



## Los lixiviados de las helófitas promueven la desnitrificación en ríos receptores de efluentes de plantas de tratamiento

Joaquín Cochero<sup>1</sup>, Miquel Ribot<sup>2</sup>, Timothy Vassen<sup>2</sup>, Susana Bernal<sup>2,3</sup>, Elliot Bastias<sup>2</sup>, Esperança Gacia<sup>2</sup>, Albert Sorolla<sup>4</sup>, Francesc Sabater<sup>3</sup> y Eugenia Martí<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuet" (CONICET – UNLP) – Bv 120 n° 1462, CP 1900, La Plata, Argentina

<sup>2</sup> Integrative Freshwater Ecology Group, Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB-CSIC) – Blanes, Girona, España

<sup>3</sup> Departamento de Biología Evolutiva, Ecología i Ciències Ambientals (BEECA), Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, España

<sup>4</sup> Naturalea, Castellar del Vallés, España

Email: jcochero@iipla.edu.ar

### RESUMEN

Las técnicas de bioingeniería empleando plantas acuáticas son utilizadas en la restauración de cursos fluviales, ya que reducen el exceso de nitrógeno (N) de la columna de agua y retienen metales pesados. A su vez, los lixiviados de su hojarasca pueden servir como una fuente adicional de materia orgánica disuelta lábil (DOM), que puede promover la respiración aeróbica y la eliminación de N a través de la desnitrificación. Probamos los efectos de los lixiviados de hojarasca de *Iris pseudacorus* y *Phragmites australis* en la estructura y actividad de biofilms de agua dulce cultivadas en canales alimentados por efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR). Todas las fuentes de DOM aumentaron significativamente la respiración aeróbica y la desnitrificación del biofilm en comparación con los controles. Los resultados sugieren que la limitación en la biodisponibilidad de DOM puede ser aliviada mediante la utilización de lixiviados de helófitas.

Palabras claves: TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES - REMOCIÓN DE NITRÓGENO – MACRÓFITAS.

### Introducción

Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) representan importantes fuentes puntuales de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) y carbono orgánico disuelto (DOC) para los ríos receptores, lo que puede afectar los procesos biogeoquímicos en la corriente y alterar la cantidad de nutrientes exportados (Martí et al. 2004). Los ríos que drenan cuencas con poca influencia de actividades humanas tienen una alta capacidad para retener, transformar y eliminar solutos debido a la actividad de la biota, que dependen de materia orgánica disuelta y nutrientes (Bernal et al. 2015, Ribot et al. 2017). Por lo tanto, los cuerpos de agua que reciben efluentes de la PTAR tienen comúnmente una calidad deficiente y bajos estándares ecológicos. El aumento en la eficiencia de la eliminación de contaminantes en las PTAR implica un alto costo económico y energético, y por lo tanto las acciones dirigidas a mejorar la capacidad de

autodepuración de las corrientes receptoras pueden contribuir a reducir los impactos del exceso de materia orgánica y nutrientes en los ríos.

Las técnicas de bioingeniería que implican el uso de helófitas se han aplicado con éxito para reducir la erosión del suelo y aumentar la estabilización de canales en arroyos y ríos (Norris et al. 2008, Stokes et al. 2010). Además, las helófitas pueden desempeñar un papel funcional relevante en los ecosistemas de arroyos a través de la absorción de nutrientes, y sus sistemas de raíces pueden liberar compuestos lábiles que promueven la respiración microbiana y mejoran la actividad de los biofilms de la rizósfera (Stottmeister et al. 2003). También, la presencia de helófitas aumenta el tiempo de residencia del agua en las rutas de flujo del agua subterránea, lo que podría contribuir aún más a aumentar el procesamiento

biogeoquímico de nutrientes (Nikolakopoulou et al. 2018).

Los objetivos de estos estudios fueron evaluar la influencia de la biodisponibilidad de los lixiviados de helófitas en la capacidad del biofilm para eliminar nitratos del agua. Para ello incubamos biofilms desarrollados sobre rocas en canales artificiales alimentados por un efluente de una PTAR con cuatro fuentes de materia orgánica disuelta (DOM): agua cruda del efluente de PTAR (es decir, control), lixiviados de hojarasca de *Iris pseudacorus* y *Phragmites australis*, y el mosto de la producción de cerveza rico en azúcares (es decir, una fuente lábil de DOM). Para explorar el efecto de las cuatro fuentes de DOM en los biofilms, medimos (i) la abundancia de bacterias totales y de desnitrificantes totales, (ii) la actividad de la enzima de desnitrificación (DEA) y (iii) la respiración aeróbica (RA).

## Materiales y métodos

Recolectamos grava (10-20 mm de diámetro) colonizada por biofilms de nueve canales artificiales de 12mts cada uno, ubicados en la instalación experimental Urban River Lab (<http://www.urbanriverlab.com>). Los canales se alimentan directamente con aguas residuales tratadas del efluente de una PTAR de Montornès del Vallès (Barcelona, España). Las gravas en los canales fueron colonizadas por biofilms en tres entornos experimentales diferentes: canales con sólo grava ("Canal\_Grava"; n = 3), canales con grava e *Iris pseudacorus* ("Canal\_Iris"; n = 3) y canales con grava y *Phragmites australis* ("Canal\_Phragm"; n = 3). De cada canal se recolectaron muestras compuestas por tres subréplicas, que se mantuvieron refrigeradas hasta el día siguiente cuando realizamos las incubaciones.

Para emplear como fuentes de DOM, se obtuvieron lixiviados de hojarasca de *I. pseudacorus* ("DOM\_Iris") y de *P. australis* ("DOM\_Phragm") sumergiendo 100 g de hojas secadas al aire en 1,5 L de agua destilada durante 48 h a temperatura ambiente de laboratorio (23 ° C). A su vez, se utilizó como primer control un subproducto del proceso de elaboración de la cerveza (mosto) como fuente de referencia de DOM altamente lábil porque contiene una alta proporción de azúcares ("DOM\_Cerveza", Mielcarek et al. 2013). Como segundo control, se utilizó el agua sin aditivos del efluente de la PTAR se utilizó ("DOM\_Control").

En el laboratorio, se realizaron incubaciones por 18hs de 100 g de grava colonizada en botellas de vidrio de 250 ml y con 150 ml de agua efluente.

Después de 12 h de aclimatación, se modificaron tres subconjuntos de botellas de incubación (nueve botellas cada una: grava de tres tipos de canales × tres réplicas cada una) con cada fuente de DOM (DOM\_Iris, DOM\_Phragm, DOM\_Cerveza y DOM\_Control). Los agregados tenían como objetivo producir un aumento de 4 mg L<sup>-1</sup> de DOC sobre la concentración basal del agua efluente de la PTAR.

Las variables respuesta medidas en el biofilm incluyeron (i) la abundancia de bacterias totales, cuantificando por qPCR el gen 16S (Epstein y Rossen 1995); (ii) abundancia de bacterias desnitrificantes, cuantificando por qPCR las copias de los genes nirK y nirS (Halin y Lindgren, 1999); (iii) la actividad enzimática desnitrificante, por cromatografía gaseosa empleando la técnica de bloqueo por acetileno (Holmes et al. 1996) y (iv) la respiración aeróbica total, utilizando el trazador biológico Resazurin (Haggerty et al. 2008). Las comparaciones con los controles se realizaron por ANOVA a dos vías, y el test *a posteriori* Tukey HSD fue empleado en aquellas variables adonde hubo diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

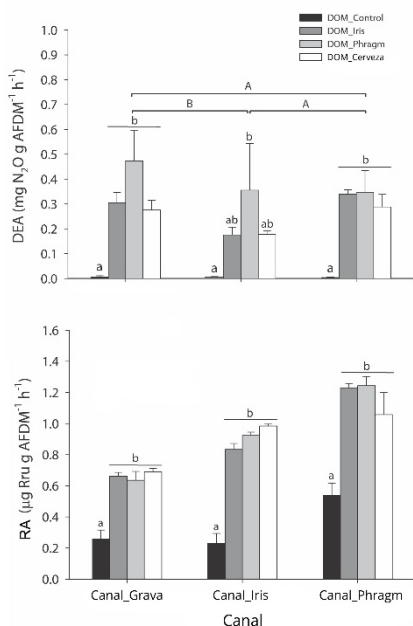
## Resultados

En los biofilms de canales no vegetados (Canal\_Grava), los tres tratamientos DOM (DOM\_Iris, DOM\_Phragm y DOM\_Cerveza) condujeron a aumentos en la abundancia bacteriana total. En los biofilms de canales con vegetación, sólo el tratamiento de DOM\_Cerveza en Canal\_Iris mostró un aumento significativo en la abundancia bacteriana total. El gen nirK, vinculado a la actividad desnitrificante, fue significativamente más abundante en Canal\_Iris, independientemente de los tratamientos de DOM. Tanto en Canal\_Grava como en Canal\_Phragm, los tratamientos de DOM no exhibieron diferencias significativas en la abundancia de nirK. La abundancia del gen nirS, también vinculado a la actividad desnitrificante, no se incrementó con la adición de las distintas fuentes de DOM.

Los biofilms con adiciones de DOM (DOM\_Iris, DOM\_Phragm y DOM\_Cerveza) demostraron mayores tasas potenciales de desnitrificación (DEA) que las incubadas en condiciones control (DOM\_Control), y mayores tasas de respiración aeróbica (Figura 1). Asimismo, en los tratamientos sin adiciones de DOM (DOM\_Control), aquellos biofilms provenientes del Canal\_Phragm tuvieron tasas respiratorias fueron mayores que en las otras configuraciones de canales.

## Conclusiones

Las tres fuentes de materia orgánica disuelta utilizadas en este estudio incrementaron la desnitrificación y la respiración aeróbica de los biofilms. Los resultados sugieren que los lixiviados de hojarasca de helófitas usadas en programas de restauración fluvial pueden promover la respiración aeróbica y la actividad desnitrificante, contribuyendo a mejorar la capacidad de los ríos en transformar y reducir los excesos de nitrógeno provenientes de efluentes de plantas de tratamiento.



**Fig. 1.** Variaciones en la actividad enzimática desnitrificante (DEA) y en la respiración aeróbica (RA) en biofilms colonizados en tres tipos de canales artificiales (Canal\_Grava, Canal\_Iris, Canal\_Phragm) y expuestos a tres fuentes de DOM (DOM\_Iris, DOM\_Phragm, DOM\_Cerveza) comparadas con los controles (DOM\_Control). Las letras indican los resultados de los test *a posteriori* (Tukey HSD).

## Referencias

Bernal S., Lupon A., Ribot M., Sabater F. y Martí E. 2015. Riparian and in-stream controls on nutrient concentrations and fluxes in a headwater forested stream. *Biogeosciences* 12:1941-1954.

Epstein S.S. y Rossel J. Enumeration of Sandy Sediment Bacteria: Search for Optimal Protocol. 1995. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 117 (1), 289-298

Haggerty R., Argerich A. y Marti E. 2008. Development of a "smart" Tracer for the Assessment of Microbiological Activity and Sediment-Water Interaction in Natural Waters: The Resazurin-Resorufin System. *Water Resour. Res.*, 44.

Hallin S. y Lindgren P.E. 1999. PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1652-1657

Holmes R.M., Jones J.B. Jr, Fisher S.G. y Grimm N.B. 1996. Denitrification in a Nitrogen-Limited Stream Ecosystem. *Biogeochemistry* 33 (2), 125-146.

Martí E., Aumatell J., Gode L., Poch M. y Sabater F. 2004. Nutrient retention efficiency in streams receiving inputs from wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Quality* 33:285-293.

Mielcarek A., Janczkowicz W., Ostrowska K., Jozwiak T., Klodowska I., Rodziewicz J. y Zielinski M. 2013. Biodegradability Evaluation of Wastewaters from Malt and Beer Production. *J. Inst. Brew.* 119 (4), 242-250.

Nikolakopoulou M., Argerich A., Drummond J.D., Gacia E., Martí E., Sorolla A. y F. Sabater. 2018. Emergent Macrophyte Root Architecture Controls Subsurface Solute Transport. *Water Resources Research* 54:5958-5972.

Norris J.E., Stokes A., Mickovski S.B., Cammeraat E., van Beek R., Nicoll B.C. y Achim A. 2008. Slope stability and erosion control: ecotechnological solutions. Springer Science & Business Media.

Ribot M., Von Schiller D. y Martí E. 2017. Understanding pathways of dissimilatory and assimilatory dissolved inorganic nitrogen uptake in streams. *Limnology and Oceanography* 62:1166-1183.

Stokes A., Sotir R., Chen W. y Ghestem M. 2010. Soil bio-and eco-engineering in China: past experience and future priorities. *Ecological Engineering* 36:247-257.

Stottmeister U., Wiessner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kastner M., Bederski O., Muller R.A. y Moormann H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22:93-117.