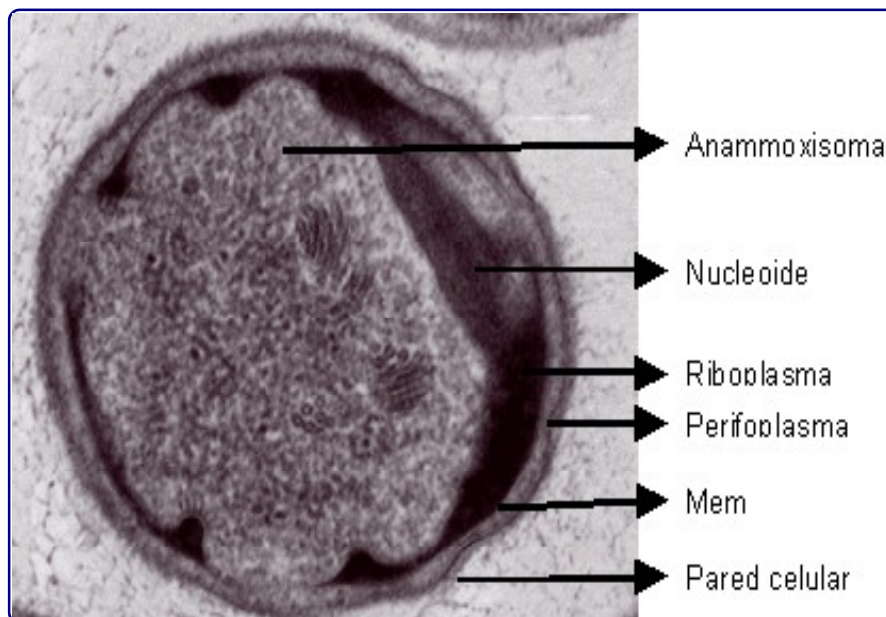


PROCESO ANAMMOX UNA APLICACIÓN EN INGENIERÍA: REVISIÓN GENERAL DE LOS ASPECTOS MICROBIANOS.



Janeth Sanabria, Ph.D.

Profesora Asociada

Escuela de Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad del Valle, Cali, Colombia
sanabria@univalle.edu.co

Leidy Bedoya, Ing.

Escuela de Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad del Valle, Cali, Colombia
leidybedoya@gmail.com

Jaime Sánchez, M.Sc.

Profesor Asistente

Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela
sjaime@ula.ve

Grupo de Investigación en Procesos Avanzados para Tratamientos Químicos y Biológicos.

**Recibido: Junio 19 2009 *Aceptado: Septiembre 10 2009*

RESUMEN

El proceso Anammox es la forma de metabolismo más prometedora para denitrificación en efluentes residuales, y quizás el ejemplo más claro en el cual su potencial uso en ingeniería depende del conocimiento detallado de los microorganismos en el proceso. Este proceso es poco conocido en Latinoamérica, aun cuando existe una gran difusión en el mundo científico. Se presenta una revisión general del proceso Anammox, la intervención de su actividad bacteriana en los procesos de transformación de los compuestos nitrogenados y en el ciclo del Nitrógeno, igualmente la biología de las bacterias reportadas que intervienen en este proceso y la bioquímica del mismo. También se describen algunas técnicas de identificación como Hibridación In Situ con Fluorescencia FISH y Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, para los grupos bacterianos y potenciales aplicaciones en los sistemas de tratamiento terciarios para aguas

residuales domésticas con altas concentraciones de amonio y nitratos.

PALABRAS CLAVES

Anammox, anamoxisoma, remoción de compuestos nitrogenados, aguas residuales domésticas.

ABSTRACT

The anammox process is the most promissory metabolism for denitrification of waste water, and clear example in which his potential uses in Engineering solution, depend on advanced knowledge of microorganisms involved in the process. Despite of important number of publication, anammox process is poverty known in Latin-American countries. In this article is shown a general coments of the process Anammox, its intervention in the cycle of nitrogen, within the context of the bacterial activity in the transformation of nitrogen compounds. The Biology of the reported bacteria that are involved in this process and their biochemistry will be described. Some techniques, as Fluorescent in situ hybridization -FISH, and Polymerase Chain Reaction PCR, actually applied for identification of the bacterial groups and their potential applications in tertiary wastewater treatment systems, with high ammonium and nitrates concentrations.

KEYWORDS

Anammox, anammoxosome, nitrogen compounds removal, advance treatment systems, domestic wastewater.

1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales (domésticas, y algunas de tipo industrial) sin tratar o efluentes parcialmente tratados, son fuente de grandes cantidades de nutrientes en forma de compuestos nitrogenados y fosfatos que comúnmente se descargan a los cuerpos de agua naturales. El

exceso de nitrógeno añadido en los cuerpos de agua por esta vía puede provocar el fenómeno conocido como eutroficación, responsable de la mortandad de peces, aumento de la frecuencia del florecimiento de algas dañinas, cambios en las especies dentro de los ecosistemas de la costa y acidificación global de sistemas acuáticos y terrestres (Ahn, 2006) y, por supuesto, disminución en la oferta de calidad de agua para potabilizar. Según el documento Conpes 3383 del Departamento Nacional de Planeación de Colombia, sólo se trata el 10% de las aguas residuales que se producen en el país antes de ser vertidas a los cuerpos de aguas naturales o reutilizadas. En países industrializados se han venido realizando investigaciones para la eliminación del amonio presente en aguas residuales mediante bacterias Anammox, microorganismos capaces de oxidar el amonio en condiciones anaerobias con producción de N_2 . Con este tipo de tecnologías se eliminan los intermediarios de óxidos nitrosos que contribuyen al efecto invernadero (Cervantes-Carillo, 2000; Inamori, 2007) se disminuyen los costos de aireación y adición de compuestos orgánicos como el metanol, usados en los procesos convencionales de denitrificación.

Las investigaciones existentes en la región describen la eficiencia de eliminación de compuestos nitrogenados como porcentajes de eliminación. En sistemas ubicados en países con estaciones se ha hecho más énfasis en el estudio microbiológico (Noophan, 2009; Qiao, 2009; Sánchez-Melsió, 2009; Xiao, 2009). Sin embargo, se desconoce si ocurre lo mismo con el componente microbiológico y su relación con la eficiencia de los tratamientos en las condiciones de diversidad de trópico en presencia del tipo de contaminantes y en las condiciones climáticas propias de la zona. Hoy se reconoce que el conocimiento y evaluación de la diversidad de los microorganismos en los sistemas de tratamiento biológico y el entendimiento de la interacción metabólica que existe entre ellos son herramientas para mejorar el rendimiento en los procesos e implementar sistemas biotecnológicos innovadores de tratamiento de aguas residuales o componentes específicos en ellos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El ciclo global del nitrógeno

Definido como 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 mediante denitrificación y oxidación anaerobia, cerrando el ciclo (Warakomski, 2007). El ciclo del nitrógeno se constituye como componente mayoritario de proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares; la mayor parte del nitrógeno utilizable está en forma inorgánica, bien sea como amoníaco o nitrato. Sin embargo, acciones antropogénicas, como la producción industrial de NH_4^+ y NO_3^- como fertilizantes para sostener el incremento acelerado de la población humana (Gruber, 2008), la combustión de hidrocarburos fósiles y la descarga de aguas residuales, entre otras, han acelerado y desbalanceado considerablemente el ciclo del nitrógeno, con efectos negativos, tales 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, 2003). Las formas del nitrógeno pueden ser "no reactivas" como el N_2 o "reactivas" (Nr) como se encuentra en todas sus otras formas (Galloway, 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, 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, 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 oxido-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). Detalles de los procesos de la actividad microbiana en la transformación del nitrógeno incluyendo los conocimientos más recientes han sido publicados recientemente (Sánchez, 2009).

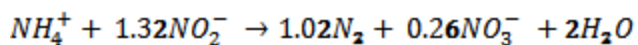
Intervención del proceso Anammox en el ciclo del nitrógeno

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, 2005). La contribución del proceso Anammox a nivel del ciclo global del N se

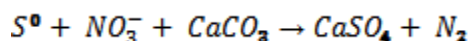
calcula entre el 30% y el 50% de la producción total de N_2 , específicamente en los sedimentos marinos (Hamersley, 2007)

Oxidación anaerobia del NH_4^+ (Anammox)

Anammox (Ananerobic Ammonium Oxidation) es un proceso que consiste en la reducción del NO_2^- acoplada a la oxidación del NH_4^+ (Schmid, 2005) para formar N_2 . Hasta 1995, el proceso de nitrificación conocido estaba relacionado con el consumo de oxígeno; es decir, el NH_4^+ se consideraba relativamente estable en condiciones anóxicas, pero algunos investigadores 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 aceptor final; a este proceso se le denominó Anammox (Graff, 1995; Mulder, 1995); posteriormente otros investigadores coincidieron en que la clave para la oxidación del NH_4^+ era el NO_2^- como aceptor de electrones y no el NO_3^- (Jin, 2008). Sin embargo, actualmente pruebas con isótopo ¹⁵ y otros experimentos reportan la posibilidad de que el aceptor de electrones puede ser tanto el NO_3^- como el NO_2^- (Kartal, 2007). El NH_4^+ podría ser oxidado por dos vías: la primera hipótesis es que el NH_4^+ es oxidado hasta Hidroxilamina, la cual a su vez es oxidada a nitrito por la enzima Hidroxilamina Oxidoreductasa (HAO) que contiene 24 citocromos c, involucrados en el proceso de transferencia de electrones (Kuenen, 2008); posteriormente el NH_4^+ y el NO_2^- son convertidos a N_2 (Ye, 2001). La segunda hipótesis plantea que el NO_2^- es reducido por la nitrito oxidoreductasa a hidroxilamina y que de alguna manera esta última reacciona con el NH_4^+ , conduce a la producción de N_2 , con Hidracina como intermediario de este último paso (Jetten, 2001) por medio de la hidracina oxidasa o la HAO, la hidroxilamina actúa como aceptor de electrones oxidando hidracina a N_2 (Chamchoi, 2007). La hidracina, usada como combustible de cohetes, es altamente tóxica y hasta el momento no había sido reportado su presencia en otros microorganismos (Pilcher, 2005). Finalmente, en presencia de NH_4^+ y NO_2^- en proporciones similares, las comunidades Anammox actúan eficientemente en la producción de N_2 (Strous, 1997). El nitrito, que actúa como aceptor de electrones, no está disponible bajo condiciones anóxicas, razón por la cual la oxidación anaerobia de amonio depende de su transporte desde capas óxicas (Schmidt, 2002). Basada en el balance de masa de comunidades enriquecidas de bacterias Anammox, la estequiometría de la segunda reacción es presentada de la siguiente manera:



(van. Dongen, 2001; Goven, 2005). Algunos estudios demuestran que el radio estequiométrico de consumo de NH_4^+ , consumo de NO_2^- y producción de NO_3^- es de 1:1.2:0.33 (Tsushima, 2007). Otras formas de denitrificación autótrofa incluyen la relacionada con algunos microorganismos quimioautótrofos oxidadores del azufre, como son los *thiobacillus denitrificans*, los cuales son anaerobios facultativos y utilizan el NO_3^- como aceptor final de electrones:



(Maier, 2000).

Biología de bacterias Anammox

Las bacterias ANAMMOX, denominadas así por el tipo de metabolismo que realizan oxidación anaerobia de amonio (anaerobic ammonium), fueron descubiertas en lodos de aguas residuales a principios de los años 90 (Mulder *et al.*, 1995). Sin embargo, la discusión de la posibilidad de que ocurriese esta reacción se venía dando desde 1977 por algunos investigadores y 10 años después en una compañía de fermentación en Holanda se observó que el amonio desapareció con un claro incremento del N_2 (Jetten, 2004). Éstas corresponden a microorganismos quimiolitautótrofos que oxidan el NH_4^+ con nitrito o nitrato como aceptor de electrones, obteniendo energía para la fijación de CO_2 y produciendo N_2 ; poseen una versatilidad metabólica con capacidad de oxidar cadenas de ácidos grasos en presencia de NO_2^- o NO_3^- , actuando en la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (RDNA), versatilidad que tiene importantes aplicaciones ecológicas y bioquímicas, ya que extienden su espectro ambiental (Galán, 2009). Estudios adicionales demuestran que las bacterias Anammox pueden usar algunos compuestos orgánicos como fuente de carbono, aunque las mismas han sido descritas como quimiolitautótrofas obligadas; también se ha observado que pueden ser inhibidas por algunos compuestos orgánicos como el metanol (Goven, 2005).

Taxonomía de bacterias Anammox

Las bacterias Anammox, pertenecen al dominio *Bacteria*, *Phylum Planctomycetes*, clase *Planctomycetia*, orden *Planctomycetales* (descubiertas en 1986 por Schlessner y Stackebrandt) y a la familia *Planctomycetaceae*, donde

se incluyen 4 géneros, *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* e *Isosphaera*. (Schmidt, 2002). El proceso ANAMMOX es realizado por un grupo de microorganismos, *Planctomyces*, de los cuales 5 subgéneros han sido reportados y nombrados provisionalmente (Chamchoi, 2007), *Brocadia* (*anamoxidans* y *fulgida*), *Kuenenia* (*stuttgartiensis*), *Scalindua* (*Wagneri*, *Brodae*, *sorokini*), *Anammoxoglobus* (*propionicus*) y *Jettenia* (*asiatica*) (Yang, 2007).

Estructura celular de bacterias Anammox

La secuencia genómica del planctomycete *Pirellula* es característica de una bacteria, aunque el 8% y el 9% se asemejan a Eucariotas y Arqueas, respectivamente (Jetten, 2004). Las bacterias Anammox son coloides, de menos de un micrómetro de diámetro y no pueden ser cultivadas en el laboratorio por técnicas convencionales (Chamchoi, 2007). Poseen compartimientos sub-celulares (organelas) de doble membrana, que los hacen similares a los Eucariotas y la ausencia de un polímero de peptidoglicano en su pared celular que los asemeja a las Arqueas (Pilcher, 2005). Las funciones de estas organelas están bajo estudio y se considera que en ellas se desarrolla la oxidación anaerobia de amonio, ésta es llamada anamoxisoma (Kuenen, 2008) y corresponde a más del 30% del volumen celular (Jetten, 2004); entre otras funciones atribuidas a este compartimiento, se encuentran la división celular y replicación cromosómica. Las bacterias ANAMMOX expresan en la membrana del anamoxisoma lípidos *ladderane*, descritos como lípidos inusuales de baja energía y muy inestables, además de lípidos hopanoides (Jetten, 2004).

La densidad e impermeabilidad de los lípidos evitan que los compuestos tóxicos intermediarios de la reacción, como la N_{24} , se dirijan al espacio extracelular (Pilcher, 2005) y afecten las demás funciones celulares (Innerebner, 2007). Los lípidos *ladderane* tienen de 3 a 5 enlaces lineales concatenados de ciclobutano, tanto éster como éter (Schmid, 2003).

Otras organelas de los planctomycetes son: el pirelulosoma que contiene un nucleoide, el riboplasma que contiene los ribosomas (Schmid, 2003) y el perifoplasma sólo en las ANAMMOX; es periférico y contiene el citoplasma separado de los demás compartimientos al interior de la célula por una membrana intracitoplasmática (Mike, 2001) (ver Figura 1).

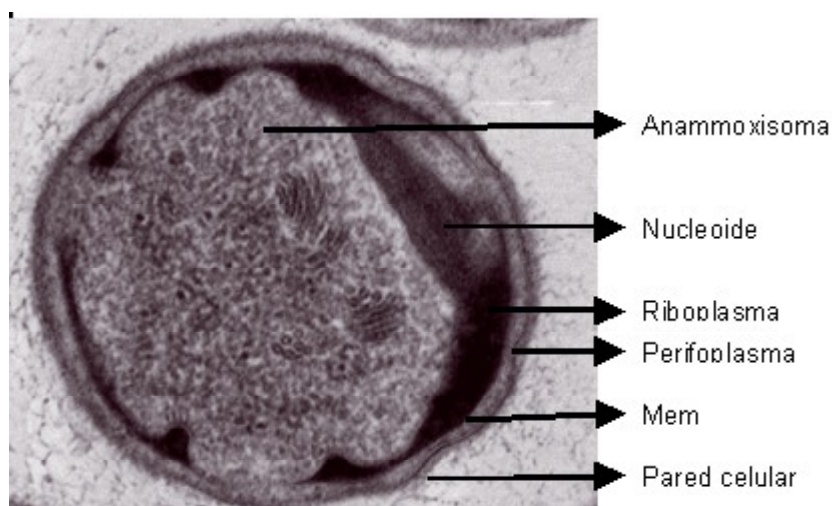


Figura 1 Microfotografía electrónica de Estructura celular (Kuenen, 2008)

3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Usando sondas de oligonucleótidos de RNA ribosomal subunidad 16S para la aplicación en la técnica Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH), se han detectado bacterias ANAMMOX en diferentes hábitats, tales como, plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos de aguas frescas y ecosistemas marinos (Kuenen, 2008) como zonas subóxicas del Mar Negro (género *Scalindua*) (Reginatto, 2005). Se encuentran generalmente en forma de biopelículas o flóculos en diversos ecosistemas acuáticos, con condiciones limitantes de oxígeno o interfase oxico/anóxico (Cirpus, 2006).

FISH es una técnica molecular que ha sido ampliamente usada en la cuantificación y descripción de células microbianas presentes en lodos activados y aguas residuales (Daims, 2007; Gilbride, 2006; Hung, 2005; Moter, 2000). En esta técnica, los microorganismos son tratados con un fijador e hibridados con sondas específicas marcadas con colorantes fluorescentes en una lámina portaobjetos. Posteriormente las láminas son observadas en un microscopio de fluorescencia (Göbel, 2000). Según las más recientes investigaciones realizadas al ciclo del nitrógeno en aguas residuales, las sondas más usadas para su análisis por el método de FISH son: NSO 1225, género *Nitrosomonas*, NIT3, género *Nitrobacter*, 820 Bacterias ANAMMOX y PLA 46, Orden *Planctomycetales* (Chamchoi, 2007; Ismail, 2007; Kindaichi, 2007).

Otra técnica molecular ampliamente usada en la microbiología ambiental para la detección de microorganismos en muestras ambientales es la PCR Reacción en cadena de la Polimerasa, la cual consiste en la amplificación selectiva de fragmentos cortos de DNA y se fundamenta en la propiedad de las enzimas DNA polimerasas para replicar hebras de DNA. Se realiza en varios ciclos alternando la temperatura para separar las hebras de DNA, alinear los primers o cebadores y replicar el DNA por medio de la enzima. La extracción de DNA de las muestras es un paso crucial, ya que de la calidad del DNA depende en gran medida el resultado de PCR. Generalmente se amplifican los fragmentos de genes que producen rRNA 16s, por ser una de las regiones más conservadas genéticamente, o fragmentos de genes de enzimas específicas.

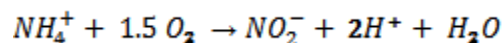
El DNA amplificado o producto PCR debe ser analizado para crear o interpretar la huella genética, normalmente se utiliza la "electroforesis". En esta técnica el DNA se separa en zonas según su tamaño molecular gracias a la acción de campos eléctricos (Rittmann, 2001). Algunos métodos complementarios o también llamados métodos basados en PCR de uso frecuente son la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y la Restricción de Polimorfismo de Longitud de Fragmento (RFLP) (Sáenz, 2007). En algunos estudios

donde se evalúan bacterias Anammox se han usado el primer Pla46f, en combinación con el primer 1378r, 1404r, o 907r (Innerebner, 2007) y el par amoA-1F y amoA-2R entre otros (Wang, 2009). Generalmente, los productos de PCR son separados en un gel de agarosa al 0,8% y visualizados con bromuro de etidio (Egli, 2003). Un ejemplo de aplicación de PCR en tiempo real fue usado en plantas de tratamiento para cuantificar la población de bacterias Anammox en un reactor de disco rotatorio (McMahon, 2008). La mezcla de dos o varias técnicas moleculares resulta muy útil para el estudio de las poblaciones microbianas presentes en los sistemas de tratamiento y su comportamiento en tiempo y en espacio, tales como DGGE, RFLP, secuenciación, Clonación, Citometría de flujo y FISH (Innerebner, 2007; McMahon, 2008)

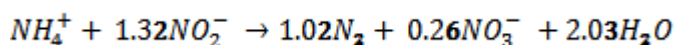
3.1. Aplicaciones potenciales del metabolismo Anammox en remoción de nitrógeno dentro de sistemas de tratamiento de agua residual

A partir de 1995 se inició el estudio y enriquecimiento de las poblaciones bacterianas responsables de ese proceso, dada su potencial aplicabilidad en el tratamiento de aguas residuales (Mulder *et al.*, 1995). Posteriormente se observó claramente que la clave para la oxidación del amonio era el nitrito como aceptor de electrones en cambio del nitrato y se experimentaron distintas configuraciones de reactores como biofiltros de corteza fija y fluidizada y se trataron los efluentes de la digestión de lodos, ricos en amonio, demostrando la aplicabilidad del proceso en la remoción de amonio y nitrito, muy eficiente cuando estos dos compuestos están en concentraciones parecidas (Strous, 1997). Los microorganismos que intervienen en el proceso son autótrofos, por lo que no requieren fuente de carbono; pero como se mencionó anteriormente requiere de una fuente de nitrito como aceptor de electrones para la remoción de amonio. Varios diseños incluyeron un paso previo de nitrificación parcial impidiendo la producción de nitratos; es decir, la oxidación de amonio a nitrito parcialmente, para luego oxidar el amonio en condiciones anaerobias. Ejemplos de estos diseños son el OLAND, CANON, SNAD, SHANON (Khin, 2004) y otros procesos combinados (Verstraete, 1998). Diferentes configuraciones de uno o dos reactores en serie, aerobias o anóxicas o combinadas, han demostrado ser eficientes para la remoción y aplicables en concordancia con las comunidades microbianas, sus requerimientos y metabolismos han sido probados. Algunos de los más experimentados y utilizados a escala real son los siguientes: 1)

CANON: (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite): proceso que utiliza un solo reactor en el cual las comunidades microbianas enriquecidas son autótrofas, fue concebido con la idea de tratar altas concentraciones de amonio (500-600 mg N/l). Las reacciones que intervienen son las siguientes:



(Khin, 2004), para la nitrificación (controlada, hasta lograr una relación $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ de 1.32) y

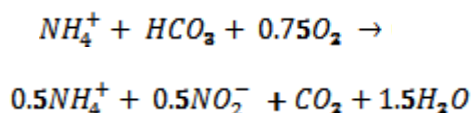


para la reacción Anammox (Ahn, 2006). Third *et al.* (2001), encontraron que en este sistema las bacterias aerobias oxidadoras de nitrito presentes en los flóculos experimentan una doble limitación, compiten con Nitrosomonas por el oxígeno y con ANAMMOX por el nitrito. Por el contrario, las oxidadoras de amonio tienen una sola limitación: de oxígeno las Nitrosomonas y de nitrito las ANAMMOX. El control de la aireación juega un papel muy importante en el sistema por la proliferación de oxidadoras de nitrito cuando hay una concentración alta de oxígeno disuelto y la inhibición de oxidadoras aerobias de amonio con bajas concentraciones (Third, *et al.*, 2001). El análisis de FISH de la biomasa de un reactor CANON mostró que el 40% de la población correspondía a bacterias aerobias oxidadoras de amonio y las células ANAMMOX constituían alrededor del 40% (Jetten, 2004). Otras ventajas son la reducción del 20% en emisiones de CO_2 y baja producción de lodo. 2)

OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification Denitrification): definido como el proceso en el cual el amonio es oxidado a nitrógeno molecular bajo condiciones de oxígeno limitadas, con las cuales se logra la nitrificación parcial; por lo cual, en realidad, se fundamenta en los mismos principios del proceso CANON, siendo su proceso similar pero aplicado en otras condiciones de reactor, específicamente en un reactor de biofiltro o de biomasa adherida; algunos autores consideran a estos dos como un mismo proceso (Hao, 2002).

3) **SHARON-Anammox:** El proceso combinado de nitrificación parcial con Anammox en dos reactores separados y en serie, normalmente llamado SHARON-ANAMMOX, consiste en la transformación aeróbica controlada del amonio a nitrito hasta oxidar aproximadamente el 44 % del amonio afluente en un reactor tipo SHARON para posteriormente en un reactor sucesivo Anammox ser denitrificado a Nitrógeno molecular. Es un proceso patentado, basado en la nitrificación parcial

($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$) por microorganismos aerobios y Denitrificación parcial ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2$) por microorganismos heterótrofos anaerobios facultativos. Generalmente el reactor Anammox es del tipo SBR (Secuencial Batch Reactor). SHARON-ANAMMOX transforma en primer reactor NH_4^+ a NO_2^- hasta oxidar aproximadamente el 44 % del NH_4^+ (van Dongen *et al.*, 2001; Third *et al.*, 2001) para posteriormente, en un reactor sucesivo Anammox ser convertido a N_2 . Se produce poco lodo y solo requiere el 40 % de la energía de aireación requerida en un proceso convencional de remoción de Nitrógeno (Hao *et al.*, 2002). El efluente del reactor SHARON modificado contiene, entonces, una mezcla de amonio y nitrito, ideal para el proceso Anammox, en el cual estos dos compuestos son convertidos a nitrógeno gaseoso. Las aguas residuales ahí tratadas deben tener concentraciones de amonio superiores a 0,5 gr./L. No requiere retención de biomasa (Ahn, 2006). La reacción en el reactor SHARON se puede generalizar de la siguiente manera (Khin y Annachate, 2004):



Las plantas instaladas en diversos países se concentran en el tratamiento de aguas residuales de alta tasa, generalmente de origen municipal y agroindustrial. Los reportes de operación señalan ventajas, como disminución en más del 50% de O_2 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, 2006; Jardin, 2006; Keeley 2006; Abma, 2007). El uso de reactores Anammox puede conducir a una reducción de los costos operacionales de hasta un 90 % (Jetten, 2004). Recientemente la compañía PAQUES de los Países Bajos ha hecho un acuerdo para el diseño e instalación de un sistema para tratamiento de efluentes para la remoción de amonio usando el proceso de Anammox, que tiene una capacidad para la conversión de 11 toneladas de nitrógeno por día. El tamaño de la planta es casi diez veces más grande que la planta más grande construida hasta ahora. El proceso de Anammox se ha desarrollado en asociación con la Universidad Técnica de Delft y la Universidad Nimega de Radboud. Una diferencia importante con el sistema convencional

de lodos activados es justamente la conversión del nitrógeno con el proceso de Anammox que no consume carbón orgánico, pero además propone la producción de biogas. En Brasil se han realizado investigaciones del uso de Anammox en sistemas para tratamiento de residuos de ganadería usando inóculos nativos alcanzando altas tasas de remoción y se está estudiando el desarrollo de prototipos usando aguas residuales provenientes de explotaciones porcinas, con el objetivo de minimizar el impacto de las aguas residuales del ganado en los recursos hídricos (Kunz, 2007). La configuración de los reactores para diferentes aplicaciones son descritas en diferentes publicaciones (Molinuelo, 2009; Furukawa, 2009; Wang, 2009; Chen, 2009); no obstante, en Latinoamérica, con excepción del Brasil, la tecnología es poco conocida.

4. CONCLUSIONES

El estudio de los procesos Anammox permite la construcción de reactores eficientes, sostenibles y adaptables a las condiciones locales para la remoción de compuestos nitrogenados de las aguas residuales domésticas con el fin de contribuir a la descontaminación de los cuerpos de aguas receptores.

La interrelación de las comunidades microbianas en los procesos del ciclo del N permite esperar que conglomerados microbianos colocados en reactores especializados logren la remoción de contaminantes en los sistemas de tratamiento.

Debido a la diversidad metabólica que presentan las comunidades Anammox, es necesario que las investigaciones propuestas definan las diferentes rutas metabólicas, sus sustratos y productos para mejorar su desarrollo e incrementar la eficiencia en la remoción de nitrógeno en reactores biológicos.

La investigación debe enfocarse al aislamiento, enriquecimiento y el cultivo de cepas locales en las diferentes latitudes en donde su aplicabilidad sea pertinente, realizando análisis cuantitativos para determinar la densidad celular de bacterias presente en la biomasa producida en los reactores.

Es importante definir la diversidad metabólica y funcionalidad de cada una de las rutas metabólicas en las cuales las bacterias Anammox intervienen, enten-

diéndose como funcionalidad las razones por las que realiza determinada ruta.

Como una alternativa sostenible y de bajo costo, este grupo bacteriano puede incluirse en los sistemas de tratamiento en condiciones de escala real, dada su contribución comprobada de formación de N_2 a partir de especies nitrogenadas presentes en exceso en las aguas residuales domésticas.

Finalmente, otro punto de interés particular es determinar experimentalmente si es posible la conversión del NH_4^+ a N_2 por bacterias Anammox, sin adición externa de NO_2^- (directa o indirecta).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abma, W.R., Schultz, C.E., Mulder J.W., van der Star W.R.L., Strous, M., Tokutomi, T. y van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Full-scale granular sludge Anammox process. *Water Science & Technology* 55(8-9):27.
- Ahn, Y-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* 41(8):1709-1721.
- Ahn, Y-H y Choi, H.C. (2006). Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochemistry* 41(9):1945-1950.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología-México* 42(2):73-82.
- Cirpus, I.E.Y., Geerts, W., Hermans, J.H.M., Op den Camp, H.J.M., Strous, M., Kuenen, J. G. y Jetten, M.S.M. (2006). Challenging protein purification from anammox bacteria. *International journal of biological macromolecules* 39(1-3):88-94.
- Chamchoi, N. y Nitisoravut, S. (2007). Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere* 66(11):2225-2232.
- Chen, H., Liu, S., Yang, F., Xue, Y. y Wang, T. (2009). The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresource Technology* 100(4):1548-1554.
- Daims, H. y Wagner, M. (2007). Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Applied microbiology and biotechnology* 75(2):237-248.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B. y Canfield, D.E. (2005). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology* 156(4):457-464.
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A.J.B. y Van der Meer, J.R. (2003). Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial ecology* 45(4):419-432.
- Francis, C.A., Beman, J.M. y Kuypers, M.M.M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* 1(1):19-27.
- Furukawa, K., Inatomi, Y., Qiao, S., Quan, L., Yamamoto, T., Isaka, K. y Sumino, T. (2009). Innovative treatment system for digester liquor using anammox process. *Bioresource Technology* 100(22):5437-5443.
- Galán, A., Molina, V., Thamdrup, B., Woebken, D., Lavik, G., Kuypers, M.M.M. y Ulloa, O. (2009). Anammox bacteria and the anaerobic oxidation of ammonium in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Research Part II* 56(16):1125-1135.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erismann, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S.P. y Sutton, M.A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320(5878):889.
- Gilbride, K.A., Lee, D.Y. y Beaudette, L.A. (2006). Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods* 66(1):1-20.
- Gruber, N. y Galloway, J.N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451(7176):293-296.
- Guyen, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S. M. y others. (2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2):1066-1071.
- Hamersley, M.R., Lavik, G., Woebken, D., Rattray, J.

- E., Lam, P., Hopmans, E.C., Damsté, J.S.S., Kruger, S., Graco, M., Gutiérrez, D. y others. (2007). Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnology and Oceanography* 52(3):923.
- Hao, X., Heijnen, J.J. y Van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process. *Water Research* 36(19):4839-4849.
- Hug, T., Gujer, W. y Siegrist, H. (2005). Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy. *Water Research* 39(16):3837-3848.
- Inamori, R., Gui, P., Dass, P., Matsumura, M., Xu, K.Q., Kondo, T., Ebie, Y. y Inamori, Y. (2007). Investigating CH₄ and N₂O emissions from eco-engineering wastewater treatment processes using constructed wetland microcosms. *Process Biochemistry* 42(3):363-373.
- Innerebner, G., Insam, H., Franke-Whittle, I.H. y Wett, B. (2007). Identification of anammox bacteria in a full-scale deammonification plant making use of anaerobic ammonia oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 30(5):408-412.
- Jardin, N., Thö, I. D. y 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., van Niftrik, L., van de Pas-Schoonen, K.T., Sliekers, O., Haaijer, S., van der Star, W., Schmid, M., van de Vossenberg, J., Schmidt, I., Harhangi, H., van Loosdrecht, M., Gijs Kuenen, J., Op den Camp, H. y Strous, M. (2005. 1994-2004): 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions* 33(Pt 1):119-123.
- Jetten, M.S.M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M., Kuenen, G. y Strous, M. (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation('anammox') process. *Current Opinion in biotechnology* 12(3):283-288.
- Jin, R-c., Hu, B-l., Zheng, P., Qaisar, M., Hu, A-h y Islam, E. (2008). Quantitative comparison of stability of ANAMMOX process in different reactor configurations. *Bioresource Technology* 99(6):1603-1609.
- Kartal, B., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Schalk, J., Op den Camp, H.J.M. y Jetten(2007). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology* 9(4):635-642.
- Keeley, J. (2006). Balancing technological innovation and environmental regulation: an analysis of Chinese agricultural biotechnology governance. *Environmental Politics* 15(2):293.
- Khin, T. y Annachhatre, A.P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology advances* 22(7):519-532.
- Kindaichi, T., Tsushima, I., Ogasawara, Y., Shimokawa, M., Ozaki, N., Satoh, H. y Okabe, S. (2007). In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73(15):4931.
- Kuenen, J.G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Micro* 6(4):320-326.
- Kunz, A., Vanotti, M., Szogi, A., Garcia, M-C., Francisco, S. y Moreira, H. (2007). Development of ANAMMOX Process For Animal Waste Treatment: Experiences in Brazil. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. p 16-19.
- Maier, R.M., Pepper, I.L. y Gerba, C.P. (2000). *Environmental Microbiology*. PRESS A, editor. San Diego, California.
- McMahon, K.D., Gu, A.Z., Nerenberg, R. y Angenent, L.T. (2007). Molecular Methods in Biological Systems. *Water Environment Research* 79:1109-1151.
- Molinuevo, B., García, M.C., Karakashev, D. y Angelidaki, I. (2009). Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance. *Bioresource Technology* 100(7):2171-2175.
- Moter, A. y Göbel, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods* 41(2):85-112.
- Mulder, A., Graaf, A.A., Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16(3):177-184.
- Mulder, J.W., Duin, J.O.J., Goverde, J., Poiesz, W. G., van Veldhuizen, H.M., van Kempen, R. y 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.
- Nieder, R. y Benbi, D.K. (2008). Carbon and Nitrogen Cycles in Terrestrial Ecosystems. Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment. p 45-80.
- Noophan L.P, Sripiboon S, Damrongsri, M. y Munakata-Marr, J. (2009). Anaerobic ammonium oxidation by *Nitrosomonas* spp. and anammox bacteria in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management* 90(2):967-972.
- Pilcher, H. (2005). Microbiology: Pipe dreams. *Nature* 437(7063):1227-1228.
- Qiao, S., Kawakubo, Y., Cheng, Y., Nishiyama, T., Fujii, T. y Furukawa, K. (2009). Identification of bacteria coexisting with anammox bacteria in an upflow column type reactor. *Biodegradation* 20(1):117-124.
- Reginatto, V., Teixeira, R.M., Pereira, F., Schmidell, W., Furigo, Jr. A., Menes, R., Etchebehere, C. y Soares, H.M. (2005). Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22:593-600.
- Sánchez-Melsió, A., Cáliz, J., Balaguer, M.D., Colprim, J. y 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(2):169-179.
- Sánchez, J. y Sanabria, J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(1):114-124.
- Sanz, J.L. y Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42(2):119-133.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W. I., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M. y Strous, M. (2003). Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 26(4):529-538.
- Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Cirpus, I., Strous, M., Bock, E., Kuenen, J.G. y Jetten, M.S.M. (2002). Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria - competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology* 39(3):175-181.
- Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. y 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(8):1955-1962.
- Third, K.A., Sliekers, A.O., Kuenen, J.G. y 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. *Systematic and Applied Microbiology* 24(4):588-596.
- Townsend, A.R., Howarth, R.W., Bazzaz, F.A., Booth, M.S., Cleveland, C.C., Collinge, S.K., Dobson, A.P., Epstein, P.R., Holland, E.A., Keeney, D.R., Mallin, M.A., Rogers, C.A., Wayne, P. y Wolf, A.H. (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. y Okabe, S. (2007). Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research* 41(8):1623-1634.
- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., De Bruijn, P., Jetten, M.S., Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and environmental microbiology* 61(4):1246.
- Van Dongen, L., Jetten, M.S.M. y Van Loosdrecht, M.C.M. (2001a). The combined SHARON/Anammox process.
- Van Dongen, U., Jetten, M.S.M., Van Loosdrecht, M.C.M. y others. (2001b). The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water science and technology* 44(1):153-160.
- Verstraete, W. y Philips, S. (1998). Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution* 102(1, Supplement 1):717-726.
- Wang, T., Zhang, H., Yang, F., Liu, S., Fu, Z. y Chen, H. (2009). Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 100(9):2501-2506.
- Warakomski, A., Kempen, Rv. y Kios, P. (2007). Microbiology/Biochemistry of the Nitrogen Cycle. Innovative Process Applications. Moving forward wastewater biosolids sustainability: technical, managerial, and public synergy. New Brunswick: GMSC. p 277-285.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.