

# Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales

FRANCISCO CERVANTES-CARRILLO, JAIME PÉREZ Y JORGE GÓMEZ\*

*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. AP 55-535, 09340 Iztapalapa, D. F., México. Fax: (525) 7 24 47 12.*

\*E-mail: dani@xanum.uam.mx

Received 23 January 2000/Accepted 25 April 2000

**ABSTRACT.** This review contains the advances about the nitrogen cycle and biological removal of nitrogen from wastewaters. A review of the factors affecting the nitrification and denitrification on the accumulation of intermediates during the nitrogen removal processes is made, as well as alternatives to achieve sustainable processes. It is included a review of the newest biotechnologies performed for nitrogen removal from wastewaters, emphasizing the employment of ammonium as electron donor to denitrify high nitrogen loading rates.

**Key words:** nitrogen cycle, nitrification, denitrification, wastewaters.

**RESUMEN.** En la presente revisión se presentan algunos de los avances en el conocimiento del ciclo del nitrógeno y en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. Se revisan algunos de los factores señalados como causantes de la acumulación de compuestos intermediarios durante la nitrificación y desnitrificación y se describen alternativas recientes para obtener procesos de tratamiento de aguas residuales sustentables, resaltando el empleo del amonio como fuente de electrones para lograr la desnitrificación de cargas altas nitrogenadas.

**Key words:** nitrogen cycle, nitrification, denitrification, wastewaters.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los contaminantes más importantes del agua es el nitrógeno, pues las actividades agrícolas e industriales han aumentado casi al doble la concentración de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera.<sup>6,9</sup> Parte importante de este nitrógeno llega a los diferentes cuerpos de agua en la forma de amonio, nitrato y nitrito, creando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, además de cambios ambientales como la eutroficación de lagos.<sup>41</sup> Es necesario, entonces, encontrar sistemas que mantengan la concentración de compuestos nitrogenados dentro de niveles que no causen el deterioro de los ríos, lagos y mares.

Existen métodos fisicoquímicos y biológicos para la eliminación de nitrógeno del agua.<sup>20</sup> Los primeros, en la mayoría de los casos, no resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los métodos biológicos sí eliminan al contaminante y, en condiciones idóneas, sus productos finales son CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.<sup>29</sup>

Los compuestos nitrogenados constituyen nutrientes clave para el crecimiento de los seres vivos,<sup>10</sup> así que el nitrógeno puede ser eliminado del agua si es asimilado por microorganismos, pero el manejo de la biomasa producida de este modo resulta en sí un problema. Por ello, los procesos biológicos no asimilativos, como la nitrificación y la

desnitrificación, han constituido la forma más efectiva, sostenible y económicamente factible de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales.<sup>29</sup>

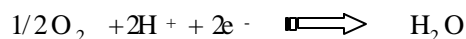
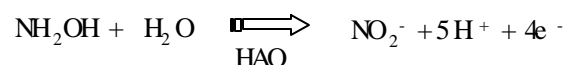
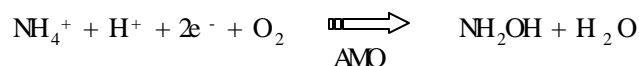
## NITRIFICACIÓN

La nitrificación es un proceso aerobio realizado por microorganismos Gram-negativos litotautotróficos que pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae, no son esporulados y pueden ser esféricos, bacilares o espirales.<sup>26,49</sup> Los cultivos nitrificantes generalmente tienden a formar estructuras denominadas flóculos, cuya estabilidad parece depender de la formación de sustancias exopoliméricas.<sup>42</sup> El proceso respiratorio nitrificante se lleva a cabo en dos etapas: 1) oxidación de amonio a nitrito y 2) oxidación de nitrito a nitrato. En cada una de ellas participan microorganismos de géneros diferentes, es decir, no se han identificado microorganismos que puedan convertir directamente el amonio a nitrato.<sup>49,65</sup>

La oxidación del amonio se realiza por bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus*, entre otros. En un primer paso, la enzima amonio mono-oxigenasa (AMO) transforma al amonio en hidroxilamina, que posteriormente se convierte en nitrito, mediante la hidroxilamina óxido-

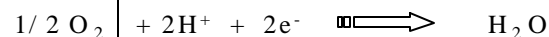
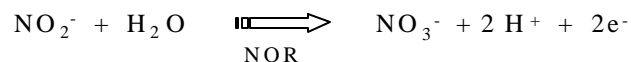


reductasa (HAO).<sup>34, 40:</sup>



Durante esta etapa ocurre el mayor consumo de oxígeno (4.33 mg O<sub>2</sub> / mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado), además de que se generan iones hidrógeno, propiciando en el cultivo un descenso del pH.<sup>19</sup> La enzima AMO es membranaral,<sup>38</sup> mientras que la HAO se localiza en el periplasma.<sup>31</sup> La oxidación de la hidroxilamina aporta 4 electrones, único sitio reductor en donde se genera energía, lo que explica por qué estas bacterias tienen un rendimiento de crecimiento muy bajo.

La oxidación del nitrito a nitrato la pueden realizar bacterias del género *Nitrobacter* y *Nitrosococcus*, por citar dos ejemplos, mediante la acción de la nitrito óxido-reductasa (NOR):



Esta enzima es un complejo enzimático formado por el citocromo *c*, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH. Esta reacción implica la generación de un potencial redox de +430 mV el cual se emplea en la fosforilación oxidativa y para la reducción del NAD.<sup>26</sup> De esta forma, el rendimiento celular es alrededor de 0.08 g células/g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para las oxidantes de amonio y 0.05 g células/g N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para las oxidantes de nitrito.<sup>70</sup>

Los valores de la constante de afinidad, K<sub>s</sub>, descritos para ambas etapas de la nitrificación muestran variaciones notorias.<sup>5</sup> Para la oxidación del amoníaco a nitrito, los valores de K<sub>s</sub> van de 0.063 a 4.59 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/m<sup>3</sup>, y para el nitrito a nitrato van de 0.34 a 1.9 g N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/m. Las variaciones tan grandes podrían deberse a que su determinación se realizó bajo una diversidad de condiciones experimentales, en consorcios microbianos (lodos) y cultivos axénicos.

Existen evidencias de que no todas las bacterias nitrificantes son litoautótrofas y aerobias estrictas. Por ejemplo, *Nitrosomonas* puede presentar una respiración facultativa si se cultiva en un medio anaerobio con nitrito e hidrógeno como fuente de energía.<sup>9</sup> Por otro lado, *Thiosphaera pantotropa* puede desarrollarse heterotróficamente, como *Nitrobacter*, cuando crece en un medio con acetato.<sup>52</sup> Así, la eficiencia nitrificante disminuye por la mayor asimilación de nitrógeno.

Algunos de los factores ambientales que controlan la nitrificación y el crecimiento microbiano son la temperatura, el oxígeno y el pH. Se sabe que la velocidad específica

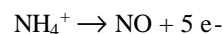
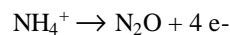
de crecimiento (μ, h<sup>-1</sup>) se modifica con la temperatura. En relación a esto, los valores de μ<sub>max</sub> de cultivos axénicos caen dentro del intervalo entre 0.014 y 0.064 h<sup>-1</sup>,<sup>49</sup> en el intervalo de temperatura de 15 a 32 °C. En una planta de tratamiento el intervalo de velocidades puede ser más amplio.

El oxígeno parece ser la variable más importante en la nitrificación.<sup>59</sup> Los resultados son variables y suponen que la concentración de oxígeno disuelto sigue una relación tipo Monod:

$$\mu = \mu_m [C]/K_c + [C]$$

donde C es la concentración de oxígeno disuelto y K<sub>c</sub> es el coeficiente de saturación. Los valores promedio para la K<sub>c</sub> varían entre 1.0 y 1.3 mg/l, aunque no se debe tomar como norma.<sup>71</sup> Como bien se sabe, la saturación depende de otras variables, destacando la temperatura y la concentración de los demás solutos presentes. *Nitrosomonas europaea* produce NO y N<sub>2</sub>O a partir de hidroxilamina, cuando la concentración de oxígeno disuelto es muy baja.<sup>33</sup> Un caso especial es el de *Alcaligenes faecalis*, que bajo condiciones totalmente aerobias produce N<sub>2</sub>O a partir de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

En los dos casos mencionados es escasa la información sobre el mecanismo que lleva a la formación de los óxidos de nitrógeno, sin embargo, es evidente el papel regulador que ejerce el oxígeno.<sup>2, 53</sup> De algún modo, esto ya sugiere que los microorganismos nitrificantes pueden ser de respiración facultativa. El rendimiento energético para las bacterias nitrificantes es menor cuando se forman los óxidos nítrico y nitroso, que cuando se forma nitrato por la oxidación del amonio, dado el siguiente flujo de electrones:



Por lo tanto, el crecimiento de las bacterias nitrificantes será aún menor.<sup>15</sup> De hecho, en función de la concentración de O<sub>2</sub> el proceso nitrificante se puede volver desnitrificante. De esta manera, se puede pensar que la formación de NO y N<sub>2</sub>O es una ruta de emergencia para la obtención de energía cuando el oxígeno está limitado.

En relación al pH, se ha observado que la K<sub>s</sub> de *Nitrosomonas* para la fuente nitrogenada aumenta a valores ácidos, por lo que se ha concluido que el sustrato para la oxidación es el amoníaco y no el ión amonio.<sup>37</sup> Sin embargo, es necesario más trabajo para desligarlo de otros eventos que el propio cambio de pH implica. Podría generalizarse que los nitrificantes se ven favorecidos por un ambiente alcalino próximo a un pH de 8. La nitrificación se detiene por completo a valores por debajo de 5,<sup>49</sup> aunque no es claro si el agente causal es el pH o la acumulación de ácido nitroso, el cual inhibe la oxidación de amonio.<sup>4</sup>

## DESNITRIFICACIÓN

Una vez que se ha oxidado el amonio a nitrato, este último puede ser reducido a  $N_2$  mediante la desnitrificación biológica.<sup>39</sup> La desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio heterotrófico del tipo anóxico (similar al de los microorganismos de respiración aerobia) donde la reducción del nitrato hasta  $N_2$  sigue una serie de pasos que involucran la actividad de enzimas diferentes.<sup>63</sup> Los géneros desnitrificantes más citados incluyen, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. La mayoría de ellos son heterótrofos, pero algunos pueden crecer autotróficamente en hidrógeno y  $CO_2$ , o en compuestos sulfurados reducidos.<sup>64</sup> La mayoría de estos microorganismos poseen la enzima nitrato reductasa para reducir nitrato a nitrito. Algunas especies, como *Pseudomonas aureofaciens*, no poseen la óxido nitroso reductasa, así que su producto final es  $N_2O$ .<sup>61</sup>

El primer paso de la desnitrificación es la reducción de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , catalizado por la nitrato reductasa. Se han identificado dos tipos de nitrato reductasa, una membranal de tres subunidades (120, 60 y 20 kDa), que emplea ubihidroquinona en el transporte de electrones y cuyo centro activo se orienta hacia el citoplasma. La otra es una enzima soluble que se localiza en el periplasma, está formada por dos subunidades (94 y 19 kDa) y aún no está bien caracterizada.<sup>6,57</sup> En general, se asume que la reducción de nitrato a nitrito ocurre a través de molibdeno como centro.<sup>40,60</sup>

El segundo paso es la reducción de  $NO_2^-$  a  $NO$  por medio de la nitrito reductasa. Se han identificado dos tipos, una contiene cobre, mientras que la otra contiene el hemo  $cd_1$ .<sup>37</sup> La que contiene cobre es un homotrímero con dos átomos de cobre por monómero,<sup>25</sup> mientras que la que contiene el hemo  $cd_1$  es un homodímero con un hemo c y un hemo  $d_1$  por cada monómero.<sup>23</sup>

La reducción de  $NO$  a  $N_2O$ , está catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática.<sup>27</sup> Ha sido aislada de *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*. Está formada por una subunidad, de 16 kDa que contiene un hemo c y otra de 53 kDa que incluye un hemo b.<sup>11</sup> De las enzimas de la desnitrificación, ésta es la menos caracterizada.<sup>40</sup>

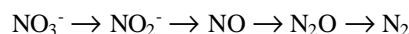
La última etapa de la desnitrificación es la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$ . Es llevada a cabo por la óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Contiene ocho átomos de cobre distribuidos en dos monómeros de aproximadamente 70 kDa, cada uno.<sup>3,16</sup> Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno.<sup>22</sup> Debido a esto, es importante evitar la entrada de oxígeno en el proceso desnitrificante para no liberar  $N_2O$ , gas que contribuye al efecto invernadero del planeta.<sup>33</sup> Evidencias recientes han mostrado que la concentración de cobre en el influente de un reactor continuo desnitrificante juega un papel importante para evitar la acumulación de  $N_2O$  durante la eliminación de concentraciones altas de nitrato.<sup>13</sup>

La cinética de la desnitrificación se puede representar por el modelo de Monod, teniendo en cuenta ambos sustra-

tos, de manera que:

$$\mu = \mu_m * \left[ \frac{S}{K_s + S} \right] * \left[ \frac{N}{K_n + N} \right]$$

donde S y N son, respectivamente, las concentraciones de los sustratos orgánicos y nitrogenados, y  $K_s$  y  $K_n$  sus respectivas constantes de saturación.<sup>71</sup> Se ha mencionado que el valor de la constante de saturación  $K_n$  del nitrato es muy baja (alrededor de 0.1 g  $N-NO_3^-/l$ ), por lo que la desnitrificación se considera como independiente de la concentración de nitrato. Esto no ha quedado claro, sin embargo, en el caso de aguas residuales con un alto contenido de nitrógeno, dado que se ha encontrado acumulación de intermediarios durante su tratamiento.<sup>7,12,13,56</sup> Al respecto, Betlach y Tiedje<sup>8</sup> propusieron que la acumulación de intermediarios durante el proceso desnitrificante podría ser explicado por la siguiente secuencia de reacciones:



Cada paso tiene una velocidad específica que depende de las características cinéticas de cada enzima. Así, si las enzimas involucradas en los últimos pasos presentan una velocidad de reacción menor que las de la primera etapa, habrá la acumulación de intermediarios. Algunas evidencias encontradas en la literatura muestran concordancia con lo anterior. De hecho, se ha visto que la reducción del óxido nitroso es la etapa más lenta durante la reducción de nitrato a  $N_2$ , por lo tanto, hay acumulación de  $N_2O$ .<sup>13</sup>

Las evidencias han mostrado que la velocidad desnitrificante está asociada con el crecimiento microbiano y puede quedar descrita por la siguiente ecuación<sup>29</sup>:

$$dS / dt = \left[ \frac{\mu_{max}}{Y_d} \right] * \left[ \frac{S}{K_d + S} \right] * \left[ X_d \right]$$

donde  $X_d$  es la biomasa desnitrificante y  $Y_d$ , el rendimiento (g biomasa/g  $NO_3^-$ ). En consecuencia, será importante considerar la concentración de sustrato asimilable (y soluble) al ajustar la relación C/N para tener un proceso desnitrificante eficiente. De hecho, hay resultados que indican que la acumulación de  $N_2O$  en un proceso desnitrificante está también relacionado con la concentración de carbono orgánico en el sistema de reacción.<sup>55</sup>

Una variable ambiental que también puede influir en la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante es el pH. Se ha descrito que en condiciones ácidas (pH 6 o menor) se acumula ácido nitroso, muy tóxico para las bacterias.<sup>24</sup> A valores de pH ligeramente alcalinos, el nitrato es convertido en  $N_2$ .<sup>63</sup> Cabe decir que estos estudios del efecto del pH sobre la desnitrificación han sido realizados en cultivos en lote. En cultivo en continuo, por el contrario, no se observó acumulación de intermediarios de la desnitrificación en el intervalo de pH de 6 a 9, aun cuando se utilizó una velocidad de carga alta (1000 mg  $N-NO_3^-/L-d$ ), pero el proceso si fue totalmente inhibido a pH de 5.<sup>48</sup>

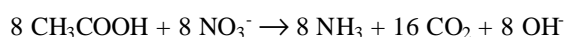
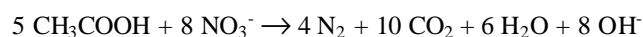


Considerando lo anterior, puede establecerse que la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante no sólo es resultado de la inhibición de una enzima de la secuencia respiratoria, sino también a las condiciones de cultivo, tales como una relación C/N baja, la insuficiencia de iones cobre o molibdeno, tiempo de retención hidráulica corto respecto de la velocidad desnitrificante, el valor de pH y la presencia de oxígeno, entre otras.

### REDUCCIÓN DESASIMILATIVA DE NITRATO A AMONIO (RDNA)

Otra forma de reducción del nitrato es la denominada reducción desasimilativa de nitrato a amonio (RDNA). Esta es realizada por una nitrato reductasa no asociada a la membrana, la cual emplea NADH y formato como donadores de electrones.<sup>35</sup> La presencia de la RDNA en un proceso de eliminación de nitrógeno de aguas residuales, impide la reducción del nitrato a N<sub>2</sub>. Es por ello que a la RDNA se le considera un "corto circuito" dentro del ciclo del nitrógeno.<sup>15</sup>

Uno de los factores ambientales que determinan considerablemente el tipo de ruta que seguirá el nitrato en su reducción, es la relación C/N. A valores bajos, se favorece la desnitrificación, y en estas condiciones se obtiene el mayor cambio de energía libre.<sup>47</sup> En cambio, generalmente se observa que a valores altos de C/N predomina la RDNA,<sup>1</sup> ya que al limitarse los aceptores de electrones (el nitrato) se favorece la vía que permite un mayor grado de reducción (del propio nitrato), lo que se puede apreciar al comparar la estequiometría de ambos procesos:



No obstante, hay resultados que muestran una actividad desnitrificante hasta con relaciones C/N de 25 con una eficiencia del 85%, empleando glucosa o acetato como fuentes reductoras.<sup>32</sup>

Es posible que la ruta de reducción del nitrato esté determinada por el tipo de fuente reductora. Se ha visto que las bacterias fermentadoras asociadas en un lodo metanogénico transforman parte del nitrato en amonio si están presentes sustratos fácilmente fermentables. En presencia de sustratos no fermentables, la desnitrificación es la vía respiratoria principal.<sup>1</sup> Sin embargo, hay evidencias en reactores en continuo que muestran que es posible la desnitrificación con eficiencias mayores al 80%, empleando glucosa.<sup>54</sup> En ese caso, la velocidad específica desnitrificante fue de 8.8 mg N/g SSV-h, que comparada con la obtenida con etanol (220 mg N/g SSV-h), fue mucho menor.<sup>43</sup> En otros trabajos no se encontró diferencia en la velocidad específica desnitrificante con distintas fuentes de electrones, tanto fermentables como no fermentables, pero con

tiempos de retención hidráulica altos.<sup>17</sup> La variabilidad de resultados podría deberse al tipo de microorganismos presentes en los lodos evaluados o a las diferencias en las condiciones de cultivo practicadas, y parece que este último argumento tiene más peso. Al respecto, hay datos que indican que el tipo de inóculo (lodo) no influye en la determinación de la ruta de reducción del nitrato.<sup>50</sup> Se ha visto que cuando dos lodos estabilizados fisiológicamente, uno en condiciones metanogénicas y otro en condiciones desnitrificantes, son mezclados en diferentes proporciones, no muestran diferencia en la velocidad ni en la eficiencia desnitrificante cuando son incubados bajo condiciones desnitrificantes (C/N baja).<sup>18</sup> Esto parece indicar que es más importante el control de las condiciones ambientales del cultivo, que la actividad original de algunos lodos.

### OXIDACIÓN ANAEROBIA DE AMONIO (ANAMMOX)

Se ha encontrado recientemente la formación de N<sub>2</sub>, a partir de nitrito y amonio, bajo condiciones anaerobias. Al proceso se le conoce como "ANAMMOX"<sup>45</sup> (siglas en inglés de oxidación anaerobia de amonio). Se tienen datos que muestran que el proceso biológico es de tipo litoautotrófico, muy poco tolerante a la presencia de materia orgánica.<sup>66,67, 68</sup> Este proceso ha sido aplicado al tratamiento de aguas residuales con un contenido alto de nitrógeno y materia orgánica limitada, como los efluentes de digestores anaerobios.<sup>62</sup> Sin embargo, se ha mostrado que es posible la utilización simultánea de amonio y acetato como donadores de electrones para reducir el nitrato a N<sub>2</sub>, aún cuando el reactor fue alimentado con cargas muy altas de acetato (4 g C-Acetato/Ld).<sup>14</sup> Una de las hipótesis que se plantean en torno a este fenómeno es que la alimentación de dos fuentes de electrones distintas, amonio y acetato, permitió dos vías reductoras diferentes, la ANAMMOX y la desnitrificación (Fig. 1), ambas llevando a la formación de N<sub>2</sub>.

Por lo tanto, el acoplamiento de la desnitrificación heterotrófica y la ANAMMOX litoautotrófica puede representar una alternativa para el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido de nitrógeno y de materia orgánica. Como el amonio es la forma nitrogenada más abundante en las aguas residuales, la adición de nitrato al influente del reactor permitiría la eliminación de amonio y materia orgánica por el acoplamiento de los procesos antes mencionados. Esto representaría una ventaja sobre los procesos depuradores convencionales, dado que la eliminación de amonio y materia orgánica ocurrirían en un solo reactor.

El proceso ANAMMOX ha sido aplicado también en el tratamiento de aguas residuales urbanas. El sistema incluye el empleo de un digestor anaerobio en una primera etapa para eliminar la mayor parte de materia orgánica y de sólidos suspendidos. El amonio presente en el efluente del digestor anaerobio es parcialmente oxidado a nitrito (50 % de conversión)<sup>36</sup> dando lugar a la eliminación simultánea

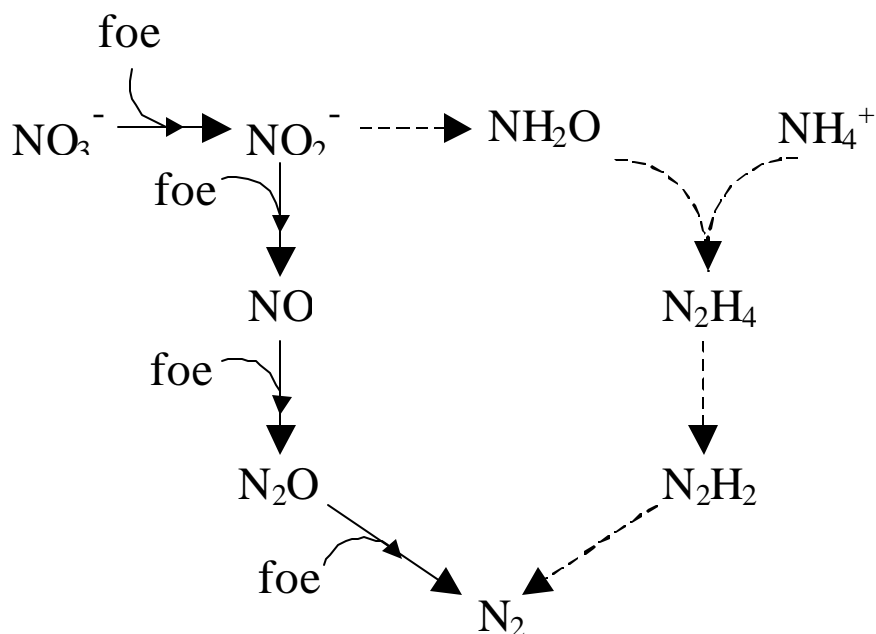


Figura 1. Acoplamiento entre la desnitrificación y la ANAMMOX para la eliminación de nitrógeno:  $\rightarrow$  desnitrificación;  $\dashrightarrow$  ANAMMOX; foe, fuente orgánica de electrones.

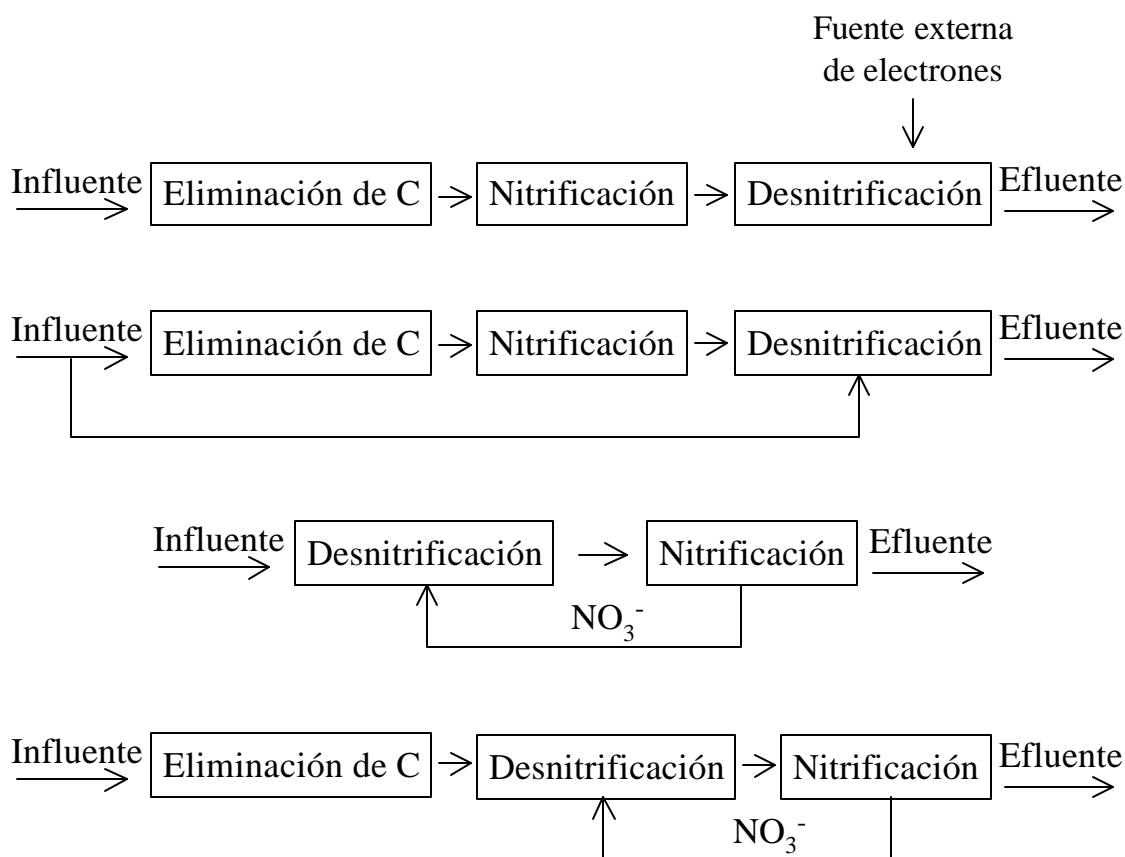


Figura 2. Alternativas convencionales para la eliminación de C y N de las aguas residuales.

Tabla 1. Características distintivas de los procesos de nitrificación y desnitrificación

Característica	Nitrificación	Desnitrificación
Tipo de microorganismos	Autotróficos	Generalmente heterotróficos
Velocidad de crecimiento	días <sup>-1</sup>	horas <sup>-1</sup>
Tipo de respiración	Aerobia	Anóxica
Cambio de pH durante el proceso	Tendencia a la acidificación	Tendencia a la alcalinización
Factores limitantes en el proceso	Baja concentración de O <sub>2</sub> disuelto, presencia de materia orgánica	Presencia de O <sub>2</sub> en el medio, baja concentración de materia orgánica (fuente de electrones)

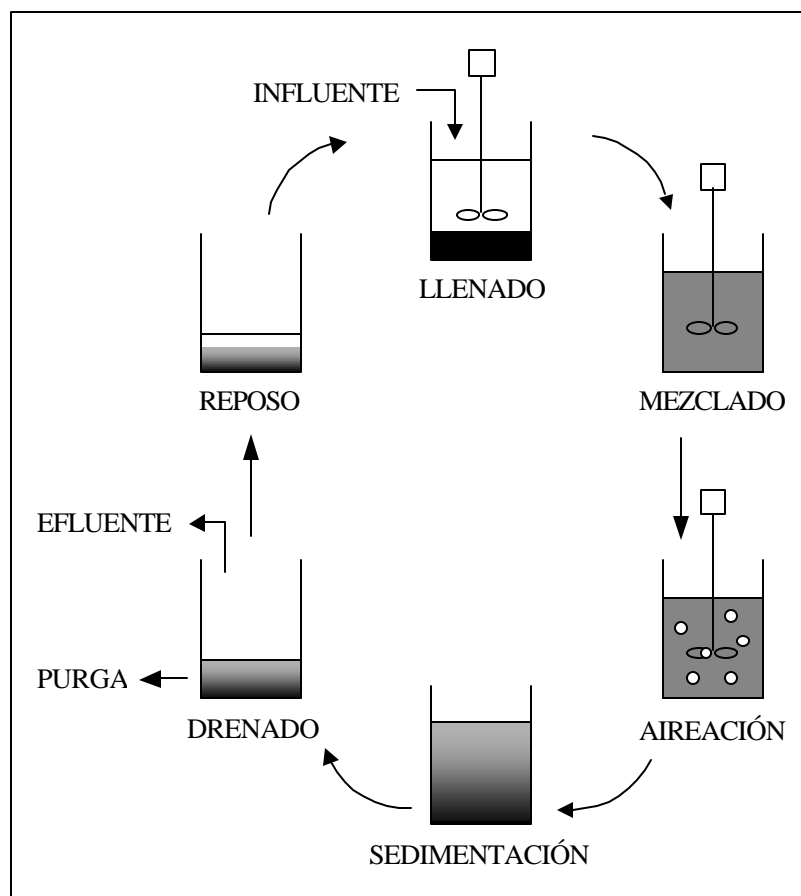


Figura 3. Esquema de un proceso cíclico de reactores secuenciados en lote para la eliminación de nitrógeno.

de amonio y nitrito vía ANAMMOX en un proceso posterior. La oxidación parcial de amonio a nitrito puede lograrse controlando el tiempo de retención hidráulico (proceso SHARON, siglas en inglés de “reactor simple para una alta conversión de amonio a nitrito”), o bien, ajustando la con-

centración del amonio (inhibidor de la oxidación de nitrito) en el reactor nitrificante.<sup>4</sup> Uno de los inconvenientes del manejo del nitrito es su efecto tóxico elevado. Si el sistema de tratamiento no opera bien, se podría liberar nitrito al ambiente.

## BIOTECNOLOGÍAS PARA LA ELIMINACIÓN DEL NITRÓGENO

Los procesos convencionales para la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales pueden ser muy diferentes, con configuraciones diversas de procesos de etapas separadas y combinadas, y con la nitrificación, desnitrificación y eliminación de materia orgánica en diferentes secuencias (Fig. 2). Una opción es el sistema de tres etapas separadas: digestión de materia orgánica, nitrificación y desnitrificación, con una fuente de electrones externa.<sup>58</sup>

Otra alternativa es el sistema ya mencionado, pero con aguas residuales crudas como fuente de electrones externa.<sup>71</sup> De hecho, en muchos casos el primer reactor que tiene contacto con el influente es el desnitrificante, que requerirá de una corriente de nitrato.<sup>1</sup> Si el agua residual presenta un contenido alto de materia orgánica, será necesario un reactor metanogénico previo al desnitrificante, para disminuir biológicamente la C/N y obtener una eficiencia mayor de eliminación de carbono y nitrógeno.<sup>7,44</sup>

A pesar de que las características fisiológicas y bioquímicas de las bacterias nitrificantes son muy distintas a las que presentan las bacterias desnitrificantes (Tabla 1), se han realizando estudios para tratar de acoplar los dos procesos en un sólo reactor. Lo anterior pudo lograrse en un reactor aerobio de tubos concéntricos (air-lift).<sup>30</sup> Este fenómeno fue atribuido a las zonas diferenciadas que se forman en los gránulos del reactor. Se cree que en las capas más internas de los gránulos se llevaba a cabo la desnitrificación, mientras que en la capa más externa se llevaba a cabo la nitrificación. También se ha mencionado al proceso simultáneo de nitrificación-desnitrificación en un reactor de contacto rotatorio, con aceptable eliminación de carbono y nitrógeno, pero el influente debe de estar muy diluido. Algunos autores suponen que el proceso podría ser debido a la presencia de *Thiosphaera pantotropha*, bacteria capaz de efectuar la nitrificación heterotróficamente y la desnitrificación bajo aerobiosis.<sup>28</sup> Asimismo, para llevar a cabo los dos procesos en un sólo reactor, se han creado pequeñas zonas anaerobias en reactores aireados, por ejemplo, un reactor de lecho fluidificado con inyección de aire en la zona central del mismo, crea una zona aerobia en la parte superior y una anaerobia en la parte inferior.<sup>21</sup> En este reactor el influente se alimenta en forma ascendente y hay recirculación de la parte superior a la parte inferior del reactor, para proporcionar el nitrato a la fracción desnitrificante. Otro caso son los tanques de oxidación, en donde es posible formar zonas anaerobias pequeñas en las que pueden actuar las bacterias desnitrificantes.<sup>51</sup>

Otro sistema es el de los reactores en lote secuenciados, que son operados a intervalos regulares de tiempo, variando la agitación, la aireación e incluso el volumen de operación para mejorar el proceso de eliminación de nitrógeno,<sup>46</sup> en un solo reactor, vía nitrificación-desnitrificación (Fig. 3). El empleo de estos tipos de reactores deberá considerar la posible formación de intermediarios en la desnitrifica-

ción, especialmente NO y N<sub>2</sub>O, que pueden liberarse cuando existen condiciones aireadas en el reactor.<sup>2</sup> En casi todos los casos se ha observado una eficiencia desnitrificante aceptable y siempre con aguas residuales muy diluidas.

## CONCLUSIONES

Los avances logrados a la fecha en el conocimiento de la nitrificación y desnitrificación y sobre la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales son importantes, sin embargo aún existen aspectos por explicar y problemas que resolver. Es frecuente que en el tratamiento de aguas residuales a gran escala no se contemplen los aspectos básicos de la fisiología del proceso, en particular aquellos vinculados con las propiedades y características químicas del influente, que finalmente repercuten sobre el proceso respiratorio y que deben ser adecuadas y ajustadas a las necesidades del consorcio que forma el lodo. No hacerlo implica desviaciones o mal funcionamiento del proceso, lo cual se traduce en tecnologías no sostenibles. Asimismo, dada la enorme variedad de aguas residuales, es ahora probable la aplicación de procesos respiratorios combinados para la eliminación de nitrógeno, con base en el conocimiento que se tiene de la fisiología de la respiración nitrogenada. Si se aplican diseños tecnológicos concebidos en esta información, la recuperación del agua y el mejoramiento ambiental serán más prometedores.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACYT México y PCCI-CESIC, España, por el apoyo a Cervantes y Pérez.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akunna, J. C., C. Bizeau and R. Moletta. 1994. Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: Ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* 15:41-49.
2. Anderson, I. and J. Levine. 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifier, denitrifiers and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:938-945.
3. Andrew, C., J. Han, S. de Vries, J. van de Oost, B. Averill, T. Loehr and J. Sanders-Loehr. 1994. CuA of cytochrome c oxidase and the A site of N<sub>2</sub>O reductase are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* 116:10805-10806.
4. Anthonisen, A., R. Loehr, T. Prakasam and E. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. W. P. C. Fed.* 48:835-852.
5. Beccari, M., D. Marani and R. Ramadori. 1979. A criti-



- cal analysis of nitrification alternatives. *Water Res.* 13:185-192.
6. Berks, B., D. Richardson, C. Robinson, A. Reilly, A. Willis and S. Ferguson. 1995. The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* 309:983-992.
  7. Bernet, N., F. Habouzit and R. Moletta. 1996. Use of an industrial effluent as a carbon source for denitrification of a high-strength wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:92-97.
  8. Betlach, M. and J. Tiedje. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1074-1084.
  9. Bock, E., I. Schmidt, R. Stueven and D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163:16-20.
  10. Brock, T. and M. Madigan. 1991. *Microbiología*. p. 109, 8a. ed. Prentice Hall Hispanoamérica. México.
  11. Carr, G. and S. Ferguson. 1990. The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269:423-429.
  12. Catalan-Sakairi, M., P. Wang and M. Matsumura. 1997. High-rate seawater denitrification utilizing a macro-porous cellulose carrier. *J. Ferm. Bioeng.* 83: 102-108.
  13. Cervantes, F., O. Monroy and J. Gómez. 1998. Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* 20:959-961.
  14. Cervantes, F., O. Monroy and J. Gomez. 1999. Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* In press.
  15. Cole, J. and C. Brown. 1980. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:65-72.
  16. Coyle, C. L., W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, H. Körner and W. Jakob. 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina* - Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* 153:459- 467.
  17. Cuervo-Lopez, F. M., F. Martínez, M. Gutiérrez-Rojas, A. Noyola and J. Gómez. 1998. Effect of volumetric loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. V Latin-American Workshop- Seminar Wastewater Anaerobic Treatment. Viña del Mar, Chile, 27-30 october.
  18. De la Rosa, D., A. Castillo, F. Cervantes and J. Gómez. 1999. Remoción de carbono y nitrógeno en diferentes relaciones de lodos anaerobios y a dos relaciones C/N. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería - IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oaxaca, México, 12-17 septiembre.
  19. Eckenfelder, W. 1989. Industrial water pollution control. p. 400, 2a ed. McGraw-Hill, Singapore.
  20. Fair, G. M., J. C. Geyer and D. A. Okun. 1984. Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. Vol. 2 de Ingeniería sanitaria y de aguas residuales. 1a. ed. LIMUSA.
  21. Fernández-Polanco, F., F. J. Real and P. A. García. 1994. Behaviour of an anaerobic/aerobic pilot scale fluidized bed for the simultaneous removal of carbon and nitrogen. *Water Sci. Technol.* 29:339-346.
  22. Ferguson, S. 1994. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:89-110.
  23. Fülöp, V., J. Moir, S. Ferguson and J. Hajdu. 1995. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell* 31:369-377.
  24. Glass, C., J. Silverstein and J. Oh. 1997. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ. Res.* 69:1086-1093.
  25. Godden, J., S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. Legall. 1991. The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* 253:438-442.
  26. Gómez-Hernández, J., J. M. Lema-Rodicio and J. R. Méndez-Pampín. 1995. La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *Ciencia* 46:507-523.
  27. Goretski, J. and T.C. Hollocher. 1990. The kinetic and isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. *J. Biol. Chem.* 265:889-895.
  28. Gupta, S. K., S. M. Raja and A. B. Gupta. 1994. Simultaneous nitrification-denitrification in a rotating biological contactor. *Environ. Technol.* 15:145-153.
  29. Halling-Sørensen, B. and S. Jørgensen (eds.). 1993. The removal of nitrogen compounds from wastewater, p. 3. Elsevier, Netherlands.
  30. Hao, X. and T. Nieuwstad. 1994. Feasibility of denitrification in airlift-loop reactors. *Environ. Technol.* 15:155-163.
  31. Hendrich, M., M. Logan, K. Andersson, D. Arciero, J. Lipscomb and A. Hooper. 1994. The active site of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: evidence for a new metal cluster in enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 116:11961-11968.
  32. Her, J. and J. Huang. 1995. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Biores. Technol.* 54:45-51.
  33. Hong Z., K. Hanaki and T. Matsuo. 1994. Greenhouse gas-N<sub>2</sub>O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 28:203-207.
  34. Hooper, A., T. Vannelli, D. Bergmann and D. Arciero. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:59-67.



35. Jackson, R., A. Cornish-Bowden and J. Cole. 1981. Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* 193:861-867.
36. Jetten, M., S. Horn and M. van Loosdrecht. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* 35:171-180.
37. Jetten, M., S. Logemann, G. Muyzer, L. Robertson, S. de Vries, M. van Loosdrecht and J. Kuenen. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71:75-93.
38. Juliette, L., M. Hyman and D. Arp. 1995. Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity in vitro. *J. Bacteriol.* 177:4908-4913.
39. Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46:43-70.
40. Kroneck, P. M. M., J. Beuerle and R. W. Schumacher. 1992. Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). *Metal ions in biological systems*, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.
41. Laws, E.A. 1993. *Aquatic pollution - an introductory text*, p. 55. Interscience, U.S.A.
42. Martinez, O. F., S. J. Soriano and J. Gómez. 1998. Análisis químico y electroforético de un lodo nitrificante asociado al IVL. IV Iberian Congress on Biotechnology, I Ibero American Meeting on Biotechnology, Braga, Portugal.
43. Mateju, V., S. Cizinska, J. Krejčí and T. Janoch. 1992. Biological water denitrification-A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14:170-183.
44. Morgan, J., B. Jimenez and A. Noyola. 1994. Anaerobic-anoxic-aerobic process with recycling and separated biomass for organic carbon and nitrogen removal from wastewater. *Environ. Technol.* 15:233-243.
45. Mulder A., A. van de Graaf, L.A. Robertson and J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16:177-184.
46. Münch, E., P. Lant and J. Keller. 1996. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* 30:277-284.
47. Muxí, L. 1994. Aspectos microbiológicos de los procesos de nitrificación-desnitrificación. En *memorias del III Taller y seminario latinoamericano "Tratamiento anaerobio de aguas residuales"*. Montevideo, Uruguay. pp. 55-63.
48. Perez, T. J., C. G. Saucedo and J. Gómez. 1999. Efecto del pH y la fuente de electrones sobre la desnitrificación en régimen estacionario. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería - IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oaxaca, México, 12-17 septiembre.
49. Prosser, J. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. In: Rose, A. and Tempest, D. (Eds.) *Advances in microbial physiology*. p. 125-181. Academic Press, London.
50. Quevedo, M., E. Guynot and L. Muxi. 1996. Denitrifying potential of methanogenic sludge. *Biotechnol. Lett.* 18:1363-1368.
51. Rittmann, B. and W. Langeland. 1985. Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. *J. Wat. Poll. Ctrl. Fed.* 57:300-308.
52. Robertson, L. and J. Kuenen. 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: Oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.* 134:857-863.
53. Robertson, L., T. Dalsgaard, N. Revsbech and J. Kuenen. 1995. Confirmation of "aerobic denitrification" in batch cultures, using gas chromatography and <sup>15</sup>N mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18:113-120.
54. Sánchez, M., R. Méndez-Pampín, J.M. Lema, O. Monroy and J. Gómez. 1997. Denitrifying activity of methanogenic sludges at several C/N ratios. International symposium of Environmental Biotechnology. Part II posters. pp. 251-254.
55. Schulthess, R. and W. Gujer. 1996. Release of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from denitrifying activated sludge: verification and application of a mathematical model. *Water Res.* 30:521-530.
56. Shing-Der, C., C. Chiu-Yang, S. Yuan-Chung, C. Chun-Mao and C. Hsiang-Ju. 1996. Treatment of high-strength nitrate wastewater by biological methods-operational characteristics study. *Water Sci. Technol.* 34:269-276.
57. Siddiqui, R., U. Warnecke-Eberz, A. Hengsberger, B. Schneider, S. Kostka and B. Friedrich. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 175:5867-5876.
58. Sison, N., K. Hanaki and T. Matsuo. 1996. Denitrification with external carbon source utilizing adsorption and desorption capability of activated carbon. *Water Res.* 30:217-227.
59. Stenstrom, M. and R. Poduska. 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res.* 14:643-649.
60. Stouthamer, A. 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14:315-375.
61. Stouthamer, A. H. 1988. Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds, p. 245-303. In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley-Liss, New York.
62. Strous M., Gerven E. van, Zheng P., Kuenen J. G. and Jetten M. S. M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations. *Water Res.* 31:1955-1962.
63. Thomsen, J., T. Geest and R. Cox. 1994. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:536-541.
64. Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, p. 179-218.



- In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley-Liss, New York.
65. Tijhuis, L., H.D. Huisman, M. van Loosdrecht and J. Heijnen. 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 47:585-595.
66. van de Graaf A. A., P. de Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten and J. Kuenen. 1996. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142:2187-2196.
67. van de Graaf, A., P. de Bruijn, L. Robertson, M. Jetten and J. Kuenen. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of  $^{15}\text{N}$  studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143:2415-2421.
68. van de Graff, A., A. Mulder, P. Bruijn, M. Jetten, L. Robertson and J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1246-1251.
69. Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco and J. M. Melillo. 1997. Human domination on Earth's ecosystems. *Science* 277:494-499.
70. Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewater, p. 113-154. In: Fiechter, A. (ed.). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Verlag, Berlin.
71. Winkler, M. 1986. *Tratamiento biológico de aguas de desecho*, 1a. ed. LIMUSA, México.