

Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva

Microbial metabolisms over advanced processes for Nitrogen removal, a prospective review

Jaime Sánchez¹, Janeth Sanabria²

Resumen

Los procesos avanzados para la remoción de nitrógeno están íntimamente relacionados con los metabolismos de las comunidades microbianas que intervienen en las transformaciones del mismo. Para el diseño, la optimización o el mejoramiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas, el ingeniero y el microbiólogo en forma conjunta, han logrado configurar reactores terciarios adecuados para el desenvolvimiento de estas comunidades, obteniendo altas eficiencias de remoción de los nutrientes. Este artículo presenta una revisión sobre la actividad bacteriana y su aplicación en los sistemas de tratamiento, inicia conceptualizando la influencia de los microorganismos y de la actividad humana en el ciclo global del nitrógeno, para después hacer un análisis de los procesos particulares en los cuales los microorganismos intervienen. Se clasifican e incluyen nuevas evidencias de metabolismos relacionados, y se describen como ejemplos algunos de los procesos de tratamiento terciario para aguas residuales desarrollados con éxito en las últimas décadas.

Palabras clave: remoción de compuestos nitrogenados, sistemas de tratamiento avanzado, nitrificación, nitrificación, desnitrificación, denitrificación, anammox, nitrógeno.

Abstract

Advanced processes for nitrogen removal are intimately related to the microbial community metabolisms that take part in the transformations. For the design, optimization or improvement of domestic waste water treatment systems, engineers and microbiologists working together, have managed to implemented suitable tertiary reactors for the development of these communities, improving the efficiency of nutrient removal. This article presents a revision of the bacterial activity and its application in treatment systems. The article begins by giving an explanation about the influence of microorganism and human activity on the global nitrogen cycle. Then, it analyzes the particular processes in which the microorga-

1 Magíster en ciencias, ingeniero civil, profesor asistente, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. sjaime@ula.ve.

2 Ph. D. Microbiología, profesora asociada, Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia. sanabria@univalle.edu.co

nisms take part. New evidence of related metabolisms are classified and included. Some of the processes of wastewater tertiary treatment, successfully developed over the last decades, are described as examples.

Key words: nitrogen compounds removal, advance treatment systems, nitrification, nitrification, denitrification, denitrification, anammox, nitrogen.

Recibido: febrero 8 de 2009

Aprobado: junio 30 de 2009

Introducción

Durante varias décadas de aplicación, los sistemas de tratamiento (ST) biológico para aguas residuales domésticas (ARD) han dado una respuesta efectiva y sostenible en cuanto a la remoción de carbono orgánico, aunque han mostrado menos eficiencia en la remoción de compuestos nitrogenados resultantes de estos procesos, agudizando la descarga de nutrientes a los cuerpos de agua receptores (Paredes et ál., 2007). Los compuestos nitrogenados representan un contaminante ambiental debido a su influencia en la eutroficación, su efecto en el contenido de oxígeno disuelto (demanda nitrogenada) y la toxicidad sobre las especies acuáticas y en los seres humanos (Kadlec y Knight, 1996). La remoción de los compuestos nitrogenados puede realizarse por métodos físico-químicos o por procesos biológicos, estos últimos han resultado más económicos y efectivos que los físico-químicos (EPA, 1993). Nuevas especies y géneros de microorganismos descubiertas en las últimas décadas ofrecen importantes ventajas comparadas con la remoción tradicional de nitrógeno (N); estas están específicamente relacionadas con la oxidación del amonio (NH_4^+), y actúan mediante nitrificación autótrofa-desnitrificación heterótrofa por etapas (Khin y Annchhatre, 2004). Este artículo presenta en forma global la intervención humana en el ciclo del N así como la influencia microbiológica, también los avances encontrados en los procesos de remoción de nitrógeno de ARD, además de algunos procesos intermedios del ciclo del nitrógeno, que sugieren reevaluar los paradigmas y las asunciones hechas en modelos bioquímicos del ciclo del nitrógeno

(Dustsch et ál., 2007). La dinámica de estos nuevos grupos bacterianos en la nitrificación-desnitrificación ha sido aplicada recientemente en procesos de tratamiento en forma innovadora, y tiene consecuencias importantes en la tasa de transformación del N (Horner-Devine y Martiny, 2008). Algunas preguntas de investigación que deben ser abordadas por grupos interdisciplinarios de ingenieros y microbiólogos se deducen del texto y se plantean al final del mismo.

El ciclo global del nitrógeno

El ciclo global del nitrógeno es la serie continua de procesos naturales en los cuales el nitrógeno se transforma a distintos estados de oxidación y reducción: de nitrógeno molecular (N_2) a amoníaco (NH_3), luego a compuestos orgánicos carbono-nitrogenados, óxidos de nitrógeno y finalmente a N_2 cerrando el ciclo (Warakomski et ál., 2007). Tanto la producción industrial de NH_4^+ y NO_3^- como fertilizantes, como la combustión de hidrocarburos fósiles, la descarga de aguas residuales y algunas otras acciones antropogénicas, han acelerado y des-balanceado considerablemente el ciclo del nitrógeno, con efectos negativos como la eutrofización de los cuerpos de agua receptores, el efecto invernadero por la generación de óxido nitroso (N_2O), y los riesgos para la salud humana como el consumo de nitratos (NO_3^-) en el agua potable (Towsend et ál., 2003). Un aspecto fundamental del ciclo del nitrógeno es su importancia y participación en la vida, es decir, su rol primario de producción de biomasa (Gruber y Galloway, 2008), siendo nutriente esencial de todos los organismos e

indispensable en las estructuras y los procesos bioquímicos que definen la vida (Francis et ál., 2007). Las formas del nitrógeno pueden ser “no reactivas” como el N_2 o “reactivas” (Nr) como se encuentra en todas sus otras formas (Galloway et ál., 2008). El mayor reservorio de N_2 se encuentra en la atmósfera (78% de la misma), y debe ser fijado a una forma reactiva para su aprovechamiento en la biosfera (Francis et ál., 2007). Otras formas de N presentes en la atmósfera son las pequeñas cantidades de óxidos de nitrógeno, NH_3 gaseoso, compuestos de NH_4^+ , ácido nítrico (HNO_3), partículas de NO_3^- y N orgánico que circulan a través de ella (Nieder y Benbi, 2008). Entre las transformaciones a gran escala se destacan: la fijación biológica, lumínica e industrial, la combustión de hidrocarburos fósiles y los procesos biológicos de óxido-reducción. La fijación industrial para la producción de fertilizantes nitrogenados (100 Tg año^{-1} de 355 totales fijados globalmente, 250 por microorganismos y 5 por tormentas), ha permitido el incremento de productos agrícolas, sosteniendo el incremento de la población humana, lo cual sería literalmente imposible sin el uso de estos fertilizantes. Por otro lado, esta misma

producción ha desbalanceado notablemente el ciclo global (Gruber y Galloway, 2008). A continuación se presentan los procesos en los cuales los microorganismos intervienen en las transformaciones de los compuestos nitrogenados dentro del ciclo del nitrógeno para su posible aplicación a los ST relacionados con la remoción.

Procesos de transformación en la actividad bacteriana

Alrededor del 12% del peso seco de las bacterias (biomasa) es contribución del N (Madigan et ál., 2004). Particularmente, las bacterias pueden realizar en su totalidad cada uno de los pasos en las transformaciones requeridas para completar y balancear el ciclo del N, ganando por su parte energía o biomasa en sus metabolismos. Warakomsky y otros en el 2007, presentan gráficamente los procesos que se realizan a nivel de biosfera y sus interrelaciones (figura 1). Entre los procesos de transformación posibles, estudiados hasta el momento, que realizan las bacterias, se describirán en forma general la fijación, la asimilación y la amonificación, mientras la nitrificación y la reducción desasi-

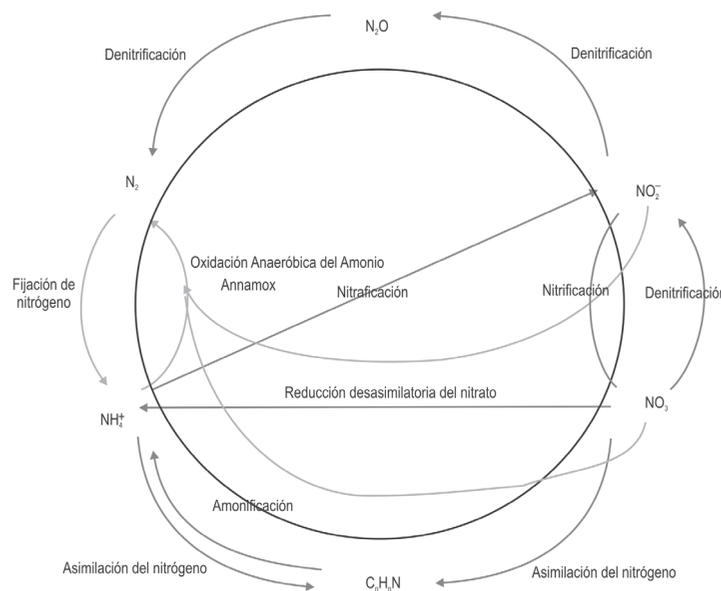


Figura 1. Ciclo del nitrógeno.

Fuente: traducido de Warakomski et ál. (2007, p. 278).

militoria del nitrato serán descritas en mayor detalle por su importancia en los ST.

1. La fijación: es la utilización del N₂ como fuente directa de N para la síntesis celular. Aproximadamente 250 Tg N anuales son fijadas por estos microorganismos en la tierra y el océano. En la búsqueda de disminuir la aplicación de fertilizantes, se han hecho nuevos descubrimientos en cuanto a géneros de bacterias fijadoras, ejemplo de estos son las bacterias ácido acéticas fijadoras de N, descritas por primera vez en Brasil en 1988. Varios otros géneros de la misma familia han sido descritos posteriormente (Pedraza, 2008).

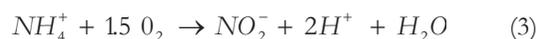
El proceso de conversión del N₂ a NH₃ también se realiza industrialmente con la implementación del proceso Haber-Bosch a partir del año 1910 (fijación industrial o antropogénica).

2. Asimilación o inmovilización del nitrógeno: proceso de utilización del NH₄⁺ o de Nr inorgánico para la síntesis celular. La forma de N más utilizada para asimilación es el NH₄⁺, aunque las plantas también asimilan NO₃⁻ de acuerdo con su especie, teniendo diferentes preferencias en cuanto a la forma de N soluble que utilizan (Vymazal, 2007).
3. La amonificación o mineralización: el N orgánico es biológicamente liberado como NH₄⁺, durante la hidrólisis de nucleótidos y proteínas, catabolizado por organismos heterótrofos (Canfield et ál., 2005). Algunos microorganismos pueden liberar diferentes enzimas como proteasas, nucleasas y ureasas que inician la degradación de moléculas contenedoras de N, fuera de la célula (depimerización), generando algunos monómeros que son llevados al interior y metabolizados a NH₄⁺ (Maier et ál., 2000). Recientes estudios sobre mineralización indican que la utilización de monómeros no es exclusiva de los mi-

croorganismos, y que las plantas pueden utilizarlos directamente (Schimel y Bennett, 2004). Los procesos que se describirán a continuación en forma más detallada son los que intervienen directamente en las transformaciones del Nr dentro de las PT de ARD e industriales. A nivel global todos los procesos equilibran y regulan el ciclo del N.

Nitrificación: la nitrificación se divide en dos etapas, la primera está definida por la oxidación de NH₄⁺ a nitrito (NO₂⁻) y se puede llamar “nitritación”. La segunda etapa definida por la oxidación de NO₂⁻ a NO₃⁻, se denomina nitratación, generalmente ocurren en la naturaleza en forma conjunta. Se prefiere hacer la diferenciación debido a que los procesos pueden inducirse en forma aislada y ocurrir independientemente en los reactores (Dongen et ál., 2001).

Nitritación NH₄⁺ a NO₂⁻: es la oxidación del NH₄⁺ a NO₂⁻ por bacterias nitrificantes vía hidroxilamina. Al menos sesenta especies de dos géneros pertenecientes a *Betaproteobacteria*, principalmente nitrosomonas y nitrosospira, son capaces de realizarlo (Yuan et ál., 2008). Ocurre bajo condiciones aeróbicas y según las siguientes reacciones (Craggs, 2005):



Catalizadas por las enzimas amonio monooxigenasa (1); hidroxilamina oxidoreductasa (2); O se puede expresar como una sola relación estequiométrica (3). Estas reacciones son ejecutadas por bacterias quimiolitóautótrofas, que dependen totalmente de la oxidación del NH₄⁺ para la generación de energía y su crecimiento. Ocurre gran consumo de oxígeno, alrededor de 4,33 mg O₂ por cada mg de NH₄⁺ oxidado. Los dos protones de hidrógeno generados disminuyen el pH consumiendo alcalinidad y acidificando el medio. Las bacterias de

nitritación en esta etapa tienen un rendimiento de crecimiento bajo comparado con la cinética de crecimiento de las bacterias nitratantes a temperaturas menores a 15 °C (Carrillo et ál., 2000), cinéticamente de gran importancia a la hora de separar los procesos.

Nitratación NO₂⁻ a NO₃⁻: Está definida por la oxidación de los NO₂⁻ para la obtención de energía generando NO₃⁻ como producto final, utilizando Nitrato Dehidrogenasa como catalizador, según la siguiente reacción:



La oxidación del NO₂⁻ puede ser realizada por cuatro géneros de bacteria hasta ahora descritos: nitrobacter, nitrospina, nitrococcus y nitrospira (Yuan et ál., 2008), quimiolitioautótrofos facultativos.

Reducción desasimilatoria del NO₃⁻: Consiste en la reducción del NO₃⁻ que puede ser a N₂ ó a NH₄⁺ (en todos los casos existe NO₃⁻ reducción) y es realizada en dos pasos, el primero es obligado mientras que el segundo depende de la ruta metabólica, pudiendo ser: Desnitrificación heterótrofa, Reducción desasimilatoria del nitrito y Desnitrificación autótrofa, como se muestra en la figura 2:

Desnitrificación del NO₃⁻: es el proceso anaerobio de reducción desasimilatoria del NO₃⁻ a NO₂⁻; es catalizado por una enzima NADH-dependiente nitrato reductasa, no asociada a la membrana, y es metabolizada por una gran cantidad de microorganismos. Prácticamente

todos los denitrificantes y nitrato amonizantes tienen la capacidad de reducir el NO₃⁻ a NO₂⁻ y a su vez continuar metabolizando el NO₂⁻ como se detalla a continuación:

Desnitrificación heterótrofa: es el proceso anaerobio de reducción desasimilatoria del NO₂⁻ a N₂, en el cual los óxidos de nitrógeno intermedios sirven como aceptores terminales de electrones en procesos de respiración. Los microorganismos que lo realizan son quimioheterótrofos, el proceso de reducción ocurre entonces según la ecuación (5):



La última etapa generalmente ocurre a menor velocidad de reacción que las anteriores, lo que genera productos intermedios como en N₂O. Las enzimas que intervienen en la reacción en orden progresivo son: nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa, óxido nitroso reductasa. La estequiometría de la reacción completa se presenta en la ecuación 6. Condiciones óptimas para el proceso incluyen concentración de OD menor a 1 mg L⁻¹, temperaturas mayores a 10 °C y pH entre 7 y 8,5 (Craggs, 2005). Se incrementa la alcalinidad puesto que el proceso necesita los protones de hidrógeno para su ejecución. Algunas investigaciones acerca del metano como fuente de carbono proponen la reacción como muestra la ecuación 7 (Modin et ál., 2007). La desnitrificación se puede

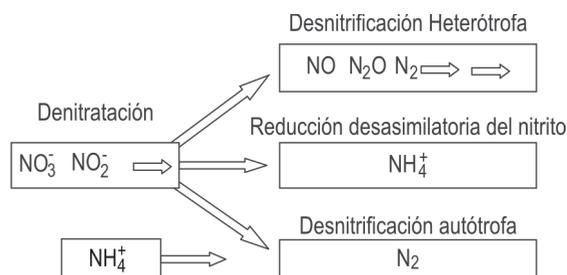


Figura 2: Formas de la desnitrificación

realizar sin incluir denitrificación como muestra la reacción 8, es una vía que requiere menos donadores de electrones, en otras palabras, menos cantidad de compuestos orgánicos. Este proceso puede ser metabolizado por otros microorganismos heterótrofos aeróbicos, como la *Thiosphaera pantotropha* (Gupta, 1997), varias de sus enzimas han sido relacionadas con el proceso y aun está en estudio su aplicabilidad a los ST de agua con relaciones C/N altas (Gupta y Gupta, 2000).

Nitrato amonificación o reducción desasimilatoria del nitrato a amonio. En la reducción que ocurre al transformar el NO_3^- a NH_4^+ , se usan 8 electrones, lo que implica que más materia orgánica puede ser oxidada por cada molécula de NO_3^- , por las bacterias nitrato amonizantes que por las denitrificantes heterótrofas, en consecuencia, las primeras parecen ser más eficientes en la producción de energía (Vymazal, 2007). Las bacterias nitrato amonizantes son facultativas quimioheterótrofas y funcionan a muy bajas concentraciones de oxígeno disuelto. En este proceso, también llamado DNRA (por sus siglas en inglés: Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium), el NO_3^- es usado como el aceptor final de electrones para producir energía, que a su vez es utilizada en la oxidación de compuestos orgánicos (Maier et ál., 2000). La estequiometría de la reacción se presenta en la ecuación 9. El proceso se realiza luego de la denitrificación (la cual es la que produce energía) y consiste en la reducción de NO_2^- a NH_4^+ ;



no provee energía adicional pero cumple con otras funciones. Son propicios para su desarrollo los ambientes saturados y ricos en carbono, como en aguas estancadas y sedimentos con grandes cantidades de materia orgánica. La presencia de DNRA impide la conversión de NO_3^- y NO_2^- a N_2 por lo cual es considerado un corto circuito dentro del ciclo del N. La ruta que se debe seguir por el NO_3^- en su reducción está determinada por la relación C/N, a valores bajos se favorece la acumulación de NO_2^- y la

desnitrificación heterótrofa, mientras que a valores altos predomina la DNRA (Carrillo et ál., 2000). Se ha observado que la ruta de reducción del NO_3^- puede cambiar de acuerdo con la fuente reductora. Por ejemplo, en presencia de sustratos no fermentables la desnitrificación a NH_4^+ es la ruta principal.

Desnitrificación autótrofa. Incluye además de los anammox la relacionada con algunos microorganismos quimioautótrofos oxidadores del azufre, como los *thiobacillus denitrificans*, los cuales son anaerobios facultativos y utilizan el NO_3^- como aceptor final de electrones (Maier et ál., 2000). Se ha descrito que la nitrificación y nitrificación también pueden ser metabolizadas por microorganismos heterótrofos como la *Thiosphaera pantotropha* (Gupta, 1997), aunque los mecanismos mediante los cuales se realizan están actualmente en estudio (Craggs, 2005). Los procesos y metabolismos descritos son aplicados con éxito, en trabajo conjunto de ingenieros y microbiólogos, en sistemas de tratamiento avanzado para la remoción de nitrógeno, algunos ejemplos destacados de estas aplicaciones novedosas se describen a continuación.

ST avanzado para la remoción del nitrógeno

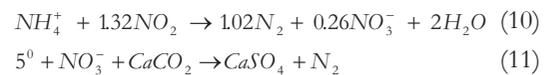
Varios procesos microbiológicos dentro del ciclo del N han conducido a replantear y desarrollar nuevos ST, adaptándolas con ventaja a la remoción de contaminantes, específicamente en la remoción de NH_4^+ y NO_3^- , dos nutrientes que no han podido ser disminuidos en los efluentes de tratamientos convencionales al estándar de 10 mg N L^{-1} (Khin y Annchhatre, 2004). Un ejemplo de aplicabilidad novedosa de remoción de NH_4^+ es el realizado en la línea secundaria de recirculación de agua, resultante del tratamiento de lodos, la cual aumenta la carga de N en la línea principal de tratamiento en más del 20% (Ahn y Choi, 2006), esta sublínea en particular contiene altas concentraciones de nutrientes y bajas concentraciones de carbono orgánico biodegradable, para lo cual es obvia la

participación de desnitrificación autótrofa. La remoción de NH_4^+ de las aguas residuales se ha realizado en forma tradicional usando nitrificación y nitrificación aerobia hasta NO_3^- , con altas demandas de aireación, seguido de la denitrificación y desnitrificación anaerobia con altas demandas de sustrato orgánico en reactores separados (Third et ál., 2001) que han sido muy efectivas pero poco sostenibles. A continuación se describen algunos procesos novedosos que de distintas formas han aprovechado las características de las comunidades microbianas asociadas a metabolismos específicos.

Proceso anammox: oxidación anaerobia del NH_4^+

Hasta 1995 el proceso de nitrificación conocido se asociaba con el consumo de oxígeno, es decir, el NH_4^+ se consideraba relativamente estable en condiciones anóxicas. Mulder et ál. (1995), describieron por primera vez la oxidación del NH_4^+ en condiciones anaerobias, considerando el NH_4^+ como donador de electrones y el NO_3^- como receptor final, a este proceso se le denominó Anammox por sus siglas en inglés (Ananerobic Ammonium Oxidation) (Graff et ál., 1995; Mulder et ál., 1995); posteriormente se observó que la clave para la oxidación del NH_4^+ era el NO_2^- como aceptor de electrones, y no el NO_3^- . Reportes iniciales de la actividad de los Anammox en el mar demuestran que son responsables del 67% de la producción de N_2 a 700 m de profundidad, 24% a 380 m y 2% a 16 m (Dalsgaard et ál., 2005). La contribución del proceso Anammox a nivel del ciclo global del N se calcula entre el 30 y el 50% de la producción total de N_2 específicamente en los sedimentos marinos (Francis et ál., 2007; Jetten et ál., 2004). Anammox es un metabolismo que consiste en la reducción del NO_2^- acoplada a la oxidación del NH_4^+ (Schmid et ál., 2005) para formar N_2 . El NH_4^+ es oxidado por dos vías, primero el NH_4^+ es oxidado hasta hidroxilamina el cual a su vez es oxidado a nitrito por la enzima hidroxilamine oxidoreductasa; segundo, el NH_3^+ y el NO_2^- son convertidos a N_2 (Ye y Thomas, 2001). Otros experimentos muestran

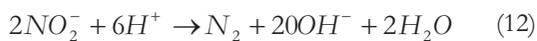
que el NO_2^- es reducido a hidroxilamina y que de alguna manera esta última reacciona con el NH_4^+ , lo cual conduce a la producción de N_2 , con hidracina como intermediario (Jetten et ál., 2001). Basada en el balance de masa de comunidades anammox enriquecidas, la estequiometría de la segunda reacción es propuesta como se presenta en la ecuación 10 (Dongen et ál., 2001; Güven et ál., 2005):



Algunos estudios demuestran que el radio estequiométrico de consumo de NH_4^+ , y NO_2^- comparado con la producción de NO_3^- es de 1:1.2:0.33 (Tsushima et ál., 2007). Se han reconocido cuatro géneros de bacterias que comparten esta fisiología y morfología, éstos son: 1) *Candidatus* Brocadia, 2) *Candidatus* Kuenenia, 3) *Scalindula*, y 4) *Anammoxglobus*, pertenecientes al género *Planctomycetes* (Francis et ál., 2007; Yang et ál., 2007). Estudios realizados demuestran que las bacterias anammox pueden usar algunos compuestos orgánicos como sustrato suplementario de carbono, aunque las mismas han sido descritas como quimiolitautótrofas obligadas; en otro sentido, se ha observado que pueden ser inhibidas por algunos compuestos orgánicos como el metanol (Güven et ál., 2005). Se ha experimentado con distintas configuraciones de reactores y se han tratado los efluentes de la digestión de lodos ricos en NH_4^+ , demostrando con éxito la aplicabilidad del proceso en la remoción de NH_4^+ y NO_2^- . Las comunidades Anammox en reactores simples controlados anaeróbicamente han resultado muy eficientes cuando estos dos compuestos están en concentraciones parecidas (Strous et ál., 1997). La introducción del proceso Anammox puede conducir a una reducción de los costos operacionales de hasta un 90% (Jetten et ál., 2004). Aunque las bacterias Anammox parecen capaces de oxidar el NH_4^+ a NO_2^- vía hidroxilamina en un primer paso, complementando la oxidación del NH_4^+ con el NO_2^- producido en un segundo paso, el proceso parece ser más eficiente y aplica-

ble cuando el NO_2^- es proporcionado por una fuente externa, como se observará en algunos de los ejemplos que se presentan. Futura investigación debe conducirse a la mejor comprensión de este fenómeno.

Proceso Sharon (por sus siglas en inglés, Single reactor system for High Ammonia Removal Over Nitrite Process): fue patentado y se basa en la nitrificación (ecuación 3) por microorganismos aerobios, y desnitrificación (ecuación 5) por microorganismos heterótrofos anaerobios facultativos, en donde la nitrificación y la denitrificación se inhiben en un reactor simple con elevadas temperaturas, aireación limitada e intermitente, controlando el pH y añadiendo sustrato orgánico en la fase anóxica (generalmente metano) (Volcke et ál., 2002). Estequiométricamente se representa como se muestra en la ecuación 12:



Es el primer proceso exitoso en el cual la nitrificación y la desnitrificación hasta y desde NO_2^- respectivamente ha sido alcanzada en condiciones estables (Khin y Annchatre, 2004). El proceso completo de Sharon logra un 25% menos de consumo de oxígeno, implicando 60% en ahorro de energía, reduce las emisiones de dióxido de carbono en un 20%, y reduce la producción de lodos en nitrificación y desnitrificación en un 35 y 55 % respectivamente (Peng y Zhu, 2006).

Proceso combinado: nitrificación parcial-Anamnox: un ejemplo claro de aplicación de metabolismos a la remoción de nitrógeno es el llamado Cannon (por sus siglas en inglés, Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite); el proceso utiliza un solo reactor, fue concebido con la idea de tratar altas concentraciones de NH_4^+ (500-600 mg N L^{-1}) y poca o nada de materia orgánica biodegradable (Ahn y Choi, 2006). La completa remoción autotrófica incluye nitrificación y oxidación anaeróbica del NH_4^+ , y requiere solo de un paso de limitación de oxígeno para alcanzar este objetivo. Las reacciones que intervienen son las que se

mostraron en la ecuación 3 para la nitrificación (controlada, hasta lograr una relación $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ de 1,32) y 10 para la reacción Anamnox (Ahn y Choi, 2006). La interacción de comunidades aerobias y anaerobias bajo condiciones de limitación de oxígeno resultan en una completa conversión del NH_4^+ a N_2 (Third et ál., 2001). El proceso autotrófico consume 63% menos oxígeno y 100% menos agentes reductores orgánicos que el proceso tradicional de remoción de N, y ha reportado hasta 0,08 kg N/ $\text{m}^3\text{r/d}$ de remoción (Sliemers et ál., 2002). Se han realizado aplicaciones de Cannon en humedales construidos de flujo vertical a escala de laboratorio, reportando remociones de hasta 0,11 kg/ $\text{m}^3\text{r/d}$ (Sun y Austin, 2007). Otro ejemplo de proceso combinado de nitrificación parcial con Anamnox es el realizado en dos reactores separados y en serie, como el llamado Sharon-Anamnox, y consiste en la transformación aeróbica controlada del NH_4^+ a NO_2^- hasta oxidar aproximadamente el 44% del NH_4^+ en un reactor tipo Sharon para posteriormente, en un reactor sucesivo Anamnox, ser denitrificado a N_2 . El proceso produce poco lodo y solo requiere el 40% de la energía de aireación comparado con un proceso convencional de remoción de N (Hao e et ál., 2002). La reacción en el reactor Sharon se puede generalizar como se muestra en la ecuación 13 (Khin y Annchatre, 2004)



La mayoría de estudios consultados a escala de laboratorio muestran el uso de monitoreo y control en línea de variables como el oxígeno disuelto, el pH y la producción de gases (Keller et ál., 2002). Además de proponer el uso de biosensores comerciales con los cuales los procesos de transformación del N pueden ser monitoreados (Verstraete y Philips, 1998). Algunos mecanismos se han diseñado y utilizado para determinar actividad nitrificante, como la adición de nitrato de sodio para determinar la actividad de las bacterias oxidadoras de NO_2^- , o la adición de cloruro de amonio en el caso de la actividad de oxidadoras de NH_4^+ y

NO₂⁻ conjuntas, midiendo la tasa de utilización de oxígeno (Moussa et ál., 2003). Métodos titulométricos con H₂O₂ y NaOH combinados con modelos de lodos activados permiten estimar las tasas de crecimiento específico de bacterias oxidadoras de NH₄⁺ y NO₂⁻ (Munz et ál., 2008). Sin embargo, su uso no se reporta claramente en las aplicaciones a escala real. Las plantas instaladas en el mundo (Holanda, Alemania, Estados Unidos, Brasil), se concentran en el tratamiento de AR de alta tasa, generalmente de origen municipal y agroindustrial. Los reportes de operación señalan ventajas como disminución en más del 50% de O₂, y 25% de fuentes de carbono externo, comparado con los sistemas convencionales, así como remociones entre 60 y 95% del nitrógeno de los efluentes con cargas contaminantes de más de 1g N/L (Mulder et ál., 2006; Jardin et ál., 2006; Keeley, 2006; Abma et ál., 2007). La biología molecular y la biotecnología ambiental pueden ayudar a identificar microorganismos funcionales, a caracterizar comunidades microbianas, y a desarrollar nuevos procesos de eliminación del nitrógeno. Métodos como Fluorescence in situ, Hybridization (FISH), *Confocal lasers scanning microscopy*, uso de microelectrodos, y nitrógeno marcado, para la identificación y estimación de biomasa de comunidades no cultivables en ambientes naturales y artificiales, así como la detección en línea, se usan en la investigación a escala de laboratorio y piloto (Sánchez-Melsió et ál., 2009, Date et ál., 2009; Jaeschke et ál., 2009; Xiao et ál., 2009). El desafío principal en la aplicación es el enriquecimiento de los microorganismos anaerobios capaces de oxidar el amoníaco con el nitrito como el aceptador de electrones y su cinética de crecimiento. Una de las limitaciones reportadas son las temperaturas de más de 30 °C, lo cual es una ventaja comparativa en el trópico.

Conclusiones

Todos los procesos descritos anteriormente son realizados por las bacterias y nos indican la estrategia que se debe seguir en la construcción de reactores eficientes, sostenibles y adaptables a las condiciones locales,

mostrándonos avances en su entendimiento. Generalmente las comunidades microbianas que intervienen en los procesos del ciclo del N se encuentran interrelacionadas. De los planteamientos y el análisis de este artículo se deduce que las comunidades autótrofas denitrificantes son mixtas, y requieren de futura investigación para mejorar su desarrollo en reactores biológicos. Es también destacable que las comunidades Anammox sobreviven y se desarrollan ampliamente a profundidades mayores de 600 m en el mar, entonces, ¿será importante ofrecerles condiciones de altas presiones o altas concentraciones de dióxido de carbono para su desarrollo potenciado dentro de los reactores? Finalmente, otro punto de interés particular es determinar experimentalmente si es posible la conversión del NH₄⁺ a N₂ por anammoxidantes, sin adición externa de NO₂⁻ (directa o indirecta).

Referencias bibliográficas

- Abma, W. R., Schultz, C. E., Mulder, J. W., van der Star, W. R. L., Strous, M., Tokutomi, T., van Loosdrecht, M. C. M. 2007. Full-scale granular sludge Anammox process. *Water Science & Technology* 55, 27.
- Ahn, Y.-h., Choi, H.-C. 2006. Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochemistry* 41: 1945-1950.
- Canfield, D. E., Kristensen, E., Thamdrup, B. 2005. The nitrogen Cycle. *Advances in Marine Biology* 48.
- Carrillo, F. C., Pérez, J., Gómez, J. 2000. Avances en la Eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 73-82.
- Craggs, R. 2005. Nutrients. In: A. Shilton (ed.). *Pond Treatment Technology*, London, UK., pp. 77-99.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Canfield, D. E. 2005. Mini-review. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology* 156: 457-464.
- Date, Y., Isaka, K., Ikuta, H., Sumino, T., Kaneko, N., Yoshie, S., Tsuneda, S. and Inamori, Y. 2009. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 281-286.

- Dongen, L. G. J., Jetten, M. S. M., Loosdrecht, M. C. M. 2001. The combined Sharon/Anammox Process: A sustainable method for N-removal From Sludge water.
- Dustsch, C., Sarmiento, L., Sigman, D. M., Gruber, N., Dunne, N. P. 2007. Spatial coupling of nitrogen inputs and losses in the ocean. *Nature* 445: 163-167.
- EPA, U. 1993. Process design manual of nitrogen control. *EPA*.
- Francis, C. A., Beman, J. M., Kuypers, M. M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME journal* 1: 19-27.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erismán, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R. et al. 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320: 889-891.
- Graff, A. A., Mulder, A., Bruijn, P. D., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1246-1251.
- Gruber, N., Galloway, J. N. 2008. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451: 293-296.
- Gupta, A. B. 1997. *Thiosphaera pantotropha*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 589-595.
- Gupta, A. B., Gupta, S. K. 2000. Simultaneous carbon and nitrogen removal from high strength domestic wastewater in an aerobic RBC biofilm. *Water Research* 35: 1714-1722.
- Güven, D., Dpena, A., Kartal, B., Schmid, M. C., Maas, B., Pas-schoonen, K. v. d. et al. 2005. Propionate Oxidation by and methanol Inhibition of Anaerobic ammonium-oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1066-1071.
- Hao, X., Heijnen, J. J., Mark, 2002. Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-Anammox biofilm process. *Water Research* 36: 4839-4849.
- Horner-Devine, M. C., Martiny, A. C. 2008. News About Nitrogen. *Science* 320: 757-758.
- Jaeschke, A., Camp, H. J. d., Harhangi, H., Klimiuk, A., Hopmans, E. C., Jetten, M. S. M., et al. 2009. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 343-350.
- Jardin, N., Thö, D., Wett, B., 2006. Treatment of Sludge Return Liquors: Experiences from the Operation of Full-Scale Plants. *Proceedings of the Water Environment Federation* 2006: 5237-5255.
- Jetten, M. S. M., Cirpus, I., Kartal, B., Niftrik, L. V., Pas-Schoonen, K. T. v. d., Slieskers, O. et al. 2004. 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society* 119-123.
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., Loosdrecht, M. v., Kuenen, G., Strous, M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Current Opinion in Microbiology* 12: 283-288.
- Kadlec, R. H., Knight, R. L. 1996. *Treatment Wetlands*. Lewis Publishers, Boca Raton, La Florida.
- Keeley, J. 2006. Balancing technological innovation and environmental regulation: an analysis of Chinese agricultural biotechnology governance. *Environmental Politics* 15: 293.
- Keller, J., Yuan, Z., Blackall, L. L. 2002. Integrating process engineering and microbiology tools to advance activated sludge wastewater treatment research and development. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1: 83-97.
- Khin, T., Annchatre, A. P. 2004. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances* 22: 517-532.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Prentice Hall.
- Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. 2000. *Environmental Microbiology*. San Diego, California.
- Modin, O., Fukushi, k., Yamamoto, K. 2007. Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research* 41: 2726-2738.
- Moussa, M. S., Lubberdin, H. J., Loosdrecht, M. C. M. v., Gijzen, H. J. 2003. Improved method for determination of ammonia and nitrite oxidation activities in mixed bacterial cultures. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 217-221.
- Mulder, A., Graff, A. A. v. d., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 177-184.
- Mulder, J. W., Duin, J. O. J., Goverde, J., Poiesz, W. G., van Veldhuizen, H. M., van Kempen, R., Roeleveld, P.

2006. Full-Scale Experience with the Sharon Process through the Eyes of the Operators. Proceedings of the Water Environment Federation 2006: 5256-5270.
- Munz, G., Gualtieri, M., Salvadori, L., Claudia, B., Claudio, L. 2008. Process efficiency and microbial monitoring in MBR (membrane bioreactor) and CASP (conventional activated sludge process) treatment of tannery wastewater. *Bioresource Technology* 99: 8559-8564.
- Nieder, R., Benbi, D. K. 2008. Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment. Springer Science, Business Media B. V.
- Paredes, D., Kuschik, P., mbwerte, T. S. A., Stange, F., Müller, R. A., Köser, H. 2007. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment - A Review. *Eng. Life Science* 7 (1): 13-25.
- Pedraza, R. O. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125: 25-35.
- Peng, Y., Zhu, G. 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Springer* 73: 15-26.
- Sánchez-Melsió, A., Cáliz, J., Balaguer, M. D., Colprim, J. s., Vila, X. 2009. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere* 75: 169-179.
- Schimel, J. P., Bennett, J. 2004. Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology* 85 (3): 591-602.
- Schmid, M. C., Maas, B., Dapena, A., Pas-Schoonen, K. V. d., Vossenber, J. v. d., Kartal, B. et ál. 2005. Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1677-1684.
- Sliekers, A. O., Derwort, N., Gomez, J. L. C., Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 2002. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research* 36: 2475-2482.
- Strous, M., Gerven, E. v., Zheng, P., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research* 31: 1955-1962.
- Sun, G., Austin, D. 2007. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: Evidence from a mass balance study. *Chemosphere* 68: 1120-1128.
- Third, K. A., Sliemers, A. O., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 2001. The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria. *System. Applied Microbiology* 24: 588-596.
- Towsend, A. R., Howarth, R. W., Bazzaz, F. A., Booth, M. S., Cleveland, C. C., Collinge, S. K. et ál. 2003. Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *The Ecological Society of America* 1: 240-246.
- Tsushima, I., Ogasawara, Y., Kindaichi, T., Satoh, H., Okabe, S. 2007. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research* 41: 1623-1634.
- Verstraete, W., Philips, S. 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution* 102: 717-726.
- Volcke, E. I. P., Loosdrecht, M. C. M. v., Vanrolleghem, P. A. 2002. Influence of operating parameters on the performance of a continuously aerated sharon reactor. *Med Fac Landbouww Univ Gen* 67/4: 209-212.
- Ymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 380: 48-65.
- Warakowski, A., Kempen, R. v., Kios, P. 2007. Microbiology/Biochemistry of the Nitrogen Cycle. Innovative Process Applications Moving forward wastewater biosolids sustainability: technical, managerial, and public synergy. *GMSC, New Brunswick*, pp. 277-285.
- Xiao, Y., Zeng, G. M., Yang, Z. H., Liu, Y. S., Ma, Y. H., Yang, L. et ál. 2009. Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE. *Journal of Applied Microbiology* 106:496-505.
- Yang, Q., Jia, Z., Liu, R., Chen, J. 2007. Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. *Process Biochemistry* 42: 180-187.
- Ye, R. W., Thomas, S. M. 2001. Microbial nitrogen cycles: Physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology* 4: 307-312.
- Yuan, Z., Oehmen, A., Peng, Y., Ma, Y., Keller, J. 2008. Sludge population optimization in biological nutrient removal wastewater treatment systems through on-line process control: A review. *Environmental Science Biotechnology*.