimentos quanto se trata da ecologia microbiana nesses sistemas.

Salomo et al. (2009) avaliaram a influência das raízes das macrófitas e da estrutura do material filtrante, na diversidade metabólica microbiana. Nas primeiras camadas do filtro, onde encontrava-se a rizosfera, fontes de carbono facilmente degradáveis como carboidratos foram utilizados, enquanto que nas camadas mais profundas do filtro, compostos inertes foram sintetizados.

Adrados et al. (2014) identificaram a comunidade microbiana procariota (bactérias e arqueas) por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) de três diferentes sistemas, WCVD, WCH e um biofiltro, operados no tratamento de esgoto doméstico na Dinamarca. Foi identificado variação populacional em cada sistema, sendo que o grupo γ -proteobactérias e bacteroides estavam presentes em todos eles, enquanto que o filo firmicutes foi observado no WCH e no biofiltro. Ainda, os autores identificaram menor atividade de arqueas quando comparadas à população bacteriana nos sistemas. Com base nos resultados do DGGE, verificaram que a estrutura da comunidade bacteriana estava relacionada com a concepção do sistema e o carregamento de matéria orgânica, enquanto que não observaram relação entre a comunidade microbiana e as características químicas de cada afluente estudado.

Foladori et al. (2015) quantificaram a abundância de bactérias viáveis e mortas no afluente, efluente e no material filtrante (areia) de um WCVD, em diferentes profundidades do perfil vertical do WC. O número de bactérias viáveis nos primeiros 10 cm foi 3,7 vezes maior que nas camadas mais profundas (de 40 a 50 cm). Enquanto que no efluente, a relação entre bactérias viáveis e mortas foi de 3,3 indicando o enriquecimento de bactérias viáveis com a passagem do efluente no maciço filtrante.

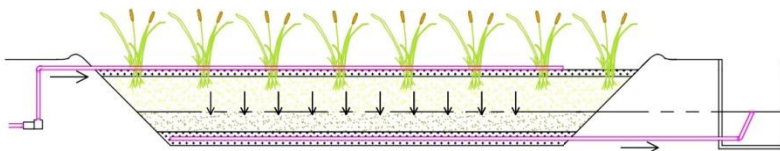
Jia et al. (2016) avaliaram o impacto da estratégia de alimentação (contínua ou intermitente) sobre o desempenho de remoção de contaminantes e na estrutura da comunidade microbiana em WCVD. Quanto ao desempenho de tratamento, a alimentação intermitente foi benéfica para remoção de nutriente e matéria orgânica carbonácea. A diversidade bacteriana diminuiu com o aumento da profundidade do filtro, e a alimentação intermitente favoreceu o crescimento microbiano, devido a maior presença de oxigênio no meio.

2.1.2 *Wetland* construído vertical descendente de fundo saturado (WCVD –FS)

O *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado (WCVD-FS) possui os mesmos princípios de tratamento que o WCVD. A principal estratégia dos WCVD-FS é proporcionar maior remoção de nitrogênio, buscando não somente a nitrificação, como é o caso dos WCVD, mas a nitrificação seguida da desnitrificação em uma única unidade (SILVEIRA et al., 2015). Para isso, proporciona-se uma saturação de fundo por meio da elevação do controlador de nível, originando condições anaeróbias/anóxicas no fundo do filtro, e condições aeróbias na superfície, promovendo ambientes oxidativos e redutores em um mesmo módulo (Figura 3)

Devido à ausência de indução de energia adicional, como ocorre nos WC intensificados, aliado à alimentação intermitente e aplicada na direção vertical, entende-se que o WCVD-FS é uma modificação do WCVD, sendo considerado desta forma neste trabalho.

Figura 3 – Esquema representando o *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado.



Fonte: Acervo GESAD.

Muitos dos estudos conduzidos em WCVD-FS, existentes até o momento, remetem-se ao sistema francês. Dessa forma, os carregamentos orgânicos e hidráulicos, bem como as condições

operacionais desses sistemas, quando empregados em nível de tratamento secundário, ainda não estão elucidados. Silveira et al. (2015) avaliaram duas alturas de saturação de fundo (0,15 e 0,25 m) e mostraram que a melhor remoção de nitrogênio (57 % de nitrificação e 85 % de desnitrificação) está vinculada com 0,25 m de saturação. Dong; Sun (2007) proporcionaram uma saturação de fundo de 0,55 m em um WCVD-FS, com 0,25 m não saturado, e reportaram remoções médias de 37 % de NT e 33 % de N-NH₄. Em outro estudo, Prigent et al. (2013) não identificaram diferença de remoção de nitrogênio em dois WCVD-FS com saturação de 0,20 e 0,40 m, ao tratar esgoto bruto com recirculação. Os autores observaram um TRH de 0,7 dia sem recirculação e 0,4 dia com 100 % de recirculação, sugerindo que o TRH mínimo necessário para a desnitrificação seja maior de que 0,4 dia.

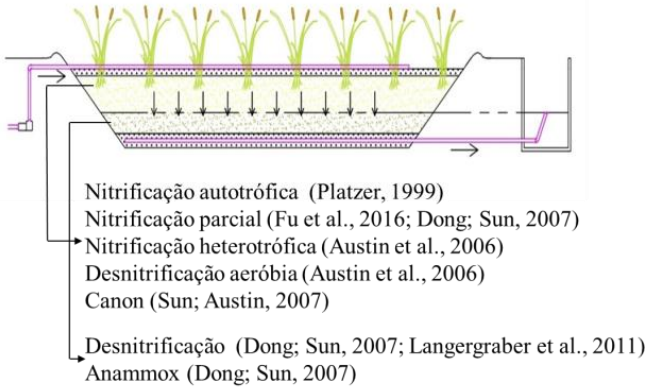
No Brasil, poucos são os estudos conduzidos nesse tipo de sistema. Trein et al. (2015), em um WCVD-FS com 0,25 m de saturação de fundo (3,141 m² de área superficial), empregado no tratamento de esgoto sanitário de um condomínio residencial, relatam que sob um carregamento de 1,9 g DQO m⁻² d⁻¹ e uma taxa hidráulica (TH) de 12 mm d⁻¹, obtiveram remoções de 93 % de DQO, 88 % DBO e 83 % para SST. Em outro estudo conduzido em escala de bancada, em colunas de areia simulando o perfil vertical de WCVD-FS, Santos et al. (2016), recomendam uma altura de saturação de fundo de 0,4 m e um carregamento de 41 g DQO m⁻² d⁻¹. Sob essas condições, a eficiência de remoção foi de 90 % para DQO, 95 % para SST, 68 % para N-NH₄ e 46 % para NT.

2.2 REMOÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DO NITROGÊNIO EM WCVD E WCVD-FS

A nitrificação e desnitrificação clássica são as principais vias de transformação e remoção do nitrogênio em WC (SAEED; SUN, 2012). Contudo, levando em consideração a região aeróbia de um WCVD e a anaeróbia/anóxica de um WCVD-FS, várias são as vias de transformação do nitrogênio passíveis de se desenvolver nesses sistemas (Figura 4). Atualmente, pode-se evidenciar além da clássica nitrificação e desnitrificação, a nitrificação e desnitrificação parcial, Anammox (do inglês *anaerobic ammonium oxidation*), o processo Canon (do inglês *complete autotrophic nitrogen removal over nitrite*), a nitrificação heterotrófica, a desnitrificação aeróbia, e nitrificação e desnitrificação

simultâneas.

Figura 4 – Vias de transformação do nitrogênio destacadas na literatura, passíveis de ocorrer em *wetland* construído vertical descendente e vertical de fundo saturado.



Nesses sistemas, a magnitude das transformações e remoções do nitrogênio, incluindo a amonificação, nitrificação, desnitrificação, volatilização da amônia, assimilação pelas macrófitas, assimilação pela biomassa microbiana e adsorção pelo material filtrante, são variáveis, dependente das condições internas e externas das unidades de tratamento (VYMAZAL 2007; SAEED; SUN 2012).

2.2.1 Adsorção no material filtrante

O nitrogênio amoniacal não ionizado pode ser removido nos WC, através de reações de adsorção ao material filtrante, porém não de forma permanente, pois a mesma pode novamente ser liberada quando as condições químicas do meio líquido variarem, ou seja, quando ocorre a dessorção (IWA, 2000).

Nos WCVD alimentados intermitentemente, geralmente ocorre a nitrificação do nitrogênio amoniacal adsorvido em função da depleção da amônia nos períodos de repouso. Cooper et al. (1996) relataram que apenas sistemas de alimentação intermitente demonstram rápida remoção de amônia da massa líquida, devido à adsorção do material filtrante. Contudo, a adsorção do nitrogênio amoniacal no material filtrante não é um processo de remoção por completo, é apenas um

armazenamento temporário, principalmente quando se utiliza areia como material filtrante, pois a mesma apresenta baixa capacidade adsorviva.

Estudo como o de Austin (2006b) demonstrou a importância da capacidade de troca catiônica dos elementos utilizados como material filtrante, pois cátions de amônia são adsorvidos em compostos com cargas negativas. Segundo o autor, a capacidade de troca catiônica deve ser um parâmetro crítico de projeto em sistemas, cujo objetivo é maximizar a remoção do nitrogênio amoniacal. Gorra et al. (2007), após estudarem diversos materiais filtrantes em sistemas tipo WC, relataram que as zeólitas mostraram ser um material filtrante apropriado, principalmente, pela sua porosidade e alta tolerância às temperaturas extremas, favorecendo a aderência de bactérias oxidantes de amônia.

2.2.2 Assimilação pelas macrófitas

A assimilação do nitrogênio pelas macrófitas consiste em uma série de processos biológicos que convertem o nitrogênio inorgânico a nitrogênio orgânico, o qual é utilizado para a síntese de novas células, sendo que posteriormente, ocorre à formação de tecidos, o qual está associado ao crescimento das macrófitas (KADLEC; WALLACE, 2009)

As formas de nitrogênio assimilado pelas plantas são o nitrogênio amoniacal e o nitrogênio nitrato. As espécies de plantas diferem do composto a ser assimilado, dependendo da disponibilidade do mesmo no solo. Contudo, a amônia por ser mais reduzida energeticamente que o nitrato torna-se fonte preferencial, apesar disso, em ambientes onde o nitrato prevalece, o mesmo torna-se a principal fonte de nitrogênio assimilável (VYMAZAL, 2005).

Em WC, a assimilação pela biomassa vegetal pode contribuir ainda para a remoção de nitrogênio. Vários estudos mostraram a importância da assimilação pelas macrófitas na remoção do nitrogênio.

Na literatura brasileira há vários estudos e diversificados valores quanto à assimilação de nitrogênio pelo tecido foliar das macrófitas. Fia et al. (2011) mostraram uma assimilação de nitrogênio pelas plantas na faixa de 44,3 a 54,0 g m⁻² ano⁻¹, Matos et al. (2010) observaram valores máximos de 35,6 g m⁻² ano⁻¹, Pelissari et al. (2014) relataram uma remoção média de 9,36 g m⁻² ano⁻¹.

No entanto, cabe ressaltar que a decomposição do material vegetal pode aumentar a concentração de nutrientes no meio, além disso, as concentrações de nitrogênio no tecido vegetal tendem a ser mais altas

no início do crescimento, porém, com o começo da senescência o valor de assimilação tende a reduzir, ressaltando assim, a necessidade da poda constante, para maximizar a remoção deste elemento no sistema. Pelissari et al. (2014) sugeriram que a poda das macrófitas seja realizada em torno de 60 a 90 dias após o plantio, para evitar assim, a liberação de nutrientes novamente no meio.

Vymazal (2005) relatou um potencial de retirada de nitrogênio via assimilação pelas macrófitas e a subsequente poda sob condições de clima tropical e subtropical na ordem de até 10 % do total de nutrientes removidos nos WC. Segundo Brix (1997), a quantidade de nitrogênio que pode ser removida através da poda é de 200 a 2.500 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ (0,05 a 0,68 g N m⁻² d⁻¹).

2.2.3 Assimilação microbiana

O processo de imobilização do nitrogênio nas células microbianas, ou seja, a assimilação pela biomassa microbiana é pouco discutida na literatura. Segundo Saeed; Sun (2012) grande quantidade de matéria orgânica é consumida do meio pelo crescimento e respiração da microbiota, dessa forma a assimilação pela biomassa microbiana pode ter um papel significativo na remoção do nitrogênio, considerando que o nitrogênio constitui um fator importante da biomassa microbiana, com 12,4 % da composição C₅H₇O₂N (CANNON et al., 2000).

Tietz et al. (2008) quantificaram os teores de N composto na biomassa microbiana pelo método de fumigação e extração em 8 unidades pilotos de WCVD, com areia como material filtrante. Segundo o autor, os teores de N na biomassa microbiana diminuem de 300 µg g⁻¹ de solo seco na primeira camada do material filtrante (até 1 cm de profundidade) para 18 µg g⁻¹ de solo seco nos 20 cm de profundidade. Abaixo dessa profundidade o N na biomassa microbiana foi inferior ao limite de detecção.

Sun et al. (2005) estudaram um WCVD alimentado com dejetos de suínos diluído, e relataram que a assimilação de nitrogênio via biomassa poderia ter desempenhado um processo importante na remoção do nitrogênio, visto que a nitrificação correspondeu a valores inferiores a 10 % da remoção do nitrogênio amoniacal, enquanto que a remoção total de amônia variou entre 27 e 48 %.

2.2.4 Volatilização do nitrogênio amoniacal

A volatilização do nitrogênio amoniacal é um processo físico-químico e está associado ao pH do meio. Em condições de pH inferiores a 7,5 a volatilização do nitrogênio amoniacal é insignificativa, sob valor de pH igual ou superior a 9,3 a relação entre os íons de amônio e amônia é de 1:1, sendo assim, as perdas por volatilização são significativas (METCALF; EDDY, 2003).

Em WC de escoamento superficial esse mecanismo é elevado em função da atividade fotossintética das algas, podendo ser responsável por uma remoção de até $2,2 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (VYMAZAL, 2007). Nos WC de escoamento subsuperficial, como o caso dos WCVD, esse mecanismo é quase desconsiderado. Nesses sistemas o íon amônia (NH_3) encontra-se em apenas em 0,6 % do total de amônia presente no meio (KADLEC; WALLACE, 2009).

2.2.5 Amonificação

A amonificação é o processo no qual o nitrogênio orgânico é convertido a nitrogênio inorgânico (especialmente a nitrogênio amoniacal). Uma grande fração do nitrogênio orgânico (até 100 %) pode ser convertido a nitrogênio amoniacal (USEPA, 1993). O nitrogênio orgânico pode ser convertido a amônio (NH_4) ou amônia (NH_3), dependendo da faixa de pH (próximo da neutralidade prevalece o surgimento de amônio e dióxido de carbono). A faixa ótima de pH para o processo de amonificação encontra-se entre 6,5 e 8,5 (USEPA, 1993).

A cinética do processo de amonificação é mais rápida que a cinética de nitrificação, portanto, esse mecanismo nos WCVD ao longo do percurso do escoamento pode influenciar no aumento das concentrações do nitrogênio amoniacal (KADLEC; WALLACE, 2009).

2.2.6 Nitrificação

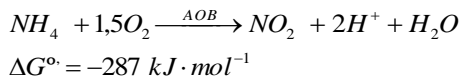
O processo convencional da nitrificação é conhecido como a oxidação do nitrogênio amoniacal (N-NH_4) a nitrato (N-NO_3), tendo como produto intermediário o nitrito (N-NO_2), utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons.

A nitrificação por completo dá-se por meio de duas fases, a nitrificação e a nitratação, sendo que ambas as fases são geralmente

realizadas por micro-organismos autotróficos, quimiolitotróficos e aeróbios obrigatórios, que utilizam o carbono inorgânico (CO₂) para síntese de novas células.

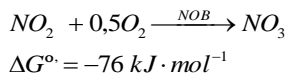
Os principais grupos pertencentes ao domínio bactéria envolvidos nesses processos classificam-se dentro das classes α , β , e γ -*Proteobactéria*, sendo as *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosolobus* responsáveis pela nitrificação e, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* responsáveis pela nitratação (SCHMIDELL et al., 2007). Além disso, um estudo recente mostrou que linhagens de *Nitrospira* geralmente conhecida como oxidantes de nitrito, pode codificar as vias de oxidação, tanto da amônia quanto de nitrito, realizando a nitrificação completa (DAIMS et al., 2015).

Em uma primeira etapa no interior da membrana citoplasmática ocorre a oxidação da amônia a hidroxilamina (NH₂OH), por meio da ação da enzima amônia *mono-oxigenase*, tendo como necessidade oxigênio molecular e energia para promover a reação (USEPA, 1993). Enquanto que na segunda etapa, a hidroxilamina é transportada para o periplasma e convertida a nitrito, através da ação da enzima *hidroxilamina-oxiredutase*, liberando dois pares de elétrons (Equação 1). Um desses pares de elétrons é utilizado para a oxidação da amônia, enquanto que o segundo par é utilizado para a produção de energia e a redução do oxigênio molecular em água (HAGOPIAN, RILEY, 1998).



Equação 1

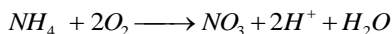
A nitratação é realizada pela enzima *nitrito-oxidoreductase*. Essa reação libera um par de elétrons, o qual é utilizado na produção de energia e a redução do oxigênio molecular em água, conforme descrito na Equação 2 (HAGOPIAN, RILEY, 1998).



Equação 2

Para 1 g de NH₄ convertido, 4,6 g O₂ são consumidos, 0,16 g de novas células são formadas, 7,07 g de alcalinidade na forma de CaCO₃

são consumidos e 0,08 g de carbono inorgânico é utilizado na formação de novas células (USEPA, 1993). A expressão estequiométrica global da nitrificação é obtida a partir da soma das Equações 1 e 2, resultando na Equação 3.



Equação 3

Vários fatores podem influenciar no processo de nitrificação, destacando-se: oxigênio dissolvido, temperatura e o pH.

-pH: Valores entre 7,5 e 8,6, são considerados como ideais para a nitrificação (WPC, 1983). O desempenho da nitrificação diminui drasticamente com a queda do valor do pH. Além disso, valores altos de pH também podem inibir o processo, pois a alta concentração de amônia livre é tóxica para microbiota associada a esse processo. O ideal é manter o valor do pH entre 7,2 e 8,2 (WPC, 1983). Cabe ressaltar que o valor pH no processo é importante porque a nitrificação consome alcalinidade (caso a alcalinidade seja um fator limitante, ocorre a redução do pH, e a inibição da nitrificação).

-Temperatura: A faixa ótima de nitrificação ocorre entre 28 e 36 °C (WPC, 1983). Segundo Cookson et al. (2002), comunidades nitrificantes podem se adaptar às mudanças de temperatura e podem manter suas atividades em temperaturas mais baixas, devido a adaptação metabólica. Com temperaturas menores de 15 °C têm-se uma considerável diminuição nas taxas de conversão, sendo a faixa de 4 a 5 °C o mínimo de temperatura para que ocorra a nitrificação (USEPA, 1983).

-Oxigênio dissolvido: baixas concentrações de oxigênio dissolvido ($< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) podem inibir a nitrificação, gerando nitrificação incompleta e acarretando no acúmulo de nitrito (USEPA, 1983). Paredes *et al.* (2007a) relataram que a oxidação do nitrito é inibida quando a concentração de oxigênio é menor que $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em sistemas de tratamento de esgoto.

A dinâmica das bactérias oxidantes de amônia (do inglês *ammonia-oxidizing bacteria* – AOB) e das bactérias oxidantes de nitrito (do inglês *nitrite-oxidizing bacteria* – NOB) está vinculada principalmente com as condições do meio. *Nitrosospira* e *Nitrospira*

utilizam baixas concentrações de substratos mais eficientemente que as *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (SCHRAMM et al., 1996). Conforme o modelo de Andrews; Harris (1986) *Nitrosospira* e *Nitrospira* são consideradas K-estrategistas (apresentam crescimento mais lento, porém têm maior afinidade pelo substrato), enquanto que *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são r-estrategistas (apresentam taxas de crescimento específico maiores, porém, com menor afinidade pelo substrato).

Durante mais de um século as AOB foram consideradas as principais responsáveis pela nitrificação. Contudo, foi descoberto que a oxidação da amônia, também, pode ser realizada por arqueas autotróficas. As arqueas oxidantes de amônia (do inglês *ammonia-oxidizing archaea* - AOA) podem desempenhar um papel relevante na nitrificação (SPANG et al., 2010). Dentre elas, o filo *Crenarchaeota* e *Thaumarchaeota* (abundante em diversos ambientes) expressam o gene *amoA*, codificado pela enzima *mono-oxigenase* que catalisa o primeiro passo da oxidação da amônia (KONNEKE et al., 2005). Baseado na expressão do gene *amoA*, os gêneros *Nitrosopumilis*, *Nitrososphaera*, *Nitrosocaldus*, *Nitrosotalea* e *Nitrososphaera* são conhecidos como os principais AOA (PESTER et al., 2012; MUNZ et al., 2012).

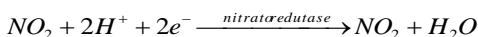
Existem evidências que a afinidade por amônia pode diferenciar o crescimento entre AOA e AOB (VERHAMME et al., 2011). Limpiyakorn et al. (2011) mostraram que AOA são mais abundantes que AOB em estações de tratamento onde as concentrações de amônia afluyente são baixas (concentrações de 0,2 a 11 mg L⁻¹). Além disso, a influência das concentrações de oxigênio na comunidade AOA está parcialmente esclarecida. Erguder et al. (2009) sugeriram que AOA podem tolerar uma ampla gama de concentrações de oxigênio, até mesmo, concentrações muito baixas (<3,1 µM a 0,2 µM). Inclusive, baixas concentrações de oxigênio podem ser um dos fatores determinantes para a atividade de AOA em relação à AOB. Estudos realizados com culturas isoladas da AOA *Candidatus Nitrosopumilus maritimus*, mostrou que a constante de saturação (K_s) de oxigênio foi de 3,9 µM (MARTENS-HABBENA et al., 2009), enquanto que, para a AOB *Nitrosomonas europea*, os valores foram na ordem de 6,9 a 17,4 µM (LAANBROEK et al., 1994).

A interação entre AOA, AOB e NOB nos nichos ecológicos ainda é pouco conhecida. Atualmente, *Nitrospira* (NOB) é conhecida como um gênero que possui espécies que se adaptam á diferentes condições ambientais (GRUBER-DORNINGER et al., 2015). Em uma descoberta recente, identificou-se que algumas linhagens de *Nitrospira*

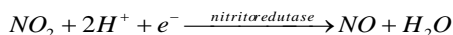
são capazes de realizar tanto a oxidação da amônia, quanto a oxidação do nitrito (SANTORO, 2016; DAIMS, et al., 2015). Essa descoberta foi chamada de Commamox (do inglês *complete ammonium oxidizer*). Dada à diversidade metabólica de *Nitrospira*, esse processo pode ocorrer em sistemas de tratamento de esgoto. Um estudo realizado em biorreatores mostrou que Commamox poderia ser favorecido em baixas temperaturas, baixas concentrações de nitrogênio e oxigênio dissolvido elevado (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2016).

2.2.7 Desnitrificação

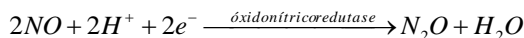
A desnitrificação propriamente dita é definida como a redução de nitrato e/ou nitrito ao nitrogênio gasoso, tendo como produtos intermediários nitrito (no caso da redução do nitrato), óxido nítrico e óxido nitroso. Cada produto formado é catalisado por uma enzima redutase específica, a qual é sintetizada quando as condições ambientais se tornam anóxicas. As enzimas envolvidas no processo de desnitrificação são: *nitrato redutase* (reação de redução do nitrato a nitrito - Equação 4), *nitrito redutase* (reação de redução do nitrito a óxido nítrico - Equação 5), *óxido nítrico redutase* (reação de redução do óxido nítrico a óxido nitroso - Equação 6) e *óxido nitroso redutase* (reação de redução do óxido nitroso a nitrogênio gasoso – Equação 7) (SCHMIDELL et al., 2007). Na equação 8 apresenta-se os genes expressos por cada enzima associada com o processo de desnitrificação.



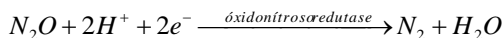
Equação 4



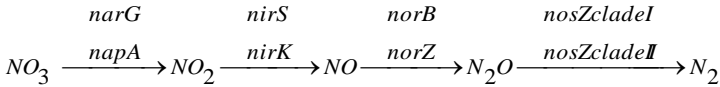
Equação 5



Equação 6



Equação 7



Equação 8

Cada etapa envolvida na desnitrificação pode ser inibida condicionalmente, fazendo com que produtos intermediários possam ser dissolvidos em água ou ainda escapar para a atmosfera (WIESMANN et al., 2007).

Esse processo é realizado por um amplo grupo de micro-organismos (distribuídos nos domínios Bactérias, Arqueas), de forma geral, esses micro-organismos são capazes de utilizar o nitrato/nitrito como aceptor final de elétrons, em condições de anaerobiose como alternativa ao oxigênio dissolvido (SCHMIDELL et al., 2007).

A maioria das bactérias desnitrificantes pertence às subclasses γ , α , e β *Proteobacteria*, sendo que a maior parte delas são aeróbias facultativas heterotróficas, ou seja, necessitam de uma fonte de carbono orgânico. Dentre as bactérias gram-negativas os gêneros mais frequentes são *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Thauera* e *Brachymonas*. Também, são reportados gêneros gram-positivos como *Bacillus* e *Jonesia*, contudo em menor frequência (SCHMIDELL et al., 2007). Além de bactérias heterotróficas, a desnitrificação pode ser realizada por bactérias autotróficas, como é o caso da AOB *Nitrosomonas europaea* (SCHMIDT et al., 2004).

Comparadas com as bactérias nitrificantes, as bactérias desnitrificantes são menos sensíveis às condições ambientais. Desta forma, quando a nitrificação se desenvolve, a desnitrificação também é possível (VAN HAANDEL et al., 2009). Entretanto, a presença de carbono biodegradável é o fator ambiental mais importante para a ocorrência do processo de desnitrificação.

A concentração de oxigênio dissolvido pode inibir completamente a desnitrificação para concentrações na ordem de 0,2 mg L⁻¹, sendo que as condições mais favoráveis são pH no valor de 8 e a temperatura de 35 °C. Nessas condições, as velocidades específicas de crescimento atingem valores na ordem de 3 a 6 dias (SCHMIDELL et al., 2007).

2.2.8 Nitrificação e desnitrificação simultâneas

Uma das alternativas para otimizar o processo de remoção biológica de nitrogênio é a nitrificação e desnitrificação simultâneas (do inglês *simultaneous nitrification and denitrification* – SND), a qual elimina a necessidade de reatores separados com condições específicas, simplificando o sistema de tratamento (ANTILEO et al., 2007).

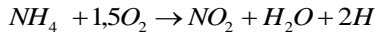
Do ponto de vista físico, esse processo é realizado dentro do biofilme, em função do gradiente de oxigênio. A atividade da comunidade microbiana nitrificante concentra-se em áreas que possuem maior concentração de oxigênio, enquanto que, os organismos desnitrificantes estão ativos onde as concentrações de oxigênio são limitantes ou quase nulas. No entanto, as condições nas quais ocorrem uma eficiente SND ainda não estão totalmente esclarecidas (CHIU et al., 2007).

Em WC nitrificação e desnitrificação simultâneas vem sendo mostrada em WCV (*wetland* construído vertical) integrados, que consiste em um leito de WCV com fluxo descendente (WCVD) seguido de um WCV com fluxo ascendente operado em série. Um estudo realizado com unidades em escala laboratorial de WCV integrados, demonstrou a presença do gene *amoA* expresso no processo de oxidação do nitrogênio amoniacal por AOB e por Anammox, e os genes *nirS* e *nosZ* expressos no processo de desnitrificação (HU et al., 2016).

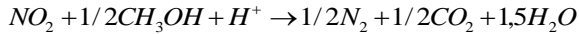
O mesmo comportamento foi identificado por Fu et al. (2016), também em WCV integrados. Por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) foi identificado a existência de nitrificação e desnitrificação simultâneas, pela presença dos genes expressos no processo da nitrificação e desnitrificação. Além desse processo, os autores descrevem a presença de nitrificação e desnitrificação parcial.

2.2.9 Nitrificação - desnitrificação parcial

Esse processo está associado com a conversão do nitrogênio amoniacal a nitrito (Equação 9) e, posteriormente, o processo de desnitrificação a partir do nitrito formado (Equação 10). A produção do nitrato nesse processo é inibida devido à limitação de oxigênio (JIANLONG; NING, 2004).



Equação 9



Equação 10

Com a nitrificação e desnitrificação parcial é possível obter vantagens em relação à nitrificação e desnitrificação convencional. Em primeiro lugar, a demanda de oxigênio é menor (cerca 25 % menos comparada com a nitrificação via nitrato) e, em segundo lugar, a taxa de desnitrificação via nitrito é geralmente de 1,5 a 2 vezes mais rápido que a desnitrificação via nitrato (JIANLONG; NING, 2004).

Nos WC, geralmente os casos de nitrificação e desnitrificação parcial reportados remetem-se aos WCH (ZHANG et al., 2011; 2010). Em WCVD, Fu et al. (2016) comprovaram a existência dessa via de transformação do nitrogênio em um WCV integrado. Esse sistema era composto por um WCVD com fluxo descendente e um WCV com fluxo ascendente em série. A remoção de NT variou entre 55 a 90 %. Por meio da técnica de qPCR empregando *primers* para identificar os genes expressos durante o processo da nitrificação e desnitrificação foi demonstrado maior abundância dos genes *amoA* (expresso durante o processo de oxidação do nitrogênio amoniacal) e *NirS* (expresso durante o processo de desnitrificação), indicando o processo de nitrificação e desnitrificação parcial.

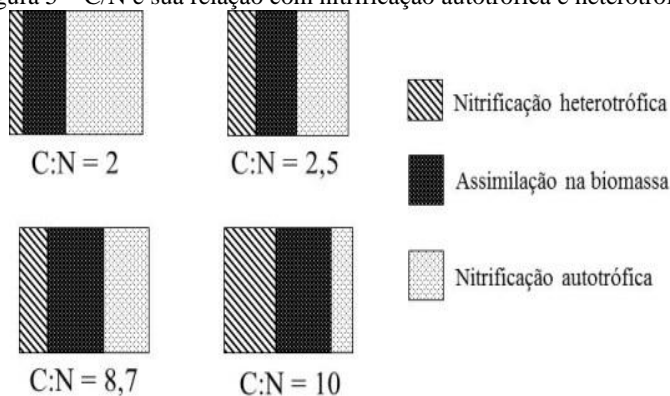
2.2.10 Nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia

Uma questão bastante promissora para o tratamento biológico de efluentes reside no fato da nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbia serem processos vinculados um ao outro (RICHARDSON, 2000).

A primeira bactéria isolada com habilidade de realizar a nitrificação heterotrófica e ainda a desnitrificação em condições aeróbias foi a *Thiosphaera pantotropha* (ROBERSTON et al. 1988), após a *T. Pantotropha* outras bactérias foram isoladas, tais como, *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Camamonas*, *Thauera mechernichensis*, *Paracoccus versutus*, *Paracoccus denitrificans*, *Providencia rettgeri* YL, *Vibrio diabolicus* (DUAN et al., 2015, ZHANG et al., 2011; TAYLOR et al., 2009; JOO et al., 2005; BOTHE et al., 2000; MOIR et al., 1996).

As bactérias nitrificantes heterotróficas e desnitrificantes aeróbias possuem o metabolismo mixotrófico, e são abundantes em águas residuárias, lodos de esgoto e no solo (JOO et al., 2005; MOIR et al., 1996). A nitrificação heterotrófica e a desnitrificação aeróbia são fortemente influenciada pela relação C/N (Figura 5). Van Neil et al. (1993) estudaram a competição entre a *T. pantotropha* e a *Nitrosomonas europae*, e variaram a relação C/N entre 1,9 e 10,4. A maior relação C/N favoreceu o crescimento da *T. pantotropha*.

Figura 5 – C/N e sua relação com nitrificação autotrófica e heterotrófica.

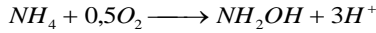


Fonte: Adaptado de Kuenen ; Robertson (1994).

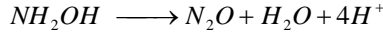
Geraats et al. (1990) relataram que a atividade específica das bactérias que realizam a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia pode ser 10^3 a 10^4 vezes menor que a nitrificação autotrófica. Contudo, a taxa de crescimento de organismos heterotróficos tende a ser maior em relação aos autotróficos, como por exemplo, a *T. pantotropha* que possui uma taxa de crescimento (μ_{\max} de 0,4 h), relativamente maior a *Nitrosomonas europaea* (μ_{\max} de 0,0 a 0,05 h) (ROBERTSON et al., 1988).

A estequiometria da nitrificação heterotrófica (oxidação do nitrogênio amoniacal - Equação 11, oxidação da hidroxilamina em condições anóxicas - Equação 12 e oxidação da hidroxilamina em condições aeróbias - Equação 13), conforme demonstrado por Moir et al. (1996), inicia-se pela oxidação do nitrogênio amoniacal a hidroxilamina. Sob condições anóxicas, o produto exclusivo dessa reação é o óxido nitroso. Por outro lado, sob condições aeróbias, o

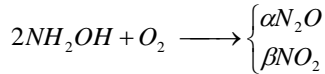
nitrito e o óxido nitroso são os produtos finais. Contudo, essa proporção ainda é desconhecida (WALLACE; AUSTIN, 2008).



Equação 11



Equação 12



Equação 13

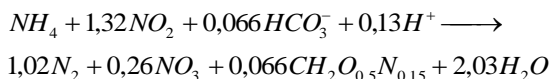
Nas bactérias desnitrificantes da via clássica, a desnitrificação somente ocorre se for mobilizada a enzima *nitrito redutase* (*nar*), sob condições de anóxia, sendo que a presença de oxigênio inibe a ação da mesma. Em contraste na desnitrificação aeróbia, as bactérias possuem ótima flexibilidade respiratória, pois os mesmos possuem genes que codificam três enzimas oxidases bioquimicamente distintos, além de utilizar oxigênio, nitrato e nitrito simultaneamente (RICHARDSON, 2000).

O organismo modelo da via metabólica da desnitrificação aeróbia que, também, é nitrificante heterotrófico é o *Paracoccus denitrificans*. Esta bactéria sobrevive e prolifera-se em regiões oxidativas, micro-oxidativas e anóxicas e adaptam-se rapidamente às variações do ambiente (RICHARDSON, 2000; ROBERTSON; KUENEN 1990). Segundo Nokhal; Schelegel (1983), a *P. denitrificans* é uma bactéria gram-negativa, heterotrófica, cocóidal, pertencente aos membros da α -proteobactéria, tem capacidade de crescimento versátil em condições aeróbias e anaeróbias, mas cresce preferencialmente em meios aeróbios, com taxas ótimas de crescimento sob valor de pH de 7,6 e temperatura de 36 °C. Além do mais, essa bactéria pode utilizar nitrito, nitrato, oxigênio e óxido nitroso, simultaneamente como aceptor de elétrons (BAUMANN et al., 1996; STOUTHAMER 1991).

2.2.11 Anammox

O processo de oxidação anaeróbia de amônia (Anammox) é uma das novas tecnologias para a remoção de nitrogênio. Nesse processo, o nitrogênio amoniacal é convertido a nitrogênio gasoso por bactérias

oxidantes anaeróbias com o nitrito atuando como aceptor de elétrons, sob condições anóxicas (GRAAF et al., 1997). Diferentes produtos intermediários, tais como hidroxilamina e hidrazina são formados durante o processo, conforme demonstrado na Equação 14.



Equação 14

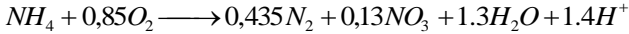
Os organismos Anammox estão classificados no filo dos *Planctomycetes*, sendo *Candidatus Brocadia Anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*, e *Candidatus Jettenia asiatica* os identificados capazes de realizar essa via de transformação do nitrogênio (KARTAL et al., 2007; QUAN et al., 2008). Em comparação com os processos de nitrificação e desnitrificação convencional, as vantagens do processo Anammox são: (i) não necessitam de fontes de carbono externas; (ii) menor demanda de oxigênio; (iii) menor consumo de energia (JETTEN et al., 2000).

Em CW, o processo Anammox foi reportado em várias modalidades de reatores. Estudos realizados por Paredes *et al.* (2007b) em WCH mostraram que essa via pode maximizar a remoção de nitrogênio entre 5 a 10 vezes em relação à via convencional. Em WCV integrados (fluxo descendente e ascendente em série), essa via de remoção de nitrogênio vem sendo fortemente evidenciada em associação com nitrificação e desnitrificação convencional (FU et al., 2016; HU et al., 2016). Em WCVD-FS, Anammox foi descrito por Dong; Sun (2007). Segundo os autores, nitrificação parcial e Anammox podem ser uma via passível de se desenvolver nesses sistemas, promovendo uma maior remoção de nitrogênio total.

2.2.12 Canon

O processo Canon (do inglês *completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*) é resultado da combinação dos processos de nitrificação via nitrito e Anammox, sendo desenvolvido em um único reator aerado e mediado por dois grupos de bactérias (AHN, 2006).

Em um primeiro momento, AOB oxidam a amônia a nitrito (Equação 1), consumindo oxigênio do meio e criando condições anaeróbias para que posteriormente, bactérias anaeróbias da ordem *Planctomycetales* possam remover efetivamente o nitrogênio. A reação global do processo Canon é representada pela Equação 15.



Equação 15

O processo Canon, é uma opção econômica e eficiente para tratamento de águas residuárias, especialmente para aquelas que apresentam elevadas concentrações de nitrogênio na forma de amônia e baixas concentrações de nitrogênio orgânico (KHIN; ANNACHHATRE, 2004).

Em WC a remoção de nitrogênio através desse processo foi reportada por Sun; Austin (2007) em um WCVD. Os autores observaram uma perda de aproximadamente 52 % de nitrogênio, a qual não poderia estar associada com a clássica nitrificação e desnitrificação. Por meio de um balanço de massa, foi identificado que o processo Canon foi a principal via de transformação do nitrogênio. Com esses resultados, os autores reportam que o processo Canon pode ser uma importante via de remoção de nitrogênio em WC com altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixas concentrações de DBO.

2.3 AVANÇOS DA ENGENHARIA NA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM WCVD E WCVD-FS

Os WCVD são considerados uma tecnologia consolidada no contexto da nitrificação. Muitos estudos foram conduzidos para elucidar os limites e possibilidades de carregamentos orgânicos e hidráulicos associados com a transformação do nitrogênio.

Platzer (1999) propôs um modelo de dimensionamento para WCVD utilizando areia como material filtrante, contendo um diâmetro efetivo (d_{10}) superior ou igual a 0,20 mm e o Coeficiente de uniformidade (Cu) ≤ 5 . Nesse modelo, a taxa hidráulica aplicada (TH) foi considerada o parâmetro chave, a qual está associada com a transferência de oxigênio no maciço filtrante. Para o modelo, foi proposto que a entrada de oxigênio deve ser superior à demanda (oxidação da matéria orgânica carbonácea e nitrificação). As entradas de oxigênio foram consideradas por meio de convecção e difusão do ar

atmosférico no interior da massa filtrante. Com base nos resultados obtidos, sob uma TH de até 250 mm d⁻¹ e uma carga de até 6,5 g NTK m⁻² d⁻¹, foi possível remover até 85 % de DQO e obter efetiva nitrificação.

Para complementar o modelo de transferência de oxigênio proposto por Platzer (1999), em um WCVD operado sob uma TH de 80 mm d⁻¹, com 4 alimentações diárias e areia como material filtrante, Kayser; Kunst (2005) mostraram que no intervalo de aplicação entre os pulsos de alimentação, o maciço filtrante do WCVD permaneceu aeróbio, indicando uma boa difusão de oxigênio nesse período.

Brix; Arias (2005) definiram critérios dinamarqueses de dimensionamento com vistas a remoção de 95 % de DBO e 90 % de nitrificação para WCVD, destacando-se uma demanda de área superficial de 3,2 m²/PE, profundidade efetiva do *wetland* de 1,0 m, o emprego da areia como material filtrante (d₁₀ entre 0,25 e 1,2 mm e Cu ≤ 3,5), um tratamento primário a montante e a recirculação à unidade de tratamento primário a montante do *wetland* para a promoção da desnitrificação.

Considerando as condições para clima subtropical, Sezerino (2006) indicou um carregamento de 41 g DQO m⁻² d⁻¹, 15 g SST m⁻² d⁻¹, 12 g NTK m⁻² d⁻¹, 10,2 g N-NH₄ m⁻² d⁻¹, e uma TH de 230 mm d⁻¹ para obter efetiva nitrificação (com transformações de cerca de 70 % do N-NH₄ afluente em N-NO₃).

O modelo francês, também, vem sendo apresentado como sistemas com potencial de remoção de matéria orgânica e nitrificação. Em geral, essas unidades de tratamento são compostas por dois estágios de WCVD, e apresentam desempenho de remoções superiores de 90 % para DQO, 90 % para SST e 85 % de nitrificação (MOLLE et al., 2005).

Após identificar que os WCVD apresentam alto potencial de nitrificação (VYMAZAL, 2005), muitos estudos voltaram-se para a remoção do nitrogênio nitrato formado nessas unidades. Dessa forma, além das modificações realizadas nessa modalidade, novas formas de operação vêm sendo propostas, para elevar a potencialidade de desnitrificação.

A aeração intermitente foi relatada como sendo uma forma eficaz de melhorar a nitrificação e desnitrificação nos WCVD, devido à alternância de fases aeróbias e anaeróbias (FAN et al., 2013). Em um WCVD operado com aeração intermitente alcançou-se remoções de 96 % de DQO, 99 % de N-NH₄ e 90 % de NT (FAN et al., 2013).

Concomitantemente com a aeração intermitente, a recirculação do efluente final também vem sendo aplicada como uma estratégia para maximizar a remoção de nitrogênio. Foladori et al. (2013) avaliaram três estratégias operacionais em WCVD, sendo: (i) recirculação do efluente tratado; (ii) aeração intermitente; e (iii) junção das duas estratégias. A remoção de DQO variou entre 85 e 90 % para todas as estratégias, com uma taxa de remoção variando entre 54 e 70 g DQO m⁻² d⁻¹. O WCVD com recirculação e aeração apresentou uma remoção maior de NT (8,6 g N m⁻² d⁻¹). Conforme os autores, o investimento para recirculação e aeração nesses sistemas seria recompensado pela redução de área por população equivalente, atingindo valores de 1,5 m²/PE.

Os WC verticais com ciclos de drenagem e enchimento, conhecidos na literatura internacional como *Tidal Flow*, são outra alternativa que vem sendo aplicada para o contexto da remoção de nitrogênio. Hu et al. (2014a) relataram remoção de 85 % de NT em um *tidal flow* operando com cargas médias aplicadas de 28 g N m² d⁻¹.

Além dos avanços citados acima, o WCVD-FS como destacado anteriormente, é uma modificação proposta com intuito de proporcionar a nitrificação e desnitrificação na mesma unidade. Dong; Sun (2007) em um WCVD-FS (modelo francês), com 0,25 m de camada insaturada e 0,55 m de camada saturada, identificaram 37 % de remoção de NT, diferentemente dos 25 % de remoção de NT em um WCVD operado em paralelo sob as mesmas condições do WCVD-FS. Silveira et al. (2015) mostraram remoções de 85 % de NT em um WCVD-FS (modelo francês) com 0,25 m saturação de fundo. Langergraber et al. (2011) em dois estágios de WCVD, composto por um WCVD-FS (10 m² de área superficial) no primeiro estágio, seguido de um WCVD (10 m² de área superficial) no segundo estágio, operados sob uma carga orgânica de 40 g DQO m⁻² d⁻¹, reportaram remoções de 57 % de NT (com uma remoção média de 3,8 g NT m⁻² d⁻¹).

Em um estudo em microcosmos de areia simulando o perfil vertical de WCVD-FS, conduzido com intuito de identificar a melhor profundidade de saturação de fundo, com vistas ao favorecimento da desnitrificação, Santos et al.(2016) mostraram que um maciço filtrante com 0,40 m saturado e 0,15 m insaturado proporcionou maior remoção de NT (46 %), enquanto os demais microcosmos que operaram com menores alturas de saturação de fundo (0,20 e 0,30 m), a remoção de NT foi de apenas 15 e 36 %, respectivamente.

Recentemente, estudos vêm sendo conduzidos em WC verticais integrados. Essas unidades são formadas por um WCV com fluxo

descendente (WCVD), e outro WCV com fluxo ascendente, operados em série. Fu et al. (2016), em um sistema integrado de WCVD de fluxo descendente e um WCV de fluxo ascendente, mostraram uma remoção de NT variando entre 55 a 94 %. As menores remoções de NT foram encontradas com uma relação C/N de 2, enquanto que, as maiores remoções de NT foram obtidas com relação C/N de 4.

Após a indicação de carregamentos orgânicos e hidráulicos e novas modificações operacionais para melhorar a remoção do nitrogênio, alguns dos estudos conduzidos nos WCVD voltaram-se diretamente para entender a dinâmica da relação C/N. Fan et al. (2013), em um WCVD com aeração, obtiveram boa remoção de DQO (96 %), N-NH₄ (99 %) e NT (90 %), sob uma relação COD/N de 10. Em outro estudo, Zhi; Ji (2014) mostraram que em um sistema *tidal flow* a nitrificação foi dominante quando a relação C/N foi ≤ 6 , ao passo em que a relação C/N foi ≥ 6 a desnitrificação foi dominante. Zhao et al. (2011) observaram melhor remoção de nitrogênio sob uma relação C/N variando entre 5 e 10 em dois estágios de WCVD. Por outro lado, em WCVD Zhao et al. (2010) mostraram melhores taxas de remoção de nitrogênio sob uma relação C/N de 2,5.

A relação C/N ideal para promover maior remoção de nitrogênio pode variar entre sistemas, dependendo do arranjo tecnológico em que o WC está inserido e o tipo de água residual, sendo difícil estabelecer um valor de referência desta relação para atingir maiores taxas de desnitrificação (SAEED; SUN, 2012).

2.4 AVANÇOS DA MICROBIOLOGIA NA NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO EM WCVD E WCVD-FS

Apesar do extenso campo de pesquisa na área da engenharia para maximizar a remoção de nitrogênio nos WCVD e WCVD-FS, estudos envolvendo técnicas de biologia molecular capazes de descrever comportamentos da comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante são relativamente novos, iniciados principalmente nos anos 2000.

A influência das concentrações de carbono orgânico disponível na nitrificação devido à competição por oxigênio entre bactérias autotróficas e heterotróficas foi abordada por muitos estudos (TRUU et al., 2005; PAREDES et al., 2007a; SAEED; SUN, 2012). Silyn-Roberts; Lewis (2001) mostraram em um biofilme de um WCVD, por meio da técnica de hibridização em fluorescência *in situ* (FISH) e por PCR que

AOB do gênero *Nitrosomonas* foi uma das colonizadoras iniciais da unidade. Entretanto, após o amadurecimento do biofilme, as bactérias heterotróficas passaram a ser dominantes.

Tietz et al. (2007b) avaliaram a comunidade AOB após 2,5 anos de operação de três unidades WCVD, cada qual com uma área superficial de 18 m², 0,50 m de profundidade, cargas médias aplicadas de 27 g DQO m⁻² d⁻¹ e areia como material filtrante. Apesar da nitrificação ser estável, baixa abundância de AOB (*Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus mobilis* e *Nitrospira*) foi identificada, indicando a necessidade de estudos voltados para outros organismos nitrificantes.

Lana et al. (2013), através de metodologias convencionais como a quantificação do número mais provável (NMP), identificaram o número total de AOB, NOB e desnitrificantes em unidades de WCVD plantados, e não plantados. A abundância bacteriana dos três grupos foi mais elevada nos 10 primeiros centímetros do material filtrante, e na unidade plantada. Além disso, a abundância de NOB foi sempre superior que AOB.

Adrados et al. (2014), em dois WCVD (um com recirculação, com 90 m² de área superficial e 1 ano de operação, e o outro sem recirculação a 4 anos de operação com 15 m² de área superficial), identificaram remoções de NT de 84 e 21 %, respectivamente. Apesar da variação no desempenho de tratamento, demonstrou-se por meio da aplicação das técnicas de PCR, DGGE e sequenciamento do 16S rRNA que a estrutura da comunidade bacteriana desnitrificante presente no mático filtrante foi similar para as duas unidades, sendo *Flavobacterium* e *Thauera terpenica* as principais bactérias associadas com a desnitrificação. Por outro lado, apesar da evidência do processo de nitrificação, não foram identificadas bactérias nitrificantes nessas unidades.

Sun et al. (2012), em seis colunas de areia simulando o perfil vertical de WCVD, alimentadas com esgoto sintético e com fonte adicional de carbono (glicose), identificaram a comunidade nitrificante e desnitrificante por meio da técnica FISH. Com o fornecimento de carbono adicional, a remoção do nitrogênio amoniacal ligeiramente diminuiu, por outro lado, a remoção do nitrogênio total aumentou. Bactérias desnitrificantes como *Azoarcus* e *Thauera* foram dominantes (58 % de todas as células) quando a fonte de carbono estava disponível, enquanto que, à medida que a fonte de carbono se esgotou, AOB e NOB passaram a ser dominantes.

Em colunas simulando o perfil vertical de WCVD, Fan et al. (2016) avaliaram o efeito da aeração intermitente na comunidade bacteriana nitrificante por meio da técnica de FISH. O WCVD operou com uma taxa de indução de ar de 1 L min^{-1} durante 4 horas. AOB e NOB foram significativamente mais abundantes no WCVD que trabalhou com recirculação (45 e 35 % para AOB e NOB respectivamente). Em contrapartida no WCVD que trabalhou sem aeração, a abundância foi de apenas 6 e 7 % para AOB e NOB, respectivamente.

Estudos conduzidos em WCV integrados (WCVD com alimentação descendente seguido de um WCV com alimentação ascendente), por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando *primers* para identificar genes expressos no processo de nitrificação, desnitrificação e Anammox, foi identificada nitrificação e desnitrificação simultâneas. O número de cópias de Anammox 16S rRNA foi de 10^7 cópias g^{-1} , enquanto *amoA* de AOB e bactérias desnitrificantes foram relativamente menores (10^4 a 10^5 cópias g^{-1} , respectivamente). Com base na dinâmica bacteriana, Anammox foi a principal via de remoção de nitrogênio nessas unidades de tratamento (HU et al., 2016).

Em outro estudo também conduzido em WCV integrados, por meio da técnica de qPCR com genes expressos durante o processo de nitrificação e desnitrificação, foi identificada maior abundância do gene *nirS* (gene expresso na redução de nitrito a óxido nítrico), variando de 10^7 a 10^8 cópias g^{-1} , e do gene *amoA* variando de 10^6 a 10^7 cópias g^{-1} , enquanto que *nxA* (gene expresso durante a oxidação de nitrito a nitrato) foi de apenas 10^3 a 10^4 cópias g^{-1} . Esses resultados mostraram nitrificação parcial, seguida de desnitrificação.

Um dos primeiros estudos de microbiologia conduzidos em WCVD-FS, Dong; Sun (2007) em um WCVD-FS (modelo francês) com uma camada saturada de 0,55 m e 0,25 m insaturados, por meio da técnica FISH, mostraram distintas vias de transformação do nitrogênio. Na região aeróbia do filtro foram identificadas bactérias nitrificantes, enquanto que na região anóxica/anaeróbia, bactérias Anammox e desnitrificantes estavam presentes no meio.

Em um estudo recente conduzido em WCVD-FS (modelo francês) em escala real e piloto, Silveira (2015) mostrou maior abundância de bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira* e *Nitrospira*) no inverno. Além disso, a maior quantidade de AOB foi

observada nos primeiros 0,30 m de profundidade das unidades de tratamento.

Um estudo realizado em microcosmos de areia simulando o perfil vertical de WCVD-FS, Santos et al. (2016) realizaram o sequenciamento do 16S rRNA em amostras coletadas na interface insaturada/saturada e no fundo do microcosmo (região saturada) e mostraram uma abundância relativa de 11,7 % de bactérias nitrificantes (na interface saturada/insaturada). Bactérias desnitrificantes foram identificadas a partir da interface saturada/insaturada, sendo os gêneros desnitrificantes *Rhodanobacter* (28,4 %) e *Denitratisoma* (15,8 %) os mais abundantes.

Atualmente, vários estudos microbiológicos vêm sendo conduzido em sistemas *tidal flow*. Zhi; Ji (2014) em um *tidal flow* mostraram que a remoção de nitrogênio variou entre 50 e 82 %. Por meio da quantificação dos genes expressos no processo de nitrificação e desnitrificação, foi possível associar a remoção do nitrogênio com a nitrificação e desnitrificação clássica e o processo Anammox.

Em outro estudo, também conduzido em *tidal flow* (10 m², dividido em 6 células, vazão média de 1,5 a 2,3 m³ d⁻¹, com ciclos de drenagem e enchimento variando entre 3 a 12 por dia), Autin et al. (2006) identificaram 95 % de nitrificação, seguido de uma remoção de 95 % de NT, sob uma relação C/N de 3. Durante o estudo foram realizados dois monitoramentos da microbiota presente no meio por meio da técnica FISH (uma com 9 meses, e outra com 30 meses de operação). Aos 9 meses de operação, 9 % da comunidade bacteriana era composta por *Paracoccus denitrificans*. Enquanto que, nos 30 meses de operação a colonização dessa bactéria aumentou para 15 %, indicando a existência de nitrificação heterotrófica nessa unidade de tratamento.

Em relação à dinâmica entre AOA e AOB, alguns comportamentos desses organismos nitrificantes foram mostrados em WC superficial e WC horizontal (WCH). Paranychianakis et al. (2016), em WCH (plantados e não plantados), mostraram que AOA contribuíram para a oxidação do nitrogênio amoniacal, porém, AOB foi mais abundante que AOA. Wang et al. (2011a) em WC superficial mostraram que AOA estava amplamente distribuída nos sedimentos e na água do WC. Nos WCVD e WCVD-FS, a diversidade e abundância de AOA, bem como, as inter-relações entre AOA e AOB não estão elucidadas atualmente na literatura.

A diversidade de micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio é muito maior do que se tem sido estudada em WC (TRUU et al., 2005). Em sistemas biológicos de tratamento de esgoto, uma ampla

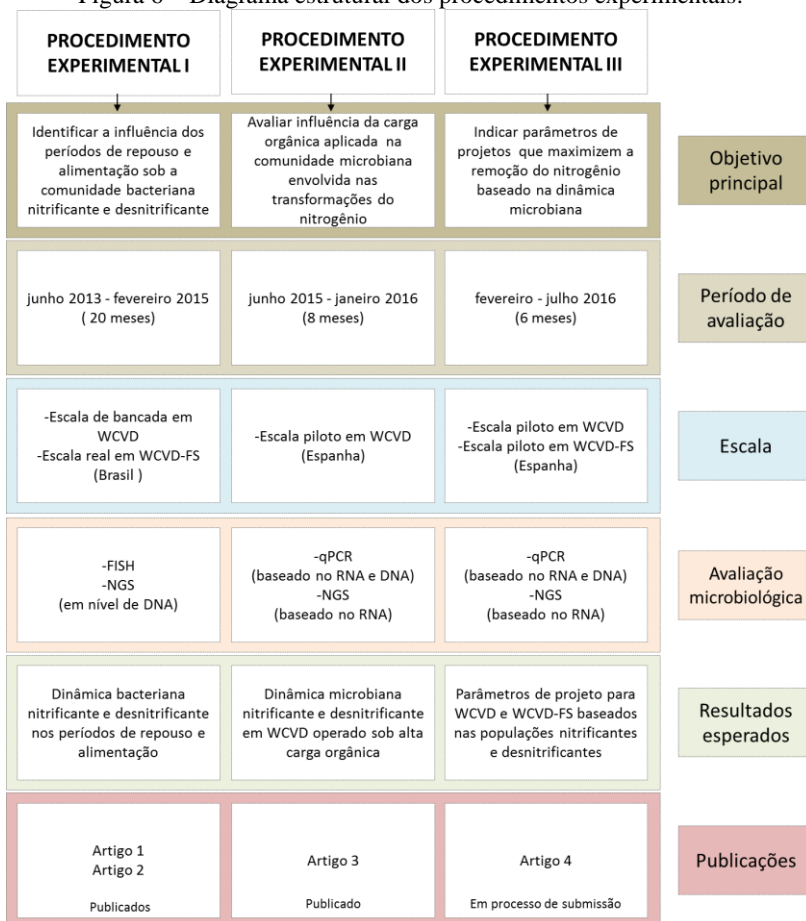
diversidade de organismos associados com o nitrogênio já foi demonstrada, tais como, a existência de arqueas nitrificantes e desnitrificantes, fungos nitrificantes, bactérias desnitrificantes autotróficas, bactérias desnitrificantes aeróbias, bactérias nitrificantes heterotróficas, bactérias Anammox, além de organismos com comportamento mixotrófico.

Com base nos trabalhos realizados em WCVD e WCVD-FS nos últimos anos, percebe-se que a dinâmica da comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante está relacionada com as estratégias operacionais, e com as particularidades de cada sistema. Esse comportamento permite inferir que parâmetros de dimensionamento de WCVD e WCVD-FS são fundamentais para obter um biofilme composto por populações de interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

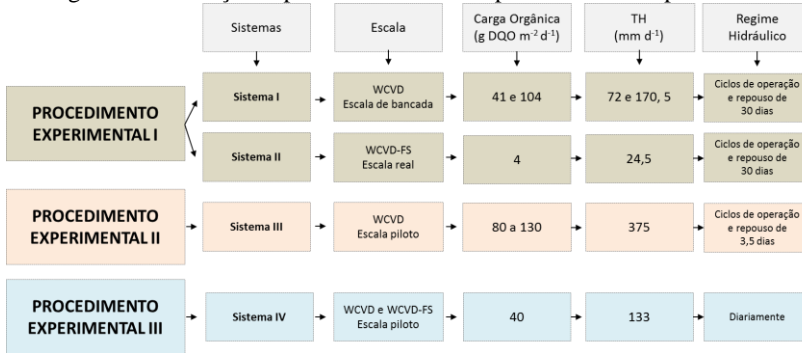
O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em cooperação com a Universidade Politécnic da Catalunha na Espanha (*Universitat Politècnica de Catalunya - Barcelona-Tech - UPC*). Ao longo do período de estudo foram avaliados três procedimentos experimentais, para responder aos objetivos específicos da pesquisa (Figura 6).

Figura 6 – Diagrama estrutural dos procedimentos experimentais.



Em cada procedimento experimental foram estudados diferentes sistemas de tratamento, baseados em condições operacionais distintas (Figura 7).

Figura 7 – Condições operacionais de cada procedimento experimental.



3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL I

Para avaliar a dinâmica das bactérias nitrificantes e desnitrificantes presentes no maciço filtrante de WCVD e WCVD-FS, em períodos de alimentação e repouso (sem alimentação com afluente), o procedimento experimental I, foi conduzido entre o período de junho de 2013 a fevereiro de 2015, simultaneamente em dois sistemas de tratamento de esgoto sanitário, sendo um em escala laboratorial de bancada (sistema I), e o outro em escala real de campo (sistema II) conforme indicado na Figura 7.

3.1.1 Sistema I

O sistema I, em escala de bancada, foi avaliado durante 12 meses, entre os meses de junho de 2013 a junho de 2014, e foi instalado no Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA), nas dependências da UFSC. Esse estudo foi conduzido em dois microcosmos que simularam o perfil vertical de um WCVD, denominados de microcosmo 1 (M1) e microcosmo 2 (M2).

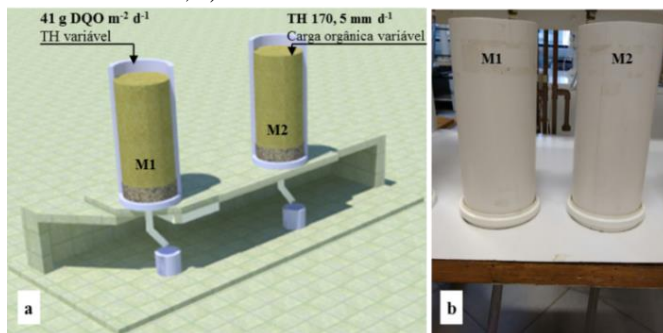
Os microcosmos possuíam um volume de 0,0053 m³ (DN 150 mm), área superficial de 0,0176 m² e profundidade de 30 cm, sendo preenchidos com areia grossa ($d_{10}= 0,3$ mm e $Cu= 6,2$) como material filtrante.

Os M1 e M2 foram alimentados com esgoto sanitário proveniente de uma rede coletora de um bairro do município de Florianópolis/SC. A alimentação foi realizada baseada em duas estratégias. Durante os primeiros 180 dias de operação (*startup*), os microcosmos foram alimentados todas as semanas, com um regime hidráulico baseado em ciclos de 3 dias de alimentação (terças, quartas e quintas-feiras, com três pulsos ao longo do dia: 9:00, 13:00 e 17:00 horas) e 4 dias de repouso. Essa estratégia foi adotada para proporcionar o estabelecimento da microbiota no maciço filtrante (RAGUZA et al., 2004).

Após o período de *startup*, ao longo de mais 180 dias de operação, foi conduzida uma estratégia baseada em um regime de operação intercalando períodos de 30 dias de repouso e 30 dias de alimentação, totalizando 4 períodos de operação e 3 períodos de repouso. Nos períodos de operação dos microcosmos, a alimentação foi realizada baseado, em ciclos de 3 dias de alimentação (com 3 pulsos de alimentação ao longo do dia) e 4 dias de repouso, conforme realizado no período de *startup*.

Nos períodos de operação, cada microcosmo operou de forma distinta (Figura 8). O M1 operou com uma carga orgânica fixa em $41 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ conforme recomendações de Sezerino et al. (2012), e TH variável. Enquanto que o M2 operou com uma carga orgânica variável, e TH fixa em $170,5 \text{ mm d}^{-1}$. Essa TH foi utilizada por se tratar da máxima TH teórica calculada, para obter um balanço positivo de oxigênio, suficiente para remoção de carbono e nitrificação, conforme o modelo de transferência de oxigênio proposto por Platzer (1999).

Figura 8 – Microcosmos simulando o perfil vertical de *wetland* construído vertical descendente. a) esquema representando as condições operacionais de cada microcosmo; b) unidades de tratamento utilizadas no estudo.



O monitoramento da qualidade do efluente (referente aos períodos de alimentação) tratado foi realizado semanalmente (sempre no último dia de operação dos microcosmos), por meio de coletas de amostras do afluente e efluente de cada unidade.

A influência dos períodos de alimentação e repouso de 30 dias sob a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante, foi avaliada por meio da técnica FISH. Sendo assim, no final de cada período de alimentação e repouso, foi coletada uma amostra do maciço filtrante na camada da superfície (0 a 5 cm de profundidade) de cada microcosmo.

Além disso, no término do experimento, os microcosmos foram desativados, e foram coletadas amostras do maciço filtrante na camada da superfície (0 a 5 cm de profundidade) e na camada do fundo (15 a 30 cm de profundidade) de cada unidade de tratamento. Com essas amostras foi extraído DNA, e realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA, para identificar a diversidade da comunidade bacteriana presentes no meio.

3.1.2 Sistema II

O sistema II foi monitorado durante 12 meses, nos meses de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015, e foi composto por um WCVD-FS em escala real, empregado no tratamento de esgoto sanitário de um condomínio residencial da cidade de Palhoça/SC (Figura 9).

A planta de tratamento possuiu um arranjo tecnológico composto por um reator anaeróbio compartimentado (RAC), o qual operou como tratamento primário, seguido de um WCVD-FS. Após o tratamento, o efluente final foi disposto em um córrego que desaguava no mar.

O WCVD-FS foi implantado em 2006, e foi dimensionado para atender a demanda total do condomínio residencial de 2.200 pessoas. No entanto, no momento que esse estudo foi conduzido, o condomínio residencial não estava completamente habitado. Sendo assim, o WCVD-FS recebeu uma contribuição de aproximadamente 100 pessoas.

O WCVD-FS possuía uma profundidade útil de 70 cm, sendo que os 20 cm no fundo permaneceram saturados com efluente (devido à manutenção do controlador de nível elevado). O material filtrante era composto por uma camada de 10 cm de brita na superfície (com diâmetro entre 3-8 mm), seguido de 50 cm de areia (d_{10} : 0,3 mm e Cu: 4,84), e por fim, 10 cm de brita no fundo (com diâmetro 3-8 mm). A macrófita plantada foi a *Cyperus papyrus*, popularmente conhecida como Papirus.

Figura 9 – *Wetland* construído vertical descendente de fundo saturado empregado para tratamento de esgoto sanitário de um condomínio residencial.



O WCVD-FS possuía uma área superficial de 3.144 m², dividida em 4 células interconectadas. Essas células operaram com ciclos de períodos de alimentação e repouso de 30 dias. Dessa forma, enquanto duas células estavam operando, as outras duas permaneciam em repouso.

A alimentação do WCVD-FS foi realizada diariamente de forma intermitente na superfície da unidade por meio de bombeamento (a cada 6 horas), com uma vazão diária de 18.064 L d⁻¹, dividida em 4 pulsos por dia, de 4.516 L pulso⁻¹.

Devido a essa pesquisa ser conduzida em um sistema em escala real, e por se tratar de uma grande área territorial, esse estudo concentrou-se em uma das células do WCVD-FS, denominada célula 3, que possuía uma área superficial de 764 m².

Em virtude da baixa contribuição de esgoto do condomínio residencial e também devido ao tratamento prévio realizado pelo RAC, a célula 3 do WCVD-FS operou com uma carga orgânica média de 4 g DQO m⁻² d⁻¹, uma TH de 24, 5 mm d⁻¹.

Nessa célula foram coletadas amostras do maciço filtrante em diferentes profundidades do perfil vertical, e pontos da seção superficial da unidade. As coletas foram sempre realizadas uma vez ao mês, no final de cada período de operação e repouso, totalizando 12 amostras (6

amostras referente ao período de operação, e as outras 6 referentes ao período de repouso da célula 3).

Com auxílio de um amostrador de solo (Figura 10), foi amostrado o perfil vertical em três pontos da área superficial da célula 3. Esses pontos (pontos, 1, 2 e 3) estavam localizados ao longo do comprimento da área superficial da unidade, acompanhando a tubulação de distribuição do afluente.

Em cada ponto foram coletadas amostras em diferentes camadas do perfil vertical, sendo: (i) camada superficial (de 0 a 17 cm de profundidade); (ii) camada intermediária (de 17 a 34 cm de profundidade); (iii) camada semi-saturada (de 34 a 51 cm de profundidade); (iv) camada saturada (de 51 a 68 cm de profundidade).

Figura 10 – Coletas de amostras do maciço filtrante do *wetland* em diferentes profundidades do perfil vertical. a) amostrador de solo; b) perfil coletado.



Nas amostras coletadas do maciço filtrante da célula 3 do WCVD-FS, foi aplicada a técnica FISH, para avaliar a influência dos períodos de operação e repouso sobre a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante.

Além disso, nos períodos de alimentação da célula 3 do WCVD-FS, mensalmente foi coletada amostra do afluente e efluente para realizar a caracterização físico-química.

3.1.3 Monitoramento dos sistemas I e II

O monitoramento dos sistemas I e II foi realizado por meio de análises físico-químicas no afluente e efluente de cada unidade avaliada, e, também, foi caracterizada a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante presente no maciço filtrante das unidades de tratamento.

3.1.3.1 Análises físico-químicas

O monitoramento do desempenho em termos da qualidade do efluente tratado nos sistemas avaliados no procedimento experimental I foi realizado por meio de análises físico-químicas. Na Tabela 1 apresentam-se os parâmetros avaliados e a metodologia empregada para cada análise.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados no afluente e efluente de cada unidade avaliada no procedimento experimental I, e a respectiva metodologia empregada.

Parâmetros	Metodologia empregada
pH	Potenciométrico, pHmetro Tekna T-1000, <i>Standard Methods</i> 4500-H+, (APHA, 2005)
DQO (mg L ⁻¹)	Digestão em refluxo fechado – método colorimétrico, Leitura em espectrofotômetro HACH® <i>Standard Methods</i> 5220D, (APHA, 2005).
Alcalinidade (mg L ⁻¹)	Titulação potenciométrica com solução de H ₂ SO ₄ <i>Standard Methods</i> 2320B, (APHA, 2005)
SST (mg L ⁻¹)	Método gravimétrico <i>Standard Methods</i> 2130B (APHA, 2005)
*NT (mg L ⁻¹)	Método colorimétrico – Digestão de persulfato – KIT HACH®, leitura em espectrofotômetro HACH®
N-NH ₄ (mg L ⁻¹)	Método colorimétrico de Nessler, leitura em espectrofotômetro HACH® (VOGEL, 1981)
N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	Método colorimétrico Alfañafilamina (APHA, 1998)
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	Método colorimétrico- KIT HACH®, Redução de Cádmió <i>Standard Methods</i> 4500 E – (APHA, 2005)

*Conduzidos apenas no sistema II

3.1.3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas conduzidas nos sistemas I e II foram realizadas com as amostras do maciço filtrante coletadas no final de cada período de operação e repouso, conforme descrito acima. Nessas amostras foi aplicada a técnica FISH.

- Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica FISH foi realizada seguindo as recomendações de Amann (1995). As sondas oligonucleotídicas empregadas nesse procedimento encontram-se descritas na Tabela 2.

Antes de iniciar o procedimento da análise de FISH, foi realizada uma etapa de preparo das amostras, para extrair o biofilme aderido no material filtrante. Para isso, foram coletados 20 g do material filtrante de cada sistema experimental, e adicionado 50 mL de água deionizada e centrifugado a 3000 G por 5 minutos. Nessa mistura de água e material filtrante foi realizado um processo de sonicação no ultrassom por 5 min (para desprender o biofilme da areia). Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 1500 G por 5 minutos. Para confirmar a integridade das células extraídas, foram realizadas medidas de absorvância e turbidez, antes e depois dos procedimentos de centrifugação e sonicação.

A observação das lâminas foi realizada por microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus BX-41, Tokio, Japão).

Para a estimativa da abundância das células hibridizadas, 10 campos de cada lâmina foram escolhidos e avaliados aleatoriamente. Para determinar a abundância das células hibridizadas com a sonda EUB mix (eubactéria), as células coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) foram consideradas como 100 %. Enquanto que para determinar a abundância das células hibridizadas com as sondas de bactérias nitrificantes e desnitrificantes, as células hibridizadas com EUB mix foram consideradas como 100 %. A abundância das células hibridizadas foi calculada usando o *software* daime (*digital image analysis in microbial ecology*) (DAIME et al., 2006).

- Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração (do inglês *Next Generation Sequencing techniques* – NGS) utilizando a plataforma MiSeq Illumina, foi realizado apenas nas amostras coletadas na superfície (0 a 5 cm de profundidade) e no fundo do maciço filtrante (15 a 30 cm de profundidade) dos dois microcosmos (M1 e M2) do sistema I, após os 360 dias de operação.

A integridade do DNA extraído das amostras coletadas na superfície e no fundo dos microcosmos foi verificada por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose (1 %), TAE 1X buffer, e Syber Green (Life Technologies, São Paulo, BR). A eletroforese foi realizada por 60 minutos a 60 v. As imagens do gel foram obtidas usando ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, EUA). A quantificação da concentração de DNA foi feita utilizando o espectrofotômetro de ácidos nucleicos (Nanodrop, Thermocientific).

Tabela 2 – Descrição de sondas de oligonucleotídeos empregadas na técnica FISH.

Sondas	Alvo	Sequência (5'-3')	Referência
EUB mix (I+II+III)	Eubactéria	I- CTGCCTCCCGTAGCA II- CAG CCACCCTAGGTGTCTG III- CCACCCGTAGGTGT	I -Amann et al., (1990) II e III -Daims et al., (1999)
THIO	<i>Thiobacillus</i> sp	GTCATGAAACCCCGCGTGGT	Figuerola;Erijman, (2007)
PAE 997	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCTGGAAAGTTCGCATCA	Amann et al., (1996)
NTSPA662	Maioria dos membros <i>Nitrospirae</i>	CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC	Daims et al., (2001)
NTSPN693	<i>Nitrospina gracilis</i>	TTCCCAATATCAACGCATTT	Juretschko (2000)
NSO 190	β - oxidantes de amônio Proteobacteria, incluindo <i>Nitrosomonas</i>	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Mobarry et al., (1996)
NEU 653	<i>Nitrosomonas</i> sp	CCCCTCTGCTGCACTACTCTA CCTGTGCTCCATGCTCCG	Wagner et al., (1995)
NIT 3	<i>Nitrobacter</i> sp	CCTGTGCTCCATGCTCCG	Wagner et al., (1996)
AMX 820	Bactérias Anammox, <i>Candidatus Brocadia</i> e <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	AAACCCCTCTACTTGCCAGTC	Schimid et al., (2001)
PDV 163	<i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Paracoccus versutus</i>	CCTCTGTCCAGGTCACCG	Neef et al., (1996)
TBD 1419	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	ACTTCTGCCAGATTCCAC	Fernandez et al., (2008)

e sequenciadas pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, BR).

A região V3-V4 do gene 16S rRNA de eubactéria, foi amplificada usando os *primers* U341F 5'CCTACGGGRSGCAGCAG 3' (ZAKRZEWSKI et al., 2012) e 806R 5'GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3' (CAPORASO et al., 2011). A amplificação foi realizada por meio de uma reação de PCR de 35 ciclos a 50°C, sendo que cada amostra foi amplificada em triplicata.

Os resultados do sequenciamento foram analisados usando o *software* QIIME versão 1.8.0 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; CAPORASO et al., 2010a) e as leituras foram compiladas em um arquivo FASTq para realizar análise de bioinformática.

As análises de bioinformática foram realizadas pela Neopropecta Microbiome Technologies. Para a identificação das unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units-OTUs*) foi utilizado o sistema BLASTn 2.2.28. considerando apenas seqüências com 99 % de similaridade.

3.1.4 Análises estatísticas

3.1.4.1 Sistema I

Primeiramente, a normalidade dos dados referente à caracterização físico-química do afluente e efluente dos dois microcosmos foi avaliada por meio do teste Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente, para verificar se ocorreu diferença estatística no tratamento realizado entre o microcosmo 1 e 2, foi aplicado o teste não paramétrico Wilcoxon, com variáveis dependentes e com um nível de significância de $p < 0,05$.

Para verificar a existência de correlações lineares entre a abundância bacteriana identificadas no microcosmo 1 e 2, e os dados de qualidade do efluente tratado, foram realizadas correlações de Pearson. Além disso, para entender a dinâmica bacteriana, foi realizada uma correlação canônica entre a eficiência de remoção de DQO, nitrogênio amoniacal e a formação de N-NO_x, juntamente com os dados de abundância bacteriana identificado por FISH.

Todas essas análises foram realizadas utilizando o *software* Statistica 7.0 (STATSOFT INC, 2004), com exceção da correlação canônica que foi realizado no *software* Canoco 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 2002).

3.1.4.2 Sistema II

Em primeiro lugar, a normalidade dos dados da caracterização físico-química foi avaliada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov.

Posteriormente, com relação aos dados de abundância bacteriana obtidos nos períodos de repouso e operação, em diferentes profundidades do perfil vertical, e nos três pontos de coleta ao longo da seção superficial da célula 3 do WCVD-FS, foi realizada uma série de análises estatísticas.

Um teste t de Student foi realizado para avaliar se ocorreu diferença significativa entre a abundância bacteriana identificada nos períodos de repouso e operação.

Em seguida, uma análise de variância ANOVA foi realizada para avaliar variáveis relacionadas com a abundância bacteriana identificada, conforme segue: (i) avaliar se ocorreu diferença significativa na abundância bacteriana identificada nas diferentes camadas da célula 3 do WCVD-FS; (ii) identificar se ocorreu diferença na abundância bacteriana identificada entre os 3 pontos de coleta da área superficial da unidade; (iii) avaliar se ocorreu influência das diferentes estações do ano na comunidade bacteriana identificada nas distintas camadas da célula 3 do WCVD-FS.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statistica 7.0 (STATSOFT INC, 2004), e com um nível de significância de $p < 0,05$.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL II

O procedimento experimental II foi conduzido entre os meses de junho de 2015 a janeiro de 2016, junto ao sistema III (Figura 7), localizado nas dependências do Grupo de Estudos em Engenharia Ambiental e Microbiologia (*Environmental Engineering and Microbiology Research Group - GEMMA*), da UPC em Barcelona/ES.

Esse estudo foi realizado em um WCVD empregado para o tratamento de esgoto sanitário, proveniente de uma rede coletora de esgoto de um dos bairros da cidade de Barcelona.

O WCVD estudado fez parte de um sistema híbrido de WC (Figura 11). O sistema híbrido foi implantado em 2010, e era composto por um tanque Imhoff, com volume de $0,2 \text{ m}^3$, que operou como tratamento primário, seguido de um WCVD que possuía 3 m^2 de área

superficial, um WCH com 2 m² de área superficial, e por fim, um WC superficial de lâmina livre, também com 2 m² de área superficial. Após a passagem do efluente no WC superficial, o mesmo retornava para a rede coletora.

O WCVD foi construído em polietileno e possuía uma área superficial dividida em duas células interconectadas. Cada célula possuía uma área superficial de 1,5 m², que alternava ciclos de 3,5 dias de alimentação e repouso (Figura 12). Essa unidade possuía uma profundidade de 80 cm, preenchidos com areia (com diâmetro entre 1 - 2 mm) nos primeiros 10 cm, seguido de uma camada de 70 cm de brita (com diâmetro de 3 - 8 mm) como material filtrante. A macrófita empregada foi a *Phragmites australis*.

O sistema híbrido de WC, até o presente estudo, operou com variação de carga orgânica entre 10 e 109 g DBO m⁻² d⁻¹, dependente das condições operacionais vinculada a cada estudo realizado nessa planta de tratamento ao longo do tempo (ÁVILA et al., 2013; 2014; 2016).

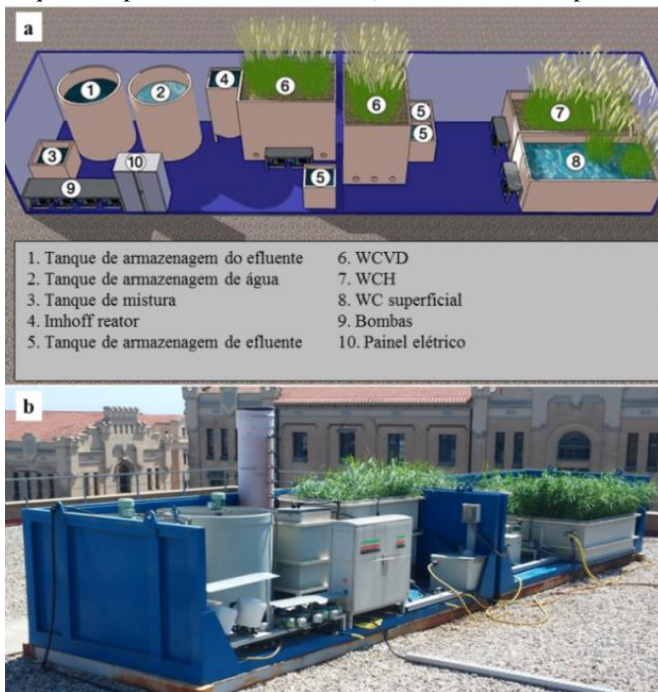
Sendo assim, esta pesquisa foi realizada no momento em que o sistema híbrido estava operando com uma estratégia de recirculação, a fim de maximizar a remoção de nitrogênio total. Dessa forma, uma parcela do efluente final do *wetland* superficial retornava para o tanque Imhoff. Portanto, a carga aplicada no WCVD variou em função da água residuária afluente, e também, do efluente final do WC superficial que foi recirculado na unidade a montante do WCVD.

Assim, esse estudo foi embasado em dois períodos distintos, vinculados a duas cargas orgânicas médias consequentes principalmente, do desempenho de tratamento do sistema híbrido. No período I, (junho a outubro de 2015) totalizando 5 meses de operação, a carga orgânica média aplicada foi de 130 g DQO m⁻² d⁻¹ (considerando a área superficial de 3 m²), e no período II, (novembro de 2015 a janeiro de 2016) referente a 3 meses de operação, a carga média aplicada foi de 80 g DQO m⁻² d⁻¹.

Para ambos os períodos a vazão aplicada foi de 1.125 L d⁻¹, resultando em uma TH de 375 mm d⁻¹. A vazão total foi dividida em aproximadamente 22 pulsos de 50 L pulso⁻¹.

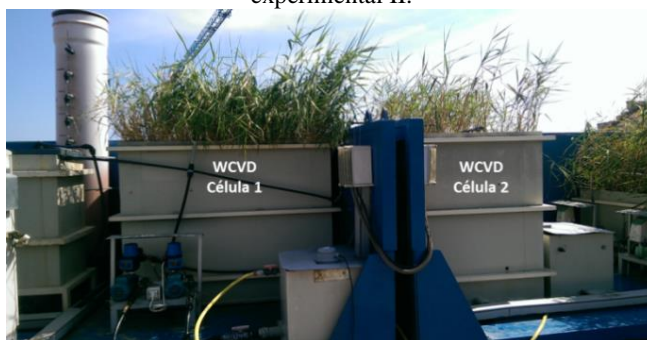
Para quantificação do afluente e efluente do WCVD foram implantados medidores de vazão eletromagnéticos (SITRANS FM MAGFLO®), permitindo assim, o controle hidráulico da unidade.

Figura 11 – Sistema híbrido de *wetlands* do procedimento experimental II.
a) esquema representando o sistema; b) foto do sistema experimental.



Fonte: Adaptado de Ávila *et al.* (2013)

Figura 12 – *Wetland* construído vertical descendente estudado no procedimento experimental II.



3.2.1 Monitoramento do sistema III

Para monitorar o desempenho do sistema, foram realizadas análises físico-químicas e biológicas no afluente e efluente do WCVD, e análises microbiológicas no maciço filtrante e no afluente e efluente dessa unidade de tratamento.

3.2.1.1 Análises físico-químicas e biológicas

O monitoramento da qualidade do efluente tratado foi realizado por meio de análises físico-químicas no afluente e efluente da unidade, com uma frequência de duas vezes na semana. Os parâmetros analisados juntamente com as metodologias empregadas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados no afluente e efluente dos *wetland* construído vertical descendente e metodologia empregada no procedimento experimental II

Parâmetros	Metodologia empregada
*OD (mg L ⁻¹)	EcSCAN DO6 oxímetro, (APHA, 2012)
pH	Potenciométrico, Crison pHmetro (APHA, 2012)
*Eh (mV)	Thermo Orion 3 Star redox meter, (APHA, 2012)
SST (mg L ⁻¹)	Gravimétrico, (APHA, 2012)
DQO (mg L ⁻¹)	Digestão em refluxo fechado, (APHA, 2012)
SST (mg L ⁻¹)	Método gravimétrico, (APHA, 2012)
NT (mg L ⁻¹)	Multi Carbon/Nitrogen (2100 S) analisador.
N-NH ₄ (mg L ⁻¹)	Método colorimétrico, (APHA, 2012)
N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	DIONEX-ICS-1000 íon cromatografia
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	DIONEX-ICS-1000 íon cromatografia

* realizadas *in situ*.

3.2.1.2 Análises microbiológicas

Para realizar as análises microbiológicas, em uma das células do WCVD, foram coletadas amostras do maciço filtrante no final do período I, que remete-se a um período de 5 meses de operação do WCVD sob uma carga orgânica média de 130 g DQO m⁻² d⁻¹, e no final do período II, referente a 3 meses de operação do WCVD, sob uma carga orgânica média de 80 g DQO m⁻² d⁻¹.

As amostras foram coletadas com auxílio de um amostrador de solo (Figura 13), na camada da superfície do WCVD (entre 0 a 15 cm de profundidade) e na camada do fundo (entre 70 a 80 cm de profundidade). Essas amostras foram coletadas em triplicatas para cada camada avaliada. E também, no final do período II, foi coletada uma amostra do afluente e efluente da unidade de tratamento.

Figura 13 – Coleta de amostras no maciço filtrante do *wetland* construído vertical descendente.



Para avaliar a dinâmica microbiana envolvida nas transformações do nitrogênio, nas amostras referentes ao final do período I (material filtrante) e período II (material filtrante e afluente/efluente do WCVD), foi realizado uma reação de Transcrição Reversa (do inglês *Reverse Transcription*) seguida da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT)-qPCR.

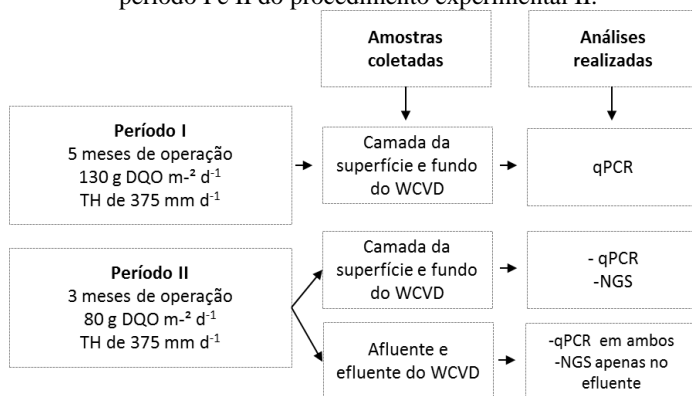
Essas técnicas foram direcionadas para identificar a abundância de cópias de genes (baseado no DNA), e a atividade (baseado no DNA complementar (cDNA), de genes funcionais expressos durante o processo da oxidação da amônia (para arqueas e bactérias) e no processo de desnitrificação (para bactérias).

Além disso, nas amostras referentes ao final do período II, foi realizado o sequenciamento de nova geração (em nível de cDNA) do 16S rRNA de eubactéria e arqueas, para identificar a diversidade de bactérias e arqueas ativas, presente no meio filtrante da camada da superfície e do fundo, e no afluente do WCVD. Na Figura 14, apresenta-se um esquema amostral das coletas e análises realizadas no WCVD do procedimento experimental II.

Após a coleta das amostras, as mesmas foram imediatamente misturadas com 2 mL de LifeGuard reagente (MoBio Laboratories, Carlsbad, Califórnia, EUA) para prevenir a degradação do RNA. Posteriormente em laboratório, foi pesado 0,25 g do material filtrante de

cada amostra e 1 mL da amostra do afluente/efluente do WCVD foi centrifugado (2000 G por 5 minutos a 4°C) formando um *pellet*. Com os 0,25 g do material filtrante e o *pellet* formado pela centrifugação, foi realizado a extração do RNA/DNA.

Figura 14 – Amostragens realizadas e análises microbiológicas empregadas no período I e II do procedimento experimental II.



A extração de RNA e DNA foi realizada nas 3 réplicas de amostras independentes coletadas nas camadas da superfície e do fundo, no final de cada período avaliado. A extração de RNA e DNA foi realizada simultaneamente utilizando o kit de extração de RNA PowerMicrobiome™ RNA Isolation kit (26000-50), (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, Califórnia, EUA).

Para extração simultânea do RNA e DNA foi realizada uma adaptação no protocolo do fabricante, onde a etapa de digestão do DNA da amostra é ignorada em um primeiro momento (passo 14 e 15 do protocolo fornecido pelo fabricante), obtendo o DNA e RNA como produto final. Posteriormente, o DNA foi separado do RNA através de um tratamento com solução de DNase I (fornecida pelo kit PowerMicrobiome™ Isolation) com temperatura em torno de 25° durante 10 minutos (passos 14 e 15 do protocolo do fabricante).

Para confirmar a pureza (ausência de contaminação com DNA) e a integridade do RNA extraído, foi realizado uma amplificação da região V3 do gene 16S rRNA por meio de uma reação de PCR (com RNA como *template*). Para isso, o mix da PCR foi realizado com um volume final de 25 µL, contendo, 1,25 U de Taq DNA polimerase, 12,5 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada *primer* (F-341 e R-907) e 100 ng de

RNA. A reação de PCR foi realizada no aparelho Master cycler (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As condições de amplificação foram realizadas seguindo recomendações de Prenafeta-Boldú et al., (2012).

Depois de confirmada a integridade do RNA extraído, os mesmos foram transcritos para cDNA por meio da enzima transcriptase reversa através da reação de transcrição reversa. Ou seja, a partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de cDNA. Esse procedimento foi realizado com o kit PrimeScript™ RT (Perfect Real Time, Takara, Japão), seguindo as recomendações do fabricante.

Os cDNA e DNA extraídos das amostras, foram armazenados a -80°C para as futuras análises. Dessa forma, a partir desse momento, as avaliações microbiológicas foram manipuladas com o DNA, o qual remete-se a abundância total de genes ou micro-organismos alvos, e com o cDNA (proveniente do RNA) que está relacionado com os transcritos, representando a atividade dos mesmos.

- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Essa análise foi conduzida para quantificar a abundância total (baseado no DNA) e abundância ativa (baseado no cDNA), de eubactéria, populações oxidantes de amônia (arquea e bactéria) e bactérias desnitrificantes, com as amostras coletadas no final do período I e II, e com o afluente/efluente coletados no final do período II.

A quantificação da abundância de eubactéria foi conduzida baseado na região V3 do 16S rRNA. Essa região delimita uma região conservada do domínio bactéria (WANG; QIAN, 2009). As condições de amplificação para os *primers* utilizados nesse procedimento encontram-se descritos na Tabela 4.

As comunidades de AOB e AOA foram quantificadas pela expressão do gene *amoA*, o qual codifica a enzima *α-amônia mono-oxigenase*, essa enzima catalisa o processo de oxidação da amônia a nitrito, ou seja, a nitratação (ROTTHAWE et al., 1997). Para a quantificação de *amoA* de AOB os *primers* utilizados, bem como, as condições de amplificação dos mesmos, encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – *Primers* empregados na análise de qPCR e suas respectivas condições de amplificação.

Alvo	<i>Primer</i>	Sequência (5'- 3')	Condição de amplificação das reações	Referência
16S rRNA de eubactéria Região V3	1055f 1392r	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	10 min a 95 °C; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s; 30 s de anelamento a 55 °C; e por fim, 45 segundos de extensão 72°C. A captura de imagem foi realizada a 80 °C durante 35 segundos para excluir a fluorescência da amplificação de dímeros de <i>primers</i> .	Prenafeta-Boldú et al.,(2012)
<i>amoA</i> de eubactéria	amoA1F amoA2r	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	5 min a 94 °C; 42 ciclos de desnaturação a 60°C por 90 s; seguido de 60°C por 90 s de anelamento; e por fim, 60°C por 90 s, seguidos de 10 min a 72 °C de extensão. A captura de imagem foi realizada a 75 °C durante 35 segundos para excluir a fluorescência da amplificação de dímeros de <i>primers</i> .	Rotthauwe et al., (1997)
<i>amoA</i> de arquea	arch amoA 19Fw arch amoA FRv	ATGGTCTGGYTWAGACG GATGTCCARGCCARTCAG	10 min a 95°C; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s; 30 s de anelamento a 52°C, e por fim, 45 s de extensão 72°C. A captura de imagem foi realizada a 75 °C durante 35 segundos para excluir a fluorescência da amplificação de dímeros de <i>primers</i> .	Pester et al., (2012) Wuchter et al., (2006)
<i>nosZ</i> de eubactéria	nosZF nosZR	WCSYTGTTTCMTCGACAGCCAG ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC	10 min at 95 °C; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s; 30 s de anelamento a 50 °C; e 62 ciclos de extensão a 72 °C por 45 s. A captura de imagem foi realizada a 80 °C durante 35 segundos para excluir a fluorescência da amplificação de dímeros de <i>primers</i> .	Calderer et al., (2014)

Para identificar a abundância do gene *amoA* de AOA, uma nova configuração de *primers* foi utilizada, buscando quantificar 4 diferentes linhagens de AOA. AOA representantes do grupo I1a: *Nitrosopumilus* e *Nitrosotalea*; grupo I1b: *Nitrososphaera*; e do grupo *Thaumarchaeota*: *Nitrosocaldus* foram utilizadas como alvo, seguindo recomendações de Pester et al., (2012). Para a quantificação de *amoA* de AOA os *primers* utilizados e as condições de amplificação encontram-se descritos na Tabela 4.

Para a quantificação de bactérias desnitrificantes, dado que existe uma variedade de enzimas envolvidas no processo completo da desnitrificação, e que as bactérias desnitrificantes são amplamente distribuídas em diferentes gêneros, foi quantificado a última etapa da desnitrificação. Dessa forma, bactérias desnitrificantes foram quantificadas através da expressão do gene *nosZ-clade I*, responsável pela redução do N_2O a N_2 . Esse gene codifica a extremidade da enzima *óxido nítrico redutase, clade I*. Na Tabela 4 encontra-se a descrição dos primers utilizados nesse procedimento e as condições de amplificação dos mesmos.

As reações foram realizadas em triplicada (considerando amostras independentes de extratos de DNA/cDNA de cada amostra coletada), para os controles-negativos e para cada diluição de DNA/cDNA (considerando a curva padrão). As reações foram realizadas com um volume final de 10 μ L, contendo 1 μ l de DNA/cDNA (com concentrações médias de 5 ng μ L⁻¹), 400 nM de cada primer, 5 μ L do mix de qPCR utilizado (Brilliant II Sybr Green qPCR Master Mix, Stratagene) e 30 nM de ROX dye.

Todas as reações de qPCR foram realizadas no aparelho Real Time PCR System MX3000P (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA). Após o término da amplificação, as amostras foram armazenadas na geladeira a 4°C.

A curva padrão de cada gene alvo foi realizada por meio dos fragmentos de genes sintéticos, construídos no banco de dados FunGene (*Functional gene pipeline Repository*; <http://fungene.cme.msu.edu/>), gBlocks® (Integrated DNA Technologies). Os fragmentos foram ressuspensos em 1mL de água ultrapura e quantificados no espectrofotômetro de ácidos nucleicos (Nanodrop, Thermocientific). A partir disso, foi realizada uma diluição de 10 vezes dos genes sintéticos. Posteriormente, as diluições foram submetidas à uma reação de qPCR, que foi realizada em duplicata, sendo possível identificar uma gama

linear entre 10^1 a 10^8 número de cópias de genes por reação para gerar a curva padrão.

Todas as reações de qPCR mostraram um R^2 acima de 0,985, com eficiências dos ensaios variando entre 90 e 110 %. Todos os resultados foram processados pelo *software* qPCR MXPRO™ (Stratagene, La Jolla, CA) e foram tratados estatisticamente.

- Sequenciamento de nova geração

A diversidade da comunidade microbiana (bactérias e arqueas) ativa (baseado no cDNA), foi identificada através do sequenciamento de nova geração na plataforma MiSeq Illumina da região V1-V3 do gene 16S rRNA para eubactéria, e região V3-V4 do gene 16S rRNA para arqueas.

Para isso, os *primers* utilizados para o sequenciamento foram: 27F (5'- AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') / 519r (5'- GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') para eubactéria e 349F (5'- GYGCASCAGKCGMGAAW-3') / 806 (5'- GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') para arqueas.

Uma reação de PCR foi realizada utilizando HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Quiagen, Califórnia, EUA). A corrida foi realizada sob as seguintes condições: 94 °C durante 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos; 53 °C durante 40 segundos e 72 °C durante 1 minuto; e um passo de alongamento final a 72 °C durante 5 minutos. Todos os produtos de PCR das diferentes amostras foram dosados em concentrações iguais, utilizando Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Posteriormente, a purificação dos produtos de PCR foi realizada usando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, EUA). E por fim, os fragmentos de cDNA foram sequenciados utilizando a plataforma MiSeq (Illumina) seguindo as orientações do fabricante.

O sequenciamento e o preparo das amostras foram realizados pelo laboratório *Molecular Research MR DNA Laboratory* (Texas, EUA).

Os resultados do sequenciamento foram analisados usando o *software* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; CAPORASO et al., 2010a) versão 1.8.0 e as leituras foram compiladas em um arquivo FASTq para a análise de bioinformática.

Os OTUs foram taxonomicamente classificados pelo método UCLUST (EDGAR, 2010). As seqüências representativas de cada OTU

foram alinhadas usando-se o PyNast (CAPORASO et al., 2010b) e ChimeraSlayer (*Chimeric Sequence Detection Utility*) (HAAS et al., 2011).

Para a classificação taxonômica das OTUs representativos, utilizou-se o RDP Classifier (*Ribosomal Database Project*; <http://rdp.cme.msu.edu/>) e BLASTn Green Genes 5.6 (DESANTIS et al., 2006).

Posteriormente, os dados finais de MISEq foram submetidos ao *Sequence Read Archive* (SRA) banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

3.2.2 Análises estatísticas

Após confirmar a normalidade dos dados referente à qualidade do efluente tratado por meio do teste Kolmogorov – Smirnov, um teste t de Student foi realizado, para avaliar se ocorreu diferença estatística entre a qualidade do efluente tratado entre os períodos I e II.

Com os resultados da análise de qPCR foi aplicado um teste t de Student para identificar se ocorreu diferença significativa na abundância dos genes expressos na mesma camada do WCVD nos diferentes períodos avaliados, e, também, para averiguar se ocorreu diferença significativa nos genes identificados em diferentes camadas do WCVD no mesmo período avaliado.

Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistica 7.0 (STATSOFT INC, 2004) e com um nível de significância de $p < 0,05$.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL III

O procedimento experimental III foi conduzido entre os meses de fevereiro a julho de 2016, durante 6 meses, no sistema IV (Figura 7), também, situado nas dependências do grupo GEMMA na UPC. Esse procedimento experimental foi conduzido no mesmo sistema híbrido de WC empregado para o tratamento de esgoto sanitário do sistema III (Figura 11), em um período seguinte ao término do procedimento experimental II. No entanto, as duas células do WCVD, nesse momento, passaram a operar de forma isolada e paralelamente. Sendo assim, uma das células operou como um WCVD, e a outra célula como um WCVD-FS, com uma área superficial de 1,5 m² cada.

Nesse procedimento experimental, o arranjo tecnológico foi composto por um tanque Imhoff, que operou como tratamento primário, seguido de um WCVD e um WCVD-FS que operaram em paralelo (Figura 15). Após a passagem do efluente no WCVD o mesmo seguiu para o WCH, enquanto que o efluente do WCVD-FS retornou para a rede de coleta, em um ponto posterior a captação.

Figura 15 – *Wetland* construído vertical descendente de fundo saturado e *wetland* construído vertical descendente do procedimento experimental III.



O WCVD-FS operou com os primeiros 45 cm do material filtrante instaurados, e os últimos 35 cm saturados com efluente, enquanto que, o WCVD operou sem saturação, sendo 80 cm de drenagem livre. O material filtrante de ambos os *wetlands* era composto por areia (com diâmetro de 1 a 2 mm) nos primeiros 10 cm, e os outros 70 cm eram brita (com diâmetro 3 a 8 mm). A macrófita plantada foi a *Phragmites australis*.

Nesse procedimento experimental, cada *wetland* operou com uma vazão diária de 200 L, resultando em uma TH de 133 mm d⁻¹, uma carga orgânica média de 40 g DQO m⁻² d⁻¹, conforme recomendações de Sezerino et al. (2012). A alimentação foi realizada intermitentemente todos os dias da semana, por meio de bombeamento, totalizando 8 pulsos por dia de 25 L pulso⁻¹.

Para o controle da quantidade de afluente e efluente dos *wetlands* foram implantados medidores de vazão eletromagnéticos (SITRANS FM MAGFLO[®]).

3.3.1 Monitoramento do sistema IV

O monitoramento do sistema IV foi realizado por meio de coletas de amostras do afluente e efluente de cada *wetland*, com frequências de

duas vezes na semana. Os parâmetros analisados juntamente com as metodologias empregadas encontram-se descritos na Tabela 3.

Para realizar as análises microbiológicas, foram coletadas amostras do maciço filtrante de cada *wetland* (em diferentes profundidades), e também do afluente de ambas as unidades.

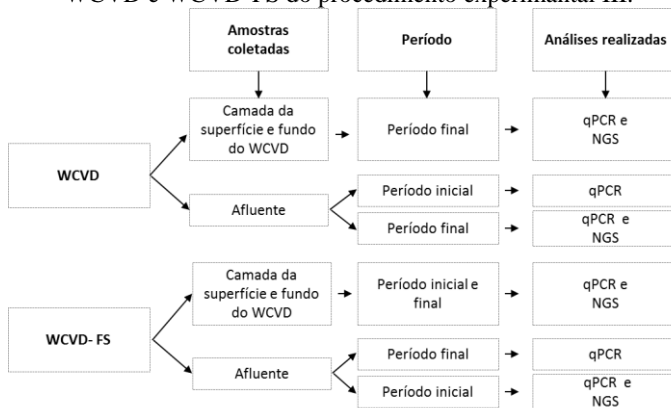
Referente a coleta de amostras do maciço filtrante, no WCVD foram coletadas amostras após um período de 6 meses de operação da unidade, sob as condições operacionais descritas no item 3.3 (período final). No WCVD-FS foram coletadas amostras em duas campanhas, a primeira, foi realizada 1 dia antes de ser implementada a saturação de fundo na unidade (período inicial), e a segunda campanha, foi realizada após um período de 6 meses de operação do *wetland*, com o fundo saturado (período final). Para o afluente, foi coletada uma amostra no período inicial e a outra no período final do estudo.

As amostras do maciço filtrante foram coletadas com auxílio de um amostrador de solo (Figura 13), na camada da superfície dos *wetlands* (entre 0 a 15 cm de profundidade) e na camada do fundo (entre 70 a 80 cm de profundidade). Essas amostras foram coletadas em triplicatas para cada camada avaliada de cada *wetland*.

Com essas amostras foi empregada a técnica de (RT)-qPCR, e sequenciamento de nova geração do 16S rRNA de bactérias e arqueas. A análise de (RT)-qPCR foi realizada com todas as amostras coletadas no material filtrante de ambos os *wetlands*, e também, com as amostras do afluente de ambos os períodos. Enquanto que, o sequenciamento de nova geração foi realizado, com as amostras do material filtrante coletadas no período final de operação do WCVD, período inicial e final de operação do WCVD-FS, e, também, com a amostra do afluente do período final. Na Figura 16 apresenta-se um esquema amostral das coletas e análises realizadas.

O procedimento de extração de RNA/DNA, as análises de (RT)-qPCR e o sequenciamento de nova geração foram conduzidos conforme descrito no item 3.2.1.2, referente ao sistema III, do procedimento experimental II.

Figura 16 – Amostragens realizadas e análises microbiológicas empregadas no WCVD e WCVD-FS do procedimento experimental III.



3.3.2 Análises estatísticas

A normalidade dos dados de qualidade do efluente tratado foi verificada com o teste Kolmogorov - Smirnov. Posteriormente, com a confirmação da normalidade, uma análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) foi empregada, para identificar se ocorreram diferenças entre a qualidade do efluente tratado entre os dois *wetlands* avaliados.

Com os resultados da análise de qPCR das amostras coletadas no final do período de operação do WCVD, foi aplicado um teste t de Student ($p < 0,05$), para identificar se ocorreu diferença significativa entre a abundância dos genes identificados nas amostras coletadas na camada da superfície e do fundo. No WCVD-FS, foi aplicado um teste t de Student ($p < 0,05$) para avaliar se ocorreu diferença significativa na abundância dos genes identificados nas amostras da camada da superfície e do fundo, coletadas no mesmo período operacional, e também, para verificar se ocorreu diferença significativa na abundância dos genes identificados na mesma camada entre as amostras coletadas nos diferentes períodos avaliados (período inicial e final).

Correlações de Pearson foram conduzidas entre a abundância de transcritos de *amoA* de AOB e AOA (resultados de qPCR) e a abundância relativa de NOB (resultados de NGS). Para o WCVD, essa análise foi realizada considerando os resultados obtidos na camada da superfície e do fundo. Enquanto que para o WCVD-FS, foi considerado apenas os dados referente à camada da superfície. Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistica 7.0 (STATSOFT INC, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida e apresentada em forma de quatro artigos científicos, os quais foram publicados e ou submetidos aos periódicos científicos.

4.1 ARTIGO 1

A carga orgânica e hidráulica são parâmetros chaves para o dimensionamento de WCVD. A aplicação de uma alta carga orgânica pode influenciar no processo de nitrificação. Ainda, a TH aplicada de forma indireta, também, está vinculada com a nitrificação. Além desses parâmetros, a utilização de um regime hidráulico baseado em períodos de alimentação e repouso, vem sendo empregado nesses sistemas, principalmente em unidades em escala real. Contudo, atualmente, não se conhece a influência de longos períodos de repouso e alimentação, na dinâmica das comunidades bacterianas atuantes nas transformações do nitrogênio, presentes no maciço filtrante dessas unidades. Neste contexto, o Artigo 1¹ teve como principal objetivo avaliar a influência da carga orgânica e hidráulica aplicada, e do regime hidráulico operado sobre a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante presentes no material filtrante de WCVD.

Para isso, foram utilizados dois microcosmos que simularam o perfil vertical de um WCVD, denominados microcosmo 1 (M1) e microcosmo 2 (M2), preenchidos com areia como material filtrante. O M1 operou com uma carga orgânica fixa de 41 g DQO m⁻² d⁻¹ e uma TH

¹ O Artigo 1 deu origem a seguinte publicação:

Ecological Engineering 95 (2016) 180–188



Organic load and hydraulic regime influence over the bacterial community responsible for the nitrogen cycling in bed media of vertical subsurface flow constructed wetland

Catiane Pelissari^a, Mayara Oliveira dos Santos^a, Benny Zuse Rousso^a,
Alessandra Pellizzaro Bento^b, Rafael Dutra de Armas^c, Pablo Heleno Sezerino^{a,*}



média de 72 mm d⁻¹, enquanto que, o M2 operou com uma carga orgânica média de 104 g DQO m⁻² d⁻¹ e uma TH fixa em 170,5 mm d⁻¹. Após um período de 180 dias de alimentação semanal, um regime hidráulico intercalado de períodos de 30 dias de alimentação e 30 dias de repouso foi adotado. No total, 7 períodos foram monitorados (4 períodos de alimentação e 3 períodos de repouso). Ao término de cada período, as comunidades bacterianas nitrificantes e desnitrificante foram caracterizadas por meio da técnica FISH. Além disso, no final do experimento (360 dias de operação) foi realizado o NGS do 16S rRNA de eubactéria, com amostras coletadas na camada do fundo e da superfície do maciço filtrante de cada microcosmo. A abundância de bactérias nitrificantes em relação ao total de bactérias foi maior no M1, que operou com menor carga orgânica e TH (15 % e 3 % para AOB, 18 % e 10 % para NOB em períodos de alimentação e repouso, respectivamente), comparativamente ao M2 (9 % e 1 % para AOB, 8 % e 4 % para NOB, em períodos de alimentação e repouso, respectivamente). Também, foi identificado no M1, maior abundância de famílias bacterianas associadas com a desnitrificação (*Rodocyclaceae* e *Camamonadaceae*). Por fim, foi identificada uma diminuição na abundância de bactérias nitrificantes no final de cada período de repouso. Contudo, as mesmas restabeleceram-se no meio, com a retomada da alimentação, demonstrando abundância similar em todos os períodos de operação. Bactérias desnitrificantes permaneceram estáveis ao longo do período de estudo.

Transcrição adaptada do Artigo 1:

4.1.1 Relevance and objective

Vertical subsurface flow constructed wetlands (VF) are an ecotechnology widely employed as treatment solution to different influent wastewater compositions. These units are designed to promote advanced treatment performance, in terms of carbonaceous organic matter and suspended solids removal as well in nitrogen transformations, markedly the nitrification (KADLEC; WALLACE, 2009)

VF wetlands sizing is dependent on the hydraulic loading rates (HLR) and the organic loading rates (OLR) applied on its superficial area (SEZERINO et al., 2012; HOFFMANN et al., 2011; PLATZER, 1999). Besides HLR and OLR, the hydraulic regime is also a

fundamental parameter to maximise treatment performance in constructed wetlands (CW). Intermittence of feeding and rest periods allows the control of biomass in the bed media (MOLLE et al., 2008). These design and operational variables are directly related with the nitrogen transformation processes that happen in CW (SAEED; SUN, 2012). Besides that, they also affect the microbial community inside the bed media, since the microbial diversity, density and stability are directly related with the treatment performance of such units (FAULWETTER et al., 2009).

Nowadays, the microbial interactions and their role in treatment performance are being increasingly main subjects of many studies conducted on VF wetland. Hu et al. (2016) elucidated through the identification of functional gene expressions, the microbial nitrogen removal pathways in those systems. The relation of viable and dead bacteria in different depths along the VF wetland profile was addressed by Foladori et al. (2015). Guan et al. (2015) evaluated the influence of substrate composition on the microbial community. The impact of different macrophyte species on the bacteria community was evaluated by Zhang et al. (2010). Salomo et al. (2009) evaluated the metabolic diversity of the microbial community in different VF wetland layers. Tietz et al. (2007b) assessed the ammonia oxidizing bacteria (AOB) community in a VF wetland.

Even though there are a high number of studies that investigate microbial dynamics in CW, there is not a clear understanding of how intermittent feeding and alternating operational periods affect the structure of the bacterial community engaged in nitrogen transformation in VF wetland. In that way, a detailed knowledge about the structure and physiology of the microbial community involved in nitrogen transformations within this operational outline is essential. Firstly, because this hydraulic regime is widely employed in full scale systems in Brazil (TREIN et al., 2015) and, secondly, due to the possible optimization of nitrogen removal pathways, and therefore, unit's performance, once these mechanisms are better understood. Furthermore, the relations of this group of microorganisms with the total microbial community and the design and operation variables can also enhance nitrogen removal efficiencies.

Given that, the aim of this study was to evaluate the effect of the OLR and the hydraulic regime over the nitrifying and denitrifying

bacterial community present in the bed media of vertical flow constructed wetland employed as wastewater treatment solution.

4.1.2 Materials and methods

4.1.2.1 Experimental units

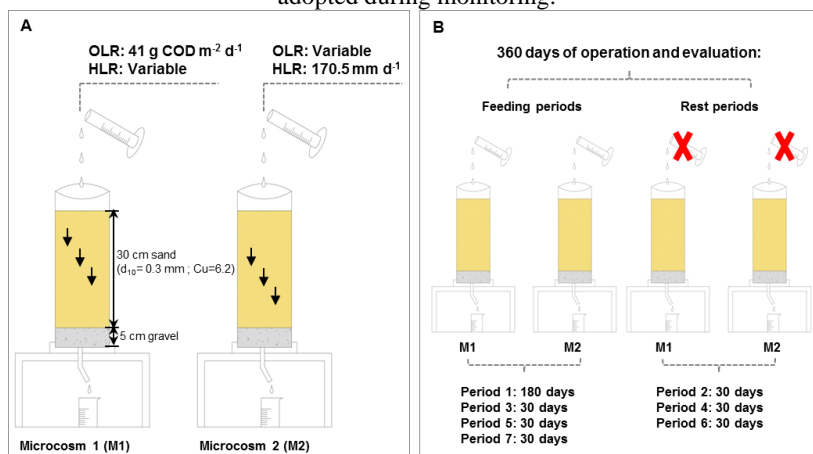
This study was conducted in bench scale using two microcosms (microcosm 1 and microcosm 2), which represent a vertical profile of bed media from VF wetland. The microcosms had superficial area equal to 0.0176 m², depth of 30 cm and coarse sand ($d_{10} = 0.3$ mm and uniformity coefficient = 6.2) as bed media. Both microcosms were operated under an average temperature of 20 °C. The treatment units were unplanted, Nevertheless, Tietz et al. (2007a) showed no statistically significant difference in bacterial biomass in all the layers of planted and unplanted VF systems.

Microcosm 1 was operated with a constant OLR of 41 g COD m⁻² d⁻¹, according to Sezerino et al. (2012) recommendations, while the HLR was variable presenting an average value of 72 mm d⁻¹. Microcosm 2 was operated with variable OLR around 104 g COD m⁻² d⁻¹ and constant HLR of 170.5 mm d⁻¹. The latter HLR value refers to calculations based on Platzer (1999) oxygen transfer model. The calculations provide an oxygen positive balance considering air drag through the superficial area and oxygen consumption for carbon and nitrogen removal.

The two microcosms were fed with urban wastewater, from the sewerage system of the municipality of the Florianópolis, southern Brazil. The feeding of the two microcosms was based on two strategies. During the startup period (first 180 days), feeding was performed every week, three days per week (Tuesdays, Wednesdays and Thursdays) and three times per day (9:00 AM, 1:00 PM and 5:00 PM). This strategy was adopted to assure the development of microbial community inside the bed media. After 180 days of startup, feeding was done based on a hydraulic regime that alternates periods of 30 days of feed and 30 days of rest. This strategy of feeding and rest periods was implemented to allow the evaluation of the effect of rest and operation periods on bacterial communities in the filtering media. Thus, seven periods were alternated, which 4 were operation periods (periods 1, 3, 5 and 7) and three were rest periods (2, 4 and 6), totalling 360 days of operating and monitoring (Figure 17).

The physical-chemical characterization of the influent and treated effluent during operational periods was done every week throughout the 360 days. The evaluated parameters were: pH, alkalinity, total suspended solids (TSS), chemical oxygen demand (COD), ammonium nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$), nitrite nitrogen ($\text{NO}_2\text{-N}$) and nitrate nitrogen ($\text{NO}_3\text{-N}$). All parameters analyses followed APHA (2005) recommendations, exception being made to the parameter $\text{NH}_4\text{-N}$, which followed Vogel (1981) recommendations.

Figure 17 – Microcosms used to simulate vertical profile of vertical flow constructed wetland. a) Scheme of the microcosms. b) Hydraulic regime adopted during monitoring.



4.1.2.2 Bacterial analysis

- Technique of fluorescence in situ hybridization

The total, nitrifying and denitrifying bacterial communities were monitored in both microcosms using the technique of Fluorescence in situ hybridization (FISH). It was used specific probes to each taxon (Tabela 2), according to Amann (1995) recommendations.

For bacterial analysis of nitrifying and denitrifying communities, aliquots of 20 g of bed media were collected, to which 50 mL of deionized water was added. Samples were mixed and sonicated in an ultrasound for 5 min in order to loosen the biofilm from the bed media.

Then, samples were centrifuged at 1500 G for 5 min. Measurement of absorbance of samples was conducted before and after centrifugation and sonication to confirm the integrity of the extracted biofilms.

In order to quantify the bacterial population, at least 10 images were recorded for each sample, and examined with a microscope (Olympus BX41, Tokyo, Japan). For the estimation of the abundance of hybridized cells using the probe EUB mix, the cells stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were considered as representatives of 100 % of all microorganisms determined by digital image. For the rest of the probes, 10 fields were randomly singled, and cells stained with the probe EUB mix were considered as being 100 % of all bacteria determined by digital image.

- Next Generation Sequencing (NGS)

At the end of the 360 days of monitoring, the microcosms were deactivated and samples from the bed media were collected. Altogether, two different depths of the vertical profile were evaluated, at 0 to 0.05 m (surface) and 0.15 to 0.30 m (bottom).

The DNA from the samples was extracted using the extraction kit DNA MoBio Power Soil TM (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), following the producer instructions. The integrity of the extracted DNA was verified through horizontal electrophoresis using agarose gel 1 %, TAE 1X buffer and Sybr Green (Life Technologies, SP, Brazil) as samples' stain. The horizontal electrophoresis lasted 60 min, at 60 V. The image visualization from the gels was done using ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA).

Afterwards, NGS of the V3-V4 region of the 16S rRNA was performed on the extracted DNA. It was utilized universal primers to bacteria, as such as the U341F 5'CCTACGGGRSGCAGCAG3' (ZAKRZEWSKI et al., 2012) and 806R 5'GGACTACHVGGGTWTCTAAT3' (CAPORASO et al., 2011). The last procedure was done using the new generation Miseq gene sequencing platform.

4.1.2.3 Statistical analysis

Statistical analyses were applied on the physical-chemical parameters aiming to compare microcosms' 1 and 2 overall treatment performances. The applied statistical test was the Wilcoxon matched-

pairs test ($p < 0.05$), a non-parametric analysis among dependent variables. Also, Pearson's linear correlations were determined between the bacterial community identification, obtained through FISH, and the treated effluent quality. All statistical analyses were done using the software Statistic 7.0™ (STATSOFT, 2004). A canonical correspondence analysis of the $\text{NH}_4\text{-N}$ and COD removal efficiencies and the $\text{NO}_x\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ formation was done. This test was made to explain the proportion of different bacterial groups identified in both microcosms using the FISH technique. The canonical correspondence analysis was done using the software CANOCO 4.5™ (TER BRAAK; SMILAUER, 2002).

4.1.3 Results and discussion

4.1.3.1 Treatment performances of microcosms

The average influent and treated effluent characteristics achieved during the 360 days of monitoring are exposed in Table 5. Microcosm 1 (operated with an average HLR of 72 mm d^{-1} and a constant ORL of $41 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), presented an average COD removal rate equal to 89 %, for the 4 periods of operation. Microcosm 2, which has been operated with higher OLR (constant HLR of 170.5 mm d^{-1} and average OLR of $104 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), showed close COD removal efficiency (83 %) to microcosm 1. The OLR increase is often concurrent with a higher rate of organic compounds removal in constructed wetlands (CALHEIROS et al., 2007).

In regards to the ammoniacal nitrogen, microcosm 1 presented, in average, 78 % of removal for the 4 periods of operation, whereas microcosm 2 was restricted to only 62 %. The removal of $\text{NH}_4\text{-N}$ in VF wetland is directly associated with nitrification (VYMAZAL, 2013). The nitrification was evident in both microcosms, being, however, greater in microcosm 1. The HLR is linked with the oxygen drag to inside of the bed media. The volume of influent that percolates in the bed media is replaced by an equivalent volume of air (KAYSER; KUNST, 2005).

According to Wilcoxon test results, microcosms 1 and 2 presented statistical differences on the removal efficiencies for the parameters COD ($p = 0.01424$), $\text{NH}_4\text{-N}$ ($p = 0.01853$) and $\text{NO}_3\text{-N}$ ($p =$

2.98×10^{-8}). These differences could be explained due to different bacterial community structures for each microcosm.

Table 5 – Mean, (\pm SD) concentrations, mean organic and inorganic applied loading rates, mean applied hydraulic rate and mean removal efficiencies of influent and effluent for microcosm 1 (M1) and microcosm 2 (M2).

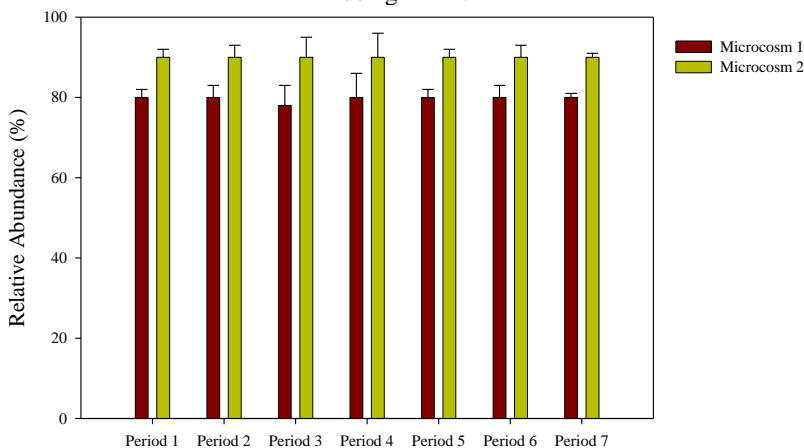
Parameters	Period 1		Period 3		Period 5		Period 7	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
	n=23	n=23	n=5	n=5	n=4	n=4	n=4	n=4
Influent concentrations (mg L ⁻¹)								
pH	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 1	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
Alkalinity	264 ± 92	264 ± 92	319 ± 38	317 ± 80	262 ± 24	273 ± 43	205 ± 71	240 ± 35
TSS	70 ± 32	70 ± 32	119 ± 52	90 ± 33	123 ± 23	110 ± 14	48 ± 29	53 ± 28
COD	580 ± 177	580 ± 177	700 ± 226	612 ± 197	745 ± 53	704 ± 89	414 ± 126	545 ± 136
NH ₄ -N	70 ± 11	70 ± 11	69 ± 12	60 ± 17	64 ± 6	61 ± 12	50 ± 11	55 ± 15
NO ₂ -N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
NO ₃ -N	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 1	1 ± 1	4 ± 1	4 ± 0	3 ± 1	3 ± 1
Effluent concentrations (mg L ⁻¹)								
pH	6 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	5 ± 1	6 ± 0
Alkalinity	93 ± 75	134 ± 90	40 ± 36	156 ± 41	0 ± 0	83 ± 48	7 ± 8	41 ± 27
TSS	19 ± 14	35 ± 26	12 ± 14	6 ± 5	1 ± 2	3 ± 2	18 ± 13	4 ± 0
COD	144 ± 93	166 ± 36	38 ± 18	79 ± 42	29 ± 13	92 ± 51	41 ± 7	74 ± 13
NH ₄ -N	13 ± 11	30 ± 17	26 ± 7	33 ± 13	12 ± 8	19 ± 13	7 ± 3	11 ± 5
NO ₂ -N	3 ± 3	3 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	6 ± 5	1.5 ± 1	6 ± 3	1 ± 5
NO ₃ -N	26 ± 8	11 ± 7	24 ± 10	12 ± 5	55 ± 0	10 ± 5	47 ± 15	12 ± 5
Mean removal efficiencies (%)								
TSS	73	50	66	93	99	97	62	92
COD	75	71	95	87	96	87	90	86
N-NH ₄ ⁺	81	57	63	45	85	68	85	80
Organic and inorganic applied loading rates and applied hydraulic loading rate								
TSS (g m ⁻² d ⁻¹)	5 ± 2	12 ± 6	7 ± 3	15 ± 4	7 ± 3	19 ± 5	6 ± 2	9 ± 5
COD (g m ⁻² d ⁻¹)	41	99 ± 8	41	104 ± 5	41	120 ± 8	41	93 ± 10
NH ₄ -N (g m ⁻² d ⁻¹)	5 ± 2	12 ± 1	4 ± 3	10 ± 4	4 ± 1	10 ± 3	5 ± 2	9 ± 3
HLR(mm.d ⁻¹)	72 ± 5	170.5	60 ± 5	170.5	55 ± 8	170.5	100 ± 10	170.5
C/N Ratio	8	8	10	10	10	12	8	10

4.1.3.2 *FISH bacterial identification*

The relative abundance of the total bacterial community was of $79.5 \pm 1\%$ and $94 \pm 5\%$ for feeding periods, and $80 \pm 0.2\%$ and $90 \pm 0.2\%$ in rest periods for the microcosm 1 and 2 respectively (Figure 18). The rest periods of 30 days did not influence the relative total bacterial abundance, since the abundance remained constant throughout the 360 days of monitoring. The stability of the bacterial community in constructed wetlands is achieved after long-term operation (more than 75 days) (WEBER; LEGGE, 2011; SAMSÓ; GARCÍA, 2013). Also, for the stabilization of the microbial biomass in constructed wetlands, more than 100 days is usually required (RAGUSA et al., 2004).

The steadiness of the bacteria domain during rest periods and the hydraulic regime rotation between rest and operation periods supported COD removal. The removal increased after the first operation period (to more than 90% for microcosm 1, with $41 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and to 85% for microcosm 2, with $104 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Alternating operation and rest periods is fundamental to support attached biomass growth in bed media. Also, it is an important factor to keep aerobic conditions inside the bed media and to mineralize organic deposits (MOLLE et al., 2008).

Figure 18 – Proportion of EUB mix probe stained bacteria against stained cells using DAPI.



During feeding periods, the mean relative abundance for the bacterial group involved in nitrogen transformations for microcosm 1 was $14 \pm 11\%$. For the same microcosm during rest periods, the abundance decreased to $7 \pm 5\%$. Concerning microcosm 2, the mean relative abundance for the same bacterial group was considerably smaller. During feeding periods, the percentage was equal to $7.5 \pm 4\%$, while during rest periods it was $5 \pm 6\%$ (Figure 19 a,b). The identified nitrifying bacteria communities were affected by rest periods. They presented a reduction on their relative abundance when compared to operational periods. Nevertheless, it was observed the reestablishment of these groups after every 30 days of operation. Also, nitrification process was not compromised. AOB as *Nitrosomonas europaea*, even if cultivated for months without ammonia input, were capable to recover its oxidizing activity shortly after a single pulse of ammonia into the bed media (LAANBROEK; BAR-GILISSEN, 2002).

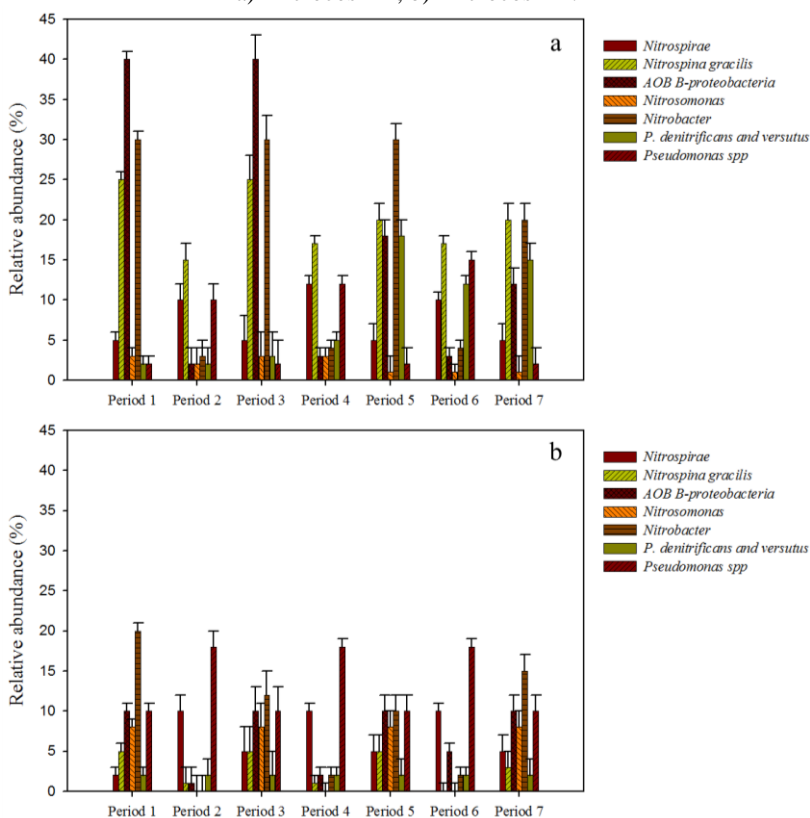
Microcosm 1 showed higher performance in nitrification (Table 5). The different performance of nitrification is related to the dynamics of nitrifying bacteria. AOB were identified in greater abundance in the microcosm 1, in feeding periods ($15 \pm 4\%$) and rest periods ($3 \pm 2\%$), compared to the microcosm 2 ($9 \pm 1\%$ and $1 \pm 2\%$, for feeding and rest periods, respectively). The same behaviour was identified for NOB bacteria in feeding periods ($18 \pm 7\%$ and $8 \pm 5\%$, for microcosm 1 and 2, respectively) and rest periods ($10 \pm 6\%$ and $4 \pm 3\%$, for microcosm 1 and 2, respectively). The high OLR can directly affect the nitrification due to the nitrifying and heterotrophic bacteria competition for oxygen and inorganic nitrogen. This competition tends to be more intense in carbon-rich environments (TRUU et al., 2005; PAREDES et al., 2007a; FAULWETTER et al., 2009).

Nitrosomonas sp (NEU 653 probe) in feeding periods, was the dominant identified AOB in microcosm 2 (operated with $10.2 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), with relative abundance of $8 \pm 0\%$. However, in microcosm 1, with lower OLR and with an ammonia loading rate of $4.5 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, the relative abundance of *Nitrosomonas* sp was only $2 \pm 1\%$ for feeding and rest periods (Figure 19 a,b). It is generally suggested that different $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations select different types of AOB, (WEBSTER et al., 2005). High $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations seem to create systems dominated by single *Nitrosomonas* species (JURETSCHKO et al., 1998). Verhamme et al. (2011) evaluated the influence of different ammonia concentrations in AOB and ammonia oxidizing archaea (AOA) growth using microcosm with soil during 28 days. The results

showed that a growth of AOA happened with all ammonia concentration, while AOB growth (*Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrospira* cluster) occurred only with the higher concentration.

Figure 19 – Proportion of the nitrifying and denitrifying bacterial community in relation to EUB probe at the end of each feeding and rest period.

a) Microcosm 1; b) Microcosm 2.



In regards to the NOB (Figure 19 a,b), during feeding periods, the *Nitrobacter* sp (NIT 3 probe) genus was the dominant for both microcosms ($27 \pm 4\%$ for microcosm 1, and $14 \pm 1\%$ for microcosm 2). During rest periods, it was identified the predominance of *Nitrospira* phylum (NTSPA 662 probe). This phylum showed an average abundance of $16 \pm 3\%$ for microcosm 1 and $10 \pm 0\%$ for the

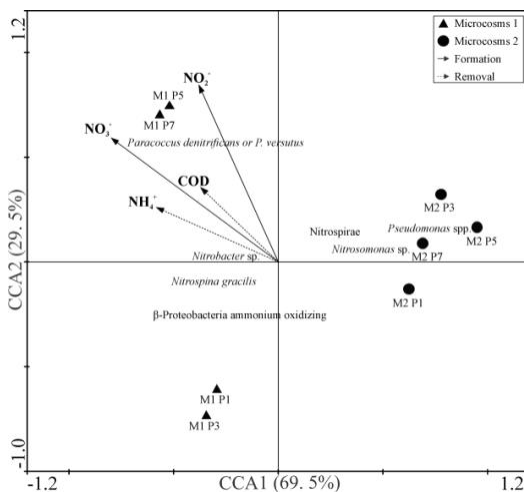
microcosm 2. *Nitrospira* genus can proliferate with small substrate concentrations, what could have occurred due to rest periods (NOGUEIRA; MELO, 2006).

Denitrifying bacteria from the *Pseudomonas* spp. genus were identified in both microcosms with higher abundance in rest periods (12 ± 2 % for microcosm 1 and 18 ± 0 % for microcosm 2) than in feeding periods (2 ± 0 % for microcosm 1 and 10 ± 0 % for microcosm 2) (Figure 19 a, b). Rest periods were beneficial to the development of this genus, probably due to the low oxygen diffusion, consequence of the lack of feeding. The higher abundance of this genus in microcosm 2 can be related to the higher availability of carbon due to higher OLR.

Presence of bacteria from the *Paracoccus* genus (PDV 1031 probe) was observed in both microcosms, with higher abundance in microcosm 1, mainly in periods 5, 6, and 7 (Figure 19 a,b). On the other hand, in microcosm 1, since the 4th period, a decrease in AOB abundance was registered (Figure 19a). After the 5th and 7th period, an increase in $\text{NO}_2\text{-N}$ e $\text{NO}_3\text{-N}$ production was noted (Table 5) Pearson's correlations undertaken during this study, between nitrite production and the abundance of *P. denitrificans* and *P. versutus*, point to a strong positive correlation (0.756) of the variables. The canonical analysis done between $\text{NH}_4\text{-N}$ and COD removal, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ production (Table 5), and relative abundance of identified bacteria showed the relation between $\text{NO}_2\text{-N}$ occurrence and *P. denitrificans* and *P. versutus* (Figure 20).

The results of these analyses could indicate the occurrence of heterotrophic nitrification. *Paracoccus denitrificans* is a heterotrophic bacterium, which survives and proliferates in oxidative, micro-oxidative and anoxic regions (STOUTHAMER, 1991). During heterotrophic nitrification under anaerobic conditions, the $\text{NH}_4\text{-N}$ is oxidized to hydroxylamine, and then, to nitrous oxide. Yet, under aerobic conditions, the hydroxylamine is oxidized to nitrite and to nitrous oxide (RICHARDSON, 2000). Nitrification and denitrification occurred concurrently with COD removal in early stages of a cascade mesocosm wetland receiving relatively organic rich wastewater (TANNER et al., 2002).

Figure 20 – Canonical correlation between $\text{NH}_4\text{-N}$ and COD removal and the $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ formation with identified bacteria using the FISH technique.



M1 P1- Microcosms 1 - Period 1; M2 P1- Microcosms 2 - Period 1;
M1 P3- Microcosms 1 - Period 3; M2 P3- Microcosms 2 - Period 3;
M1 P5- Microcosms 1 - Period 5; M2 P5- Microcosms 2 - Period 5;
M1 P7- Microcosms 1 - Period 7; M2 P7- Microcosms 2 - Period 7;

4.1.3.3 Bacterial community structure

NGS results obtained at the end of the 360 days of the microcosms monitoring indicate that microcosm 1 and 2 present differences in terms of bacterial community structure (Figure 21). Microbial community structure is directly related with the oxygen availability, which is dependent on f the HLR and the OLR (ADRADOS et al., 2014).

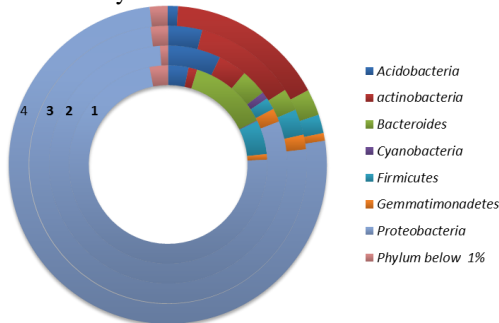
(i) Phylum rank

In total, 15 phyla for each microcosm were identified (Figure 21). Most of them are naturally present and abundant in natural wetlands (ANGELONI et al., 2006) and constructed wetlands (CHEN et al., 2015; ANSOLA et al., 2014).

The *Proteobacteria* phylum was the dominant for both microcosms. It presented a mean relative abundance of the surface and

bottom zones, equal to 76 % of all identified sequences (Figure 21). The *Proteobacteria* phylum included a very high level of bacterial metabolic diversity related to global carbon, nitrogen and sulfur cycling (ANSOLA et al., 2014). Similar behavior has been reported in constructed wetlands by Chen et al. (2015), Calheiros et al. (2009) and Ahn et al. (2007), using pyrosequencing, PCR technique, and FISH technique, respectively. Following the *Proteobacteria* phylum, the phyla *Bacteroides*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Gemmatimonadetes* were the most abundant among the taken samples.

Figure 21 – Relative abundance in phylum rank identified in surface and bottom layers of microcosms 1 and 2.



Microcosm 1: Surface layer ; (2) Microcosm 1: Bottom layer; (3) Microcosm 2: Surface layer ; (4) Microcosm 2 Bottom layer. The relative abundance is defined as the number of identified sequences of the taxon divided by all sequences of the sample.

A clear difference between both microcosms was the distribution of the *Actinobacteria* phylum. For the surface and bottom samples from microcosm 1, abundances of 2 % and 4 % of all sequences were found. Meanwhile, for microcosm 2, the abundance for this phylum was higher (12 % in surface and 16 % for bottom). Different organisms are encountered among *Actinobacteria*, and the phylum includes pathogens (e.g., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., and *Propionibacterium* spp.), soil inhabitants (*Streptomyces* spp.), plant commensals (*Leifsonia* spp.), nitrogen-fixing symbionts (*Frankia*), and gastrointestinal tract inhabitants (*Bifidobacterium* spp.) (VENTURA et al., 2007). This phylum encompasses bacteria that are diverse with respect to their biochemistry, and relationship to oxygen (STACH et al., 2003). *Bifidobacterium* spp. are, for instance, anaerobic/microaerophilic and fermentative

microorganisms (BOTTACINI et al., 2012). On the other hand, *Mycobacterium* spp. are strict aerobic organisms (very abundant in microcosm 2 – see Figure 22) (VAN KEULEN et al., 2007). Species of *Streptomyces*, as *S. coelicolor* (abundant in soil) are also strict aerobic microorganisms (FISCHER et al., 2010). Probably the higher abundance of this phylum in microcosm 2 can point to better oxygen diffusion due to the applied HLR of 170.5 mm d⁻¹, generating aerobic conditions even on the microcosm's bottom.

(ii) Family rank

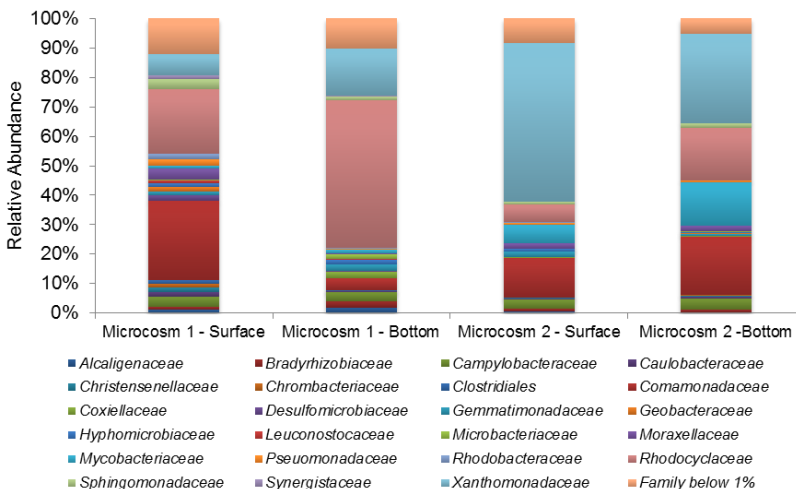
At the family taxonomic rank, 68 different families were identified within microcosm 1, whereas in microcosm 2 only 33 different taxon were determined (Figure 22). The families *Rhodocyclaceae* (36 ± 20 %), *Comamonadaceae* (15 ± 16 %) and *Xanthomonadaceae* (12 ± 6 %) were the dominant ones in microcosm 1. *Rhodocyclaceae* and *Comamonadaceae* are known denitrifying bacteria (LU et al., 2015), which could indicate the lack of oxygen diffusion and the occurrence of denitrification along the media. These processes result in a smaller oxygen demand, since these bacteria families can use nitrate or nitrite as final electrons acceptor. The high abundance of the families *Rhodocyclaceae*, *Comamonadaceae* in microcosm 1, can indicate the occurrence of nitrification (due to AOB and NOB metabolism) and simultaneous denitrification. Simultaneous nitrification and denitrification in VF wetland were already reported in other studies (HU et al., 2016; TANNER et al., 2002).

In microcosm 2, it was observed a higher abundance of the identified families. However, a smaller bacterial diversity was also noticed (Figure 22). The dominant families were the *Xanthomonadaceae* (42 ± 16 %), *Comamonadaceae* (16.4 ± 4 %), *Rhodocyclaceae* (11.8 ± 8 %) and *Mycobacteriaceae* (10.4 ± 6 %). Members of the *Xanthomonadaceae* family rank are strict aerobes and heterotrophs (MARTÍNEZ-LAVANCHY et al., 2015), therefore acting as bioindicators of aerobic environments. The great abundance of these organisms can elucidate the small abundance of nitrifying bacteria identified using FISH technique in microcosm 2. A driving force for this equilibrium state can be the competition of these organisms for oxygen.

The high abundance of these microorganisms can explain the low abundance of nitrifying bacteria identified using the FISH technique for

microcosm 2. Furthermore, oxygen competition between those groups supports the higher abundance of *Xanthomonadaceae*.

Figure 22 – Relative abundance of surface and bottom samples at the family taxonomic rank.



The relative abundance is defined as the number of identified sequences of the taxon divided by all sequences of the sample.

4.1.4 Conclusions

Taking in consideration the microcosms 360 days of monitoring, which simulated VF wetland with various applied loading rates of $\text{NH}_4\text{-N}$, OLR, and HLR ($4.5 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, $41 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, and mean HLR of 73.5 mm d^{-1} for microcosm 1; average of $10.2 \text{ NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, $104 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, and HLR of 170.5 mm d^{-1} for microcosm 2), it can be concluded that:

- Rest periods of 30 days did not interfere in relative abundance of the Bacteria domain. However, it did affect relative abundance of nitrifying bacterial community. During feeding periods, the mean abundance of the bacteria involved in nitrogen transformation was 14 %, whereas in rest periods it was 7 % for microcosm 1. For microcosm 2, in feeding periods, it was displayed a mean abundance of these bacteria of 7.5 %, while rest periods exhibited 5 %;

- Differently from the nitrifying bacteria dynamics, rest periods were beneficial for the abundance of denitrifying bacteria in both

microcosms. In rest periods, the abundance of this genus significantly increased (12 % for microcosm 1 and 18 % for microcosm 2). During feeding periods, the abundance was equal to only 2 % for microcosm 1 and 10 % for microcosm 2.

- According to FISH analyses and NGS from the 16S rRNA of bacteria, microcosm 1 operating conditions promoted greater abundance of nitrifying and denitrifying bacteria when compared to the microcosm 2.

- Due to the presence of nitrifying and denitrifying bacteria in both microcosms, the simultaneous nitrification and denitrification may be associated with removal of nitrogen in these treatment units.

4.2 ARTIGO 2

Os WCVD-FS apresentam uma nova proposta de transformação do nitrogênio em relação aos WCVD. O Artigo 1 mostrou que períodos de repouso de 30 dias promoveram uma diminuição na abundância bacteriana nitrificante, presentes no maciço filtrante de microcosmos, que simularam o perfil vertical de WCVD, operados sob alta carga orgânica. Por outro lado, não influenciaram as bactérias desnitrificantes.

Nesse contexto, dado que os WCVD-FS apresentam uma possibilidade de nitrificação e desnitrificação simultâneas, o Artigo 2² teve como objetivos: (i) identificar a dinâmica bacteriana nitrificante e desnitrificante em um WCVD-FS operado sob baixa carga orgânica; e (ii) avaliar a influência dos períodos de repouso na comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante em um WCVD-FS, operado com baixa carga orgânica. Para isso, foi caracterizada a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante durante 1 ano, em um WCVD-FS, preenchido com areia como material filtrante, empregado no tratamento de esgoto sanitário de um condomínio residencial. O WCVD-FS possuía uma área superficial de 3.141 m², dividida em 4 células que operavam com períodos de repouso e de alimentação de 30 dias. Em uma das células (com área superficial de 764 m²) foram coletadas amostras do maciço filtrante, em diferentes profundidades do perfil vertical do *wetland*, no final de cada período de operação e repouso. Com essas amostras, foi caracterizada a comunidade bacteriana nitrificante e desnitrificante com a técnica FISH. A célula monitorada do WCVD-FS operou com uma carga orgânica média de 4 g DQO m⁻² d⁻¹ e TH de 24,5 mm d⁻¹. A abundância de bactérias nitrificantes identificada em relação ao total de bactérias foi de (8 % e 3 % para AOB e 5 % e

² O Artigo 2 deu origem a seguinte publicação:

Science of the Total Environment 574 (2017) 390–399



Nitrogen transforming bacteria within a full-scale partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater



Catiane Pellissari ^a, Cristina Ávila ^b, Camila Maria Trein ^a, Joan Garcia ^b,
Rafael Dultra de Armas ^c, Pablo Heleno Sezerino ^{a,*}

2 % para NOB, em períodos de alimentação e repouso, respectivamente). Bactérias desnitrificantes foram identificadas com uma abundância em torno de 10 % ao longo do perfil vertical. Períodos de repouso continuaram promovendo uma diminuição na abundância bacteriana nitrificante. Por outro lado, as bactérias desnitrificantes não foram influenciadas pelos períodos de repouso.

Transcrição adaptada do Artigo 2

4.2.1 Relevance and objective

Various configurations and operational strategies have been investigated in constructed wetlands (CW) technology in order to provide complete removal of nitrogen, such as the use of tidal flow systems (HU et al., 2014a; AUSTIN et al., 2006a), the intermittent aeration (FOLADORI et al., 2013), the recirculation of the treated effluent (FOLADORI et al., 2013; AYAZ et al. 2012), the use of hybrid systems combining vertical subsurface flow CW (VF) and horizontal subsurface flow CW (HF) (VYMAZAL, 2013), the use of filter media that promotes greater adsorption of the different forms of nitrogen (SAEED; SUN, 2011a), the bioaugmentation of microbial populations (ZHAO et al., 2016), and the promotion of aerobic and anaerobic environments within the same reactor (SILVEIRA et al., 2015; PRIGENT et al., 2013; DONG; SUN, 2007).

Nonetheless, the knowledge, particularly concerning nitrogen transforming bacteria in VF wetlands is still limited to a few studies (ADRADOS et al., 2014; MAYO; BIGAMBO, 2005). Tietz et al. (2007b) evaluated the community of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in three VF beds (18 m², 0.50 m depth) treating municipal sewage after 2.5 years of operation and despite nitrification was stable, little AOB bacterial activity was identified. During the winter nitrification decreased, however not affecting the spatial distribution of AOB, being *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* the dominant AOB. Zhi; Ji (2014) identified functional genes involved in nitrification and denitrification in a tidal flow CW showing nitrification activity performed by AOB and Anammox bacteria, as well as denitrification.

Thus, there is a clear need to gain further insight into the dynamics of nitrogen transforming bacteria in VF wetlands, and even

more particularly in partially-saturated VF beds intended to promote TN removal within a single wetland bed, The aim of this study was therefore to characterize the nitrifying and denitrifying bacterial communities within a mature partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland at full-scale used in the treatment of urban wastewater and operated under low organic load.

4.2.2 Materials and methods

4.2.2.1 Description of the wastewater treatment plant

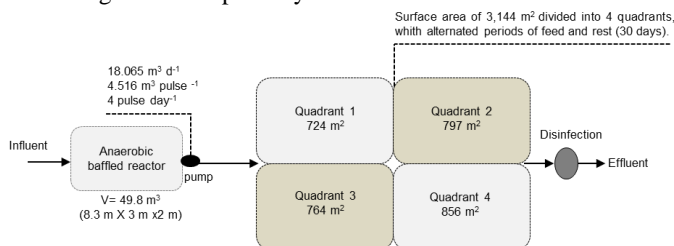
The research was conducted at a full-scale VF system located in a residential condominium in the city of Palhoça, Santa Catarina state, southern Brazil, under subtropical climate (latitude 27°45'4.82" and longitude 48°37'39.35"). This treatment plant started operation in 2006, and was designed for an estimated maximum demand of 2,200 P.E. However, during the time of the current study the system received a contribution of approximately 100 people, due to the fact that the residential condominium was not totally inhabited. This resulted in low organic and hydraulic loading rates applied to the VF wetland.

Urban wastewater flowed into an anaerobic baffled reactor acting as primary treatment before it was conveyed to the VF wetland (Figure 23) , which had a surface area of 3,141 m², a depth of 0.7 m and a saturated zone at the bottom of 0.20 m, kept constant by a level controller. The bed media consisted of 0.1m gravel of granite (3 - 8 mm) at the bottom of the drainage area, followed by 0.5 m of sand (Effective diameter $d_{10} = 0.3$ mm and Uniformity Coefficient of 4.84), and finally 0.1 m of gravel (3 - 8 mm) on the top. The planted macrophyte was *Cyperus papyrus*, which was very well developed at the time of this study.

The VF wetland had a surface area of the 3,144 m² divided into four wetland cells interconnected, which alternated cycles of feed and rest. In this way, while two of the wetland cells (crosswise) were being fed the other two were at rest, and vice versa. Cycles were of 30 days each, and were applied so as to control the growth of the attached biomass, to maintain aerobic conditions within the filter bed and to mineralize the organic deposits accumulated on the bed surface (MOLLE et al., 2008). Distribution pipes were installed across the surface of the wetland and feeding was done intermittently on the

surface of the unit by pumping every 6 hours, giving a total number of 4 pulses per day (4,516 L per pulse) (Figure 23).

Figure 23 – Diagram of the partially saturated vertical subsurface flow wetland.

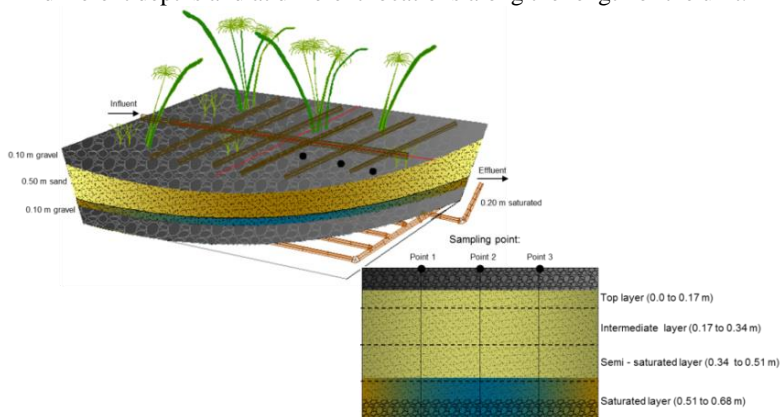


4.2.2.2 Sampling procedure

From February 2014 to February 2015, collection of samples from the bed media of the saturated VF wetland was performed monthly, totaling 12 collections throughout the year. Sample collections were always conducted in wetland cell 3 (763.6 m² surface area) at the end of each period of feed and rest. In this way, 6 sampling campaigns were carried out during the feed periods, and another six during the rest periods (n=12). At each sampling campaign, a complete vertical profile was collected from 3 points of the wetland coinciding with the holes of the distribution pipes of the unit (i.e. initial – point 1, central – point 2, and final - points 3 of portion the wetland) (Figure 24). The vertical profile was divided in layers along the depth, namely ‘top’ (0 to 0.17m depth), ‘intermediate’ (0.17 to 0.34 m depth), ‘semi-saturated’ (0.34 to 0.51 m depth), and ‘saturated’ layers (0.51 to 0.68 m).

Moreover, monitoring of the performance of the system in terms of conventional water quality parameters was performed taking grab samples at the influent and effluent of the VF wetland. Samples were collected just when the wetland cell 3 was being fed (n=10). The parameters evaluated in final effluent of VF were: pH, alkalinity, chemical oxygen demand (COD), total suspended solids (TSS), total nitrogen (TN), ammonium nitrogen (NH₄-N), nitrite nitrogen (NO₂-N), and nitrate nitrogen (NO₃-N). Their analysis followed APHA (2005) recommendations, with the exception of NH₄-N, which was determined following recommendations of Vogel (1981).

Figure 24 – Representation of the sampling cores points within the bed media of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 at different depths and at different locations along the length of the unit.



4.2.2.3 Bacterial analysis

For bacterial analysis of nitrifying and denitrifying communities, aliquots of 20 g of bed media were collected from every point and depth, to which 50 mL of deionized water was added. Samples were mixed and sonicated in an ultrasound for 5 min in order to loosen the biofilm from the bed media. Then, samples were centrifuged at 1500 G for 5 min. Measurement of absorbance of samples was conducted before and after centrifugation and sonication to confirm the integrity of the extracted biofilms.

The total, nitrifying and denitrifying bacterial communities were monitored using the technique of Fluorescence in situ hybridization (FISH). It was used specific probes to each taxon (Tabela 2), according to Amann (1995) recommendations.

For the estimation of the abundance of cells hybridized with the probe EUB mix, the cells stained with DAPI were considered as representatives of 100 % of all microorganisms determined by digital image. For the rest of the probes 10 fields were randomly singled and cells stained with the probe EUB mix were considered as being 100 % of all bacteria determined by digital image. The relative abundance of total, nitrifying and denitrifying bacteria was calculated using the software daime and split into individual color channels before image segmentation (DAIMS et al., 2006).

4.2.2.4 *Statistical data analysis*

Data normality was checked for water quality parameters through the implementation of Kolmogorov–Smirnov test. This analysis was performed by using the software Statistic 7.0™.

With regards to the identified bacterial abundance, statistical analyses were performed considering the operational parameters of the wetland, local climate conditions, and the different sampling points collected. Firstly, *t* test was realized to identify whether there was statistical significance in bacterial abundance between feed and rest periods. Secondly, one way analysis of variance - ANOVA test was used to (i) identify whether there was significant difference in bacterial abundance between the different layers of the wetland; (ii) evaluate whether statistical significance in bacterial abundance occurred between the different samples cores along wetland cell 3 (Points 1, 2, and 3); (iii) evaluate whether there were significant differences in bacterial community in different seasons. These analyses were performed with a level of significance of $\alpha=0.05$ by using the software Statistic 7.0™.

4.2.3 **Results and discussion**

4.2.3.1 *Treatment performance of the constructed wetland*

The wetland cell 3 operated with low organic (OLR) and hydraulic loading rates (HLR), with average values of 4 g COD m⁻² d⁻¹, and a HLR of 24.5 mm d⁻¹. The nitrogen load was 1.5 g TN m⁻² d⁻¹, resulting. The literature recommends an OLR in the range of 60 to 70 g COD m⁻² d⁻¹ and a HLR of 250 mm d⁻¹ for unsaturated VF in warm climates (HOFFMANN *et. al.*, 2011), and of 41 g COD m⁻² d⁻¹, 10.2 g NH₄-N m⁻² d⁻¹ and HLR of 230 mm d⁻¹ in subtropical climates (SEZERINO *et al.*, 2012). Design parameters as OLR and HLR are directly associated to the TN removal processes (SAEED; SUN, 2012). Firstly, OLR is linked to the C/N ratio of the filter media. Low OLR can result in low availability of organic carbon for denitrification. ZHAO *et al.* (2011) reported better TN removal efficiencies in VF wetlands with a C/N ratio ranging 5 to 10, compared to a C/N of 2.5. Secondly, the HLR is related to the transfer of oxygen into the filter media in VF wetlands. Lower HLR results in lower dragging of oxygen in the bed media in VF wetlands having sand as filtering material (PLATZER, 1999).

Table 6 shows the wastewater physico-chemical characterization at the influent and effluent of wetland cell 3 during feed periods. In general, the VF presented a good removal of solids and carbonaceous organic matter, being of $86 \pm 4\%$ for TSS, and $89 \pm 10\%$ for COD. With regards to nitrogen, the removal efficiency of TN and $\text{NH}_4\text{-N}$ was of $58 \pm 12\%$ and $93 \pm 2\%$ respectively. The good performance of nitrogen removal in this system may be associated with nitrification followed by denitrification, provided the bottom saturation, and the bacterial interactions in the medium. The large removal efficiency of TN in the wetland can be attributed to the saturation of the bottom of the unit, which may have enhanced the elimination of nitrogen by enabling the process of denitrification (SILVEIRA et al., 2015).

Table 6 – Mean, median and standard deviation of wastewater quality parameters at the influent and effluent wastewater of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland.

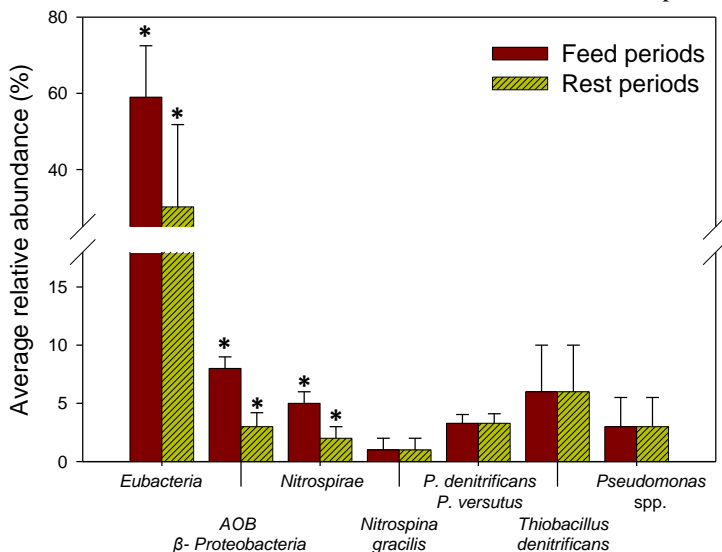
Parameter n=10	Influent VF wetland			Effluent VF wetland			Removal efficiency (%)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	
pH	6.9	7.0	0.4	6.5	6.5	0.3	-
Alkalinity (mg L^{-1})	206	212	68	120	115	36	-
TSS (mg L^{-1})	21	14	11	3	3	3	86
COD (mg L^{-1})	154	174	65	17	15	14	89
TN (mg L^{-1})	52	50	18	22	18	10	58
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg L^{-1})	42	46	21	2	3	2	93
$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg L^{-1})	<LOD	-	-	<LOD	-	-	-
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg L^{-1})	<LOD	-	-	10	10	7	-

LOD: below limit of detection

4.2.3.2 Influence of feed and rest periods on nitrifying and denitrifying bacterial communities

In general, periods of feed and rest largely influenced the structure of the bacterial communities identified in the wetland bed (Figure 25). Based on the statistical analyses, rest periods influenced mainly the abundance of eubacteria, AOB (*β -Proteobacteria*) and NOB (*Nitrospirae*) (Figure 25). The composition, diversity, and abundance of microbial communities in CW depend on environmental factors, properties of wastewater, substrate type, biomass and activity of macrophytes, and operational conditions of the treatment units (MENG et al., 2014).

Figure 25 – Mean (\pm SD) relative abundance of bacteria in partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 in feed and rest periods.



*Statistically significant: ($p < 0.05$)

The overall average relative abundance of eubacteria (EUB mix) identified in the four layers of the vertical profiles of the VF wetland was of 59 ± 13 % during feed periods, and of 30 ± 21 % during rest periods (Figure 25). The decay of this domain in rest periods is attributed to the limited availability of organic matter and nutrients in the bed media during these periods, which is magnified by the low organic and hydraulic loads applied to the unit during feed periods. This is accordance with Johnson et al. (2014), which used the metatranscriptome technique applied in different sewage treatment plants, and observed that the functional richness and microbial taxonomy is directly associated with the environmental nitrogen variation and the availability of carbon. Via FISH technique, various abundance values of Eubacteria are reported in CW. Krasnits et al. (2009) in a HF (130 m² surface area) operated for 7 years in the treatment of municipal sewage under a OLR larger (11 g BOD₅ m⁻² d⁻¹) identified an abundance of 85 %. In another study, Sawaitayothin; Polprasert (2007) reported an abundance of 49 % in CW treating

municipal landfill leachate, while according to the authors the remaining 51 % may be associated with archaea or inactivated bacteria.

In general, the diversity of bacteria involved in nitrogen transformations was the same for periods of operation and rest. However, the abundance of nitrifying bacteria was lower in rest periods (Figure 25). The decay of the abundance of this group could be a bioindication of environments with low concentration of substrate and/or oxygen, since ammonia-oxidizing bacteria (AOB) have a lower affinity for ammonium and oxygen than ammonia-assimilating heterotrophic bacteria (HANAKI et al., 1990; VERHAGEN et al., 1992). The average relative abundance of AOB β -proteobacteria (NSO190) (*Nitrosomonas* and *Nitrospira*) was 8 ± 1 % in feed periods and 3 ± 1 % in rest periods (Figure 25). *Nitrosomonas* sp. (NEU 653) was however not identified in any of the samples. This could be attributed to the fact that *Nitrosomonas* spp. have lower affinity for substrate than *Nitrospira* spp. (although higher activity) (Schramm et al., 1996). In this study, *Nitrospira* spp. was the dominant AOB, showing to prevail in environments with low $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations, and a good capacity of withstanding the physico-chemical variations in the bed media (PURKHOLD et al., 2000).

In regards to nitrite-oxidizing bacteria (NOB), the *Nitrospirae* phylum (NTSPA 662) was the most abundant of this group (5 ± 1 % in feed periods and 2 ± 1 % in rest periods). The identification of this phylum in CW has been shown by previous studies. Guan et al. (2015) characterized the microbial community in three VF wetlands (1.2 m² surface area each) applied to river water treatment, with influent concentrations around 8 to 12 mg L⁻¹ of dissolved organic carbon and 2 to 4 mg L⁻¹ of $\text{NH}_4\text{-N}$. The wetlands presented an $\text{NH}_4\text{-N}$ removal efficiency of 95 %, and the main bacteria associated with nitrification, which was present in greater abundance, was *Nitrospira*-like. Besides the phylum *Nitrospirae*, the NOB species *Nitrospina gracilis* (NTSPN 693) was present and remained stable, although with low abundance (1 ± 0 %).

Despite the lower abundance of nitrifying bacteria during rest periods these were able to remain active along the whole study period, showing their ability to recover their enzymatic activities quickly after a period of stress. This is in accordance with various studies, such as that of Wilhelm et al. (1988), which observed how *Nitrosomonas europaea* was able to recover its oxidant activity in a few minutes after about one year under limited $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations. Moreover, *Nitrospira*

briensis after a period of 2 weeks with substrate limitation reached their maximum potential for $\text{NH}_4\text{-N}$ oxidation within 30 to 60 minutes after a pulse of ammonia (BOLLMANN et al., 2005). Autotrophic nitrifying bacteria can adapt to survival strategies with low substrate based on cellular components, and have a high capacity to generate power when new substrate becomes available (GEETS et al., 2006). Another study conducted in a mature aerated saturated VF wetland showed that after two weeks of no aeration, nitrification recovered within two days when aeration was applied, whereas nitrification establishment in a new system was previously observed to require 20 to 45 days (MURPHY et al., 2016).

On the other hand, the abundance and diversity of denitrifying bacteria was the same in feed and rest periods. The identified average relative abundance was of $3 \pm 2.4\%$ for the genus *Pseudomonas* spp. (PAE 997), of $6 \pm 4\%$ for the species *Thiobacillus denitrificans* (TBD 1419) and of $3 \pm 0.8\%$ for the species *Paracoccus versutus* and *denitrificans* (PDV 163) (Figure 25). The fact that rest periods showed no influence on this community can presumably be explained by the stability provided by saturated layer at the bottom, which maintained the necessary conditions for the stability of this group. Moreover, the low availability of oxygen during rest periods seems to favor the growth of denitrifying bacteria, as it was observed in a study conducted in two VF wetland microcosms, where greater abundance of denitrifying bacteria was identified in rest than in feed periods (PELISSARI et al., 2016). In addition to the classic denitrification carried out mainly by *Pseudomonas* spp. (AHN, 2006), other pathways of denitrification were identified in this study. *Thiobacillus denitrificans* are organisms that use inorganic compounds as a carbon source, and compounds such as sulfates, nitrates or nitrites as electron donors. Therefore, this species is associated to autotrophic denitrification. The presence of *Thiobacillus* in CW has previously been reported by Zhong et al. (2015) in a HF bed ($\text{HLR} = 100 \text{ mm d}^{-1}$) treating urban wastewater. According to the authors this genus was present in great abundance (680 sequences) due to the anaerobic conditions of the HF. Furthermore, *Paracoccus denitrificans* was also identified in the current study, a species that is associated with aerobic denitrification and heterotrophic nitrification (Richardson, 2000). AUSTIN et al. (2006a) in a tidal flow VF wetland (10 m^2 divided into 6 cells, under flow of 1.5 to 2.3 m^3), reported a nitrification rate of 95 %, related to a load of $104 \text{ g TKN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and C/N

ratio of 3.3:1. During the study period, two characterizations of microbiota through the FISH technique revealed that after 9 months of operation 9 % of the bacterial community was composed of *Paracoccus denitrificans*, while after 30 months of operation colonization of this bacterium increased up to 15 %.

4.2.3.3 *Nitrifying and denitrifying bacteria distribution along the vertical profile of the filter media*

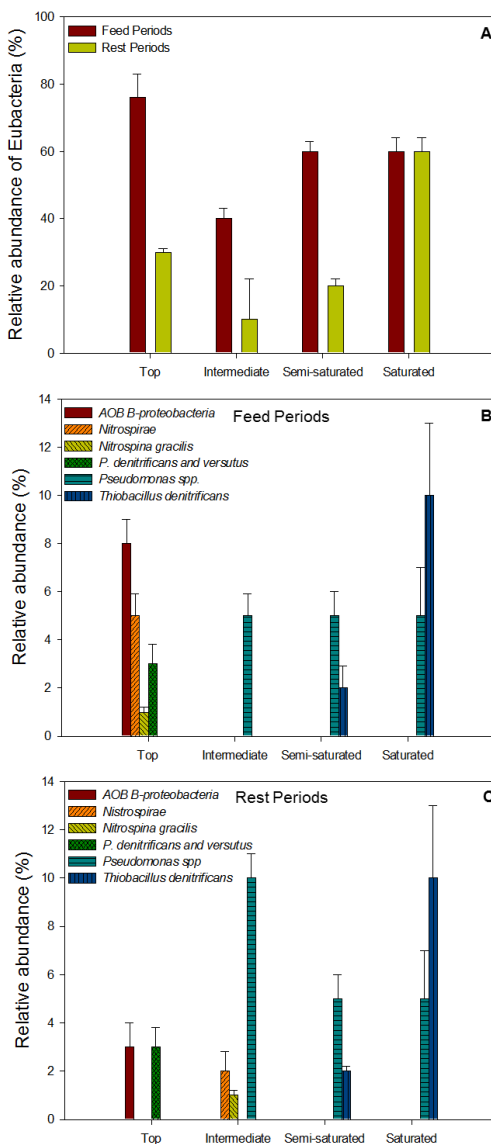
According to the ANOVA test performed to the bacterial abundance identified in each layer of VF wetland cell 3, significant differences were identified between all the layers. This can be explained by the different bacterial community structure found along the wetland depth.

(i) Top layer (0 to 0.17 m)

The highest average relative abundance of Eubacteria in the vertical profile of the wetland was identified in the top layer (76 ± 7 % in feed periods, and 30 ± 1 % in rest periods) (Figure 26). This behavior has already been observed by other studies. TIETZ et al. (2007a) in a VF bed (1 m² surface area) with sand as bed media applied in the treatment of municipal wastewater reported that more than 50 % of the bacterial biomass and activity was concentrated in the top 0.10 m of the unit. Moreover, FOLADORI et al. (2015) in a VF wetland (2.25 m² surface area) detected that the highest amount of viable bacteria were found in the top from 0 to 0.10 m depth, mainly owed to the vertical feed which causes increased availability of organic matter and nutrients in the upper layer of the bed, thus stimulating microbial growth.

AOB were identified both in feed and rest periods. AOB β -*proteobacteria* (*Nitrospira* and *Nitrosomonas*) presented an abundance of 8 ± 1 % in feed periods, and of 3 ± 1 % in rest periods. Despite the decay of abundance of AOB β -*proteobacteria* during rest periods at the top layer this group remained active throughout the study (Figure 26).

Figure 26 – Mean (\pm SD) relative abundance of studied bacteria in different layers of partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 during feed and rest periods. A) Relative abundance of eubacteria in feed and rest periods at different layers. B) Nitrifying and denitrifying bacteria in different layers during feed periods. C) Nitrifying and denitrifying bacteria in different layers during rest periods.



Conversely, NOB was identified only in feed periods, with a relative abundance of 5 ± 0.3 % for *Nitrospirae* phylum, and of 1 ± 0.2 % for *Nitrospina gracilis* species. *Nitrospira sp.* have high affinity for substrate, even in low concentrations (ANDREWS; HARIS 1986), being well suited to low concentrations of oxygen and nitrite (KIM; KIM, 2006). In this way, the absence of *Nitrospirae* in rest periods can be a bioindicator of absence of substrate adsorbed in the bed media.

The occurrence of the genus *Paracoccus* of the species *denitrificans* and *versutus* was identified throughout the whole study at this layer with an average relative abundance of 3 ± 0.8 % for feed and rest periods. The presence of *P. denitrificans* can be associated both with heterotrophic oxidation of $\text{NH}_4\text{-N}$ and aerobic denitrification, as heterotrophic nitrification can occur in media with a C/N ratio as low as 2 (KUENEN; ROBERTSON, 1994).

(i) *Intermediate layer (0.17 to 0.34 m)*

The average relative abundance of Eubacteria decreased to 40 ± 3 % in feed periods and to 10 ± 12 % in rest periods at the intermediate layer (Figure 26). As previously discussed, the depth has great influence on bacterial distribution, due to the differing environmental conditions of the bed media along the vertical profile (FOLADORI et al., 2015; TIETZ et al., 2008).

AOB were not identified from the intermediate layer downwards (Figure 26). Instead, this community in this study was concentrated in the top layer. This can be explained by the higher availability of oxygen in the upper layer, as well as by the fact that the low organic loadings applied to the wetland may result in low oxygen competition between heterotrophic and autotrophic bacteria. In this way, faster heterotrophic organic degradation depletes dissolved oxygen availability (SAEED; SUN 2011b). This finding agrees with other studies conducted in VF wetlands operated with higher OLR, which show a stratification of AOB along the vertical profile owing to the higher amount of organic matter available in the upper part of the wetland, which results in highest abundance of heterotrophic bacteria. Tietz et al. (2007b) studied the AOB in three VF operated with $27 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, C/N ratio of 8.4, and HLR of 43 mm d^{-1} , and identified AOB species up to 0.50 m depth from bed surface.

Although AOB were not found in this layer, NOB were identified just in rest periods, with average relative abundance for *Nitrospirae*

phylum of 2 ± 0.8 % and 1 ± 0.2 % for the species *Nitrospina gracilis*. The NOB colonization may be associated with the presence of adsorbed nitrite in the filter material. The colonization of denitrifying bacteria of the genus *Pseudomonas* spp. was observed at the intermediate layer, with an average relative abundance of 5 ± 0.2 % in feed periods. Although the intermediate layer presumably has aerobic conditions during operation periods, the colonization of this genus may be associated with the availability of carbon at this bed depth. According to Salomo et al. (2009), this layer of VF beds are predominantly ideal for bacterial use of organic substrates, due to the penetration of the roots of macrophytes which provide an additional source of easily degradable carbon. The average relative abundance of *Pseudomonas* spp. increased to 10 ± 1 % in rest periods. The lower availability of oxygen due to reduced oxygen transfer capacity during rest periods should explain the increase in abundance of *Pseudomonas* spp., indicating the occurrence of the denitrification process in these periods.

(ii) *Semi-saturated layer (0.34 to 0.51 m)*

At this depth, during feed periods an increase in the abundance of Eubacteria (60 ± 3 %) in relation to the intermediate layer (40 ± 3 %) was observed. This could be associated with the moisture in the filter media, since this layer is semi-saturated. During rest periods the relative abundance of the bacterial community was of 20 ± 2 % (Figure 26). Despite the larger bacterial abundance in feed periods, AOB and NOB were not identified at this layer, which may be explained by an environment with low oxygen concentrations.

Furthermore, a greater diversity of denitrifying bacteria was observed in comparison with the intermediate layer. Besides the genus *Pseudomonas* spp., the species *Thiobacillus denitrificans* was also observed at this depth (Figure 26).

The average relative abundance was the same for feed and rest periods, being of 5 ± 1 % and 2 ± 0.2 % for *Pseudomonas* spp. and *Thiobacillus denitrificans*, respectively. The presence of these two denitrifying genus in the same layer may indicate distinct dynamics regarding the use of carbon. The denitrifying bacteria are usually heterotrophic, however, several bacteria, among them the genus *Pseudomonas* are facultative chemolithoautotrophic, capable of growing in the absence of organic matter, using molecular hydrogen as electron

donor and CO₂ as inorganic carbon source. They can also switch between chemolithotrophic or chemoorganotrophic metabolism, depending on the nutritional status of their habitats (MADIGAN et al., 2010). However, *Thiobacillus denitrificans* is an obligatory chemolithotrophic example, since it uses only inorganic compounds as electron donors for energy, and CO₂ as a carbon source. These findings are in accordance with those reported by Salomo et al. (2009), which evaluated the microbial metabolic diversity in a VF wetland (48 m² surface area) that had been for 13 years in operation applied in the treatment of domestic wastewater, and in the third layer in depth (where anoxic conditions equivalent to the semi-saturated layer of this study prevailed) none of the tested carbon sources were metabolized by the microbial groups present in the medium. Since anoxic bacteria are dependent on oxidized electron acceptors, such as NO_x, SO₄²⁻ or Fe₃⁺, it is hypothesized that the denitrification process may be associated with autotrophic bacteria, as indicated by the presence of the species *Thiobacillus denitrificans*.

(iii) *Saturated layer (0.51 to 0.68 m)*

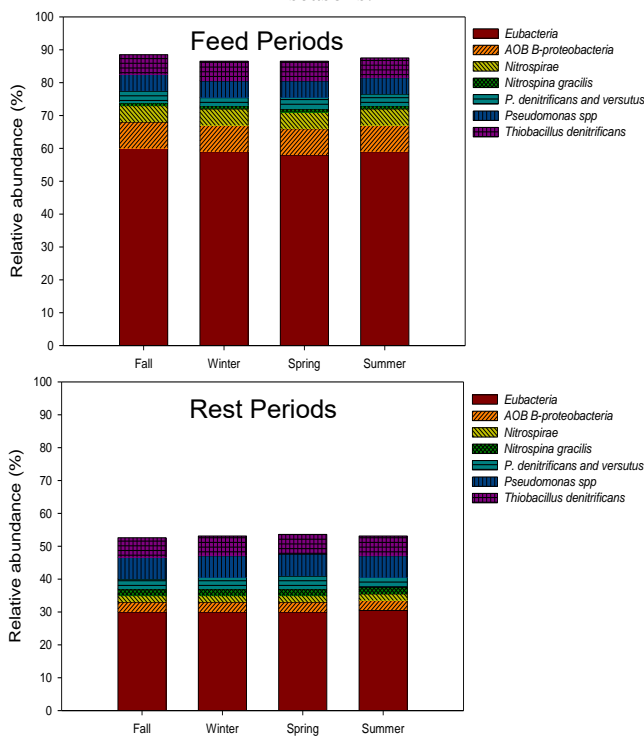
In the bottom of the wetland bed the abundance of Eubacteria remained stable (60 ± 4 %) throughout the whole study (both in feed and rest periods), which can be attributed to the saturation of the bed. Bacteria growth seems rather favored in water films along the preferential water flow directions. Foladori et al. (2015) evaluated the relationship between viable and dead bacteria in the soil of a VF wetland, and in the influent of the unit. According to the authors, dead bacteria were prevalent in the soil of VF (viable/dead bacteria ratio of 0.52). In the same direction, Rajabzadeh et al. (2015) in VF mesocosms reported that the flow of organic matter necessary for the growth of heterotrophic bacteria may be limited in dead zones of the unit.

At this layer only denitrifying bacteria were identified. The diversity of this group in the saturated layer was the same as in the semi-saturated layer. However, the abundance was higher at this layer. Average relative abundances were of 5 ± 2 % for *Pseudomonas* spp. in feed and rest periods, and of 10 ± 3 % for *Thiobacillus denitrificans* in feed and rest periods.

4.2.3.4 Spatiotemporal variation of nitrifying and denitrifying bacteria

Considering the results of the ANOVA test performed to the average relative abundance of bacteria identified during feed and rest periods, and in the different points and depth layers of the wetland cell 3, the total, nitrifying and denitrifying bacterial communities were not influenced by seasonal variations (Figure 27).

Figure 27 – Average relative abundance of bacteria in the four layers of partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland cell 3 at the different seasons.



The bacterial stability identified throughout the 1 year span of this study may be associated with the climatic conditions of the study site, since temperatures in this part of the country are mild even during

the winter season (14 ± 2 °C air temperature). Conversely, other studies have shown seasonality, such as that by Bouali et al. (2014) in a HF wetland, which observed variation of the microbial community in different seasons (24 ± 3 °C in summer and 12 ± 1 °C in winter). Microbial activity is related to temperature, and growth rate and metabolic activity of bacteria are greatly reduced with low temperatures (ATLAS; BARTHA, 1998). In particular, nitrifying activity is inhibited in a temperature range of 6 to 10 °C, whereas denitrifying activity was detected at a temperature as low as 5 °C (BRODRIC et al., 1988; WERKER et al., 2002).

Based on an ANOVA test, no variation in the spatial distribution of the total, nitrifying and denitrifying bacterial communities was observed for the three sampling points (1, 2 and 3) along the length of wetland cell 3 ($p \geq 0.05$). This can be explained by the fact that wastewater is uniformly distributed across the wetland surface, resulting in the even availability of carbon and nutrients across the unit. Conversely, in HF wetlands, where feeding is provided by a single distribution pipe at one end of the wetland, a decrease in biomass and microbial activity along the distance from the inlet zone has been observed due to decreased availability of organic matter and nutrients (SAMSÓ; GARCÍA, 2014; NGUYEN, 2000; NURK et al., 2005).

4.2.4 Conclusions

In this study the nitrifying and denitrifying bacterial communities were characterized at different depths of the vertical profile of a partially-saturated vertical subsurface flow constructed wetland (0.20 m of saturation) at full-scale treating urban wastewater from a residential area in south Brazil. The wetland operated under low organic and hydraulic loads and was divided into four wetland cells, two of which were operated while the other two rested, alternating cycles of 30 days. Samples were taken monthly from February 2014 to February 2015 from one wetland cell. The main conclusions are:

- The average abundance of Eubacteria was higher in feed (59 %) than in rest periods (30 %). However, nitrifying and denitrifying bacteria remained active even during rest periods.
- Ammonia-oxidizing bacteria (AOB β -proteobacteria) were identified in the top layer (0 to 0.17 m depth) of the wetland cell, both during feed (8 %) and rest (3 %) periods.

- The identified nitrite-oxidizing bacteria (*Nitrospirae* and *Nitrospina gracilis*) were present in the top and intermediate layers (0.17 to 0.34 m depth) of the wetland cell, although showing different dynamics in feed and rest periods. When the wetland cell was in operation these bacteria were present just in the top layer, however when it was at rest they were also present in the intermediate layer.
- Denitrifying bacteria (*Pseudomonas* spp., *Paracoccus denitrificans* and *versutus*, and *Thiobacillus denitrificans*) were identified from the top layer downwards and were not affected by rest periods.
- No seasonal or spatial influences were observed on bacteria abundance or diversity.
- In addition to the classical nitrification and denitrification, the occurrence of species such as *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus versutus* and *Thiobacillus denitrificans* was identified, which are associated with heterotrophic nitrification and aerobic and autotrophic denitrification.
- The saturated zone (0.51 to 0.68 m depth) of the filter was beneficial for the abundance of the bacterial domain as well as for the abundance of denitrifying bacteria.
- Different wetland layers provided distinct transformations of nitrogen. Nitrification was performed only in top (in feed and rest periods) and intermediate (only in rest periods) layers. On the other hand, denitrification occurred from top layer both in feed and rest periods.
- Based on the identification of nitrogen transforming bacteria as well as on the high nitrogen removal efficiency (58 ± 12 % removal of TN) of the wetland, it has been shown that implementing a partial saturation of the VF wetland bed can enhance the total elimination of nitrogen by enabling simultaneous nitrification and denitrification to occur in a single treatment unit, thus decreasing the footprint of this ecotechnology.

4.3 ARTIGO 3

Como apresentado no Artigo 1, em WCVD preenchidos com areia como material filtrante, bactérias nitrificantes e desnitrificantes foram mais abundantes sob uma carga orgânica de 41 g DQO m⁻² d⁻¹ e taxa hidráulica de 72 mm d⁻¹, quando comparado a maiores carregamentos orgânicos e hidráulicos (104 g DQO m⁻² d⁻¹ e 170,5 mm d⁻¹). A competição por oxigênio entre bactérias autotróficas e heterotróficas é amplamente reportada pela literatura, principalmente em ambientes com altas concentrações de carbono. Diante disso, o procedimento experimental II, que deu origem ao Artigo 3³, teve como principal objetivo entender como se comporta a comunidade microbiana nitrificante e desnitrificante ativa, presente no maciço filtrante de um WCVD, operado sobre alta carga orgânica e hidráulica. Para isso, foi operado um WCVD com ciclos de 3,5 dias de repouso e 3,5 dias de alimentação e com uma TH de 375 mm d⁻¹, sob duas cargas orgânicas distintas, sendo 130 g DQO m⁻² d⁻¹ (Período I) e 80 g DQO m⁻² d⁻¹ (Período II). No final de cada período, foram coletadas amostras do maciço filtrante na camada da superfície e do fundo do WCVD. Com essas amostras, foi extraído o RNA e DNA e, posteriormente, foi empregada a técnica de qPCR, baseado nos genes funcionais envolvidos nas transformações do nitrogênio (*amoA* de AOB, AOA e *nosZ* de bactéria), para identificar a abundância total (baseado no DNA) e a abundância ativa (baseado no cDNA) dos mesmos. Além disso, com as amostras do final do período II, foi realizado NGS do 16S rRNA de bactérias e arqueas (baseado no cDNA). A partir dos resultados microbiológicos, a nitrificação foi realizada por AOB (*Nitrosospira*),

³ O artigo 3 deu origem a seguinte publicação:

Science of the Total Environment 584–585 (2017) 642–650



Unraveling the active microbial populations involved in nitrogen utilization in a vertical subsurface flow constructed wetland treating urban wastewater



Catiane Pellissari^{a,1}, Miriam Guivernau^{b,1}, Marc Viñas^b, Samara Silva de Souza^c, Joan García^d, Pablo Heleno Sezerino^a, Cristina Ávila^{d,e,*}

AOA (*Nitrososphaeraceae*) e NOB (*Nitrobacter*). AOB foram mais abundantes que AOA na superfície e no fundo do WCVD nos dois períodos. Contudo, AOA sempre foram mais ativas que AOB. Dessa forma, AOA mostraram ser mais estáveis que AOB, sendo menos afetadas pela variação da carga orgânica. AOB, AOA e bactérias desnitrificantes (*nosZ*) foram identificadas mais ativas na camada da superfície quando o WCVD operou com 130 g DQO m⁻² d⁻¹. Opostamente, quando a carga orgânica diminuiu para 80 g DQO m⁻² d⁻¹, AOB, AOA e bactérias desnitrificantes mostraram maior atividade na camada do fundo.

Transcrição adaptada do Artigo 3

4.3.1 Relevance and objective

It has been proven that the nitrification capacity of vertical subsurface flow constructed wetlands (VF) is directly related to the applied organic loading rate (OLR), since the excess of organic compounds can affect the oxidation of ammonia due to the competition of oxygen between heterotrophic and autotrophic organisms (SAEED; SUN 2012; SUN et al., 1998). On the other hand, the presence of biodegradable organic compounds seems to promote the growth of denitrifying organisms (HEADLEY et al., 2005). In general, nitrogen removal is associated with nitrification of ammonia nitrogen followed by denitrification of nitrate. In this way, nitrogen transformation in VF wetland is accomplished by ammonia-oxidizing bacteria (AOB), ammonia-oxidizing archaea (AOA), nitrite oxidizing bacteria (NOB) and to a lesser extent by denitrifying bacteria enriched in the biofilm of bed media, which are metabolically active depending on the specific environmental conditions.

Several studies have been conducted to elucidate the bacterial dynamics involved in the nitrogen cycle in VF wetlands. It has been well established in the literature that the autotrophic oxidation of ammonia is not only limited to the bacteria domain, but it is also performed by archaea (ANGNES et al., 2013; KONNEKE et al., 2005). Studies conducted in CW have demonstrated that bacterial diversity is greater than archaeal in VF and horizontal subsurface flow wetlands (HF), however ammonia-oxidizing archaea (AOA) and taxonomic assignment of archaea were not assessed (ADRADOS et al., 2014). The

same behavior was observed in a free water surface (FWS) wetland, where archaeal communities showed lower richness and diversity than bacterial communities (FAN et al., 2016). ZHI and JI (2014) observed in a tidal flow CW that archaea were not dominant in the microbial community during the entire operation period. Oppositely, SIMS et al. (2012) showed that AOA were found to be generally in higher abundance than AOB in FWS soils and water in both summer and winter over a period of two years. On the other hand, in planted and unplanted HF wetlands PARANYCHIANAKIS et al. (2016) showed that the abundance of *amoA* genes of AOA was lower than that of AOB, and plant species showed to have a weak effect on the abundance of AOA.

In spite of the knowledge gained in the abovementioned studies, the contribution fraction of ammonia oxidizers (AOA vs. AOB) and their *amoA* gene expression between kingdoms in VF wetlands is still unknown (YOU et al., 2009). In addition, there are no studies evaluating the effect of operational conditions (different OLR) on nitrifying and denitrifying microbial populations. To our knowledge, the microbial community structure of active microbial populations (eubacteria and archaea) involved in the nitrogen cycle in CW wetlands is scarcely known in the literature. The present study aims at gaining insight into the dynamics of active microbial populations during a nitrification-based process in a vertical flow constructed wetland treating urban wastewater under high OLR.

4.3.2 Materials and methods

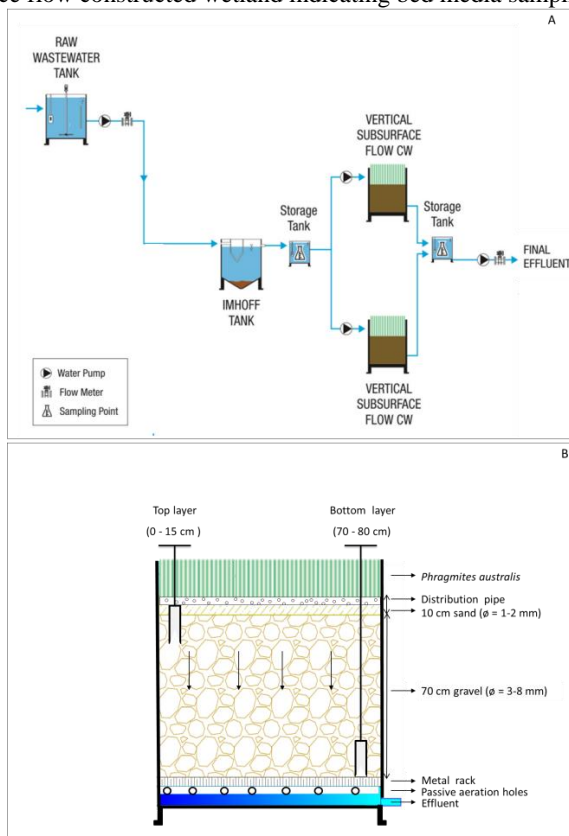
4.3.2.1 Description of the wastewater treatment plant

This study was conducted in a VF wetland, which was part of a hybrid CW system treating urban wastewater from a nearby sewer. The hybrid system was comprised of a primary treatment performed by an Imhoff tank, followed by a VF wetland stage, a HF wetland, and a FWS wetland in series. The experimental treatment plant is set outdoors at the experimental facility of the GEMMA group (Department of Civil and Environmental Engineering of the Universitat Politècnica da Catalunya - Barcelona-Tech, Spain) in a Mediterranean climate. It was commissioned in 2010, and up to the time of the current study the treatment system operated in a continuous mode under different organic

and hydraulic loads over the years of operation (ÁVILA et al., 2013; 2014; 2016).

The VF wetland stage had a surface area of 3 m², divided into two cells with 1.5 m² of surface area each (1.0 W × 1.5 L × 0.8 D), operating alternatively in cycles of 3.5 days, in order to control the growth of attached biomass, maintain aerobic conditions within the bed media and mineralize the organic deposits accumulated on the bed surface (MOLLE et al., 2008). The bed media was composed by a 0.1 m sand layer ($\phi = 1\text{--}2$ mm) in the top, and 0.7 m layer of fine gravel ($\phi = 3\text{--}8$ mm) underneath (Figure 28).

Figure 28 – Pilot treatment plant. a) Diagram of the treatment system indicating sampling points of influent and effluent wastewater. b) Detail of the vertical subsurface flow constructed wetland indicating bed media sampling points.



The VF cells were constructed in polyethylene tanks, and a polyethylene pipe distributed the pumped water 0.1 m above the top of the bed. This pipe contained 5 perforations with diffusers that provided a true 360° radial horizontal water pattern, thus ensuring an even distribution of the wastewater over the whole surface of the filter. Water was pumped from the effluent of the Imhoff tank to the VF bed in operation in an intermittent mode, providing about 22 pulses per day (about 50 L pulse⁻¹). Each VF container had a metal rack 0.1m above floor level and a number of holes situated underneath it so as to allow for passive aeration of the bed. The aquatic macrophyte planted in all wetland units was *Phragmites australis*.

During the period of this study (Jun 2015 to Jan 2016), the hybrid system operated with a recirculation strategy, with the purpose of enhancing the removal of total nitrogen. A parcel of the final effluent of FWS was recycled back to the Imhoff tank by means of a peristaltic pump in a recirculation flow rate of 50% (RFR= daily recirculated effluent volume / daily raw wastewater volume × 100). The performance of the hybrid system varied substantially during the implementation of the recirculation strategy owed to the poor performance of the FWS during the fall season, which was attributed to the senescence stage of macrophytes. The decay of plant biomass caused a steep increase in the concentration of organic matter and other contaminants in the water table, which due to the recirculation generated a high OLR applied in the VF wetlands (considered as Period I). As a remediation measure the aboveground biomass was harvested in this unit. Therefore, the pollutant loads recycled back to the Imhoff tank decreased. As a result, a lower OLR was applied in the VF beds (considered as Period II). The determination of the microbial community structure and activity was carried out in one of the two VF beds at the culmination of these two periods. In Period I (Jun–Oct) the VF wetland operated with an OLR of 130 g COD m⁻² d⁻¹, whereas in Period II (Nov–Jan) the OLR decreased to 80 g COD m⁻² d⁻¹. In both periods the VF wetland operated under a flow of 1.125 m³ d⁻¹, resulting in a HLR of 375 mm d⁻¹ (taking into account the area of the two VF beds). Table 7 shows the operational conditions of each period.

An electromagnetic flow meter (SITRANS FM MAGFLO®) was installed at the inlet and outlet of the VF wetland, so as to assist on the follow up of the flow values entering the treatment system, which allowed expressing the results on a mass balance basis. Physicochemical data from influent and effluent samples from the VF beds were

determined twice a week throughout the whole study period. Some water quality parameters (i.e. temperature, pH, dissolved oxygen –DO-, electrical conductivity –EC- and redox potential –E_H) were measured onsite at the time of sample collection, and grab water samples were taken to the adjacent laboratory for the immediate analysis of the following parameters: total suspended solids (TSS), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), ammonium nitrogen (NH₄-N), nitrate and nitrite nitrogen (NO_x-N).

Onsite measurements of water temperature, DO, pH and EC were taken by using a Checktemp-1 Hanna thermometer, a Eutech Ecoscan DO6 oxymeter, a Crison pH-meter and an EH CLM 381 conductivity meter, respectively. E_H was also measured onsite by using a Thermo Orion 3 Star redox meter and values were corrected for the potential of the hydrogen electrode. The determination of conventional wastewater quality parameters, including TSS and NH₄-N was done by following the Standard Methods (APHA, 2012). TN and TOC were analyzed using a Multi N/C (2100 S) analyzer. NO_x-N⁻ was measured using a DIONEX ICS-1000 chromatography system.

Table 7 – Operational conditions of the vertical subsurface flow constructed wetland in Periods I and II.

Operational conditions	Period I (Jun-Oct)	Period II (Nov-Jan)
Duration (months)	5	3
Air temperature °C	25	14
Flow (m ³ d ⁻¹)	1,125	1,125
HLR (mm d ⁻¹)	375	375
OLR (g COD m ⁻² d ⁻¹)	130	80
TN load rate (g m ⁻² d ⁻¹)	17	19

4.3.2.2 *Microbial community assessment*

To elucidate the microbial community dynamics involved in nitrogen transformation in the VF wetland, a DNA vs RNA-based assessment of functional genes (Reverse Transcription (RT)-qPCR of *amoA* of eubacteria and archaea, *nosZ* and 16S rRNA for eubacteria)

was performed in order to quantify active microbial populations during nitrification and denitrification processes. Moreover, active eubacterial and archaeal communities were deeply assessed by means of 16S rRNA based high-throughput sequencing (rRNA-based MiSeq), to identify the most predominant microbial key players which were actively enriched at different depths of the VF wetland and under different OLR (Period I vs. Period II).

- Sample collection and RNA/DNA extraction

In order to determine the microbial community involved in nitrogen utilization in the VF wetland and the effect of the OLR, water influent, water effluent and bed media samples (gravel and sand), from the top (0–15 cm depth) and bottom (70–80 cm depth) layers, were collected at two sampling campaigns. The first campaign took place at the end of Period I (Oct), after 5 months of VF wetland operation (OLR = 130 g COD m⁻² d⁻¹), and the second one was performed at the end of Period II (Jan), after 3 months of operation under lower OLR (80 g COD m⁻² d⁻¹). Samples were immediately submerged and mixed with 2 mL of Life Guard Reagent (MO BIO, Inc., Carlsbad, CA) to prevent RNA degradation according to manufacturer's instructions.

Simultaneous RNA + DNA extraction from approx. 0.25 g of bed media and 1 mL pellet of water samples (20.000 g/5' at 4 °C) were extracted in triplicate at each campaign by using an adapted protocol of Power Microbiome™ RNA Isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). The RNA extracts were treated during 10 min at 25 °C with 10 units of DNase I (a room temperature stable DNase enzyme provided by the Power Microbiome Isolation kit) to remove any contamination of genomic DNA. All of the DNase I-treated RNAs were subjected to 16S rRNA-based PCR amplification as previously described (Prenafeta-Boldú et al., 2012) to verify their purity. RNAs were subsequently transcribed to cDNA by means of Prime Script™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, Takara) following the manufacturer's instructions. cDNA and DNA extracts were kept frozen at -80 °C until further analysis.

- (i) Quantitative assessment of total, nitrifying and denitrifying microbial populations

- Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Quantitative analysis of total and active eubacterial population was conducted on the V3 hypervariable region of 16S rRNA (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2012). The denitrifying population was quantified by *nosZ* (clade I), the encoding gene of catalytic subunit of nitrous oxide reductase, as previously reported in Calderer et al. (2014). AOB and AOA populations were quantified by means of ammonia monooxygenase α -subunit encoding genes (*amoA*_AOB (eubacteria) and *amoA*_AOA (archaea) genes, respectively). *amoA*_AOB genes and transcripts were performed as previously reported by Rotthauwe et al. (1997), whereas a new combination of primers for *amoA*_AOA was applied in the present study, in order to include the known *amoA*-related AOA lineages (group I.1a: *Nitrosopumilus* cluster; *Nitrosotalea* cluster; group I.1b: *Nitrososphaera* cluster; and ThAOA group: *Nitrosocaldus* cluster): CamoA19Fw 5'-ATGGTCTGGYTWAGACG-3' (PESTER et al., 2012) and Arch_amoAF_Rv 5'-GATGTCCARGCCCARTCAG-3' (WUCHTER et al., 2006). The reaction was performed in 10 μ L volume containing 1 μ L of DNA template, 400 nM of each primer, 5 μ L of the ready reaction mix (Brilliant II Sybr Green qPCR Master Mix, Stratagene) and 30 nM of ROX reference dye. qPCR reaction was operated with the following protocol: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s; annealing for 30 s at 52 °C, extension at 72 °C for 45 s and the image capture was performed at 75 °C for 35 s to exclude background fluorescence from the amplification of primer dimmers. All qPCR reactions were conducted in a Real Time PCR System MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA). All samples were analyzed in triplicate by means of three independent cDNA and DNA extracts.

For the standard curve of each target gene, it was designed by using FunGene data base (<http://fungene.cme.msu.edu/>) five gBlocks® Gene Fragments (IDT, Integrated DNA Technologies). Ten-fold serial dilutions from synthetic genes were subjected to qPCR assays in duplicate showing a linear range between 10^1 and 10^8 gene copy numbers per reaction to generate standard curves. qPCR reactions fitted quality standards: efficiencies were between 90-110 % and R^2 above

0.985. All results were processed by MxPro™ QPCR Software (Stratagene, La Jolla, CA) and were treated statistically.

(ii) Active microbial community abundance and diversity

- Next Generation Sequencing (NGS)

A 16S rRNA based metabarcoding assessment through MiSeq platform was performed to study the diversity of active microbial populations. Transcribed 16S rRNA libraries targeting V1–V3 and V3–V4 regions from eubacterial and archaeal population, respectively, were sequenced by utilizing MiSeq Illumina sequencing platform Molecular Research DNA following manufacturer's instructions. For the eubacterial and archaeal libraries, the primer set 27F (5'-AGRGTGTTGATCMTGGCTCAG-3')/519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') and 349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3') /806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') were used, respectively.

Downstream MiSeq data analysis was carried out by using QIIME software version 1.8.0. The obtained DNA reads were compiled in FASTq files for further bioinformatic processing. Trimming of the 16S rRNA barcoded sequences into libraries was carried out using QIIME software version 1.8.0 (CAPORASO et al., 2010a). Quality filtering of the reads was performed at Q25, prior to the grouping into Operational Taxonomic Units (OTUs) at a 97% sequence homology cutoff. The following steps were performed using QIIME: Denoising using Denoiser (Reeder; Knight, 2010), reference sequences for each OTU (OTU picking up) were obtained via the first method of UCLUST algorithm (Edgar, 2010), for sequence alignment and chimera detection the algorithms PyNASt (Caporaso et al., 2010b) and ChimeraSlayer (Haas et al., 2011) were used. OTUs were then taxonomically classified using BLASTn against GreenGenes and RDP (Bayesian Classifier) database and compiled into each taxonomic level (DESANTIS et al., 2006).

Data from MiSeq NGS assessment were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the accession number SRP090290.

4.3.2.3 Statistical data analyses

Normality of the data of water quality parameters was tested by Kolmogorov–Smirnov test. Furthermore, Student's t-test ($p < 0.05$) was used to test whether there were statistically significant differences on (i) water quality of samples between Periods I and II; (ii) bacterial and archaeal abundance between the top and bottom layer samples within the same period; (iii) bacterial and archaeal abundance in the same layer between Periods I and II. For statistical analysis Statistic 7.0 software was used (STATSOFT INC., 2004).

4.3.3 Results and discussion

4.3.3.1 Treatment performance of the vertical subsurface flow constructed wetland

Recommendations regarding design OLR loads to be applied in VF wetlands vary in relation to climatic conditions. For warm climates, Hoffmann et al. (2011) recommend a range of 60 to 70 g COD $m^{-2} d^{-1}$, for subtropical climates the recommendation is 41 g COD $m^{-2} d^{-1}$ (SEZERINO et al. 2012), and under cold climate the indicated OLR decreases to 20 g COD $m^{-2} d^{-1}$ (WINTER; GOETZ, 2003). The VF wetland in the current study operated under high OLR (average of 130 g COD $m^{-2} d^{-1}$ and 80 g COD $m^{-2} d^{-1}$ in Periods I and II, respectively) as can be observed in Table 8. However, the TN load applied to the VF unit was very similar in the two periods (Figure 29). However, the TN load applied to the VF unit was very similar in both periods. Despite the high organic and HLR, the performance of the VF wetland was generally high and stable overtime, showing a great capacity of the VF wetland to handle large loads, observing no signs of clogging of the bed media throughout the whole study.

Average of removal efficiencies were very similar in Periods I and II, exhibiting values of about 40 and 30 % COD, 60% NH_4-N and 20% TN (Figure 29). High organic load removal rates were achieved, with mean values of 54 g COD $m^{-2} d^{-1}$ in Period I, and 32 g COD $m^{-2} d^{-1}$ in Period II. These results are in accordance with other studies which report that the higher the organic load, the greater the removal of organic carbon in CW (CALHEIROS et al., 2007; SAEED; SUN, 2012).

The removal of the ammonium nitrogen load was also similar in both periods (4 g $NH_4-N m^{-2} d^{-1}$). Nitrification is the main mechanism

associated with the elimination of $\text{NH}_4\text{-N}$ in VF wetlands (KADLEC; WALLACE, 2009). Effluent $\text{NO}_x\text{-N}$ values were similar in both periods ($10 \pm 4 \text{ mg NO}_x \text{ L}^{-1}$ in Period I and $14 \pm 3 \text{ mg NO}_x \text{ L}^{-1}$ in Period II) (Figure 29). The average TN removal rate was of $2 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in both periods, which is in agreement with other studies conducted in VF wetlands, owed to the low denitrification capacity of these systems due to the prevailing aerobic conditions within the bed media, which hinder the establishment of denitrifying microorganisms (SAEED; SUN, 2012; VYMAZAL, 2013).

Table 8 – Average (\pm SD) concentration and loads of water quality parameters at the influent and effluent of the vertical subsurface flow constructed wetland in Periods I and II.

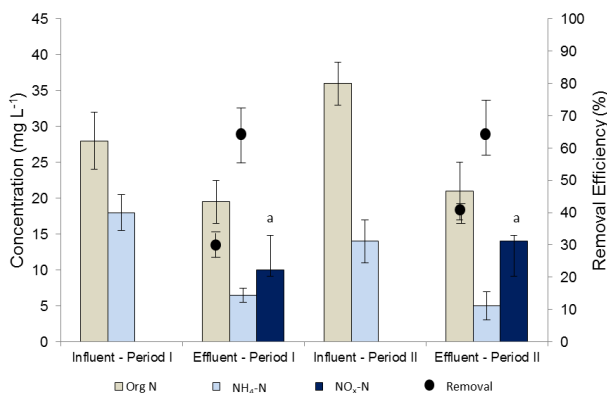
Parameter	Period I (Jun-Oct) n = 26			Period II (Nov-Jan) n = 15		
	Influent	Effluent	Removal Efficiency (%)	Influent	Effluent	Removal Efficiency (%)
T ($^{\circ}\text{C}$)	23 ± 5	23 ± 5	-	11 ± 7	11 ± 9	-
DO (mg L^{-1})	0.5 ± 0.2	2.5 ± 1	-	0.6 ± 0.2	3.1 ± 1.1	-
EC (mS cm^{-1})	2 ± 0.5	2 ± 0.4	-	2 ± 0.2	2 ± 0.2	-
E_H (mV)	-101 ± 66	$+181 \pm 67$	-	-71 ± 63	$+112 \pm 72$	-
pH	7.5 ± 0.3	7.5 ± 0.3	-	7.8 ± 1.2	7.6 ± 0.3	-
TSS (mg L^{-1})	72 ± 31	55 ± 45	23 ± 42	112 ± 53	40 ± 30	67 ± 24
COD (mg L^{-1})	347 ± 104	207 ± 88	43 ± 14	213 ± 21	129 ± 17	28 ± 10
TOC (mg L^{-1})	90 ± 30	45 ± 21	50 ± 12	91 ± 9	51 ± 28	44 ± 18
TN (mg L^{-1})	46 ± 10	36 ± 9	24 ± 21	50 ± 12	40 ± 10	20 ± 22
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg L^{-1})	18 ± 7	6.5 ± 3	64 ± 11	15 ± 3	5 ± 2	64 ± 12
$^{\circ}\text{NO}_x\text{-N}$ (mg L^{-1})	<LOD	10 ± 4	-	<LOD	14 ± 3	-

Parameter	Applied load ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Load removal ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Applied load ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Load removal ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)
COD ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	130 ± 39	54 ± 36	80 ± 8	32 ± 9
TN ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	17 ± 4	2 ± 2	19 ± 5	2 ± 2
$\text{NH}_4\text{-N}$ ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	7 ± 2	4 ± 2	6 ± 1	4 ± 1

<LOD: below limit of detection

^a Statistical significance between the periods ($p < 0.05$)

Figure 29 – Nitrogen transformation in the vertical subsurface flow constructed wetland in Period I (130 g COD m⁻² d⁻¹) and II (80 g COD m⁻² d⁻¹).



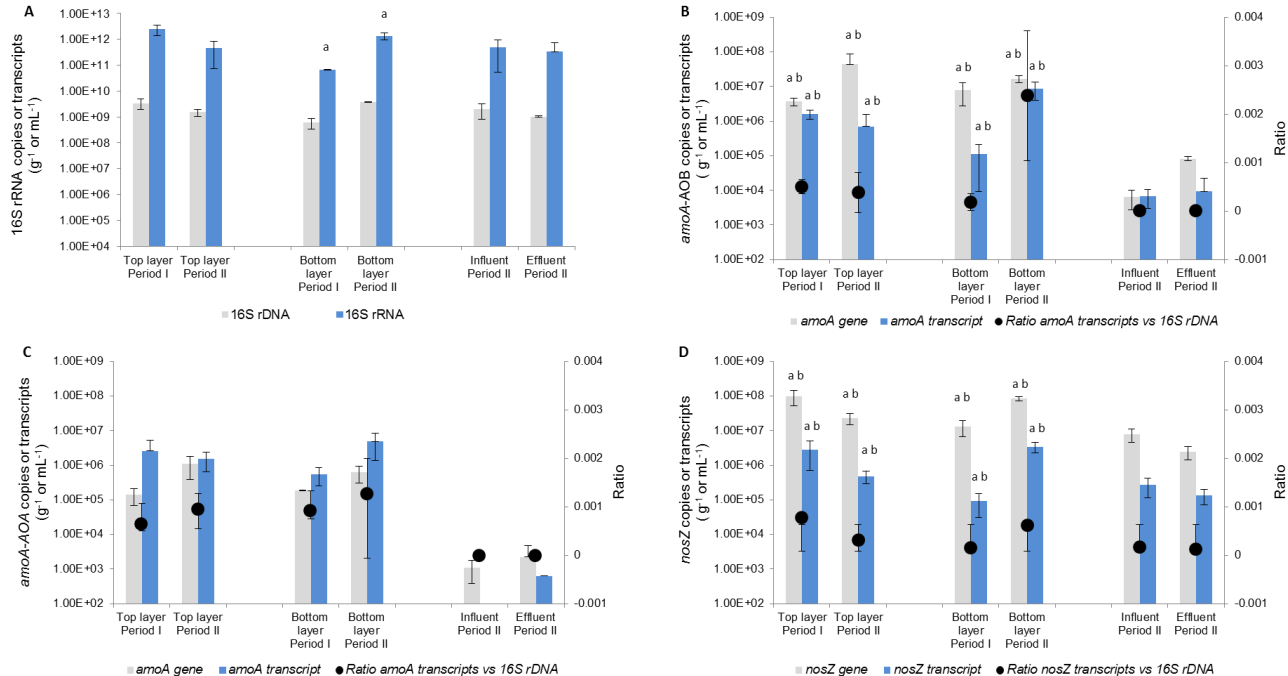
a: Statistical significance between the two periods ($p < 0.05$).

4.3.3.2 Microbial community assessment

(i) Quantification of nitrifying and denitrifying population

Eubacterial populations exhibited variability on the metabolic activity and active diversity as a function of the filter depth and OLR applied (Figure 30a). In Period I (130 g COD m⁻² d⁻¹) eubacteria were more active in top than in the bottom layer of the wetland (10¹² and 10¹⁰ 16S rRNA transcripts g⁻¹, respectively). Greatest microbial abundance has been reported to occur in the top layer of VF wetlands by previous studies, being attributed to the higher availability of organic matter and nutrients in the surface of the unit (FOLADORI et al., 2015; TIETZ et al., 2008). However, in the current study, the activity of eubacteria decreased in the top layer (10¹⁰ 16S rRNA transcripts g⁻¹) and increased in bottom layer (10¹² 16S rRNA transcripts g⁻¹) when the OLR decreased (Period II). This stratification may be associated with greater availability of oxygen along the vertical profile of the filter medium promoted by the lower OLR applied in this period.

Figure 30 – Average of nitrogen functional genes identified in top (0–15 cm) and bottom (70–80 cm) layers of the bed media of the vertical subsurface flow constructed wetland in the two microbiological sampling campaigns: Period I (ORL = 130 g COD m⁻² d⁻¹) and Period II (ORL = 80 g COD m⁻² d⁻¹), and in influent and effluent wastewater from Period II. a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial *amoA* copy numbers and transcripts; c) Abundance of archaeal *amoA* copy numbers and transcripts; d) Abundance of *nosZ* copy numbers and transcripts.



a: Statistical significance observed in the same layer between the two periods ($p < 0.05$).

b: Statistical significance observed between top and bottom layers within the same period ($p < 0.05$).

Nitrification was identified as an active process in the top and bottom layers of the VF wetland throughout the study, where AOB, AOA and phylotypes related to NOB belonging to *Nitrobacter* genus, were actively detected (Figure 30 a, b and Figure 32). Independently of the applied OLR, total AOB were more abundant than AOA populations in both periods and depths, being 10^6 *amoA*_AOB copies g^{-1} quantified in Period I, and 10^7 *amoA*_AOB copies g^{-1} in Period II, in both layers; and 10^5 *amoA*_AOA copies g^{-1} for Periods I and II, in both layers. Paranychianakis et al. (2016) showed higher abundance of *amoA*_AOB gene copies in respect to *amoA*_AOA in 6 units of CW with conditions of horizontal flow (planted and unplanted) fed with synthetic wastewater. Lower abundance of AOA has been reported to be presumably caused by a lack of ecological niche variables in CW (CORREA-GALEOTE et al., 2013). However, the previous studies conducted in CW were not performed at gene expression level of *amoA*, and therefore no information regarding the effect of environmental variables, such as the OLR on the metabolic activity of ammonia-oxidizers, has been described so far.

Current results concerning the active biomass at gene expression level (*amoA* transcripts) showed different dynamics of the ammonia oxidizing populations than those previously observed. The active AOA community was stable throughout the study, showing high resilience to changes in OLR. Moreover, in Period I, when the VF wetland operated under higher OLR, similar active archaeal and bacterial abundance was recorded in top and bottom layers (10^6 and 10^5 *amoA* transcripts g^{-1} in top and bottom respectively). However, in Period II at lower OLR, AOB activity decreased in the top layer (10^5 *amoA* transcripts g^{-1}) and increased in the bottom layer (10^6 *amoA* transcripts g^{-1}), while, AOA activity remained stable (10^6 *amoA* transcripts g^{-1} in both layers). Environmental conditions seem to be fundamental in the growth and development of stable and specialized ammonia-oxidizing communities (FAN et al., 2016). AOA have been detected over a wide pH range, whereas AOB are neutrophilic and their highest growth rate occurs at pH 7 to 7.5 (PROSSER; NICOL, 2012). qPCR results show how under higher oxygen availability across the bed media (under lower ORL) and more availability of carbon in top layer, AOB exhibited their highest activity at the bottom layer. Differently, metabolically active AOA remained more stable. As previously described, increasing oxygen concentrations enhanced enrichment of AOB, whereas the archaeal population was almost oxygen-insensitive.

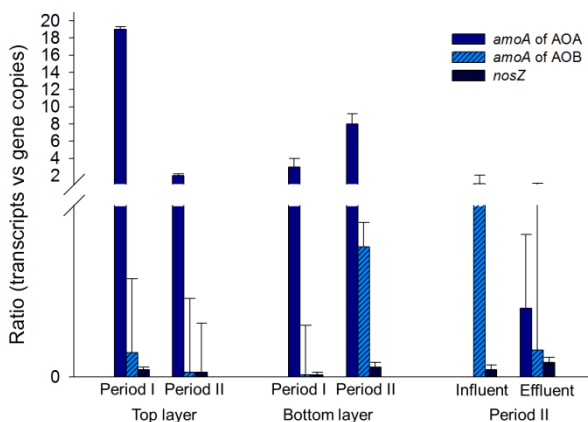
In relation to the denitrification activity, *nosZ* gene abundance (clade I) was similar in both periods and along the depth of the bed media (10^7 *nosZ* copies g^{-1}). Nevertheless, *nosZ* gene copies were always higher in respect to *nosZ* gene transcripts (Figure 30 d). In Period I greater activity of denitrifying bacteria was identified in the top (10^6 *nosZ* transcripts g^{-1}) than in the bottom (10^4 *nosZ* transcripts g^{-1}) of the wetland. When the OLR decreased (Period II), the activity of denitrifying bacteria showed a similar behavior than AOB, decreasing in the top layer (10^5 transcripts g^{-1}) and increasing in the bottom layer (10^6 transcripts g^{-1}). These results suggest that under conditions of high carbon concentrations the denitrification could occur in the surface layers at low oxygen availability (Period I). Under lower OLR (Period II), a higher oxygen transfer capacity would displace the denitrifying community to the bottom of the wetland. This community may also be linked to the activity of the nitrifying community in this part of the wetland, which would help decreasing oxygen availability in the filter, thus promoting the denitrification activity both inside the biofilms and in planktonic cells.

Globally, ammonia oxidizers (eubacteria and archaea), as well as denitrifying bacteria (*nosZ*) were detected to be more active in the bottom of the wetland during Period II at lower OLR (Figure 30 b, c and d). However, a higher activity of both groups was detected in the top layer during Period I, which would confirm the occurrence of higher simultaneous active nitrifying-denitrifying process in the VF wetland at a specific range of organic load.

Figure 31 shows the ratio of gene transcripts vs. gene copies of bacterial and archaeal *amoA* and *nosZ* in top and bottom layers of the VF wetland at the two sampling campaigns. Regardless of OLR applied in the VF wetland, AOA was the active nitrifying community more abundant along the vertical profile of wetland, whereas AOB activity showed highly dependent on the OLR. Interestingly, AOB could be also be influenced by the availability of carbon. High carbon availability resulted in higher specific growth rate of heterotrophic organisms (compared to autotrophic) and promoting a rapid consumption of available oxygen (SAEED; SUN, 2012). This would also end up promoting the displacement of the nitrifying bacteria to the lower part of the filter, where the availability of organic carbon compounds would be lesser (SALOMO et al., 2009). Transcript levels of *nosZ* gene were lower than *amoA* gene in both periods, which was in accordance with

the low denitrification potential observed in VF wetlands (VYMAZAL, 2013).

Figure 31 – Ratio of gene transcripts and gene copies of bacterial and archaeal *amoA* and *nosZ* in top (0-15 cm) and bottom layers (70-80 cm) of the vertical flow wetland at the two microbiological sampling campaigns: Period I (ORL= 130 g COD m⁻² d⁻¹) and Period II (ORL= 80 g COD m⁻² d⁻¹) and in influent and effluent wastewater from Period II.



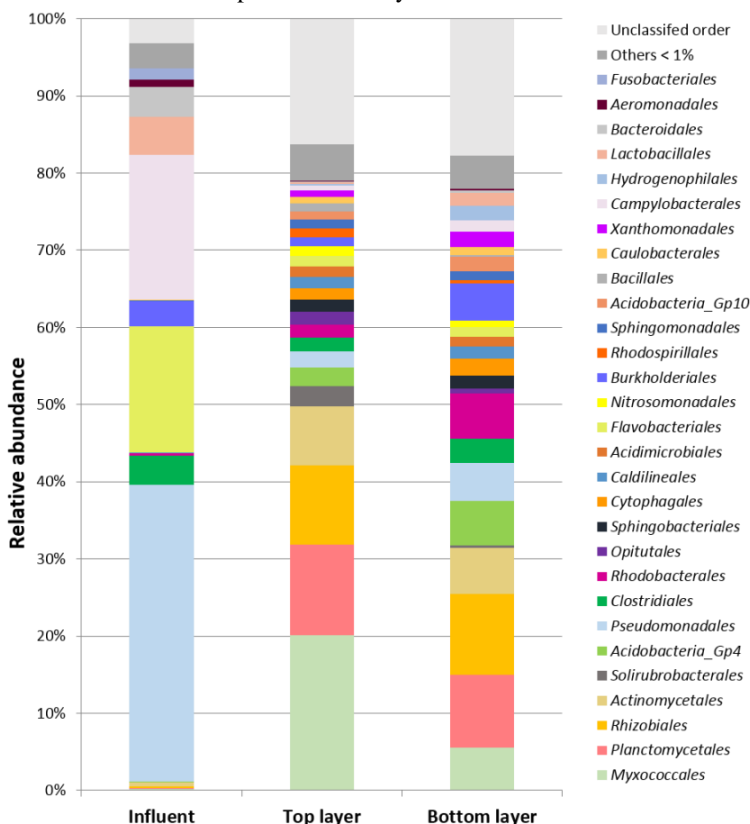
(ii) Active microbial community diversity

High-throughput bacterial 16S rRNA (cDNA) sequencing detected 3263 and 112 OTUs with 48,525–92,518 and 62,921–55,563 reads, for eubacteria and archaea, respectively. Figure 32 and 33 shows the relative abundance (RA) of the active eubacterial and archaeal populations present in water influent and the biofilm established at bed media samples in Period II.

Active microbial community from water influent was dominated by *Gammaproteobacteria* (40% RA), *Epsilonbacteria* (19% RA) and *Flavobacteria* (16% RA) classes, whereas the active biofilm from the bed media of the VF wetland presented a different microbial community, showing more diverse and similar between layers (Figure 34). In the top layer *Deltaproteobacteria* (21% RA) was the predominant class followed by *Alphaproteobacteria* (18% RA), *Planctomycetia* and *Actinobacteria* (both at 12% RA). The profile of

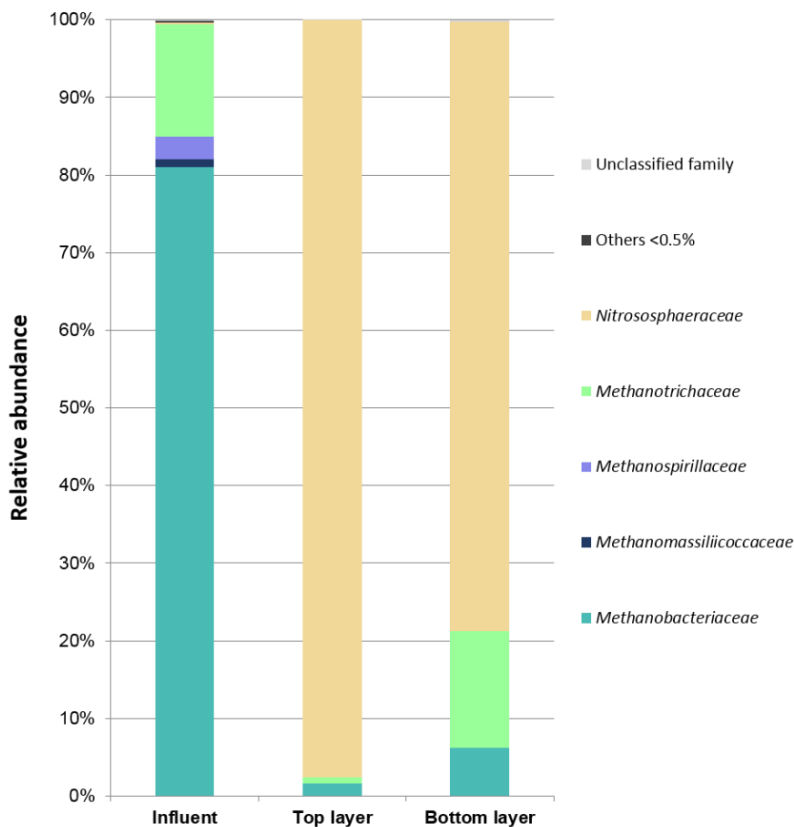
active bacteria in the bottom was slightly different being *Alphaproteobacteria* the most active class (22% RA), followed by *Gammaproteobacteria*, *Plantomycetia*, *Acidobacteria_Gp4*, *Betaproteobacteria* (all classes at 9% RA). Interestingly, *Deltaproteobacteria* was marginal at the bottom layer accounting for 6% of RA.

Figure 32 – Taxonomic assignment of sequencing reads (MiSeq) from the active eubacterial community (16S rRNA based cDNA) of influent wastewater, and bed media from top and bottom layers of Period II at order level.



Relative abundance was defined by the number of reads (sequences) affiliated with any given taxon, divided by the total number of reads per sample. Phylogenetic groups with a relative abundance lower than 1 % were categorised as ‘others’. Taxonomic assignment of individual datasets using the RDP Bayesian Classifier with a bootstrap cut-off of 80 %.

Figure 33 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active archaeal community (16S rRNA based cDNA) of influent wastewater, and bed media from top and bottom layers of Period II at family level.



Relative abundance was defined by the number of reads (sequences) affiliated with any given taxon, divided by the total number of reads per sample. Phylogenetic groups with a relative abundance lower than 0.5 % were categorised as ‘others’. Taxonomic assignment of individual datasets using the RDP Bayesian Classifier with a bootstrap cut-off of 80 %.

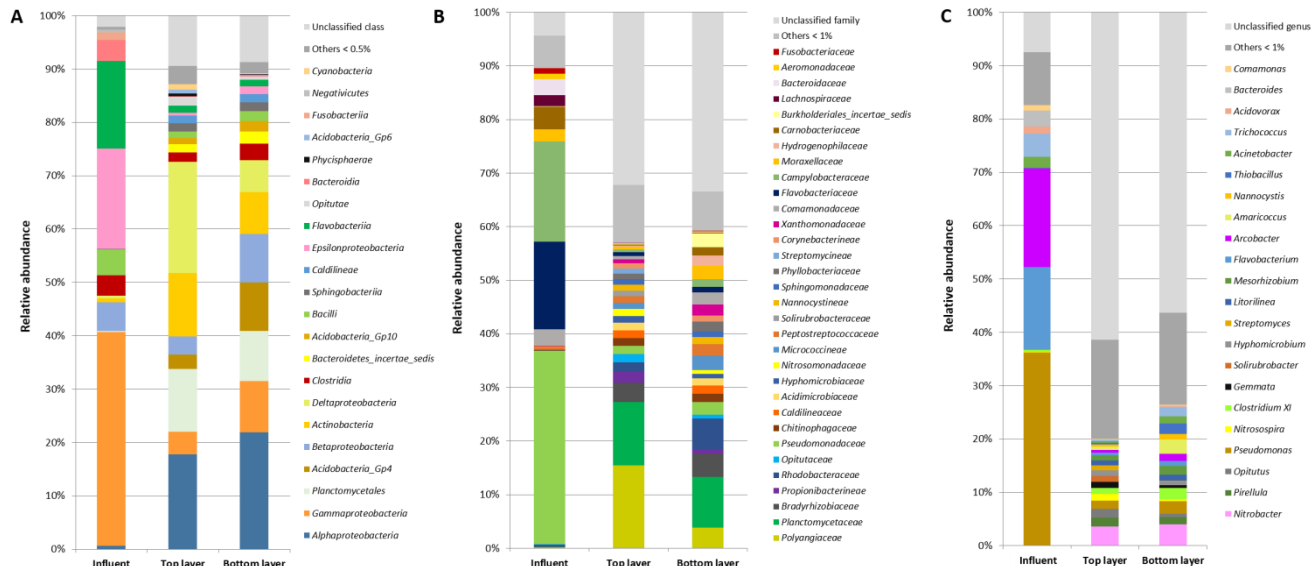
NGS results revealed that eubacterial populations of biofilms attached to bed material (gravel-sand) were clearly represented by metabolically active families linked to the nitrogen cycle (GRAF et al., 2014). Regarding the active AOB population, *Nitrosomonadaceae*

family (1% and 0.8% RA at top and bottom layers, respectively) were represented by OTUs belonging to the genus *Nitrosospira* (Figure 34) that could accumulate nitrite in the oxygenated layers of the biofilm. Recently, it has been described that all known AOB are able to conduct nitrifier-denitrification by means of nitrite reductases (*nir* genes) and nitric oxide reductases (*nor* genes), favoring the transformation of NO_2 to N_2O under low O_2 environments (KOZŁOWSKI et al., 2016; ZHU et al., 2013).

Active NOB were represented by OTUs belonging to the genus *Nitrobacter* (4% RA at both layers) that belongs to the order *Rhizobiales* (*Bradyrhizobiaceae* family) (Figure 32). The high revealed activity of *Nitrobacter* could be related with the accumulation of nitrate observed in the present study and enhanced at lower OLR (Period II). *Nitrobacter* have a low-nitrite affinity, high growth rate and develop large populations when nitrite is present at high concentrations (ANDREWS; HARRIS, 1986). In this way, the active presence of AOB and AOA populations in the VF wetland could favor the nitrite accumulation and the potential activity of *Nitrobacter* genus even at the bottom layer.

Active archaeal community structure and diversity was completely different between water influent and wetland bed media (Figure 33). Active methanogenic archaea of water influent, accounted for 99.4% of archaeal population, whereas, in bed media biofilm, methanogens represented less than 3% in the top and 20% in the bottom layer. Active archaeal biofilms in the bed media were clearly dominated by AOA, with a relative abundance of *Nitrososphaeraceae* accounting for 97.5% at the top and 78.4% at the bottom layer. It is obviously the establishment and activity of AOA population, becoming an important group of the bed media biofilm as previously observed by qPCR quantification (Figure 30b). The main representative OTU of the AOA family was OTU2 that belongs to the genera *Nitrososphaera* (Figure 34). That sequence showed 100% of similarity (NCBI Blastn) with Archaeon G61 (KR233006.1), related to the new genus *Candidatus Nitrosfontus exaquare* (belonging to *Nitrososphaeraceae* family), found in a municipal wastewater treatment plant. Despite the fact that AOA could accumulate nitrite, Sauder et al. (2016) found the important role of nitric oxide (NO) as a key player of *Thaumarchaeotal* ammonia oxidizing pathway. So, the microbial community from the biofilm that could generate NO, i.e. *Planctomycetia*, could enhance the ammonia-oxidizing activity of AOA.

Figure 34 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active eubacterial community (16S rRNA-based cDNA) of influent wastewater, and filter media from top and bottom layers of Period II. A) Class level; B) Family level; C) Genus level.



Relative abundance was defined by the number of reads (sequences) affiliated with any given taxon, divided by the total number of reads per sample. Phylogenetic groups with a relative abundance lower than 0.5 or 1 % were categorised as ‘others’. Taxonomic assignment of individual datasets using the RDP Bayesian Classifier with a bootstrap cut-off of 80 %.

Jin et al. (2010) showed that AOB community was more sensitive than of AOA to operational conditions, such as ammonia loading rate and dissolved oxygen in a nitrogen-removing reactor. The lower active abundance of AOB in relation to AOA observed in the current study could be associated with the higher OLR applied in the wetland, which favored the activity of heterotrophic bacteria, such as *Myxococcales* that was identified as active biomass in higher abundance (20% in top and 5% in bottom layers) (Figure 32). *Myxococcales* live in environments with lots of decomposed organic matter, and are gliding bacteria commonly found in soils and activated sludge that are thought to significantly impact biomass carbon (LUEDERS et al., 2006).

On the other hand, denitrifying bacteria were found in lower abundance and activity in the bed media of the VF wetland (Figure 32), concomitant with the $\text{NO}_x\text{-N}$ accumulation observed in the effluent. The active abundance of *Pseudomonadales* (*Pseudomonadaceae* family; *Pseudomonas* genus – Figure 34) was higher in the water influent (38% RA). However, in the bed media of the wetland the active abundance of *Pseudomonadaceae* was significantly lower (2% in top and 5% in bottom layers). The same behavior was identified for other well-known denitrifying bacteria in wastewater such as *Opitutus* (*Opitutaceae* family; *Opitutus* genus – Figure 34) and *Clostridiales* (*Peptostreptococcaceae* family; *Clostridium XI* genus), that could indicate a low stability of active denitrifying bacteria in the bed media, probably due to the oxygen availability.

4.3.4 Conclusions

This study showed the microbial population dynamics involved in nitrogen transformation along the depth of the bed media of a vertical subsurface flow constructed wetland operated under high OLR (Period I: $130 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; Period II: $80 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). COD removal loading rates were higher in Period I ($54 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) than Period II ($32 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), demonstrating its great capacity to handle large organic loads. $\text{NH}_4\text{-N}$ and TN removal rates were similar in both periods ($4 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $2 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).

The combination of qPCR and NGS at RNA level revealed that the nitrification process was associated with AOB (*Nitrospira*), AOA (*Nitrosoarchaeae*) and NOB (*Nitrobacter*). AOB populations were observed more abundant (at DNA level) than AOA along the depth of the wetland. However, considering the active abundance (based in *amoA* transcripts) the ammonia oxidizers dynamics was inverted, being AOA

population more stable in both periods and depths. Archaea from active bed biofilms were clearly dominated by AOA, that became actively established. Although denitrifying bacteria (*nosZ* copies and transcripts) were detected in the bed media, it was not enough to decrease the $\text{NO}_x\text{-N}$ accumulation in the water effluent.

Different strategies in vertical subsurface flow constructed wetlands are necessary to improve nitrogen removal, promoting the stability and activity of nitrifying and denitrifying populations. Our study showed that high OLR associated with a high HLR did not limit the activity of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers, which showed a relatively high predominance in the wetland biofilms promoted by the oxygen transfer rate of this wetland configuration. In order to enhance total nitrogen removal in this type of wetlands, a saturation of the bottom part of the filter bed represents a promising strategy to favor suitable conditions for the growth and activity of denitrifying bacteria.

4.4 ARTIGO 4

A partir do Artigo 3, foi exposto que AOA apresentaram maior atividade que AOB ao longo de todo o estudo. AOA, AOB e bactérias desnitrificantes (*nosZ*) foram identificadas mais ativas na camada da superfície sob uma carga orgânica de 130 g DQO m⁻² d⁻¹. Porém, quando a carga orgânica diminuiu para 80 g DQO m⁻² d⁻¹, maior atividade dessas populações passou a ser identificada na camada do fundo. Foi demonstrado também, que bactérias desnitrificantes estavam ativas ao longo do perfil vertical do maciço filtrante, inclusive, na camada da superfície do WCVD. Apesar disso, a remoção de NT foi de apenas 2 g NT m⁻² d⁻¹.

Nesse contexto, no procedimento experimental III, que resultou no Artigo 4⁴, buscou-se: (i) entender como é a dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante em um WCVD operado sob uma carga orgânica recomendada para condições climáticas subtropicais; (ii) avaliar se uma menor TH pode promover maior atividade de bactérias desnitrificantes no maciço filtrante em um WCVD; e (iii) identificar as variações entre a dinâmica microbiana nitrificante e desnitrificante ativa presentes no maciço filtrante de um WCVD-FS e um WCVD, quando submetidos às mesmas condições operacionais.

Para isso, foi avaliado um WCVD e WCVD-FS (1,5 m² de área superficial cada), com areia e brita como material filtrante, operados em paralelo, sob as mesmas condições operacionais (carga orgânica média de 40 g DQO m⁻² d⁻¹, TH de 133 mm d⁻¹ e um regime hidráulico com alimentações diárias). Após 6 meses de operação, foram coletadas amostras do maciço filtrante na camada da superfície e do fundo de ambos os *wetlands*. Com estas amostras, foi extraído o RNA e DNA e empregada a técnica de qPCR, baseado nos genes funcionais envolvidos nas transformações do nitrogênio (*amoA* de AOB e AOA e *nosZ* de bactéria) para identificar a abundância total (baseado no DNA) e a abundância ativa (baseado no cDNA) dos mesmos. Além disso, foi realizado o sequenciamento de nova geração do 16S rRNA de bactérias

⁴ O artigo 4 dara origem a seguinte publicação:

PELLISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; VIÑAS, M.; ROUSSO, Z.B.; GARCÍA, J.; ÁVILA, C.; ARMAS, D.R.; SEZERINO, P. H. Deciphering metabolically active microbial populations involved in nitrifying-denitrifying processes in partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands. **Environmental Science & Technology**. A ser submetido.

e arqueas (baseado no cDNA). O WCVD-FS apresentou maior remoção de nitrogênio ($5 \text{ g NT m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) que o WCVD ($2,5 \text{ g NT m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). No WCVD, a atividade de AOB decaiu significativamente, sendo identificada uma relação simbiótica entre AOA e NOB. Enquanto que no WCVD-FS, devido à presença de condições anóxicas/anaeróbias no meio, arqueas metanogênicas foram predominantemente ativas, reduzindo a atividade de AOA. Porém, mesmo assim em ambos os *wetlands*, AOA continuaram mostrando maior atividade que AOB. Bactérias desnitrificantes permaneceram sendo identificadas em baixa atividade no WCVD. No WCVD-FS a atividade de bactérias desnitrificantes, sobretudo, na camada saturada da unidade, foi beneficiada.

Transcrição adaptada do Artigo 4

4.4.1 Relevance and objective

In general, it has been reported to be around 40 to 50 %, exhibiting load removal rates ranging between 0.68 and $1.7 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ or 250 and $630 \text{ g TN m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ depending on CW type and inflow loading (VYMAZAL, 2007). Thus, enhance removal efficiency of TN is essential for further development of this ecotechnology (ADRADOS et al., 2014).

The typically implemented vertical subsurface flow constructed wetlands, which are unsaturated (UVF), are employed for nitrification, due to the high oxygen transfer capacity of this wetland type provided by the unsaturated condition of its bed media (which enables air diffusion into the filter pores) and the intermittent feeding mode (PLATZER, 1999; KAYSER; KUNST, 2005). Conversely, horizontal subsurface flow CW (HF), which are permanently saturated beds fed horizontally in a continuous mode, can favor denitrification processes, due to the presence of anaerobic/anoxic conditions in the filter media. In this way, when UVF or HF wetlands are operated in separate technological arrangements they are not able to accomplish complete TN removal.

So far, different operational strategies have been used to maximize the removal of TN in CW, such as tidal flow systems (HU et al., 2014 a, b), the recirculation of the final effluent (FOLADORI et al, 2013) or the use of hybrid CW system containing various CW

configurations in series (VYMAZAL, 2013). However in many cases, excessive energy input or large surface area are required in these approaches, thus increasing the footprint of this ecotechnology.

Recently, a simple cost-effective alternative, known as *partially saturated* vertical subsurface flow CW (SVF), has been successfully employed. The saturation of the bottom part of the wetland bed promotes favorable conditions to enable both nitrification and denitrification processes to take place within a single wetland unit, due to the occurrence of aerobic conditions in the top and anaerobic/anoxic in the bottom (PELISSARI, et al., 2017a; SILVEIRA et al., 2015; LANGERGRABER et al., 2011; DONG; SUN, 2007). Pelissari et al. (2017a), in Brazil, observed 58 % of TN removal in a SVF at full scale (45 cm unsaturated layer followed by 25 cm saturated layer at the bottom), which was operated under low organic loading rates (OLR): 4 g COD m⁻² d⁻¹ and 1.5 g TN m⁻² d⁻¹). Langergraber et al. (2011), reported 57 % of TN removal in two stages of VF wetlands of 10 m² each (a SVF followed by a UVF) operated under an OLR of 40 g COD m⁻² d⁻¹. Moreover, two French systems SVF wetlands (surface area of 2m²) with a filter depth of 70 cm where operated in parallel over 16 months with different saturation depths (25 and 15 cm) and enhanced denitrification was observed at the unit with 25 cm of saturation. Under an OLR of 25 g COD m⁻² d⁻¹ the removal efficiency was of 47 % and 56 % for NH₄-N and TKN, respectively (SILVEIRA et al., 2015).

Although there are studies that discriminate the dynamics of the microorganisms involved in nitrogen removal in different modalities of CW, the interrelation between microorganisms involved in the nitrogen cycle and environmental conditions presents in the bed media, mainly in SVF wetland, is still not clear. Firstly, because there is a wide variation of environmental conditions in the bed media, due to the presence of two distinct layers (aerobic and anaerobic/anoxic layers). Secondly, little is known regarding the dynamics of metabolically active nitrifying and denitrifying populations presents in the biofilms from bed media of SVF wetland.

Elucidating the behavior of nitrifying and denitrifying populations and their interrelationships linked to operational conditions is a key objective to understand and maximize nitrogen removal in CW. In this way, the present study aims at gaining an insight into the dynamics of metabolically active populations involved in the transformation of different nitrogen fractions in an unsaturated and in a

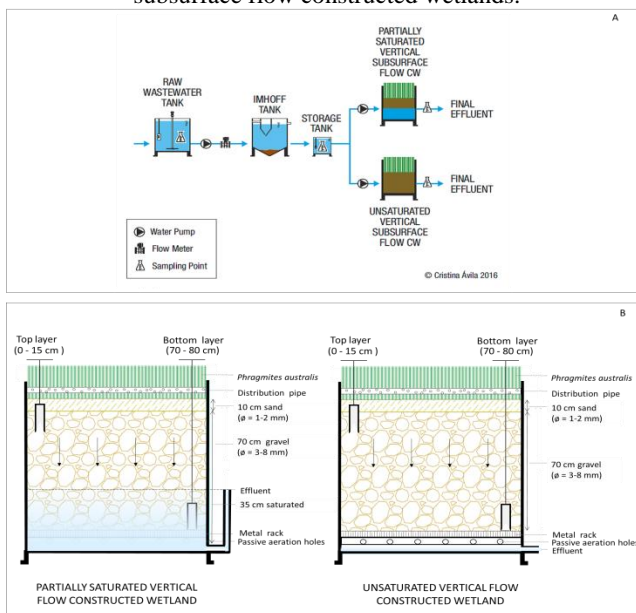
partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland operated in parallel under the same conditions.

4.4.2 Materials and methods

4.4.2.1 Description of the treatment system

The experimental treatment plant is set outdoors at the experimental facility of the GEMMA group (Department of Hydraulic, Maritime and Environmental Engineering of the Universitat Politècnica da Catalunya - Barcelona-Tech, Spain) in a Mediterranean climate. The treatment pilot plant was composed by a Imhoff tank (0.2 m³), which was designed as primary treatment, followed by a UVF wetland and SVF wetland, both operated in parallel (Figure 35).

Figure 35 – Diagram of the experimental CW treatment system. A) Sampling collected from influent and effluent of constructed wetlands; B) Sampling collects from bed media of unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.



Each wetland had a surface area of 1.5 m² (1.0 W × 1.5 L × 0.8 D), and a bed media depth of 0.8 m. This consisted of 0.1 m sand layer (Ø = 1-2 mm) in the top, and 0.7 m layer of fine gravel (Ø = 3-8 mm) underneath. The macrophyte planted in both wetlands was *Phragmites australis*. Whereas the UVF wetland was operated typically unsaturated (i.e. 0.8 m free drainage) and the SVF wetland had the bottom part (0.35 m) saturated with effluent by setting the outlet pipe at that height.

The wetlands were constructed in polyethylene tanks, and a polyethylene pipe distributed the pumped water 0.1 m above the top of the bed. This pipe contained 5 perforations with diffusers that provided a true 360° radial horizontal water pattern, thus ensuring an evenly distribution of the wastewater over the whole surface of the filter.

During the period of this study (February to July 2016), each wetland (partially saturated and unsaturated) were operated with flow of 200 L d⁻¹, OLR of 40 g COD m⁻² d⁻¹, following recommendations of Sezerino et al. (2012), and HLR of 133 mm d⁻¹. Feeding was performed in a continuous mode by intermittent pumping, totaling 8 pulses per day (25 L pulse⁻¹).

Physicochemical data from influent and effluent samples from both wetland beds were determined twice a week throughout the whole study period. Some water quality parameters (i.e. temperature, pH and dissolved oxygen - DO) were measured onsite at the time of sample collection, and grab water samples were taken to the adjacent laboratory for the immediate analysis of the following parameters: total suspended solids (TSS), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), ammonium nitrogen (NH₄-N), nitrate and nitrite nitrogen (NO_x-N) and sulfate (SO₄).

Onsite measurements of water temperature, DO and pH were taken by using a Checktemp-1 Hanna thermometer, a Eutech Ecscan DO6 oxymeter and a Crison pH-meter, respectively. E_H was also measured onsite by using a Thermo Orion 3 Star redox meter, and values were corrected for the potential of the hydrogen electrode. The determination of conventional wastewater quality parameters, including TSS and NH₄-N was done by following the Standard Methods (APHA, 2012). TN and TOC were analyzed using a Multi N/C (2100 S) analyzer. NO_x-N and SO₄ were analyzed using a DIONEX ICS-1000 chromatography system.

An electromagnetic flow meter (SITRANS FM MAGFLO®) was installed at the inlet and outlet of the wetlands to monitor the flow

values in the system. In this way, it was possible to assess the evapotranspiration influence in the treatment of units.

4.4.2.2 Microbial community assessment

To elucidate the microbial community dynamics involved in nitrogen transformation in the UVF and SVF wetlands, a DNA and RNA based assessment of functional genes was performed in order to quantify active microbial populations. In this way, Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT)-qPCR of ammonia oxidizers (*amoA_AOB*, *amoA_AOA*) and typical denitrifiers (*nosZ – clade I*) were performed. Moreover, active eubacterial and archaeal microbial communities were deeply assessed by means of 16S rRNA based high throughput sequencing (rRNA-based) by Next Generation Sequencing (NGS). This analysis allows identifying the metabolically active microbial diversity enriched in the biofilm's bed media of UVF and SVF wetlands throughout the bioprocess.

- Sample collection

Influent wastewater and bed media samples (gravel and sand) from the top (0-15 cm depth) and bottom (70-80 cm depth) layers of both wetlands were collected. Influent samples were collected in two periods (initial and end periods). Concerning bed media samples, in the UVF wetland, sampling was done after 6 months of operation (at end period of study). In the SVF wetland, sampling was performed in two campaigns: the first, 1 day before the bottom saturation be implemented in the unit (initial period), and the second, after 6 months of operation under this configuration (in the end period of study). Table 9 shows the sampling collection design for each wetland and the specific analysis conducted during the period.

- RNA and DNA extraction

Samples after collection were immediately mixed with 2 mL of LifeGuard Reagent (MO BIO) to prevent RNA degradation. Total RNA + DNA extraction from approx. 0.25 g of bed media and 1 mL pellet of influent samples (20.000 g/5' at 4°C) were extracted in triplicate for each period by using an adapted protocol of Power Microbiome™ RNA

Isolation kit, (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). The RNA extracts were treated for 10 minutes at 25 °C with 10 units of DNase I (at room temperature stable DNase enzyme from the same Power Microbiome Isolation kit) to remove any contaminating genomic DNA. All of the DNase I-treated RNAs were tested using 16S rRNA-based PCR amplification to detect DNA impurities. Purified RNAs were transcribed to cDNA with PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, Takara) following the manufacturer's instructions. cDNA and DNA extracts were kept frozen at -80 °C until further analysis.

Table 9 – Samples collected and analyses employed in unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.

Constructed Wetlands	Sampling collections	Period	Analyses conducted
UVF wetland	Influent wastewater	Initial period and	qPCR
	Bed media (Top and bottom layers)	End period	qPCR + NGS
		End period	qPCR + NGS
SVF wetland	Influent wastewater	Initial period and	qPCR
	Bed media (Top and bottom layer)	End period	qPCR + NGS
		Initial and End period	qPCR + NGS

- Quantifying total and metabolically active microbial populations by qPCR

qPCR analysis were performed with samples from influent (initial and end periods) and bed media (top and bottom layers) from UVF wetland (end period of study) and SVF wetland (initial and end periods). From these analyses it was possible to identify abundance (at DNA level) and activity (at cDNA level) of *amoA* of ammonia oxidizers (AOA and AOB) and denitrifying bacteria (*nosZ*).

Quantitative analyses of total eubacterial population were conducted on the V3 hypervariable region of 16S rRNA as described in Prenafeta-Boldú et al. (2012). AOB and AOA populations were quantified by means of ammonia monooxygenase α -subunit encoding genes (*amoA*_AOB and *amoA*_AOA genes, respectively). *amoA*_AOB abundance genes and activity were performed as previously reported by Rotthauwe et al. (1997). For *amoA*_AOA a new combination of primers were applied in order to include the known *amoA* related AOA lineages (group I.1a: *Nitrosopumilus* cluster; group I.1a-associated: *Nitrosotalea*

cluster; group I.1b: *Nitrososphaera* cluster; and *Thaumarchaeota* group: *Nitrosocaldus* cluster): CamoA19Fw 5'-ATGGTCTGGYTWAGACG-3' (PESTER et al., 2012) and Arch_amoAF_Rv 5'-GATGTCCARGCCARTCAG-3' (WUCHTER et al., 2006). The qPCR reaction and amplifications conditions for these primers were performed as described in PELISSARI et. al (2017b). Denitrifying population was quantified by *nosZ* gene (clade I), the encoding gene of catalytic subunit of nitrous oxide reductase, as previously reported in Calderer et al. (2014). All qPCR reactions were conducted in a Real Time PCR System MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA). All samples were analyzed in triplicate by means of three independent cDNA and DNA extracts.

For the standard curve of each target gene, it was designed by using FunGene data base (<http://fungene.cme.msu.edu/>) five gBlocks® Gene Fragments (IDT, Integrated DNA Technologies). Ten-fold serial dilutions from synthetic genes were subjected to qPCR assay in duplicate showing a linear range between 10^1 and 10^8 gene copy numbers per reaction to generate standard curves. qPCR reactions fitted quality standards: efficiencies were between 90-110 % and R^2 above 0.985. All results were processed by MxPro™ QPCR Software (Stratagene, La Jolla, CA) and were treated statistically.

- Microbial diversity metabolically active by NGS

High throughput analyses were performed to find out the most prevalent active eubacterial and archaeal populations. This analysis was performed with influent samples (from end period of study) and bed media from both wetlands at different depths (top and bottom layers). For UVF wetland, samples from end period of study were utilized. While for SVF wetlands, samples from initial and end periods were employed in this analysis.

16S rRNA libraries targeting V1-V3 and V3-V4 regions from eubacterial and archaeal populations, respectively, were sequenced by utilizing MiSeq Illumina sequencing platform at Molecular Research DNA Laboratory (Shallowater, TX, USA) following manufacturer's instructions. For the eubacterial 16S rRNA libraries, the primer set was 27F (5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3') / 519R (5'-GTNTACNGCGGCKGCTG-3') and for the archaeal was 349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAG-3') / 806R (5'-

GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'). The obtained reads were compiled in FASTq files for further bioinformatic processing. Trimming of the 16S rRNA barcoded sequences into libraries was carried out using QIIME software version 1.8.0 (CAPORASO et al., 2010a). Sequences were denoised and chimeras were removed (REEDER; KNIGHT, 2010; CAPORASO et al., 2010b; HAAS et al., 2011). Quality filtering of the reads was performed at Q25, prior to the grouping into Operational Taxonomic Units (OTUs) at a 97 % sequence homology cut-off. OTUs were then taxonomically classified using BLASTn against GreenGenes and RDP (Bayesian Classifier) database and compiled into each taxonomic level (DESANTIS et al., 2006).

Data from MiSeq NGS assessment were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the accession number SRP095451, for active eubacterial and archaeal populations.

4.4.2.3 Statistical data analyses

Data normality, concerning treated effluent quality for both wetlands, was verified using Kolmogorov - Smirnov test. Moreover, ANOVA analysis of variance ($p < 0.05$) was employed to identify differences on water quality between the UVF and SVF wetlands.

A t-Student test was performed with qPCR results from bed media of both wetlands. This analysis was done to check statistical differences in the abundance (gene copies and transcripts) identified in different layers and periods. For UVF wetlands this analysis was performed considering samples from top and bottom layers of same period (end period). In regards to the SVF wetland, the analysis was performed to check statistical differences between top and bottom layer samples collected at the same period and also between samples of the same layer collected in different periods (initial and end periods).

Furthermore, Pearson correlations tests among transcripts abundance of *amoA* of ammonia oxidizers (qPCR results) and the relative abundance of NOB (NGS results) were conducted in both wetlands. For the UVF wetland, this analysis was done considering the results from top and bottom layers, whereas for the SFV wetland, only the top layer from end period was included.

4.4.3 Results and discussion

4.4.3.1 *Performance of unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands*

The general characteristics of the influent and effluent quality of the UVF and SVF wetlands, both under the same operational conditions (OLR of 40 g COD m⁻² d⁻¹ and HLR of 133 mm d⁻¹), as well as the applied loading rate, load removal and load removal efficiencies are shown in Table 10. According to ANOVA test results, UVF and SVF wetlands presented statistical differences on the removal efficiencies for TSS (p= 0.03233), TN (p= 5.4x10⁻⁷), NO_x-N (p=0.00349), E_H (p= 0.01234) and SO₄ (p= 0.02345). These differences could be explained by the different status of saturation of the bed media, which in turn creates different microbial community structures in the UVF and the SVF wetland.

The TSS load removal rate was 10 ± 6 g TSS m⁻² d⁻¹ in UVF wetland and 9 ± 5 g TSS m⁻² d⁻¹ in SVF wetland. This performance represents a load removal efficiency of 77 ± 29 % for the UVF and 69 ± 23 % for the SVF wetland. Despite both wetlands displayed similar treatment efficiencies, still statistical differences were found on the removal efficiency for TSS. This fact can be explained by the different operational design of each unit. The removal of the easily removable TSS fraction occurs in the first layer of the filter bed (DONG; SUN, 2007). Probably, lower TSS removal in SVF wetland is associated with a desorption process of inorganic solids, affecting solids entrapment. The COD load removal rates were very similar for both units (26 ± 12 g COD m⁻² d⁻¹ or 65 ± 19 % for UVF wetland, and 27 ± 11 g COD m⁻² d⁻¹ or 67.5 ± 16 % for SVF wetland). These load removal rates are consistent with that of 25 g COD m⁻² d⁻¹ observed in a UVF wetland that was operated under OLR of 32 g COD m⁻² d⁻¹ (FOLADORI et al., 2012). These results showed that the lower availability of oxygen in the SVF unit compared to the UVF wetland did not minimize the ability for organic matter removal. In fact, the removal of COD in the SVF wetland could be also associated with the denitrification process. The redox potential of the effluent of the SVF wetland revealed a more reductive environment when compared to UVF wetland (Table 10), which could be related with a higher denitrification activity in the SVF wetland, promoting an equivalent COD depletion in both wetlands.

Different nitrogen removal pathways occurred in the UVF and SVF wetlands (Figure 36), being nitrogen transformations associated with the environmental factors of the media (SAEED; SUN, 2012). Redox potential and DO of the effluent of the UVF were more oxidative ($+92 \pm 34$ mV and 2.2 ± 0.8 mg L⁻¹) than the SVF wetland, which presented higher variability throughout the study (-4 ± 43 mV and 0.7 ± 1 mg L⁻¹). In general, high redox potentials can offer oxidizing conditions to promote aerobic nitrification, while lower redox potential provides reducing environments favoring to promote nitrate, iron, manganese and sulfate reduction processes, as well as methanogens (FAULWETTER et al., 2009).

Table 10 – Average (\pm SD) concentration, loading rates and removal efficiencies of water quality parameters at the influent and effluent of the unsaturated (UVF) and partially saturated (SVF) vertical subsurface flow constructed wetland.

Parameters n= 38	Influent	UVF wetland	SVF wetland	Mean removal	Mean removal
		Effluent	Effluent	efficiency UVF wetland (%)	efficiency SVF wetland (%)
T (°C)	17.6 \pm 5	16.9 \pm 4	18 \pm 5		
DO (mg L ⁻¹)	0.6 \pm 0.8	2.2 \pm 0.8	0.7 \pm 1		
^s EH (mV)	-27 \pm 49	+92 \pm 34	-4 \pm 43		
pH	7.3 \pm 0.2	7.4 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2		
^t TSS (mg L ⁻¹)	97 \pm 41	27 \pm 15	34 \pm 16	72 \pm 30	65 \pm 28
COD (mg L ⁻¹)	302 \pm 88	101 \pm 38	121 \pm 44	66.5 \pm 20	60 \pm 19
TOC (mg L ⁻¹)	104 \pm 63	32 \pm 10	50 \pm 18	69 \pm 36	52 \pm 32
^t TN (mg L ⁻¹)	61 \pm 11	40 \pm 7	31 \pm 6	34 \pm 11	49 \pm 14
NH ₄ -N (mg L ⁻¹)	19 \pm 4	5 \pm 2	6 \pm 4	74 \pm 15	68 \pm 20
^s NO _x -N (mg L ⁻¹)	<LOD	27 \pm 5	1 \pm 0.9		
^s SO ₄ (mg L ⁻¹)	101 \pm 25	120 \pm 15	56 \pm 42		45 \pm 18

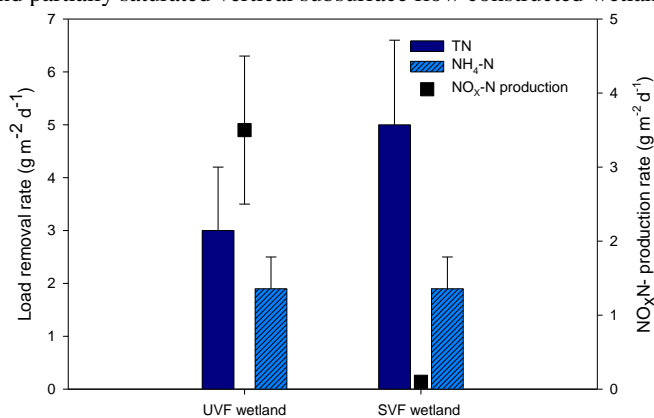
Parameters	Applied load (g m ⁻² d ⁻¹)	Load removal	Load removal	Load removal	Load removal
		UVF wetland (g m ⁻² d ⁻¹)	SVF wetland (g m ⁻² d ⁻¹)	efficiency UVF wetland (%)	efficiency SVF wetland (%)
TSS (g m ⁻² d ⁻¹)	13 \pm 5.5	10 \pm 6	9 \pm 5	77 \pm 29	69 \pm 23
COD (g m ⁻² d ⁻¹)	40 \pm 11	26 \pm 12	27 \pm 11	65 \pm 19	67.5 \pm 16
TN (g m ⁻² d ⁻¹)	8 \pm 2	2.5 \pm 1	5 \pm 1	31 \pm 11	62 \pm 12
NH ₄ -N (g m ⁻² d ⁻¹)	3 \pm 0.6	2 \pm 0.8	2 \pm 0.6	67 \pm 14	67 \pm 17
SO ₄ (g m ⁻² d ⁻¹)	14 \pm 3	-2 \pm 3	8 \pm 6		57 \pm 49

<LOD: below limit of detection

^sStatistical difference between UVF and SVF wetland (p<0.05) in mg L⁻¹

Although UVF and SVF wetlands have generally different operational design purposes, being the UVF wetlands commonly designed to promote nitrification (PLATZER, 1999), while simultaneous nitrification and denitrification is expected to occur in the SVF wetland (PELISSARI et al., 2017a; SILVEIRA et al., 2015), no statistical differences were detected in regards to $\text{NH}_4\text{-N}$ removal (Figure 36). $\text{NH}_4\text{-N}$ load removal rates were similar for both wetlands ($2 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ or 67 %), showing that nitrification was not presumably affected by the more reductive environment described in the SVF unit. However, differences were remarkable for nitrate production between the two units, as well as statistically significant. While high $\text{NO}_x\text{-N}$ was produced in the UVF wetland ($3.5 \text{ g NO}_x\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; $27 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$), comparatively low $\text{NO}_x\text{-N}$ was identified in the SVF wetland ($0.1 \text{ g NO}_x\text{-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; $1 \pm 0.9 \text{ mg L}^{-1}$), showing an effective denitrification capacity of this unit provided by the saturation of the bottom part of the same.

Figure 36 – Nitrogen load rate removal and $\text{NO}_x\text{-N}$ production in an unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland.



These variable behaviors observed between the two wetlands resulted in different TN load removal rates (Figure 36). In the UVF wetland, the TN load removal rate was of $2.5 \pm 1 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (31 ± 11 %), which is in agreement with previous studies conducted in the same UVF wetland operating under an OLR of 80 and $130 \text{ g COD m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and HLR of 375 mm d^{-1} (PELISSARI et al., 2017b).

Oppositely, the TN load removal rate was as high as $5 \pm 1 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ($62 \pm 12 \%$) in the SVF wetland. This removal was similar to the performance identified in a UVF wetland with intermittent aeration ($5.6 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (FOLADORI et al., 2012), and resembled that observed in hybrid systems with a free flow unit ($4.2 \pm 5.1 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (VYMAZAL, 2013). Furthermore, the efficiency was higher than that identified in two combined SVF and UVF wetlands operated in series ($3.8 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (LANGERGRABER et al., 2011). In this way, it has been proven that the saturation of the bottom layer of vertical flow wetlands can effectively promote both nitrification and denitrification processes within a single wetland unit, without the need for larger area or induction of energy.

In addition, sulfate was removed in SVF wetland ($8 \pm 6 \text{ g SO}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ or $57 \pm 49 \%$), while in the UVF wetland no removal was observed (Table 10). In CW, chemical and microbial oxidation is the main sulfate oxidation processes (WU et al., 2012). In a subsurface flow CW microcosms, it was shown that mixotrophic denitrification could effectively remove nitrate along with sulfide oxidation, which may lead to the simultaneous removal of organics, nitrate and sulfate compounds (CHEN et al., 2016). Thereby, the saturated bottom layer in the SVF may promote environments with favorable conditions to remove sulfate.

Maintaining a water-saturated environment in the bottom layer in a VF wetland can promote different redox environments. Besides that, in SVF wetlands, higher evapotranspiration generates a lower effluent discharge when compared to UVF wetlands. In the current study the SVF unit had an evapotranspiration of 13 %, while the UVF evapotranspiration was limited to only 2 %. Moreover, it is worth noticing that macrophyte biomass was more abundant and adapted in the SVF unit when compared to UVF. This could be explained by the higher humidity within the SVF bed, provided by the saturated layer.

4.4.3.2 Microbial community structure in unsaturated and partially saturated vertical flow constructed wetlands

The total microbial abundance and the expression of functional genes linked to the nitrogen cycle were quantified by (RT)-qPCR in the bed media of both wetlands as well as in the influent wastewater. (RT)-qPCR analysis were performed with samples from influent (initial and end periods) and bed media (top and bottom layers) from UVF wetland (end period of study) as well as SVF wetland (initial and end periods).

Moreover, high throughput sequencing (MiSeq) of 16S rRNA massive libraries (cDNA level) was performed in the influent (end period) and in the bed media (top and bottom layers) from both wetlands. In the UVF wetland, this analysis was performed at the end period, while in SVF wetland it was conducted in the initial and end periods. 16S rRNA cDNA-based sequencing of all samples detected 7336 and 247 OTUs with 57,189-72,242 and 25,978-122,818 reads, for eubacteria and archaea kingdom, respectively.

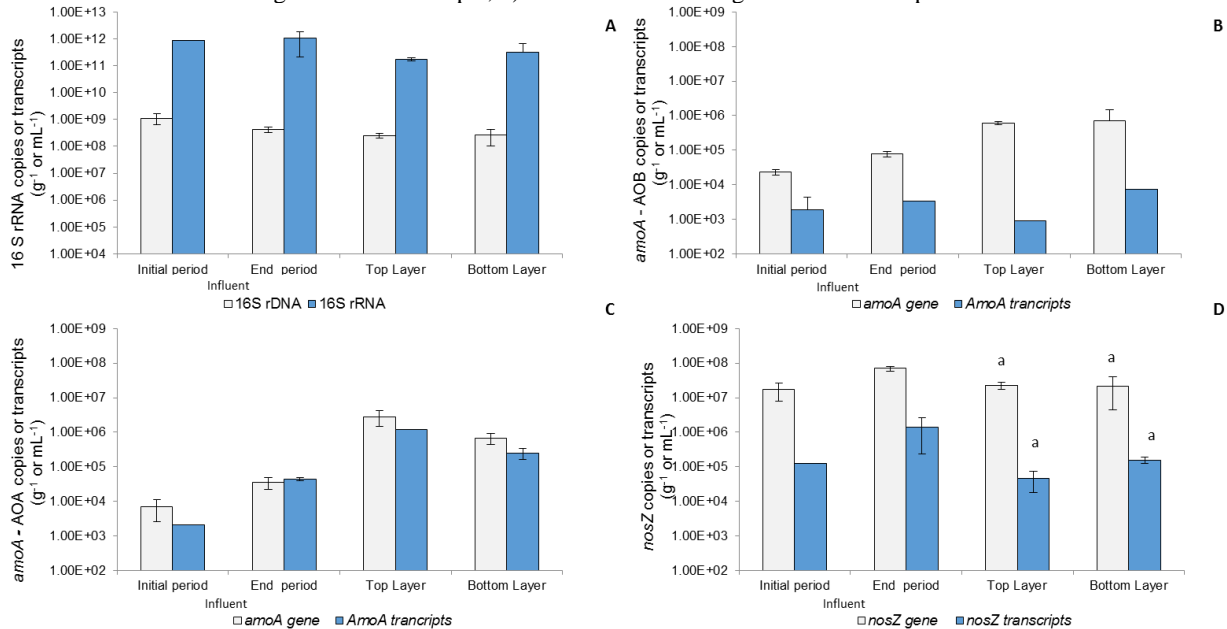
(i) Unsaturated vertical subsurface flow constructed wetland

After 6 months of operation of the UVF wetland, the eubacterial population in the biofilm of the bed media was actively detected (10^{11} 16S rRNA transcripts g^{-1}) in top and bottom layers. Concerning *amoA* transcripts (Figure 37), AOA were identified as the main metabolically active ammonia oxidizer (AO) community in all depths, achieving 10^6 and 10^5 *amoA* transcripts g^{-1} in top and bottom layers, respectively. Oppositely, only 10^2 and 10^3 *amoA* transcripts g^{-1} of AOB were detected in top and bottom layers, respectively. Therefore, AOA proved to be again predominantly active at the same range compared to a previous study conducted within the same UVF wetland unit, but under higher ORL (80 - 130 $g\ COD\ m^{-2}\ d^{-1}$) and HLR (375 $mm\ d^{-1}$) (PELISSARI et al., 2017b).

AO populations differences between layers were clearly identified (Figure 38). AOA had similar activity ratio (*amoA* transcripts/*amoA* copies) in both layers (0.44 in top and 0.34 in bottom layers). In contrast, in relation to total eubacteria population (*amoA* transcripts/16S rDNA), AOA differed along the filter depth, holding the top layer the highest active populations abundance of AOA. AOB displayed a minor role, having poor activity when compared to AOA, also found in NGS data. Therefore, AOA was the predominant AO population in this filter bed, playing a key role in nitrogen transformation in the UVF wetland.

In fact, environmental parameters are critical for the development of AO community. AOB are described to be more resistant to high influent ammonium concentrations and pH changes (FAN et al., 2016; WEBSTER et al., 2002) than AOA, and are commonly found in industrial wastewater treatment plants (WWTP) with higher ammonium concentrations (CYDZIK-KWIATKOWSKA et al., 2016).

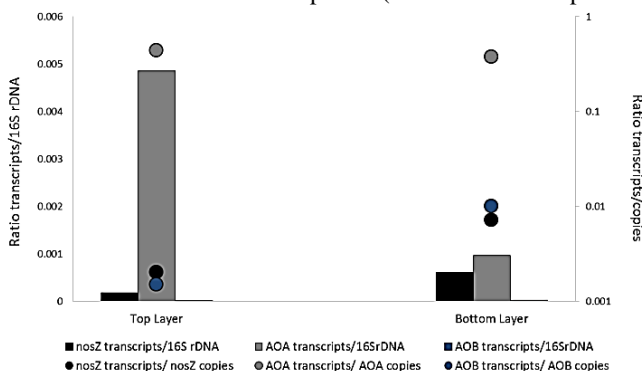
Figure 37– Average of nitrogen functional genes identified in influent (at the initial and end periods), and in the top (0-15 cm) and bottom (70-80 cm) layers of the bed media of the unsaturated vertical subsurface flow constructed wetland (at the end period). a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial *amoA* genes and transcripts; c) Abundance of archaeal *amoA* genes and transcripts; d) Abundance of *nosZ* genes and transcripts.



a: Statistical significance observed between top and bottom layer ($p < 0.05$).

Limpiyakorn et al. (2011) showed a higher population of AOB than AOA, when influent and effluent of the WWTP contained high levels of $\text{NH}_4\text{-N}$ (36 - 422 and 5 - 29 mg L^{-1}). In contrast, significant abundance of AOA occurred when lower $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations were measured in the influent and effluent (6 - 11 and 0.2- 3 mg L^{-1}). In the present study, influent was urban wastewater with $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration ($19 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$). This fact probably favored the AOA at expenses of AOB, whom displayed less activity (Figure 38).

Figure 38 – Ratio between transcripts/16S rDNA and transcripts/genes copies identified in top and bottom layers of the unsaturated vertical subsurface flow constructed wetlands at the end period (after 6 months of operation).



In relation to the denitrification (*nosZ*), it was observed that not all denitrifiers from clade I had the optimal conditions to be active (Figure 37). *nosZ* gene abundance (10^7 *nosZ* copies g^{-1} in both layers) was always greater than activity (10^4 and 10^5 *nosZ* transcripts g^{-1} , in top and bottom layers, respectively). Taking into account the activity ratio (*nosZ* transcripts/*nosZ* copies) and *nosZ* normalization with total eubacteria population (*nosZ*/16S rDNA), denitrifying bacteria exhibited differences between the top and bottom layers of the UVF wetland (Figure 38). Slightly higher of *nosZ* expression was identified in the bottom layer in comparison with the top layer, which could be related to a more reducing environment. Nevertheless, the low presence and activity of denitrifiers were also concomitant with a $\text{NO}_x\text{-N}$ accumulation in the UVF wetland effluent (Table 10), oppositely to SVF wetland effluent, where no $\text{NO}_x\text{-N}$ accumulation was identified.

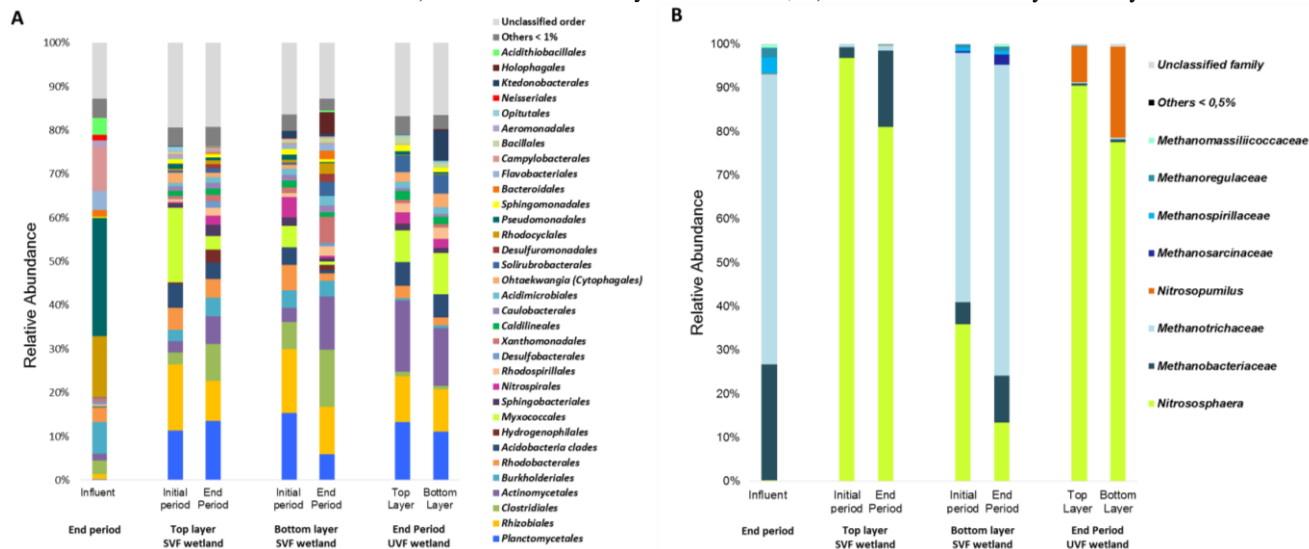
Remarkable differences of metabolically active eubacteria and archaea community were identified between the influent wastewater and the biofilm of the bed media of the UVF wetland (Figure 39). At class level (Figure 40), the eubacterial community profile of the influent was dominated by *Gammaproteobacteria* (34 % Relative Abundance - RA) and *Betaproteobacteria* (28 % RA), whereas *Actinobacteria* (20 % RA) and *Alfaproteobacteria* (20 % RA) were selectively enriched on the bed biofilm at all depths of the UVF wetland.

To gain a deeper insight into the active nitrifying population (AO and NOB), different taxon levels were studied. At order level, in the biofilm of the bed media *Alphaproteobacteria* was mostly represented by *Rhizobiales* (10 % RA in both layers) where several OTUs belonging to the genus *Nitrobacter* were found. In relation to previous studies conducted in the same UVF wetland with higher OLR (80 g COD m⁻² d⁻¹) and HLR (375 mm d⁻¹) (PELISSARI et al., 2017b), this NOB presented a prominent decrease from 3 % and 4 % to 1 % RA for both layers. On the other hand, other well-known NOB, represented by *Nitrospira* genus, showed an increased from 0.1 % and 0.5 % to 2 % and 2.5 % RA in top and bottom layers, respectively. This NOB population shift could be explained by less nitrite availability favoring *Nitrospira* population, due to lower activity of AO populations (10⁵ to 10⁶ and 10² to 10³ *amoA* transcripts g⁻¹ for AOA and AOB, respectively), compared to previous studies of Pelissari et al., 2017 b (10⁵ to 10⁶ *amoA* transcripts g⁻¹ of AOA and AOB). Since *Nitrospira*-like bacteria are classified as *K*-strategist with a higher affinity to nitrite and oxygen than *Nitrobacter*, they can reach high densities under substrate-limited conditions (SCHRAMM et al., 1999).

It is noteworthy to mention that AOB families were found with a relative abundance below 1 % (Table 11). These results agree with the *amoA*_AOB qPCR approach (Figure 37) and with a recent study that states that in microaerophilic conditions AOA have greater advantage over AOB in anthropogenic wetland paddy fields (WANG et al., 2015) due to physical-chemical properties such as pH and redox.

Based on the quantification of *amoA* transcripts of AOB (qPCR results) and the relative abundance of *Nitrospira* (NGS results), a population shift with respect to the previous evaluation at higher HLR and OLR (PELISSARI et al., 2017b) was identified in both layers. AOB decreased and *Nitrospira* clearly increased. Meanwhile, AOA remained metabolically active, exhibiting great stability to varying physico-chemical conditions.

Figure 39 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active bacterial and archaeal communities (16S rRNA based cDNA) of the influent, and bed media from top and bottom layers of the unsaturated and the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands. A) Bacterial community at order level; B) Archaeal community at family level.



Relative abundance was defined by the number of reads (sequences) affiliated with any given taxon, divided by the total number of reads per sample. Phylogenetic groups with a relative abundance lower than 0.5 % were categorised as others. Taxonomic assignment of individual datasets using the RDP Bayesian Classifier with a bootstrap cut-off of 80 %.

Stempfhuber et al. (2015) found the same tendency in an unfertilized grassland soil where oxygen played an important role in substrate limited conditions (nitrite and oxygen concentrations). The authors identified that nitrification was predominantly accomplished by AOA and *Nitrospira*. In this way, based on the current observations it could be possible that a mixotrophic metabolism of AOA and *Nitrospira*, which could increment the competitiveness over their counterparts by providing a growth advantage in condition of substrate limitation.

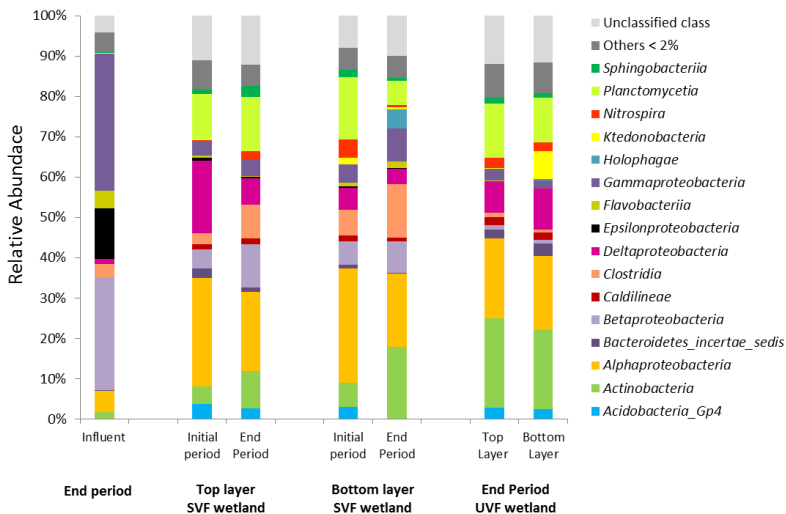
Although a great active abundance of denitrifying bacteria was observed in the influent, represented by the *Pseudomonadales* (27 % RA), in the bed media of UVF wetland only 1 % RA was identified in top and bottom layers (Figure 39), showing the low potential of the UVF wetland for denitrification. Other denitrifying bacteria were found with relative abundance below 1 %.

Regarding the metabolically active archaeal community (Figure 39b), the influent wastewater was highly enriched with seven methanogenic archaea families (99.7 % RA). Meanwhile, the bed media from both layers of UVF wetland were greatly enriched only by AOA community (98 % RA). Two AOA lineages were represented by OTUs belonging to *Nitrososphaeraceae* family (90 and 77 % RA in the top and bottom layer, respectively) and *Nitrosopumilaceae* family (8 and 21 % RA in the top and bottom layers, respectively).

Table 11 – AOB abundance identified in the influent sample and in both layers of the unsaturated and the partially saturated vertical flow constructed wetlands.

AOB families	OTUS	Bootstrap >80% RDP	Influent End period	SVF wetland				UVF wetland	
				Top layer	Bottom layer	Top layer	Bottom layer	Top layer	Bottom layer
				Initial Period		End Period		End Period	
<i>Nitrosomonadaceae</i>	OTU_65	100%	0.003%	0.477%	0.325%	0.126%	0.181%	0.024%	0.017%
	OTU_1404	97%	0.000%	0.002%	0.007%	0.044%	0.003%	0.000%	0.000%
	OTU_1695	85%	0.000%	0.002%	0.015%	0.023%	0.000%	0.000%	0.000%
	OTU_2512	98%	0.000%	0.000%	0.030%	0.007%	0.000%	0.000%	0.000%
	OTU_4243	98%	0.000%	0.013%	0.010%	0.003%	0.000%	0.000%	0.000%
	OTU_5433	98%	0.000%	0.008%	0.002%	0.002%	0.000%	0.000%	0.000%
	OTU_5531	91%	0.000%	0.003%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.008%
	OTU_6002	96%	0.000%	0.000%	0.000%	0.003%	0.002%	0.000%	0.000%
	OTU_6518	89%	0.000%	0.003%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.003%
Total Relative abundance (%)			0.003	0.508	0.389	0.208	0.186	0.024	0.028

Figure 40 – Taxonomic assignment of sequencing reads from the active bacterial communities (16S rRNA based cDNA) at class level of influent, and bed media from top and bottom layers of the unsaturated and the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands.

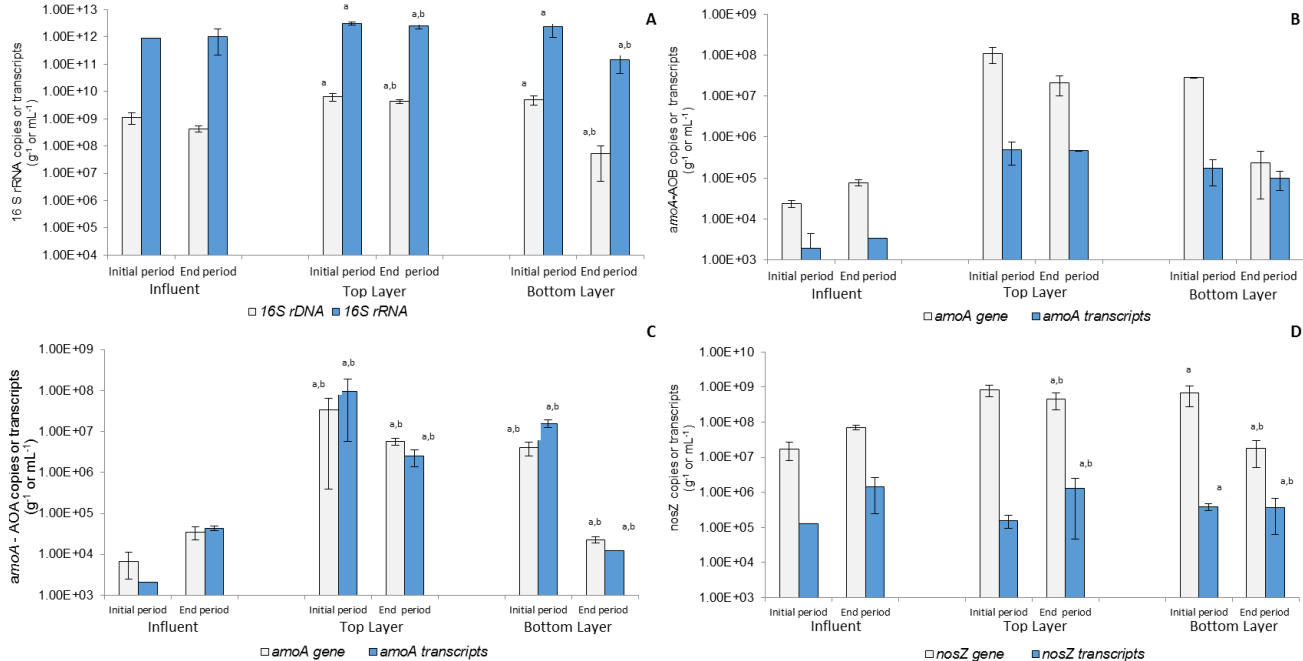


Relative abundance was defined by the number of reads (sequences) affiliated with any given taxon, divided by the total number of reads per sample. Phylogenetic groups with a relative abundance lower than 0.5 % were categorised as others. Taxonomic assignment of individual datasets using the RDP Bayesian Classifier with a bootstrap cut-off of 80 %.

(ii) Partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland

After 6 months of operation of the SVF wetland, eubacteria population was more active in the top than in the bottom layer (10^{12} and 10^{11} 16S rRNA transcripts g^{-1} , respectively). This could be explained by the greater availability of carbon and nutrients in the surface layer, which stimulate microbial growth (TIETZ et al., 2008). The saturated condition of the bottom layer provides less oxygen availability ($0.7 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ in the SVF wetland effluent vs. $2.2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ in the UVF wetland effluent), which resulted in a biomass decrease in respect to the initial period (Figure 41).

Figure 41 – Average of nitrogen functional genes identified in influent (at the initial and end periods), and in the top (0-15 cm) and bottom (70-80 cm) layers of the bed media of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland (at the initial and end periods). a) Abundance of 16S rDNA and 16S rRNA; b) Abundance of bacterial *amoA* genes and transcripts; c) Abundance of archaeal *amoA* genes and transcripts; d) Abundance of *nosZ* genes and transcripts.



a: Statistical significance observed in the same layer between the two sampling periods (initial and end periods) ($p < 0.05$).

b: Statistical significance observed between top and bottom layers within the same sampling period ($p < 0.05$).

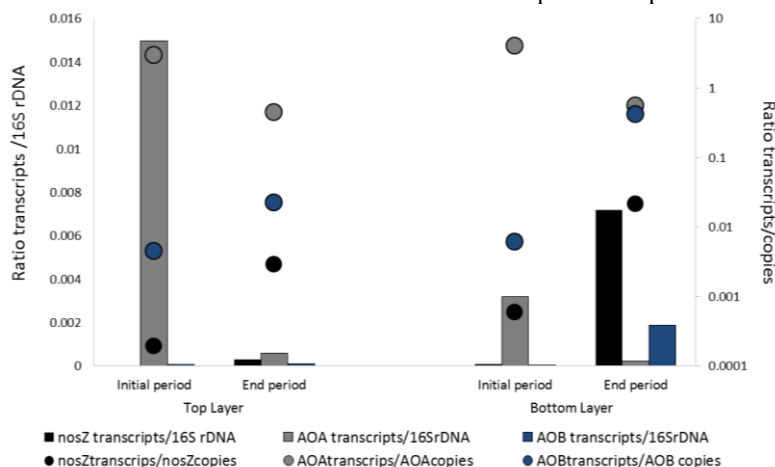
The existence of a partial saturation of the bed of the SVF clearly affected the AO community. The main affected group was the AOA, majorly in the bottom layer (Figure 41). In the initial period, AOA presented more activity than AOB, being two orders of magnitude superior in both layers (10^7 *amoA*_AOA and 10^5 *amoA*_AOB transcripts g^{-1}). However, after 6 months of operation SVF wetland with the saturation of the bottom layer (end period), AOA decreased one and three orders of magnitude in top and bottom layers, respectively (10^6 and 10^4 *amoA* transcripts g^{-1}). At the same time, AOB maintained a similar activity in the top layer (10^5 *amoA* transcripts g^{-1}) and decreased one order of magnitude in the bottom layer (10^4 *amoA* transcripts g^{-1}). Moreover, specific activity ratio of AOA (transcript/genes) declined in both layers, (from 2.9 to 0.44 in top and from 4 to 0.55, in bottom layers). This behavior can be associated with the enrichment of methanogenic archaea (Figure 39b). In contrast, metabolically active AOB showed a clear population enrichment, getting closer to AOA population ratios, mainly in the bottom layer (from 0.0044 to 0.022 and from 0.006 to 0.41, in top and bottom layers, respectively). Despite this fact, AOA continued to be the most active AO community in both layers (Figure 42).

In regards to the denitrification (*nosZ*), oppositely to the UVF wetland, the SVF wetland was able to promote a complete microbial denitrification process. Thus, it prevented a transient accumulation of NO_x -N and achieved an average load removal rate of $5 \text{ g TN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. *nosZ* gene abundance was always greater than *nosZ* transcripts (Figure 41). Moreover, *nosZ* gene expression in the biofilms was higher in the top layer (10^6 transcripts g^{-1}) than in the bottom layer (10^5 transcripts g^{-1}). However, the specific activity ratio (*nosZ* transcripts/*nosZ* copies), as well as the *nosZ* expression in respect to the total eubacterial population were clearly higher in the bottom layer, when compared to top and bottom layers from initial period (Figure 42). This indicates optimized condition one for an active denitrification.

Regarding the diversity of the active microbial community (Figure 39 a, b), the biofilms of the SVF wetland harbored completely different active microbial communities than those observed in the influent, as well as in the bed media of the UVF wetland. In addition, different metabolically active diversity profiles were observed in biofilms through depth and periods of operation of the SVF wetland. In the initial period (startup), *Alfaproteobacteria* (27 % and 28 % RA),

Deltaproteobacteria (18 % and 5 % RA) and *Planctomycetia* (11 % and 16 % RA) were the predominant active populations in top and bottom layers of the SVF wetland, respectively. After 6 months of operation (end period), *Alfaproteobacteria* (20 % and 18 % RA) and *Deltaproteobacteria* (7 % and 4 % RA) had decreased.

Figure 42 – Ratio between transcripts/16S rDNA and transcripts /genes copies identified in top and bottom layers of the partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands in the initial and end period of operation.



AOB represented by the *Nitrosomonadaceae* family, decreased in the top layer from 0.5 % in the initial period to 0.2 % RA in the end period (Table 11). Regarding the NOB population depicted by *Nitrospira* and *Nitrobacter*, OTUs were present at around 0.5 % and 2.5 %, respectively in the top layer.

In relation to denitrifying bacteria, NGS data revealed that active families of potential denitrifiers could belong to *nosZ* clade I and clade II (SANDFORD et al., 2012; JONES et al., 2013; DOMEIGNOZ-HORTA 2016; YOON et al., 2016; SAMAD et al., 2016).

Active archaeal populations (Figure 39 b) in the initial period were dominated by AOA population led by the *Nitrososphaeraceae* family (97 % and 80 % RA, in top and bottom layers, respectively). Saturated conditions in the bottom layer (end period) showed prominent changes of the archaeal community. The AOA population experienced a steep decline, greater than 60 % of RA at both layers. Methanogenic populations, mainly from influent, were also actively established

becoming the largest archaeal population in biofilms (64 % and 87 % RA, in top and bottom layers), confirming the establishment of reductive redox conditions in the SVF wetland biofilms without hampering ammonium oxidizing process, occurring mainly in the non-saturated top region of the bed media.

4.4.3.3 *Potential interactions among active nitrifying populations in the unsaturated and partially saturated vertical subsurface flow constructed wetlands*

Unravelling the interactions taking place between different species in biofilms is a challenge, which gets harder when biofilms are attached in a surface of a biotechnological process. As a result, microbe interactions among nitrifiers in CW have not been completely deciphered yet. A recent study has changed the perspective on NOB and provides a new basis on these enigmatic organisms, which have been called “nitrification aggregate” (DAIMS et al., 2016). The aggregate is postulated as a complex network composed by AO and NOB populations that have a tight interaction owing to the close spatial congregation (DAIMS et al., 2016), where metabolites are exchanged using short diffusion pathways, minimizing the loss and maximizing the effectiveness of substrate use (FLEMMING et al., 2016).

Pearson’s correlation conducted considering *amoA* transcripts from AOA and AOB (qPCR results), and the RA of *Nitrospira* and *Nitrobacter* (NGS results), in the top and bottom layers of the UVF wetland, and just in the top layer of the SVF wetland, showed that interesting nitrifier dynamics happened when aerobic and/or microaerophilic conditions prevailed in the CW biofilms.

Regarding NOB population, a negative correlation between *Nitrospira* and *Nitrobacter* (-0.98556) was observed. As mentioned above, *K/r* strategy linked with oxygen and nitrite concentrations could affect directly the NOB dynamics.

Looking at *amoA* transcripts of the AO population, a positive correlation (0.98556) between AOA and the RA of *Nitrobacter* was observed. This possible symbiosis could be explained by the fact that NOB can produce nitric oxide (NO), a key intermediate in the AOA ammonia-oxidizing pathway (KOZLOWSKI et al., 2016 b). Furthermore, they can act as an electron flux regulator in *Nitrobacter* (STARKENBURG et al., 2008).

On the other hand, a negative correlation between AOB activity and *Nitrospira* (-0.69772) was identified inside the biofilm aggregates of oxygenic/microaerophilic layers. This behavior elucidates a potential comammox activity by some *Nitrospira* members, due to the discovery of their capacity to catalyze the complete nitrification (Daims et al., 2015). However, physical-chemical and microbial data is not enough to confirm this hypothesis. Nevertheless, NGS and qPCR data revealed a clear competition between *Nitrospira* and AOB in a microaerophilic ambient. Contrarily, *Nitrospira* could not compete with the AOA population (0.74962) probably due to the preference of smaller ammonia concentrations by the AOA. Daims et al. (2016) stated that situations when *Nitrospira* population is greater than AO communities could be an indicator of comammox process. However, in this study, *Nitrospira* was detected by NGS, but not assessed by qPCR. Therefore, exact amounts of *Nitrospira* are not revealed. It is important to mention that AOB population by NGS data was always lower than of *Nitrospira*. Nevertheless, it was not possible to conclude that comammox process prevails in aerobic bed media because *amoA*_AOA transcripts were always one or two orders of magnitude greater than AOB.

4.4.4 Conclusions

This study showed the microbial population dynamics involved in nitrogen transformation along the vertical profile of the filter media of an unsaturated (UVF) and a partially saturated vertical (SVF) subsurface flow constructed wetland, both operating in parallel under the same operational conditions (OLR of 40 g COD m⁻² d⁻¹ and HLR of 133 mm d⁻¹). The occurrence of a partial saturation (0.35 m) of the bottom of the wetland bed in the SVF provided a much greater removal of total nitrogen (5 g TN m⁻² d⁻¹) than the UVF wetland (2.5 g TN m⁻² d⁻¹).

The combination of qPCR and NGS at RNA level revealed that nitrification was the main process taking place in the filter media of the UVF wetland. Meanwhile, in the SVF wetland simultaneous nitrification and denitrification processes occurred. In the UVF wetland AOB activity (*Nitrosomonadaceae*) was low (10² and 10³ *amoA* transcripts g⁻¹ in top and bottom layers), whereas AOA (*Nitrososphaera* and *Nitrosopumilus*) was more active (10⁶ and 10⁵ *amoA* transcripts g⁻¹ in top and bottom layers). Oppositely, in the SVF wetland methanogenic archaea were dominant, mainly in bottom layer, resulting in a decrease of AOA activity (*Nitrososphaera*) in this layer (from 10⁷ to 10⁴ *amoA*

transcripts g^{-1}). Even so, AOA showed to be more active than AOB in both wetlands. AOA showed an important role in the ammonia oxidizing process in both wetlands. Activity of denitrifying bacteria (10^5 *nosZ* transcripts g^{-1}) was clearly benefited in the saturated layer of the SVF wetland.

Based on the metabolic active microbial community involved in nitrogen transformation, it has been shown that the partial saturation of the filter bed of vertical subsurface flow constructed wetlands can significantly enhance the total elimination of nitrogen by enabling simultaneous nitrification and denitrification processes in a single treatment unit.

4.5 SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS

(i) *Em relação aos períodos de alimentação e repouso*

Bactérias nitrificantes e desnitrificantes foram identificadas nos períodos de 30 dias de operação e nos 30 dias de repouso, ao longo de todo o estudo realizado nos sistemas I e II do procedimento experimental I. Entretanto, como demonstrado nos Artigos 1 e 2, a abundância bacteriana nitrificante identificada foi menor nos períodos de repouso quando comparado aos períodos de operação, tanto nos microcosmos, simulando o perfil vertical de WCVD, operados com maior carga orgânica (de 41 a 104 g DQO m⁻² d⁻¹), quanto no WCVD-FS, em escala real, operado sob baixa carga orgânica (4 g DQO m⁻² d⁻¹)

Apesar disso, essas bactérias mostraram estratégias de sobrevivência com baixa concentração de substrato (devido à ausência de alimentação), e permaneceram ativas nos períodos de repouso, restabelecendo-se novamente no meio com a retomada da alimentação, com abundância similar em todos os períodos de alimentação. Dessa forma, destaca-se que em ambas as unidades de tratamento, os períodos de repouso de 30 dias não afetaram a nitrificação.

Em relação às bactérias desnitrificantes, nos microcosmos simulando WCVD (Artigo 1) a abundância dessa comunidade foi maior nos períodos de repouso do que nos períodos de operação, enquanto que o WCVD-FS em escala real, (Artigo 2) propiciou condições para manter estabilidade bacteriana desnitrificante nos dois períodos, sendo identificadas abundâncias similares tanto nos períodos de alimentação quanto de repouso.

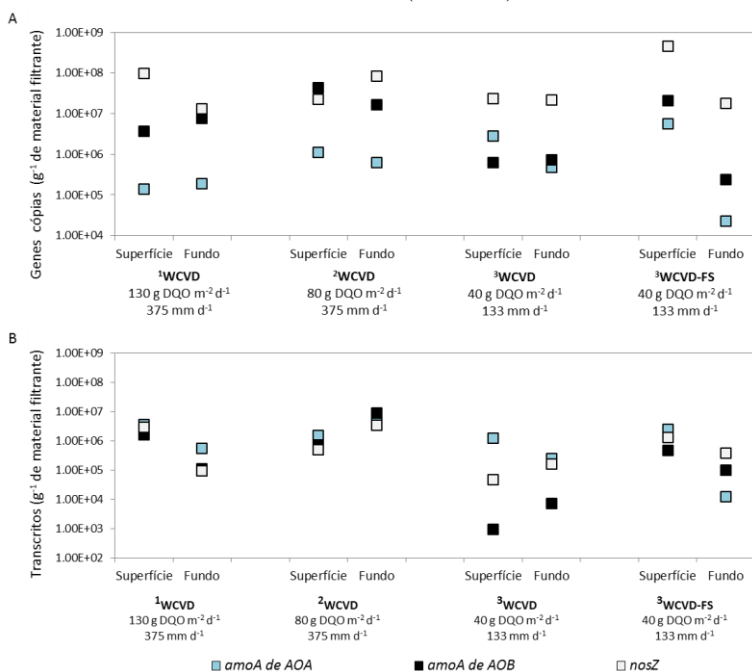
Portanto, períodos de repouso seguidos de períodos de alimentação de até 30 dias não afetaram a atividade bacteriana nitrificante e desnitrificante, podendo-se, assim, indicar essa estratégia operacional como uma possibilidade para maximizar a vida útil dos *wetlands* construídos verticais empregados no tratamento de esgoto sanitário.

(ii) *Em relação à carga orgânica e taxa hidráulica aplicadas*

Apesar do desafio de entender as inter-relações de AOA, AOB, NOB e bactérias desnitrificantes, em um complexo biofilme presente no material filtrante de WCVD e WCVD-FS, por meio de técnicas de biologia molecular em nível de RNA empregadas nesse trabalho, foi

possível identificar comportamentos microbianos envolvidos nas transformações do nitrogênio (Figura 43).

Figura 43 – Abundância de genes funcionais envolvidos nas transformações do nitrogênio identificados na camada da superfície e do fundo do WCVD e WCVD-FS. A) número de cópias de genes (abundância total). B) número de transcritos (atividade).



*Resultados referente ao término de um período operacional de: ¹5 meses; ²3 meses; ³6 meses.

Parâmetros operacionais podem promover mudanças populacionais no interior de um biofilme. Populações oxidantes de amônia (do inglês *ammonia oxidizers* – AO), principalmente as populações de AOB, mostraram ser altamente sensíveis às alterações promovidas no meio. Contudo, uma vez tendo o biofilme estabelecido, as mesmas apresentaram estratégias de adaptação às variações operacionais.

Quando o WCVD operou sob a maior carga orgânica do estudo (130 g DQO m⁻² d⁻¹), alta atividade de AOA e AOB (10⁶ transcritos

amoA g⁻¹⁵) foram identificadas na camada da superfície (mesmo com alta disponibilidade de carbono). Ao passo que na camada do fundo, a atividade de AOB e AOA diminuiu uma ordem de grandeza (10⁵ transcritos *amoA* g⁻¹), reflexo de um ambiente com menor disponibilidade de oxigênio. Portanto, alta carga orgânica (até 130 g DQO m⁻² d⁻¹) associado de uma alta TH (375 mm d⁻¹) não limitou a atividade de populações AO.

À medida que a carga orgânica diminuiu para 80 g DQO m⁻² d⁻¹ e a TH foi mantida constante em 375 mm d⁻¹, pôde-se observar uma interessante dinâmica da comunidade AO (Figura 43). A abundância de AOB e AOA aumentou uma ordem de magnitude na camada da superfície (de 10⁶ para 10⁷ cópias *amoA* de AOB g⁻¹ e de 10⁵ para 10⁶ cópias *amoA* de AOA g⁻¹). Por outro lado, a atividade de AOB diminuiu na camada superior (de 10⁶ para 10⁵ transcritos *amoA* g⁻¹) e aumentou na camada do fundo (de 10⁵ para 10⁶ transcritos *amoA* g⁻¹). Enquanto isso, a atividade de AOA permaneceu estável (10⁶ transcritos *amoA* g⁻¹ em ambas as camadas). Esses resultados mostraram que, com maior disponibilidade de oxigênio (menor carga orgânica aplicada) e maior disponibilidade de carbono na camada da superfície, em relação à camada do fundo do WCVD, AOB exibiram sua maior atividade na camada inferior. Diferentemente, AOA metabolicamente mais ativas permaneceram mais estáveis ao longo de todo o perfil vertical do maciço filtrante. Portanto, sob uma carga orgânica de 80 g DQO m⁻² d⁻¹ e TH de 375 mm d⁻¹, AOB estavam mais ativas na camada do fundo do que na camada da superfície, enquanto que AOA mostraram maior estabilidade em relação à mudança de carga orgânica.

Quando o WCVD operou com a menor carga orgânica de 40 g DQO m⁻² d⁻¹ e TH de 133 mm d⁻¹, a abundância de AOB foi efetivamente afetada, diminuindo duas ordens de magnitude em ambas as camadas (de 10⁷ para 10⁵ cópias *amoA* g⁻¹). Enquanto que, AOA mostraram maior estabilidade (10⁶ e 10⁵ cópias *amoA* g⁻¹ na camada da superfície e do fundo, respectivamente). Dessa forma, AOB nesse momento, exibiram um menor papel no processo de oxidação da amônia, apresentando menor atividade (10² e 10³ transcritos *amoA* g⁻¹ na camada da superfície e do fundo, respectivamente). O decaimento de AOB sob essas condições operacionais pode estar associado primeiramente, com a redução da TH, que resulta em menor

disponibilidade de oxigênio, e como mostrado anteriormente AOB é mais sensível à variação de oxigênio que AOA. Em segundo lugar, o decaimento de AOB, pode estar associado com a dinâmica simbiótica que ocorreu entre AOA e NOB (Artigo 4). Portanto, sob 40 g DQO m⁻² d⁻¹ e TH de 133 mm d⁻¹, AOA (10⁶ e 10⁵ transcritos *amoA* g⁻¹ na camada da superfície e do fundo, respectivamente) foi a principal comunidade associada com processo de oxidação da amônia.

A saturação de fundo proporcionada no WCVD-FS mudou a dinâmica das populações OA. Maior abundância de AOA e AOB foi identificada na camada da superfície (10⁶ cópias *amoA* de AOA e 10⁷ cópias *amoA* de AOB g⁻¹). Enquanto que na camada do fundo, a abundância de AOA e AOB diminuíram duas ordens de magnitude (10⁴ e 10⁵ cópias *amoA* de AOA e de AOB g⁻¹, respectivamente). O mesmo comportamento foi observado para a abundância ativa. AOA apresentaram uma diminuição de duas ordens de grandeza na camada do fundo (de 10⁶ para 10⁴ transcritos *amoA* g⁻¹), enquanto que AOB diminuíram uma ordem de magnitude nessa camada (de 10⁵ para 10⁴ transcritos *amoA* g⁻¹). A atividade de AOA reduziu em ambas as camadas, provavelmente devido ao aumento de arqueas metanogênicas (Artigo 4). Em contraste, AOB mantiveram-se mais estáveis, indicando um ambiente competitivo entre AOA e AOB. Apesar disso, AOA estavam mais ativas que AOB em ambas as camadas.

Em relação às bactérias desnitrificantes (*nosZ* *clade I*), quando o WCVD operou com alta carga orgânica (130 g DQO m⁻² d⁻¹), maior abundância (10⁷ cópias *nosZ* g⁻¹) e atividade (10⁶ transcritos *nosZ* g⁻¹) de bactérias desnitrificantes foram identificadas na camada da superfície. Ao passo que com a diminuição da carga orgânica para 80 g DQO m⁻² d⁻¹, a atividade de bactérias desnitrificantes mostrou um comportamento similar a AOB, aumentando a abundância e atividade no fundo (10⁷ e 10⁶ cópias e transcritos *nosZ* g⁻¹, respectivamente). Posteriormente, quando a carga orgânica e TH foram ainda menores (40 g DQO m⁻² d⁻¹ e 133 mm d⁻¹), a abundância de bactérias desnitrificantes manteve-se na mesma magnitude em ambas as camadas (10⁷ cópias *nosZ* g⁻¹). Contudo, a atividade desnitrificante reduziu uma ordem de magnitude em ambas as camadas (de 10⁵ e 10⁶ para 10⁴ e 10⁵ transcritos *nosZ* g⁻¹ na camada da superfície e do fundo, respectivamente). Dessa forma, a atividade desnitrificante apresentou um decaimento tanto na superfície quanto no fundo, mostrando estarem mais ativas na camada do fundo que na camada da superfície.

No WCVD-FS, foi identificado um comportamento claro de aumento da expressão do gene *nosZ* em relação ao total de eubactéria. Dessa forma, a camada de saturação de fundo mostrou claramente beneficiar a atividade bacteriana desnitrificante (Figura 44).

Esses resultados mostraram que, sob altas concentrações de carbono, a desnitrificação pode ocorrer, principalmente, a partir da camada superficial do WCVD, como observado com cargas orgânicas de 130 g DQO m⁻² d⁻¹. À medida que a carga orgânica diminuiu para 80 g DQO m⁻² d⁻¹ e 40 g DQO m⁻² d⁻¹, a disponibilidade de oxigênio provavelmente aumentou na superfície, fazendo com que ocorresse um deslocamento dessa comunidade desnitrificante para a camada do fundo da unidade de tratamento, onde condições anóxicas/anaeróbias são mais suscetíveis de ocorrerem. Enquanto que, no WCVD-FS as bactérias desnitrificantes foram visivelmente beneficiadas.

Apesar da quantificação de N-NO_x no efluente final de todas as condições operacionais aplicadas no WCVD, bactérias desnitrificantes pareceram ser favorecidas por ambientes com altas concentrações de carbono, enquanto que a diminuição da TH não favoreceu a atividade das mesmas. Por outro lado, promover uma saturação de fundo em WCVD, mostrou-se favorável à atividade bacteriana desnitrificante, sendo uma potencial estratégia para maximizar a remoção do nitrogênio.

Considerando a relação entre transcritos e número de cópias de genes (Figura 44), AOA sempre foi mais ativa que AOB, independente das condições operacionais, e bactérias desnitrificantes mostraram maior atividade sob alta carga orgânica, bem como, no WCVD-FS.

Deste modo, maior atividade de AOB, AOA e bactérias desnitrificantes foi identificada na superfície do WCVD com maior carga orgânica (130 g DQO m⁻² d⁻¹). Ao passo que a carga orgânica diminuiu para 80 g DQO m⁻² d⁻¹, maior atividade dessas populações, passou a ser encontrada no fundo da unidade de tratamento. E por fim, com a menor carga orgânica e TH do estudo (40 g DQO m⁻² d⁻¹ e 133 mm d⁻¹) a atividade de AOB e bactérias desnitrificantes diminuíram significativamente, à medida que AOA mostraram maior estabilidade.

Já no WCVD-FS, bactérias desnitrificantes e AOB foram favorecidas pelas condições operacionais, por outro lado, AOA mostraram uma menor atividade nesta unidade comparativamente ao WCVD, devido à predominância de arqueas metanogênicas metabolicamente ativas, conforme identificado pelo sequenciamento do 16S rRNA de arqueas (baseado no cDNA).

Baseado na dinâmica metabólica ativa das populações nitrificantes e desnitrificantes, relações simbióticas entre AOA e NOB, competição entre populações de NOB e processos como Commamox podem ter ocorridos no interior do biofilme de WCVD e WCVD-FS, dependente do modo operacional.

Globalmente, AOA foi uma comunidade chave no processo de oxidação da amônia em WCVD e WCVD-FS, apresentando maior atividade e estabilidade que a comunidade de AOB. Enquanto que, AOB mostraram ser sensíveis às mudanças operacionais das unidades de tratamento. Bactérias desnitrificantes mostraram um comportamento associado com a disponibilidade de carbono e, também, com a variação espacial das populações AO, sendo evidentemente beneficiadas na camada saturada do WCVD-FS.

(iii) Em relação à indicação de parâmetros de projeto

Levando em consideração a dinâmica microbiana metabolicamente ativa identificada em diferentes condições operacionais de WCVD e WCVD-FS, bem como a qualidade do efluente tratado relacionados com as cargas orgânicas e hidráulicas aplicadas (Figura 45), apresentam-se as seguintes sugestões de parâmetros de projeto:

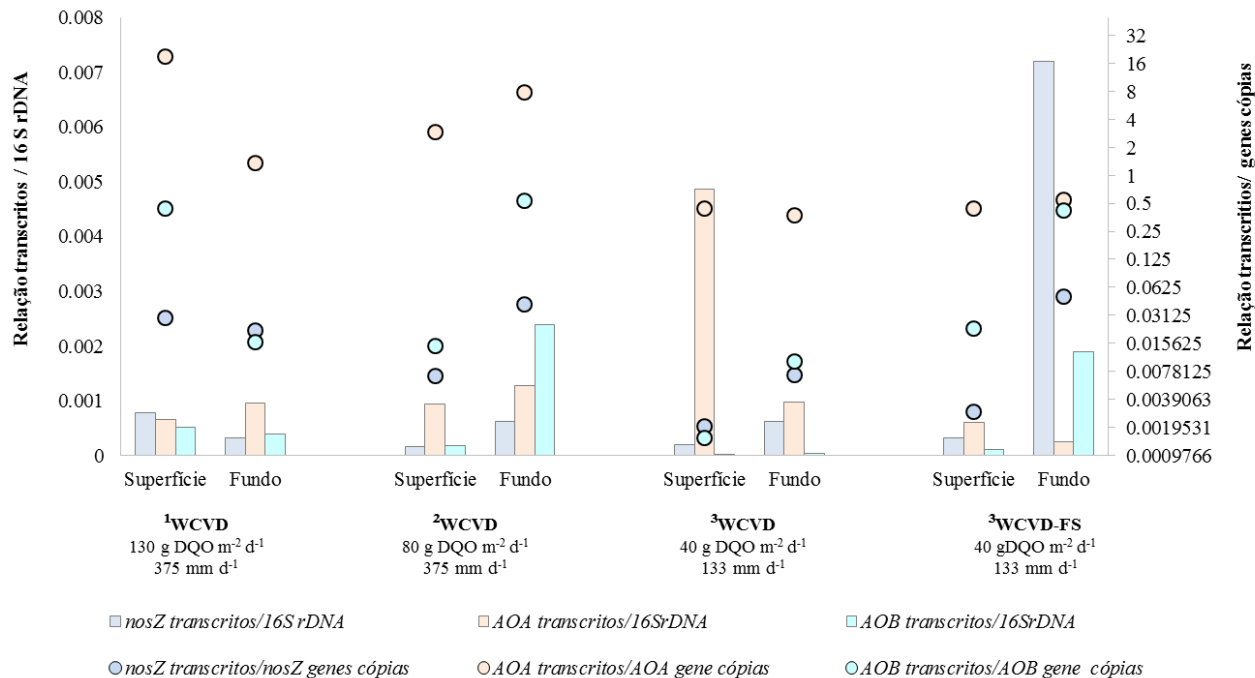
- períodos de repouso de até 30 dias podem ser empregados em WCVD e WCVD-FS, a fim de maximizar a vida útil da unidade de tratamento, ou para flexibilizar alternativas de arranjos tecnológicos, aplicáveis, por exemplo, para edificações com população flutuante;

- para WCVD com brita e areia como material filtrante recomenda-se uma carga orgânica de 80 g DQO m⁻² d⁻¹ e TH de 375 mm d⁻¹, as quais mostraram promover alta atividade de AOA, AOB e bactérias desnitrificantes ao longo do perfil vertical do maciço filtrante;

- a taxa hidráulica aplicada em WCVD mostrou estar vinculada com a atividade de populações oxidantes de amônia. Portanto, no caso do emprego da brita e areia como material filtrante, taxa hidráulica de 375 mm d⁻¹ favoreceu a atividade nitrificante nesses sistemas;

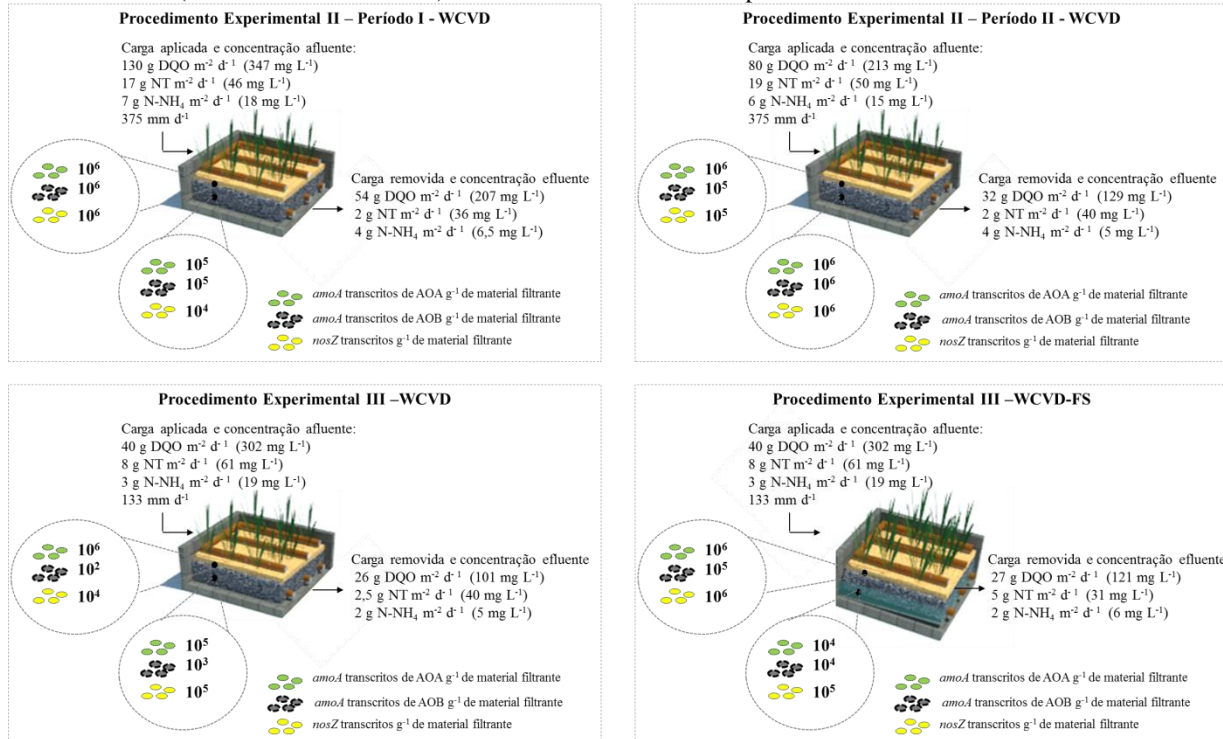
- independente dos carregamentos orgânicos e hidráulicos, a remoção de nitrogênio, bem como, a atividade de bactérias desnitrificantes, foi maximizada em unidades de tratamento com uma saturação de fundo. Portanto, quando o critério de projeto for remoção de nitrogênio, indica-se a utilização de um WCVD-FS.

Figura 44 – Relação entre transcritos/16S rDNA e relação entre transcritos/cópias de genes identificados na camada da superfície e na camada do fundo do WCVD e WCVD-FS em diferentes condições operacionais.



*Resultados referente ao término de um período operacional de: ¹15 meses; ²23 meses; ³36 meses

Figura 45 – Desempenho de tratamento dos WCVD e WCVD-FS operados sob as condições operacionais avaliadas no procedimento experimental II e III, associado com a abundância de transcritos (abundância ativa) de *amoA* de AOB e AOA e *nosZ* (bactérias densitrificantes) identificado na camada da superfície e do fundo de cada *wetlands*.



5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram, para as condições operacionais testadas na pesquisa, que a hipótese formulada para este estudo foi confirmada. Com base nessa hipótese e nas questões norteadoras, têm-se as seguintes conclusões:

- obteve-se nitrificação e desnitrificação simultâneas em *wetland* construído vertical descendente submetidos a distintas condições operacionais (com remoções de carga de NT variando entre 10 % a 31 %). Contudo, a desnitrificação não foi completa, sendo liberado nitrogênio na forma oxidada no efluente final. Para maximizar o processo de desnitrificação, destaca-se que a utilização de um *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado favoreceu a atividade de bactérias desnitrificantes (10^5 transcritos *nosZ* g^{-1} de material filtrante), promovendo um desempenho de remoção de carga de NT (na ordem de 62 %) em proporções similares às obtidas em módulos intensificados de *wetlands*, porém, sem a necessidade de indução de energia.
- a aplicação de alta carga orgânica até o valor de $130 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, associada com alta taxa hidráulica de 375 mm d^{-1} , não limitou a atividade de populações oxidantes de amônia. Ainda sob estas condições operacionais, foram identificadas alta atividade de bactérias e arqueas oxidantes de amônia, tanto na camada da superfície, quanto na camada do fundo do *wetland* construído vertical descendente;
- cargas orgânicas superiores a $40 \text{ g DQO m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ favoreceram a atividade de bactérias desnitrificantes. Entretanto, a aplicação de uma taxa hidráulica de 133 mm d^{-1} não propiciou um aumento na abundância e atividade desta comunidade bacteriana;
- períodos de operação e repouso de 30 dias não comprometeram a dinâmica bacteriana nitrificante e desnitrificante, tampouco, o desempenho do *wetland* construído vertical descendente e

vertical descendente de fundo saturado, podendo ser uma estratégia aplicável para maximizar a vida útil desses sistemas;

- bactérias oxidantes de amônia mostraram ser mais sensíveis às condições operacionais que as arqueas oxidantes de amônia. Além disso, em todos os sistemas avaliados essas arqueas mostraram maior abundância ativa que as bactérias, indicando serem populações chave no processo de oxidação da amônia em *wetland* construído vertical descendente;
- bactérias desnitrificantes foram identificadas ativas ao longo de todo o perfil do maciço filtrante dos *wetlands* construídos verticais descendentes avaliados. Inclusive, sobre alta carga orgânica aplicada, a desnitrificação ocorreu a partir da camada superficial do *wetland*. Destaca-se ainda, que a atividade de bactérias desnitrificantes foi claramente beneficiada na camada saturada do *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado.
- no *wetland* construído vertical descendente submetido a 80 g DQO m⁻² d⁻¹, 375 mm d⁻¹, operado com ciclos de alimentação e repouso intercalados em 3,5 dias, foi identificada alta atividade de AOA, AOB e bactérias desnitrificantes (10⁵ e 10⁶ transcritos *amoA* de AOB, AOA e *nosZ* g⁻¹ de material filtrante) ao longo do perfil vertical do maciço filtrante. Adicionalmente, para maximizar a remoção do NT, recomenda-se utilizar uma saturação de fundo na ordem de 44 % da profundidade total do maciço filtrante.

6 RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista os resultados obtidos com a presente pesquisa, sugerem-se as seguintes recomendações para futuros trabalhos:

- aplicar o carregamento orgânico e hidráulico sugerido com essa pesquisa em um *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado somente com areia como material filtrante, e elucidar o comportamento microbiológico, bem como o desempenho de tratamento;
- elucidar a inter-relação entre arqueas e bactérias oxidantes de amônia e bactérias oxidantes de nitrito, buscando alternativas operacionais para maximizar as transformações do nitrogênio em *wetlands* construídos;
- Avaliar a potencialidade do processo COMAMOX em *wetland* construído vertical, bem como, seu desempenho na oxidação da amônia nesses sistemas;
- descrever por meio de um modelo matemático a inter-relação entre bactérias e arqueas nitrificantes e desnitrificantes vinculados às condições operacionais de unidades de tratamento.

REFERÊNCIAS

ADRADOS, B.; SÁNCHEZ, O.; ARIAS, A.C.; BECARES, E.; GARRIDO, L.; MAS, J.; BRIX, H.; MORATÓ, J. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v.55, p.304-312, 2014.

AHN, C.; GILLEVET, P.M.; SIKAROODI, M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. **Ecological Indicators**, v.7, p.852-863, 2007.

AHN, Y.H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. **Process Biochemistry**, v.41, p.1709-1721, 2006.

ALLEN, W.C.; HOOK, P.B.; BIEDERMAN, J.A.; STEIN, O.R. Temperature and wetland plant species effects on wastewater treatment and root zone oxidation. **Journal Environmental Quality**, v.31, p.1010-1016, 2002.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHULZE, R.; SPRING, S.; MOORE, E.; SCHLEIFER, K.-H. rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the Identification of Genuine and Former Pseudomonads. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.501-509, 1996.

AMANN R. In situ identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: A.D.L. Akkerman, J.D.van Elsas, F.J. de Bruijn (eds). **Molecular microbial Ecology Manual**. Kluwer academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, v.3.3, p.61-15, 1995.

AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1919-1925, 1990.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R. r- and k-selection and microbial ecology. **Advances Microbiology Ecology**, v.9, p.99-147, 1986.

ANGELONI, N.L.; JANKOWSKI, K.J.; TUCHMAN, N.C.; KELLY, J.J. Effects of an invasive cattail species (*Typha x glauca*) on sediment nitrogen and microbial community composition in a freshwater wetland. **FEMS Microbiology Letters**, v.263, p.86-92, 2006.

ANGNES, G.; NICOLOSO, R.S.; SILVA, M.L.B.; OLIVEIRA, P.A.V. DE; HIGARASHI, M.M.; MEZZARI, M.P.; MILLER, P.R.M. Correlating denitrifying catabolic genes with N₂O and N₂ emissions from swine slurry composting. **Bioresource Technology**, v.140, p.368-375, 2013.

ANSOLA, G.; ARROYO, P.; SÁENZ DE MIERA, L.E. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v.473-474, p.63-71, 2014.

ANTILEO, C.; ROECKEL, M.; LINDEMANN, J.; WIESMANN, U. Operating parameters for high nitrite accumulation during nitrification in a rotating biological nitrifying contactor. **Water Environment Research**, v.79, n.9, p.1006-1014, 2007.

APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. 2012.

APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. 2005.

APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20st ed. American Public Health Association Washington, DC, USA. 1998.

ARIAS, C. A.; DEL BUBBA, M.; BRIX, H. Phosphorus removal by sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds. **Water Research**, v.35, n.5, p.1159-1168, 2001.

ATLAS, R.M., BARTHA, R. **Microbial Ecology Fundamentals and Applications**, 4th ed. Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park, CA. 1998.

AUSTIN, D.; WOLF, L.; STROUS, M. Mass transport and microbiological mechanisms of nitrification and denitrification in tidal flow constructed wetland systems. In: **10th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control**, Lisbon, Portugal, p.209-216, 2006a.

AUSTIN, D. Influence of cation exchange capacity (CEC) in a tidal flow, flood and drain wastewater treatment wetland. **Ecological engineering**, v. 28, p.35-43, 2006b.

AUSTIN, D.; LOHAN, E.; VERNON, E.; MACHINES, L. Nitrification and denitrification in a tidal vertical flow wetland pilot. **Water Environment Federation Technical Conference**. Los Angeles, California, p.1-25, 2003.

ÁVILA, C.; GARCÍA, J.; GARFÍ, M. Influence of hydraulic loading rate, simulated storm events and seasonality on the treatment performance of an experimental three-stage hybrid constructed wetland system. **Ecological Engineering**, v.87, p.324-332, 2016.

ÁVILA, C.; MATAMOROS, V.; REYES-CONTRERAS, C.; PIÑA, B.; CASADO, M.; MITA, L.; RIVETTI, C.; BARATA, C.; GARCÍA, J.; BAYONA, J.M. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. **Science of the Total Environment**, v.470, p.1272-1280, 2014.

ÁVILA, C.; GARFI, M.; GARCÍA, J. Three-stage hybrid constructed wetland system for wastewater treatment and reuse in warm climate regions. **Ecological engineering**, v. 61, p.43-49, 2013.

AYAZ, S.Ç.; AKTAŞ, Ö.; FINDIK, N.; AKÇA, L.; KINACI, C. Effect of recirculation on nitrogen removal in a hybrid constructed wetland system. **Ecological Engineering**, v. 40, p.1-5, 2012.

BAUMANN, B.; SNOZZI, M.; ZEHNDER, A.J.B.; VAN DER MEER, J.R. Dynamics of Denitrification Activity of *Paracoccus denitrificans* in Continuous Culture during Aerobic-Anaerobic Changes. **Journal of bacteriology**, v. 178, n.15, p.4367-4374, 1996.

BIALOWIEC, A.; JANCZUKOWICZ, W.; RANDERSON, P.F. Nitrogen removal from wastewater in vertical flow constructed wetlands containing LWA/gravel layers and reed vegetation. **Ecological Engineering**, v.37, n.6, p.897-902, 2011.

BOLLMANN, A.; SCHMIDT, I.; SAUNDERS, A.M.; NICOLAISEN, M.H. Influence of starvation on potential ammonia-oxidizing activity and amoA mRNA levels in *Nitrospira briensis*. **Applied Environmental Microbiology**, v.7, p.1276-1282, 2005.

BOTHE, H.; JOST, G.; SCHLOTTER, M.; WARD, B.B.; WITZEL K. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.5, p.673-690, 2000.

BOTTACINI, F.; MILANI, C.; TURRONI, F.; SANCHEZ, B.; FORONI, E.; DURANTI, S.; SERAFINI, F.; VIAPPANI, A.; STRATI, F.; FERRARINI, A.; DELLEDONNE, M.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.; FITZGERALD, G.F.; MARGOLLES, A.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Bifidobacterium asteroides PRL 2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut. **PLoS ONE**, v.7, p.1-14, 2012.

BOUALI, M.; ZRAFI, I.; BAKHROUF, A.; CHAUSSONNERIE, S.; SGHIR, A. Bacterial structure and spatiotemporal distribution in a horizontal subsurface flow constructed wetland. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.3191-3203, 2014.

BRIX, H.; ARIAS, C. A. The use of vertical flow constructed wetlands for on-site treatment of domestic wastewater: New Danish guidelines. **Ecological Engineering**, v.25, p.491-500, 2005.

BRIX, H. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? **Water Science and Technology**, v. 35, n. 5, p.11-17, 1997.

BRODRICK, S.J.; CULLEN, P.; MAHER, W. Denitrification in a natural wetland receiving secondary treated effluent. *Water Research*, v.22, p.431-439, 1988.

BUTTON, M.; NIVALA, J.; WEBER, K.P.; AUBRON, T.; MÜLLER, R.A. Microbial community metabolic function in subsurface flow constructed wetlands of different designs. **Ecological Engineering**, v.80, p.162-171, 2015.

CALDERER, M.; MARTÍ, V.; DE PABLO, J.; GUIVERNAU, G.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VIÑAS, M. Effects of enhanced denitrification on hydrodynamics and microbial community structure in a soil column system. **Chemosphere**, v.111, p.112-119, 2014.

CALHEIROS, C.S.C.; TEIXEIRA, A.; PIRES, C.; FRANCO, A.R.; DUQUE, A.F.; CRISPIM, L.F.C.; MOURA, S.C.; CASTRO, P.M.L. Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. **Water Research**, v.44, p.5032–5038, 2010.

CALHEIROS, C.S.C.; DUQUE, A.F.; MOURA, A.; HENRIQUES, I.S.; CORREIA, A.; RANGEL, A.O.S.S.; CASTRO, P.M.L. Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. **Ecological Engineering**, v.35, p.744-753, 2009.

CALHEIROS, C.S.C.; RANGEL, A.O.S.S.; CASTRO, P.M.L. Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. **Water Research**, v.41, p.1790-1798, 2007.

CANNON, A.D.; GRAY, K.R.; BIDDLESTONE, A.J.; THAYANITHY, K. Pilot-scale development of a bioreactor for the treatment of dairy dirty water. **Journal Agriculture Engineering Research**, v.77, p.327-334, 2000.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERGLYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; FIERER, N., KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of

millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.08, p.4516-22, 2011.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v.7, p.335-336, 2010a.

CAPORASO, J.G.; K. BITTINGER; F.D. BUSHMAN; T.Z. DESANTIS; G.L. ANDERSEN; R. KNIGHT. PyNASt: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v.26, p.266-267, 2010b.

CHEN, Y.; WEN, Y.; ZHOU, Q.; HUANG, J.; VYMAZAL, J.; KUSCHK, P. Sulfate removal and sulfur transformation in constructed wetlands: The roles of filling material and plant biomass. **Water Research**, v.102, p.572–581, 2016

CHEN, Y.; WEN, Y.; TANG, Z.; HUANG, J.; ZHOU, Q.; VYMAZAL, J. Effects of plant biomass on bacterial community structure in constructed wetlands used for tertiary wastewater treatment. **Ecological Engineering**, v.84, p.38-45, 2015.

CHIU, Y.C.; LEE, L.L.; CHANG, C.N.; CHAO, A.C. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n.1, p.1-7, 2007.

COBAN, O.; KUSCHK, P.; KAPPELMEYER, U.; SPOTT, O.; MARTIENSSSEN, M.; JETTEN, M. S.; KNOELLER, K. Nitrogen transforming community in a horizontal subsurface-flow constructed wetland. **Water Research**, v.74, p.203-212, 2015.

COOKSON, W.R.; CORNFORTH, I.S.; ROWARTH, J.S. Winter soil temperature (2-15 C°) effects on nitrogen transformations in clover green manure amended or unamended soils; a laboratory and field study. **Soil Biology Biochemistry**, v.34, p.1401-1415, 2002.

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.

CORREA-GALEOTE, D.; MARCO, D.E.; TORTOSA, G.; BRU, D.; PHILIPPOT, L.; BEDMAR, E.J. Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v.83, p.340-351, 2013.

CUI, L.; OUYANG, Y.; LOU, Q.; YANG, F.; CHEN, Y.; ZHU, W.; LUO, S. Removal of nutrients from wastewater with *Canna indica* L. under different vertical-flow constructed wetland conditions. **Ecological Engineering**, v.36, p.1083-1088, 2010.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; MAGDALENA Z. Bacterial Communities in Full-Scale Wastewater Treatment Systems. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p.66-72, 2016.

DAIMS, H.; LUCKER, S.; WAGNER, M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. **Trends in Microbiology**, v.24, n.9, p.699-712, 2016.

DAIMS, H.; ELENA, V.; PALATINSZKY, M.; VIERHEILIG, J.; BULAEV, A.; KIRKEGAARD, R.H.; BERGEN, M. VON; RATTEI, T. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.528, p.504-509, 2015.

DAIMS, H.; LÜCKER, S.; WAGNER, M. daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. **Environmental Microbiology**, v.8, p.200-213, 2006.

DAIMS, H.; PURKHOLD, U.; BJERRUM, L.; ARNOLD, E.; WILDERER, P.A.; WAGNER, M. Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. **Water Science Technology**, v.41, p.85-90, 2001.

DAIMS, H.; BRÜHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more

comprehensive probe set. **Systematic and applied microbiology**, v.22, p.434-444, 1999.

DAN, T.H.; QUANG, L.N.; CHIEM, N.H.; BRIX, H. Treatment of high-strength wastewater in tropical constructed wetlands planted with *Sesbania sesban*: horizontal subsurface flow versus vertical down flow. **Ecological Engineering**, v. 37, n.5, p.711-720, 2011.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D., HU, P.; ANDERSEN, L.G. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5069-5072, 2006.

DOMEIGNOZ-HORTA, L.A.; PUTZ, M.; SPOR, A.; BRU, D.; BREUIL, M.C.; HALLIN, S. Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria - An effective N₂O sink in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.103, p.376-379, 2016.

DONG, X.; REDDY, G.B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. **Bioresource Technology**, v.101, p.1175–1182, 2010.

DONG, Z.; SUN, T. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands-Promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX. **Ecological Engineering**, v. 31, p.69-78, 2007.

DUAN, J.; FANG, H.; SU, B.; CHEN, J.; LIN, J. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. **Bioresource Technology**, v.179, p.421–428, 2015.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, p.2460-2461, 2010.

ERGUDER, T.H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, n.5, p.855-869, 2009.

FAN, J.; WANG, W.; ZHANG, B.; GUO, Y.; NGO, H.H.; GUO, W.; ZHANG, J.; WU, H. Nitrogen removal in intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: Impact of influent COD/N ratios. **Bioresource Technology**, v. 143, p.461-466, 2013.

FAULWETTER, J.L.; GAGNON, V.; SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M.D.; BRISSON, J.; CAMPER, A.K.; STEIN, O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. **Ecological Engineering**, v. 35, p.987-1004, 2009.

FERNANDEZ, N.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J.A.; AMILS, R.; SANZ, J.L.; Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. **Chemosphere**, v.70, p.462-474, 2008.

FIA, F.R.L.; MATOS, A.T.; FIA, R.; LAMBERT, T.F.; MATOS, M.P. Remoção de nutrientes por *Typha latifolia* e *Cynodon* spp. cultivadas em sistemas alagados construídos. **Ambi-água**, v.6, n.1, p.77-89, 2011.

FIGUEROLA, E.L.; ERIJMAN, L. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. **Environmental Microbiology**, v. 9, n.7, p.1780-789, 2007.

FISCHER, M.; ALDERSON, J.; VAN KEULEN, G.; WHITE, J.; SAWERS, R.G. The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. **Microbiology**, v.156, p.3166-3179, 2010.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, A.S.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14 p.563-575, 2016.

FOLADORI, P.; BRUNI, L.; TAMBURINI, S. Bacteria viability and decay in water and soil of vertical subsurface flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v.82, p.49-56, 2015.

FOLADORI, P.; RUABEN, J.; ORTIGARA, A.R.C. Recirculation or artificial aeration in vertical flow constructed wetlands: A comparative

study for treating high load wastewater. **Bioresource Technology**, v.149, p.398-405, 2013.

FONDER, N.; HEADLEY, T. The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. **Ecological Engineering**, v.51, p. 203-211, 2013.

FU, G.; YU, T.; NING, K.; GUO, Z.; WONG, M. Effects of nitrogen removal microbes and partial nitrification-denitrification in the integrated vertical-flow constructed wetland. **Ecological Engineering**, v.95, p.83-89, 2016.

GARCÍA, J., ROUSSEAU, D.P.L., MORATÓ, J., LESAGE, E., MATAMOROS, V., BAYONA, J.M. Contaminant removal processes in subsurface-flow constructed wetlands: a review. **Environmental Science Technology**, v.40, p.561-661, 2010.

GEETS, J.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.58, p.1-13, 2006.

GERAATS, S.G.M.; HOOIJMANS, C.M.; VAN NIEL, E.W.J.; ROBERTSON, L.A.; HEIJNEN, J.J.; LUYBEN, K.C.A.M.; KUENEN J.G. The use of a metabolically structured model in the study of growth, nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha*. **Biotechnology Bioengineering**, v.36, p.921-930, 1990.

GONZALEZ-MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, A.; LOOSDRECHT, M.C.M. VAN; GONZALEZ-LOPEZ, J.; VAHALA, R. Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using tag 454-pyrosequencing. **Environmental Science Pollution Research**, v.23, p.25501–25511, 2016.

GORRA, R.; COCI, M.; AMBROSOLI, R.; LAANBROEK, H.J. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p.1442-1452, 2007.

GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M.;

KUENEN, J.G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. **Microbiology**, v.143, p.2415-2421, 1997.

GRAF, D.R.H.; JONES, C.M.; HALLIN, S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. **PLoS One**, v.9, p.114-118, 2014.

GRUBER-DORNINGER, C.; PESTER, M.; KITZINGER, K.; SAVIO, D.F.; LOY1, A.; RATTEI, T.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. **ISME - International Society for Microbial Ecology**, v.9, p.643-655, 2015.

GUAN, W.; YIN, M.; HE, T.; XIE, S. Influence of substrate type on microbial community structure in vertical-flow constructed wetland treating polluted river water. **Environmental Science Pollution Research**, v.22, p.16202-16209, 2015.

GUNES, K. Restaurant wastewater treatment by constructed wetlands. **Clean**, v.35, n.6, p.571-575, 2007.

HAAS, B.J.; GEVERS, D.; EARL, A.M.; FELDGARDEN, M.; WARD, D. V; GIANNOUKOS, G.; CIULLA, D.; TABBAA, D.; HIGHLANDER, S.K.; DESANTIS, T.Z.; SODERGREN, E.; METHE, B.; HUMAN, T.; CONSORTIUM, M.; PETROSINO, J.F.; KNIGHT, R.; BIRREN, B.W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Gen Research**, v.21, p.494-504, 2011.

HAGOPIAN, D.S.; RILEY, J.G. A closer look at the bacteriology of nitrification. **Aquacultural Engineering**, v.18, n.4, p.223-244, 1998.

HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. **Water Research**, v.24, p.289-296, 1990.

HANSEL, C.M.; FENDORF, S.; JARDINE, P.M.; FRANCIS, C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, p.1620-1633, 2008.

HEADLEY, T.R.; HERITY, E.; DAVISON, L. Treatment at different depths and vertical mixing within a 1-m deep horizontal subsurface flow wetland. **Ecological Engineering**, v.25, p.567-582, 2005.

HOFFMANN, H.; PLATZER, C.; WINKER, M.; VON MUENCH, E. **Technology Review of Constructed Wetlands: Subsurface Flow Constructed Flow Constructed Wetlands for Greywater and Domestic Wastewater Treatment**. Deutsch Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH, Eschborn, 2011, 35p.

HU, Y.; HE, F.; MA, L.; ZHANG, Y.; WU, Z. Microbial nitrogen removal pathways in integrated vertical-flow constructed wetland systems. **Bioresource Technology**, v.207, p.339-345, 2016.

HU, Y.; ZHAO, Y.; RYMSZEWICZ, A. Robust biological nitrogen removal by creating multiple tides in a single bed tidal flow constructed wetland. **Science of the Total Environment**, v.470-471, p.1197-1204, 2014a.

HU, Y.; ZHAO, X.; ZHAO, Y. Achieving high-rate autotrophic nitrogen removal via Canon process in a modified single bed tidal flow constructed wetland. **Chemical Engineering Journal**, v.237, p.329-335, 2014b.

INTERNATIONAL WATER ASSOCIATION – IWA. **Constructed Wetlands for Pollution Control: Processes, Performance, Design and Operation**. Scientific and Technical. Report N°. 8. London, England: IWA Publishing, 156 p. 2000.

JIA, L.W.; ZHANG, J.; WANG, Q. Impacts of feeding strategy on microbial community structure diversity in vertical flow constructed wetlands. **Earth and Environmental Science**, v.39, p.1-8, 2016.

JIANLONG, W.; NING, Y. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. **Process Biochemistry**, v.39, p.1223-1229, 2004.

JIN, T.; ZHANG, T.; YAN, Q. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.1167-1176, 2010.

JOHNSON, D.R.; LEE, T.K.; PARK, J.; FENNER, K.; HELBLING, D.E. The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability. **Environmental Microbiology**, v.17, p.4851-4860, 2014.

JONES, C.M.; GRAF, R.H.D.; BRU, D.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.7, p.417-426, 2013.

JOO, H.S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification - aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* N. 4. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.2, p.184-191, 2005.

JURETSCHKO S. Mikrobielle Populationsstruktur und dynamik in einer nitrifizierenden/denitrifizierenden Belebtschlammanlage. Tese de doutorado Technische Universität München, 2000.

JURETSCHKO, S.; TIMMERMANN, G.; SCHMID, M.; SCHLEIFER, K.; POMMERENING-RO, A. Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* -Like Bacteria as Dominant Populations, **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3042-3051, 1998.

KADLEC, R.H.; WALLACE, S.D. **Treatment Wetlands**, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2009. 1016p.

KANTAWANICHKUL, S.; KLADPRASERT, S.; BRIX, H. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucreatus*. **Ecological Engineering**, v.35, p.238-247, 2009.

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHMID, M. C.; WEBB, R. I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J. A.; DAMSTÉ, J. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p.39-49, 2007.

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.

KHIN, T.; ANNACHHATRE, A. P. Novel microbial nitrogen removal processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.519–532, 2004.

KIM, B.; GAUTIER, M.; PROST-BOUCLE, S.; MOLLE, P.; MICHEL, P.; GOURDON, R. Performance evaluation of partially saturated vertical flow constructed wetland with trickling filter and chemical precipitation for domestic and winery wastewaters treatment. **Ecological Engineering**, v. 71, p. 41-47, 2014.

KIM, D.J.; KIM, S.H. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. **Water Research**, v.40, p.887-894, 2006.

KOCH, H.; LÜCKER, S.; ALBERTSEN, M.; KITZINGER, K.; HERBOLD, C.; SPIECK, E. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, p.11371-11376, 2015.

KONNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; DE LA TORRE, J.R.; WALKER, C.B.; WATERBURY, J.B.; STAHL, D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p437:543, 2005.

KOZLOWSKI, J.A.; KITS, K.D.; STEIN, L.Y. Comparison of Nitrogen Oxide Metabolism among Diverse Ammonia-Oxidizing Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1-9, 2016a.

KOZLOWSKI, J.A.; STIEGLMEIER, M.;SCHLEPER, C.; KLOTZ, M.G.; STEIN, L.Y. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and thaumarchaeota. **The Multiplicinary Journal of Microbial Ecology**, v.10, p.1836-1845, 2016b.

KRASNITS, E.; FRIEDLER, E.; SABBAH, I.; BELIAVSKI, M.; TARRE, S.; GREEN, M. Spatial distribution of major microbial groups in a well-established constructed wetland treating municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v.35, p.1085-1089, 2009.

KUENEN, J.G; ROBERTSON, L.A. Combined nitrification denitrification processes. **FEMS Microbiology Review**, v.15, p.109-117,1994.

LAANBROEK, H.J.; BÄR-GILISSEN, M.J. Weakened activity of starved ammonia-oxidizing bacteria by the presence of pre-activated *Nitrobacter winogradskyi*. **Microbiology Environmental**, v.17, p.122-127, 2002.

LAANBROEK, H.J.; S, GERARDS.; BODELIER, P.L.E. Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. **Archives of Microbiology**, v.161, p.156-162, 1994.

LANA, O. C. L.; MORAES, C. D.; VON SPERLING, M.; MORATO, M. L. N.; VASCONCELLOS, G. R.; PARAENSE, O. M.; MOREIRA, T.P.A. Performance of a single stage vertical flow constructed wetland system treating raw domestic sewage in Brazil. **Water Science and Technology**, v.68, n.7, p.1599-1606, 2013.

LANGERGRABER, G.; PRESSL, A.; LEROCH, K.; ROHRHOFER, R.; HABERL, R. Long-term behaviour of a two-stage CW system regarding nitrogen removal. **Water Science Technology**, v.64, n.5, p.1137-1141, 2011.

LANGERGRABER, G.; LEROCH, K.; PRESSL, A.; ROHRHOFER, R.; HABER. R. A two-stage subsurface vertical flow constructed

wetland for high-rate nitrogen removal. **Water Science and Technology**, v.57, n.12, p.1881-1887, 2008.

LANSING, S.L.; MARTIN, J.F. Use of an ecological treatment system (ETS) for removal of nutrients from dairy wastewater. **Ecological Engineering**, v.28, p.235-245, 2006.

LAVROVA, S.; KOUMANOVA, B. Influence of recirculation in a lab-scale vertical flow constructed wetland on the treatment efficiency of landfill leachate. **Bioresource Technology**, v.101, p.1756-61, 2010.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L.E.; GE, C.; ROSS, J.; YAO, H.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds. **FEMS Microbiology Ecology**, v.89, p.542-552, 2014.

LIANG, W.; WU, Z.B.; CHENG, S.B.; ZHOU, Q.B.; HU, H.B. Roles of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system. **Ecological Engineering**, v.21, p.191-195, 2003.

LIMPIYAKORN, T.; SONTIPHAND, P.; RONGSAYAMANONT, C.; POLPRASERT, C. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v.102, p.3694-3701, 2012.

LU, L.; XING, D.; REN, Z.J. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v.195, p.115-121, 2015.

LUEDERS, T.; KINDLER, R.; MILTNER, A.; FRIEDRICH, M.W.; KAESTNER, M. Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p.5342-5348, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12a edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2010. 1160p.

MATOS,A.T; ABRÃO, S.S; MONACO, P.L.V.A; SARMENTO, A.P; MATOS, M. P. Capacidade extratora de plantas em sistemas alagados utilizadas no tratamento de águas residuárias de laticínios. **Engenharia Agrícola Ambiental**, v.14, n.12, p.1311-1317, 2010.

MAIXNER, F.; NOGUERA, D.R.; ANESSER, B.; STOECKER, K.; WEGL, G.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria. **Environmental Microbiology**, v.8, p.1487-1495, 2006.

MARTENS-HABBENA,W.; BERUBE, P. M.; URAKAWA, H.; DE LA TORRE, J.R.; STAHL, D.A. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. **Nature**, v.461, p. 976-979, 2009.

MARTÍNEZ-LAVANCHY, P.M.; CHEN, Z.; LÜNSMANN, V.; MARIN-CEVADA , V.; VILCHEZ VARGAS, R.; PIEPER , D. H.; REICHE, N.; KAPPELMEYER, U.; IMPARATO, V.; JUNCA H.; NIJENHUIS , I.; MÜLLER , J. A.; KUSCHK, P.; HEIPIEPER, H. J. Microbial toluene removal in hypoxic model constructed wetlands occurs predominantly via the ring monooxygenation pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p.6241-6252, 2015.

MATOS, A. T; ABRÃO, S. S; MONACO, P. L. V. A; SARMENTO, A. P; MATOS, M. P. Capacidade extratora de plantas em sistemas alagados utilizadas no tratamento de águas residuárias de laticínios. **Engenharia Agrícola Ambiental**, v.14, n.12, p.1311-1317, 2010.

MATOS, A.T.; FREITAS, W.S.; FIA, R.; MATOS, M.P. Qualidade do efluente de sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de águas residuárias da suinocultura visando seu reuso. **Engenharia na Agricultura**, v.17, p.383-391, 2009.

MATOS, A.T.; ABRAHÃO, S.S.; PEREIRA, O.G. Desempenho agrônomo de capim tifton 85 (*Cynodon* spp.) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. **Revista Ambiente e Água**, v.3, n.1, p.43-53, 2008.

MAYO, A.W.; BIGAMBO, T. Nitrogen transformation in horizontal subsurface flow constructed wetlands I: Model development. **Physics and Chemistry of the Earth**, v.30, p.658–667, 2005.

MENG, P.; PEI, H.; HU, W.; SHAO, Y.; LI, Z. How to increase microbial degradation in constructed wetlands: Influencing factors and improvement measures. *Bioresource Technology*, v.157, p.316–326, 2014.

METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse**. 4.ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

MOBARRY, B.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMANN, B.; STAHL, D. Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.2156-2162, 1996.

MOIR, J.W.B.; CROSSMAN, L.C.; SPIRO, S.; RICHARDSON, D.J. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. **FEBS Letters**, v.387, p.71-74, 1996.

MOLLE, P.; PROST-BOUCLE, S.; LIENARD, A. 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.

MOLLE, P.; LIÉNARD, A.; BOUTIN, C.; MERLIN, G.; IWEMA, A. How to treat raw sewage with constructed wetlands: an overview of the French systems. **Water Science Technology**, v.51, n.9, p.11-21, 2005.

MUNZ, G.; SZOKE, N.; OLESZKIEWIC, J. Effect of ammonia oxidizing bacteria (AOB) kinetics on bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.125, p.88-96, 2012.

MURPHY, C.; RAJABZADEH, R.A.; WEBER, P.K.; NIVALA, J.; WALLACE D.S.; COOPER J.D. Nitrification cessation and recovery in an aerated saturated vertical subsurface flow treatment wetland: Field studies and microscale biofilm modeling. **Bioresource Technology**, v.209, p.125-132, 2016.

NEEF, A.; ZAGLAUER, A.; MEIER, H.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K.H. Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4329-4339, 1996.

NGUYEN, L.M. Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. **Ecological Engineering**, v.16, p.199-221, 2000.

NIVALA, J.; WALLACE, S.; HEADLEY, T.; KASSA, K.; BRIX, H.; VAN AFFERDEN, M.; MÜLLER, R. Oxygen transfer and consumption in subsurface flow treatment wetlands. **Ecological Engineering**, v.61, p.544-554, 2013.

NOGUEIRA, R., MELO, F. L. Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.95, n.1, p.169-175, 2006.

NOKHAL, T.H.; SCHLEGEL, H. G. Taxonomic study of *Paracoccus denitrificans*. **International journal of systematic bacteriology**, v.33, p.26-37, 1983.

NURK, K., TRUU, J., TRUU, M., MANDER, U. Microbial characteristics and nitrogen transformation in planted soil filter for domestic wastewater treatment. **Journal Environmental of Science and Health**, v.40, n.6-7, p.1201-14, 2005.

PACE, N.R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v.62, p.463-470, 1996.

PARANYCHIANAKIS, N. V., TSIKNIA, M., KALOGERAKIS, N. Pathways regulating the removal of nitrogen in planted and unplanted subsurface flow constructed wetlands. **Water Research**, v.102, p.321-329, 2016.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T.S.A.; STANGE, F.; MÜLLER, R.A.; KÖSER, H. 2007a. New aspects of microbial nitrogen

transformations in the context of wastewater treatment - A review. **Engineering. Life Science**, v.7,p.13-25, 2007a.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; STANGE, F.; MÜLLER, R.A.; KÖSER, H. Model experiments on improving nitrogen removal in laboratory scale subsurface constructed wetlands by enhancing the anaerobic ammonia oxidation. **Water Science Technology**, v.56, n.3, p.138-145, 2007b.

PELISSARI, C.; ÁVILA, C.; TREIM, C.M.; GARCÍA, J.; DE ARMAS, D. R.; SEZERINO, P.H. Nitrogen transforming bacteria within a partially saturated vertical subsurface flow constructed wetland at full scale. **Science of the Total Environmental**, v.574, p.390-399, 2017a.

PELISSARI, C.; GUIVERNAU, M.; VINAS, M.; SOUZA, S.S.; GARCÍA, J.; SEZERINO, P.H.; ÁVILA, C. Untraveling the active microbial populations involved in nitrogen utilization in a vertical subsurface flow constructed wetlands treating urban wastewater. **Science of the Total Environmental**, em processo de publicação.2017b.

PELISSARI, C.; SANTOS, M.O.; ROUSSO, B.Z.; BENTO, A.P.; DE ARMAS, R.D.; SEZERINO, P.H. Organic load and hydraulic regime influence over the bacterial community responsible for the nitrogen cycling in bed media of vertical subsurface flow constructed wetland. **Ecological Engineering**, v.95, p.180-188, 2016.

PELISSARI, C.; SEZERINO, P.H.; DECEZARO, S.T.; WOLFF, D.B.; BENTO, A.P.; JUNIOR, O.C.; PHILIPPI, L.S. Nitrogen transformation in horizontal and vertical flow constructed wetlands applied for dairy cattle wastewater treatment in southern Brazil. **Ecological Engineering**, v.73, p.307-310, 2014.

PENG, L.; HUA, Y.; CAI, J.; ZHAO, J.; ZHOU, W.; ZHU, D. Effects of plants and temperature on nitrogen removal and microbiology in a pilot-scale integrated vertical-flow wetland treating primary domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v.64, p. 285-290, 2014.

PESTER, M.; RATTEL, T.; FLECHL, S.; GRÖNGRÖFT, A.; RICHTER, A.; OVERMANN, J.; REINHOLD-HUREK, B.; LOY, A.;

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

PICKUP, R.W. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. **Journal of general Microbiology**, v.137, p.1009-1019, 1991.

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.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; GUIVERNAU, M.; GALLASTEGUI, G.; VIÑAS, M.; DE HOOG, G. S.; ELÍAS, A. 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.

PRIGENT, S.; PAING, J.; ANDRES, Y.; CHAZARENCO, F. Effects of a saturated layer and recirculation on nitrogen treatment performances of a single stage Vertical Flow Constructed Wetland (VFCW). **Water Science e Technology**, v. 68, n.7, p.1461-1467, 2013.

PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidizers in soil: the quest for niche specialization and differentiation. **Trends Microbiology**, v.20, p.523-531, 2012.

PURKHOLD, U.; POMMERENING-RÖSER, A.; SCHMID, M.C.; KOOPS, H.-P.; JURETSCHKO, S.; WAGNER, M. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA. **Applied Environmental and Microbiology**, v.66, p.5368-5382, 2000.

QUAN, Z.X.; RHEE, S.H.;ZUO, J.E.;YANG, Y.;BAE, J.W.; PARK, J.R.; LEE, S.T.;PARK, Y. H Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox)

reactor. **Environmental Microbiology**, v.10, n.11, p. 3130-3139, 2008.

RAGUSA, SR.; MCNEVIN, D.; QASEM, S.; MITCHELL, C. Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. **Water Research**, v.38, p.2865-73, 2004.

RAJABZADEH, A.R.; LEGGE, R.L.; WEBER, K.P. Multiphysics modelling of flow dynamics, biofilm development and wastewater treatment in a subsurface vertical flow constructed wetland mesocosm. **Ecological Engineering**, v.74, p.107-116, 2015.

REEDER, J.; R. KNIGHT. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. **Nature Methods**, v.7, p.668-669, 2010.

RICHARDSON, D. Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. **Microbiology**, v.146, p.551-571, 2000.

ROBERTSON, L.; KEUNEN, J. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 57, p.129-152, 1990.

ROBERTSON, L.A.; VAN NIEL, E.W.J.; TORREMANS, R.A.M.; KUENEN, J.G. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2812-2818, 1988.

ROTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. 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.

SAEED, T; SUN, G. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. **Journal of Environmental Management**, v.112, p.429-448, 2012.

SAEED, T.; SUN, G. A comparative study on the removal of nutrients and organic matter in wetland reactors employing organic media. **Chemical Engineering Journal**, v.171, n.2, p.439-447, 2011a.

SAEED, T., SUN, G. Kinetic modelling of nitrogen and organics removal in vertical and horizontal flow wetlands. **Water Research**, v.45, p.3137-3152, 2011b.

SAEED, T.; SUN, G. Enhanced denitrification and organics removal in hybrid wetland columns: comparative experiments. **Bioresource Technology**, v.102, n.2, p.967 -974, 2011c.

SALOMO, S.; MÜNCH, C.; RÖSKE, I. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog analysis. **Water Research**, v.43, p.4569-4578, 2009.

SAMAD, S.; BAKKEN, L.R.; NADEEM, S.; CLOUGH, T.J.; DE, C.A.M. High-Resolution Denitrification Kinetics in Pasture Soils Link N₂O Emissions to pH, and Denitrification to C Mineralization. **PlosOne**, v.18, p.1-11, 2016.

SAMSÓ, R.; GARCÍA, J. The Cartridge theory: a description of the functioning of horizontal subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment, based on modelling results. **Science of the total environment**, v.473-474, p.651-658, 2014.

SAMSÓ, R.; GARCÍA, J. Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modelling results. **Science of the total environment**, v.461-462, p.430-40, 2013.

SANFORD, R. A.; WAGNER, D. D.; WU, Q.; CHEE-SANFORD, J. C.; THOMAS, S. H.; CRUZ-GARCÍA, C., RODRÍGUEZ, G., MASSOL-DEYÁ, A., KRISHNANI, K.K., RITALAHTI, K.M. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 48, p. 19709-19714, 2012.

SANTORO, A.E. The do-it-all nitrifier. **Science**, v.351, p.342-343, 2016.

SANTOS, M. O.; PELISSARI, C.; ROUSSO, B.Z.; SEZERINO P.H. Influência da saturação de fundo de maciços filtrantes componentes de

wetlands construídos verticais aplicados no tratamento de esgoto sanitário. **Revista AIDIS**, v.9, p.303-316, 2016.

SAUDER, A.L.; ROSS, A.A.; NEUFELD, J.D. Nitric oxide scavengers differentially inhibit ammonia oxidation in ammonia-oxidizing archaea and bacteria. **FEMS Microbiology Letter**, v.363, p.386-397, 2016.

SAWAITAYOTHIN, V.; POLPRASERT, C. Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate. **Bioresource Technology**, v.98, p.565-70, 2007.

SCHMID, M.; SCHMITZ-ESSER, S.; JETTEN, M.; WAGNER, M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Implications for phylogeny and in situ detection. **Environmental Microbiology**, v.3, p.450-459, 2001.

SCHMIDELL, W.; REGINATTO, V. Processos de eliminação de nitrogênio in tratamento biológico de águas residuárias. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J.; BERTOLA, N.C.; CONTRERAS, E.M. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Florianópolis: Gráfica PaperPrint, 2007, 449-508.

SCHMIDT, I.; STEENBAKKERS, J.M.P.; OP DEN CAMP, H. J. M.; SCHMIDT, K.; JETTEN, M.S.M. Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. **Journal Bacteriology**, v.186, p.2781-2788, 2004.

SCHRAMM, A.; DE BEER, D.; VAN DEN HEUVEL, J.C.; OTTENGRAF, S.; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.3690-3696, 1999.

SCHRAMM, A.; LARSEN, L.H.; REVSBECH, N.P.; RAMSING, N.B.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.4641-4647, 1996.

SEZERINO, P.H.; BENTO, A.P.; DECEZARO, S.T.; CARISSIMI, E.; PHILIPPI, L.S. Constructed wetlands and sand filter applied as onsite post-treatment of anaerobic effluent. **Water Practice Technology**, v. 7, p.1-9, 2012.

SEZERINO, P.H. **Potencialidade dos filtros plantados com macrófitas (constructed wetlands) no pós- tratamento de lagoas de estabilização sob condições de clima subtropical**. 2006. 171f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

SHACKLE, V.J.; FREEMAN, C.; REYNOLDS, B. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.935-1940, 2000.

SILVEIRA, D.D.; BELLI FILHO, P.; PHILIPPI, L.S.; KIM, B.; MOLLE, P. Influence of partial saturation on total nitrogen removal in a single-stage French constructed wetland treating raw domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v.77, p,257-264, 2015.

SILVEIRA D.D. **Potencial de remoção de nitrogênio em um único estágio de filtros plantados com macrófitas para o tratamento de esgoto doméstico bruto: aporte da biologia molecular para a compreensão dos processos**. 2015. 248f, Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

SILYN-ROBERTS, G.; LEWIS, G. In situ analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms. **Water Research**, v.35, p. 2731-2739, 2001.

SIMS, A.; HORTON, J.; GAJARAJ, S.; MCINTOSH, S.; MILES, R.J.; MUELLER, R.; REED, R.; HU, Z. Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. **Water Research**, v.46, p.4121-4129, 2012.

SPANG, A.; HATZENPICHLER, R.; BROCHIER-ARMANET, C.; RATTEI, T.; TISCHLER, P.; SPIECK, E.; STREIT, W.; STAHL, D.A.;

WAGNER, M.; SCHLEPER, C. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing Archaea supports the phylum Thaumarchaeota. **Trends Microbiology**, v.18, p.331-340, 2010.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. New primers for the class Actinobacteria: Application to marine and terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, v.5, p.828-841, 2003.

STARKENBURG, S. R.; LARIMER, F. W.; STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G.; CHAIN, P. S. G.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; PORET-PETERSON, A.T; GENTRY, M. E.; ARP, D. J.; WARD, B. B.; BOTTOMLEY, P. J. Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p.2852-2863, 2008.

STATSOFT INC. **STATISTICA**. Data Analysis Software System, Version 7. 2004.

STEMPFHUBER, B.; RICHTER-HEITMANN, T.; REGAN, K.M.; KOLBL, A.; WUST, P.K.; MARHAN, S.; SIKORSKI, J.; OVERMANN, J.; FRIEDRICH, M.; KANDELER, E.; SCHLOTTER, M. Spatial interaction of archaeal ammonia-Oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria in an unfertilized grassland soil. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.1567, p.1-15, 2016.

STOUTHAMER, A.H. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. **Journal Bioenergy Biomembrana**, v.23, p.163-185, 1991.

SUN, G.; ZHU, Y.; SAEED, T.; ZHANG, G.; LU, X. Nitrogen removal and microbial community profiles in six wetland columns receiving high ammonia load. **Chemical Engineering Journal**, v.203, p.326-332, 2012.

SUN, G.; AUSTIN, D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: Evidence from a mass balance study. **Chemosphere**, v. 68, p.1120-1128, 2007.

SUN, G.; ZHAO, Y.; ALLEN, S. Enhanced removal of organic matter and ammoniacal-nitrogen in a column experiment of tidal flow constructed wetland system. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p.189-197, 2005.

SUN, G.; GRAY, K.R.; BIDDLESTONE, A.J. Treatment of agricultural wastewater in downflow reed beds: experimental trials and mathematical model. **Journal Agriculture Engineering Research**, v.69, p.63-71, 1998.

TANNER, C.C.; KADLEC, R.H.; GIBBS, M.M.; SUKIAS, J.P.S.; NGUYEN, M.L. Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands - Influence of wastewater characteristics. **Ecological Engineering**, v.18, p.499-520, 2002.

TAYLOR, S.M.; HE, Y.; ZHAO, B.; HUANG, J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.1336-1341, 2009.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. CANOCO Reference manual and Cano Draw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca, **Microcomputer Power**, 2002, 500p.

TIETZ, A.; LANGERGRABER, G.; WATZINGER, A.; HABERL, R.; KIRSCHNER, A.K.T. Bacterial carbon utilization in vertical subsurface flow constructed wetlands. **Water Research**, v.42, p.1622-34, 2008.

TIETZ, A.; KIRSCHNER, A.; LANGERGRABER, G.; SLEYTR, K.; HABERL, R. Characterization of microbial biocoenosis in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science Total Environmental*, v.380, p.163-172, 2007a.

TIETZ, A.; HORNEK, R.; LANGERGRABER, G.; KREUZINGER, N.; e HABERL, R. Diversity of ammonia oxidizing bacteria in a vertical flow constructed wetland. **Water Science and Technology**, v.56, n.3, p.241-247, 2007b.

TOURNA, M.; FREITAG, T.E.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Environmental Microbiology**, v.10, p.1357-1364, 2008.

TREIN, C.M.; PELISSARI, C.; HOFFMANN, H.; PLATZER, C.J.; SEZERINO, P.H. Tratamento descentralizado de esgotos de empreendimentos comercial e residencial empregando a ecotecnologia dos wetlands construídos. **Ambiente Construído**, v. 15, p.351-367, 2015.

TRUU, M.; JUHANSON, J.; TRUU, J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v.407, n.13, p.3958-3971, 2009.

TRUU, M.; TRUU, J.; IVASK, M. Soil microbiological and biochemical properties for assessing the effect of agricultural management practices in Estonian cultivated soils. **European Journal of Soil Biology**, v.44, p.231-237, 2008.

TRUU, J.; NURK, K.; JUHANSON, J.; MANDER, U. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health**, v.40, p.1191-1200, 2005.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency. Nitrogen control manual. EPA/625/R-93/010, Office of Water, US **Environmental Protection Agency, Washington**, DC.1993, 311p.

VAN HAANDEL, A.C.; KATO, M.; VON SPERLING, M. Remoção biológica de nitrogênio: aplicações para o sistema de lodo ativado. In: MOTA, F.S.B., VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitários: utilização e remoção**. Rio de Janeiro: ABES, p.174-226, 2009.

VAN KEULEN, G.; ALDERSON, J.; WHITE, J.; SAWERS, R.G. The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. **Environmental Microbiology**, v.9, p.3143-3149, 2007.

VAN NIEL, E.; PAM, A.; WESSELINK, B.J.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. **FEMS Microbiology Ecology**, v.102, p.109–118, 1993.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K.F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.71, p.495-548, 2007.

VERHAGEN, F.J.M.; DUYTS, H.; LAANBROEK, H.J. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns. **Applied Environmental and Microbiology**, v.58, p.3303-3311, 1992.

VERHAMME, D.T.; PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **ISME Journal**, v.5, p.1067-1071, 2011.

VOGEL, A. L. **Análise Inorgânica Qualitativa**. 4ed. Editora Guanabara. Rio de Janeiro – RJ, 1981, 665p.

VYMAZAL, J. The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: a review of a recent development. **Water Research**, v.47, p.4795-811, 2013.

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

VYMAZAL J. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. **Ecological Engineering**, v.25, p. 478-90, 2005.

WAGNER, M.; RATH, G.; KOOPS, H.; FLOOD, J.; AMANN, R. analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. **Water Science and Technology**, v,34, p.237-244, 1996.

WAGNER, M.; RATH, G.; AMANN, R.; KOOPS, H.P.; SCHLEIFER,

K.H. In situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v.18, p.251-264, 1995.

WALLACE, S.; AUSTIN, D. Emerging models for nitrogen removal in treatment wetlands. **Journal Environmental Health**, v.71, p.10-17, 2008.

WANG, Q.; XIE, H.; ZHANG, J.; LIANG, S. Effect of plant harvesting on the performance of constructed wetlands during winter: radial oxygen loss and microbial characteristics. **Environmetnal Science Pollution Research**, v.23, p.7476-7484, 2015.

WANG, S., WANG, Y., FENG, X., ZHAI, L., ZHU, G. 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, 2011a.

WANG, L.; LI, T. Anaerobic ammonium oxidation in constructed wetlands with biocontact oxidation as pretreatment. **Ecological Engineering**, v.37, p.1225-1230, 2011b.

WANG, Y.; QIAN, P. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PloSOne**, v.14, n.10, p.1-9, 2009.

WEBER, K.P.; LEGGE, R.L. Dynamics in the bacterial community-level physiological profiles and hydrological characteristics of constructed wetland mesocosms during start-up. **Ecological Engineering**, v.37, p.666-677, 2011.

WEBSTER, G., EMBLEY, T.M., FREITAG, T.E., SMITH, Z., PROSSER, J.I. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. **Environmental Microbiology**, v.7, p.676-684, 2005.

WERKER, A.G.; DOUGHERTY, J.M.; MCHENRY, J.L.; VAN LOON, W.A. Treatment variability for wetland wastewater treatment design in cold climates. **Ecological Engineering**, v.19, p.1-11, 2002.

WIESMANN, U.; CHOI, I.S.; DOMBROWSKI, E.M. **Fundamentals of Biological Wastewater Treatment**. Weinheim: Wiley-VCH, 392 p., 2007.

WILHELM, R.; ABELIOVICH, A.; NEJIDAT, A. Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. **The Journal of Biochemistry**, v.124, p.811-815, 1998.

WINTER, K.J.; GOETZ, D. The impact of sewage composition on the soil clogging phenomena of vertical flow constructed wetlands. **Water Science. Technology**, v.48, p.9-14, 2013.

WPCF - Water Pollution Control Federation. **Nutrient Control Manual of Practice** FD-17. Alexandria, VA: WPCF. 1983. 205 p.

WU, H.; FAN, J.; ZHANG, J.; HAO, H.; GUO, W.; LIANG, S.; LV, J.; LU, S.; WU, W.; WU, S. Bioresource Technology Intensified organics and nitrogen removal in the intermittent-aerated constructed wetland using a novel sludge-ceramsite as substrate. **Bioresource Technology**, v.210, p.101-107, 2016.

WU, S.; KUSCHK, P.; BRIX, H.; VYMAZAL, J.; DONG, R. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. **Water Research**, v. 57, p.40-55, 2014.

WU, S.B.; CHEN, Z.B.; BRAECKEVELT, M.; SEEGER, E.M.; DONG, R.J.; KASTNER, M.; PASCHKE, H.; HAHN, A.; KAYSER, G.; KUSCHK, P. Dynamics of Fe(II), sulphur and phosphate in pilot-scale constructed wetlands treating a sulphate-rich chlorinated hydrocarbon contaminated groundwater. **Water Research**, v.46, p.1923-1932, 2012.

WUCHTER, C.; ABBAS, B.; COOLEN, M.J.L.; HERFORT, L.; VAN BLEIJSWIJK, J.; TIMMERS, P.; STROUS, M.; TEIRA, E.; HERNDL, G.J.; MIDDELBURG, J.J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTA, J.S.S. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v.103, p.12317–12322, 2006.

YOON, S.; NISSEN, S.; PARK, D.; SANFORD, R.A.; LOFFLER, F.E. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I nosZ from those harboring clade II nosZ. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, p.3793-3800, 2016.

YOU, J.; DAS, A.; DOLAN, E.M.; HU, Z. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. **Water Research**, v.43, p.1801-1809, 2009.

ZAKRZEWSKI, M.; GOESMANN, A.; JAENICKE, S.; JÜNEMANN, S.; EIKMEYER, F.; SZCZEPANOWSKI, R.; AL-SOUD, W.A.; SØRENSEN, S.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. **Journal of Biotechnology**, v.158, p.248-258, 2012.

ZHAI, X.; PIWPUAN, N.; ARIAS, A.C.; HEADLEY, T.; BRIX, H. Can root exudates from emergent wetland plants fuel denitrification in subsurface flow constructed wetland systems? **Ecological Engineering**, v.61, p.555-563, 2013.

ZHANG, Q. D.; JINADASA, K.B.S.N.; GERSBERG, R.M.; LIU, Y.; JERN, W.; KEAT, S. Application of constructed wetlands for wastewater treatment in developing countries e A review of recent developments (2000 and 2013). **Journal Environmental Management**, v.141, p.116-131, 2014.

ZHANG, J.; WU, P.; HAO, B.; YU, Z. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. **Bioresourch Technology**, v.102, p.9866-9869, 2011.

ZHANG, C.B.; WANG, J.; LIU, W.L.; ZHU, S.X.; GE, H.L.; CHANG, S.X.; CHANG, J.; GE, Y. Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland. **Ecological Engineering**, v.36, p.62-68, 2010.

ZHAO, X.; YANG, J.; BAI, S.; MA, F.; WANG, L. Microbial population dynamics in response to bioaugmentation in a constructed wetland system under 10°C. **Bioresource Technology**, v. 205, p.166-173, 2016.

ZHAO, Y. J.; HUI, Z.H., CHAO, X., NIE, E., LI, H.J., HE, J., ZHENG, Z., 2011. Efficiency of two- stage combinations of subsurface vertical down-flow and up-flow constructed wetland systems for treating variation in influent C/N ratios of domestic wastewater. **Ecological Engineering**, v.37, p.1546-1554, 2011.

ZHAO, B.; HE, Y.L.; HUGHES, J.; ZHANG, X.F. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR. **Bioresource Technology**, v.101, p.5194-5200, 2010.

ZHI, W.; JI, G. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints. **Water Research**, v.64, p.32-41, 2014.

ZHONG, F.; WU, J.; DAI, Y.; YANG, L.; ZHANG, Z.; CHENG, S.; ZHANG, Q. Bacterial community analysis by PCR-DGGE and 454-pyrosequencing of horizontal subsurface flow constructed wetlands with front aeration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.1499-1512, 2015.

ZHU, X.; BURGER, M.; DOANE, T. A.; HORWATH, W. R. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, p.6328-633, 2013.