

DOI: 10.24850/j-tyca-2024-04-08

Artículos

Enriquecimiento de bacterias anammox a temperatura ambiente con inóculos de lodos activados

Enrichment of anammox bacteria at room temperature with activated sludge inocula

Iván Fernández-Dorado¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5252-6950>

Aylet Vega Aguilar², ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1368-6788>

¹Empresa Mixta "Aguas de La Habana", La Habana, Cuba, ivang200278@gmail.com

²Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría", Facultad de Ingeniería Química, La Habana, Cuba, ayletvega@gmail.com

Autora para correspondencia: Aylet Vega Aguilar, ayletvega@gmail.com

Resumen

El descubrimiento del proceso de oxidación anaeróbica del amonio (anammox) abre nuevas alternativas para la eliminación de nitrógeno, más económicas que los tradicionales sistemas de nitrificación-desnitrificación. El enriquecimiento de estas bacterias se ve favorecido a

temperaturas cálidas (superiores a 30 °C), similares a las que se logran en ambientes naturales cubanos. En este trabajo se evalúa el enriquecimiento de bacterias anammox a temperatura ambiente, con inóculos que provienen de diferentes sistemas de lodos activados para el tratamiento de aguas residuales municipales en Cuba. Los reactores son operados en batch, y se alimentan con medio sintético con suficiente amonio, nitrito y carbonatos. La actividad anammox comienza a detectarse, bajo condiciones controladas, después de los 40 días. Los valores promedio obtenidos para las relaciones estequiométricas, $N-NO_2^-/N-NH_4^+$ y $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ fueron de 1.16 y 0.22, respectivamente. El mayor valor de la actividad máxima específica que se logra en los enriquecimientos es de $0.160 \text{ gNT} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, operando con velocidades de remoción de nitrógeno entre 150 y $350 \text{ mgNT} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, y alcanzando una eficiencia media de remoción de nitrito del 93.8%. La actividad anammox en la fase estacionaria del crecimiento se afecta reversiblemente por la presencia de OD, lo cual es comprobado con ensayos en sistemas manométricos.

Palabras clave: anammox, enriquecimiento de bacterias anammox, inhibición reversible por oxígeno disuelto, remoción de nitrógeno.

Abstract

The discovery of the anaerobic ammonium oxidation process (anammox) opens up new alternatives for nitrogen removal that are cheaper than traditional nitrification-denitrification systems. The enrichment of these bacteria is favored at warm temperatures (above 30 °C), similar to those achieved in cubans natural environments. In this work, the enrichment of

anammox bacteria at room temperature was evaluated, with inocula that come from different activated sludge systems for the treatment of municipal wastewater in Cuba. The reactors are batch operated and are fed with synthetic medium with sufficient ammonium, nitrite and carbonates. Anammox activity begins to be detected, under controlled conditions, after 40 days. The average values obtained for the stoichiometric ratios, $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ and $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ were 1.16 and 0.22, respectively. The highest value of the maximum specific activity that is achieved in the enrichments is $0.160 \text{ gNT gSSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, operating with nitrogen removal rates between 150 and $350 \text{ mgNT l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and reaching an efficiency 93.8% nitrite removal media. The anammox activity in the stationary phase of growth is reversibly affected by the presence of OD, which is verified with assays in manometric systems.

Keywords: Anammox, enrichment of anammox bacteria, reversible dissolved oxygen inhibition, nitrogen removal.

Recibido: 06/09/2022

Aceptado: 17/03/2023

Publicado Online: 29/03/2023

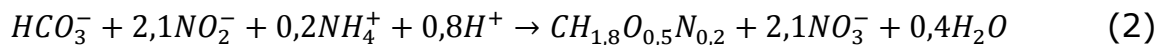
Introducción

El proceso de nitrificación-desnitrificación tradicional es el más utilizado para la remoción biológica de nitrógeno en las aguas residuales. Este proceso implica elevados costes de explotación que podrían verse reducidos con el uso de nuevas alternativas de eliminación del nitrógeno de las aguas residuales basados en procesos completamente autótrofos, que incluyen una etapa de oxidación anaerobia del amonio (García-Ruiz, 2018). El proceso conocido como anammox (anaerobic ammonium oxidation, por sus siglas en inglés) oxida directamente el amonio a nitrógeno molecular (N_2), utilizando el nitrito como aceptor de electrones (Chen, van Loosdrecht, Ekama, & Brdjanovic 2020).

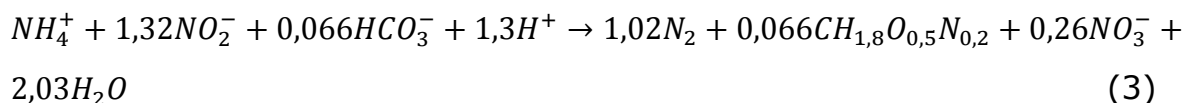
El amonio, el nitrito y el bicarbonato son los sustratos principales en el proceso anammox (van de Graaf, De Bruijn, Robertson, Jetten, & Kuenen, 1996). El acoplamiento del átomo de nitrógeno del amonio y el átomo de nitrógeno del nitrito para formar gas dinitrógeno (N_2) comprende la reacción catabólica (Ecuación (1)):



El proceso anammox es autótrofo, es decir, utiliza el HCO_3^- como fuente de carbono para la producción de biomasa en el anabolismo (Ecuación (2)) (van der Star, 2008). La oxidación de nitrito a nitrato genera los electrones necesarios para el proceso de reducción del HCO_3^- (van de Graaf *et al.*, 1996):



La reacción general de la combinación del catabolismo (Ecuación (1)) y el anabolismo (Ecuación (2)) fue propuesta y luego validada de acuerdo con la estequiometría encontrada experimentalmente por diversos estudios, quedando de la siguiente manera (Strous, Heijnen, Kuenen, & Jetten, 1998):



En ausencia de oxígeno molecular, las bacterias anammox activan el amonio a través del poder oxidante del óxido nítrico (NO). La oxidación anaeróbica de amonio es un proceso de tres pasos (van der Star, 2008), con NO e hidracina como intermediarios. Primero, el nitrito se reduce a NO; luego, el NO producido reacciona con el amonio para formar hidracina, catalizada por la enzima única hidracina sintetasa; y finalmente, la hidracina es oxidada a N₂ (Kartal *et al.*, 2011); las bacterias desnitrificantes normales tienen N₂O como intermedio, estando este compuesto ausente en la fisiología del anammox (Schalk, Oustad, Kuenen, & Jetten, 1998).

El proceso anammox lo realizan bacterias quimiolitotróficas, lo cual implica que la tasa de crecimiento y reproducción sea baja. La velocidad específica máxima de crecimiento para una biomasa anammox es de

0.065 d⁻¹ y el tiempo de replicación de 11 a 22 días. Ello se traduce en un largo periodo de tiempo para la puesta en marcha de los sistemas, superior a los 100 días (Strous *et al.*, 1998). Dependiendo del inóculo escogido, la tecnología utilizada y del afluente a tratar, este tiempo puede oscilar entre los 2 y 6 meses (Zhang *et al.*, 2017; van der Star *et al.*, 2008). En investigaciones desarrolladas en MBR (Membrane BioReactor, por sus siglas en inglés), se han obtenido tiempos de replicación tan bajos como 2 a 3 días (Lotti, Kleerebezem, Lubello, & van Loosdrecht, 2014). El lento crecimiento de estas bacterias, principal problema de las bacterias anammox, no limita la alta capacidad de remoción que tiene la biomasa, presentando valores de hasta 5 a 10 kg N.m⁻³.d⁻¹ (Ni & Zhang, 2013). Por otro lado, su lento crecimiento significa una baja producción de lodo, la cual es otra de sus ventajas. Este proceso no requiere de fuente externa de carbono, por lo que es una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales con elevada carga de nitrógeno amoniacal y baja concentración de materia orgánica biodegradable (Kuenen, 2008).

Las bacterias anammox son muy difíciles de aislar de los hábitats naturales, aunque se encuentran distribuidas ampliamente en el medio natural (Kuenen, 2008; Ali, Shaw, & Saikaly, 2020) y están presentes en el lodo de plantas de tratamiento de aguas residuales (Dapena-Mora *et al.*, 2004). Estos microorganismos fácilmente se inmovilizan a sí mismos en biopelículas compactas o gránulos, permitiendo un contenido muy alto de biomasa en el reactor (van der Star *et al.*, 2007). También se han logrado obtener altas concentraciones, como células libres en sistemas con MBR (van der Star *et al.*, 2008).

Sin embargo, el crecimiento de la biomasa y la estabilidad del sistema empleando bacterias anammox se ven afectados ante cualquier cambio de las condiciones operacionales y ambientales. Algunas variables importantes para considerar son las siguientes: las concentraciones de compuestos nitrogenados (nitrito y amonio), de materia orgánica, de oxígeno disuelto (OD), de salinidad, de compuestos tóxicos y de biomasa, el pH y la temperatura, entre otros (Jin, Yang, Yu, & Zheng 2012). Estas bacterias no son inhibidas por elevadas concentraciones de amonio y nitrato (1 gN.l^{-1}), sin embargo, el proceso es inhibido por la presencia de nitrito a concentraciones superiores a los $100 \text{ mg N-NO}_2.\text{l}^{-1}$. No obstante, mientras mayor sea la concentración de la biomasa anammox, se producirá una mayor degradación de nitrito y, por lo tanto, una menor acumulación e inhibición del proceso (Strous, Kuenen, & Jetten, 1999). A concentraciones superiores al 0.5% de oxígeno disuelto de saturación, la biomasa anammox es inhibida (Strous, van Gerven, Kuenen, & Jetten, 1997). La actividad se recupera cuando se restablecen las condiciones anaerobias en el interior del reactor, indicativo de una inhibición reversible del proceso después de mantener la biomasa anammox en contacto con oxígeno (Egli *et al.*, 2001).

Actualmente, la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) que utilizan tecnología con el proceso anammox para la remoción de amonio se encuentran en países de climas fríos o templados (Lackner *et al.*, 2014). Su implementación solo ha sido posible en el tratamiento de la línea de lodos, consecuente con las altas concentraciones de amonio presente en este residual y las altas

temperaturas, necesarias para la digestión anaerobia de lodos (Chen *et al.*, 2020).

La temperatura ha sido un parámetro clave y limitante para el estudio e implementación de este proceso en la línea principal de las PTAR de lodos activaos en climas templados (Kamp *et al.*, 2019) debido a que el intervalo de temperatura óptima de crecimiento de las bacterias anammox es de 30 a 35 °C (Hoekstra, De Weerd, Kleerebezem, & van Loosdrecht, 2017). Éste es un problema fácil de resolver en los países con climas tropicales, como en el caso de Cuba, pues la temperatura media del agua residual municipal en una PTAR varía entre 20 y 30 °C. Recientes estudios se han encauzado en aprovechar dicha ventaja para la puesta en marcha de sistemas con bacterias anammox (Peralta & Serrato, 2016). Aunque se han logrado eficiencias de eliminación de nitrógeno satisfactoria en reactores a escala de laboratorio (Sánchez-Guillén, Jayawardana, López-Vázquez, De Oliveira, & van Lier, 2015b; García-Ruíz, 2018), no hay ejemplos conclusivos de implementación exitosa a gran escala en la línea principal de las PTAR municipales. Muchas revisiones han resumido las posibles estrategias operativas (Cao, van Loosdrecht, & Daigger, 2017) y se continúan realizando estudios para superar las limitaciones de su implementación (Gómez *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023).

De manera reciente se puso en marcha un sistema (Gómez *et al.*, 2020) donde la nitrificación parcial se desarrolla en un reactor con relleno móvil, y el proceso anammox se desarrolla en un sistema con biomasa granular, alcanzándose porcentajes de eliminación cercanos al 60% para el N total y al 75% para el N amoniacal, bajo condiciones similares a un

residual doméstico (concentración: $90 \text{ gN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) y a temperatura ambiente ($15\text{-}20 \text{ }^{\circ}\text{C}$). El empleo de la concentración de oxígeno disuelto (entre 1 y 1.5 ppm) fue una estrategia clave para controlar la concentración de NOB en el reactor de nitrificación parcial (Gómez *et al.*, 2020). Otros estudios, como el de Sánchez-Guillén y colaboradores (Sánchez-Guillén *et al.*, 2015a; Sánchez-Guillén *et al.*, 2015b) demostraron la coexistencia de bacterias nitrificantes y anammox en biopelículas perfectamente estructuradas en un sistema de filtros biológicos para el tratamiento de aguas residuales con características medias similares a residuales municipales: concentración de amonio entre 100 y 250 mg.l^{-1} , de OD entre 1 y 2 mg.l^{-1} , bajo condiciones controladas de temperatura ($30\text{-}35 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Estos investigadores obtuvieron elevadas eficiencias de remoción de amonio (80-99%) y nitrógeno total (54-92%) (Sánchez-Guillén *et al.*, 2015b; García-Ruíz, 2018). El presente trabajo evalúa el enriquecimiento de bacterias anammox en condiciones de climas cubanas, a partir de varios inóculos de diferentes sistemas de tratamiento de residuales municipales. Sería una primera etapa para la implementación de este proceso en las líneas de agua de PTAR operadas en países de climas cálidos.

Materiales y métodos

Para el enriquecimiento de bacterias anammox se llevan a cabo cinco experimentos con inóculos proveniente de diferentes sistemas de lodos activados para el tratamiento de aguas residuales municipales (Tabla 1). La concentración de sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) en el inicio de los experimentos varía entre 4 y 5 g·l⁻¹.

Tabla 1. Procedencia de los inóculos.

Lodo	Exp	Sistema de tratamiento	Edad del lodo (operación)
Luyanó	1	Lodo activado convencional con carrusel diseñado para la nitrificación-desnitrificación	> 25 días El sistema operaba con baja carga orgánica en comparación con datos de diseño
	2		
	3		
Hicacos	4	Lodo activado con aireación extendida diseñado solo para nitrificación	≈ 15 días Operación según diseño
MBR	5	Lodo activado con membranas sumergidas con tanques separados para la nitrificación y desnitrificación	> 50 días El sistema operaba con cargas bajas en comparación con datos de diseño

En todos los experimentos se sigue la misma metodología de trabajo para el crecimiento de las bacterias. La composición del medio de alimentación de los reactores, en cuanto a las especies nitrogenadas se basa en estudios previos (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Strous *et al.*, 1998).

Estos estudios proponen mantener la composición del medio por debajo de $100 \text{ mg N-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ para evitar la inhibición del sistema.

Se añade suficiente NH_4Cl , NaNO_2 , NaHCO_3 y Na_2CO_3 durante el periodo de evaluación; estos dos últimos para el control de la alcalinidad. A diferencia de la bibliografía consultada, en nuestro caso se emplea como solución base para la preparación del medio de alimentación el efluente proveniente de un filtro percolador (Tabla 2). Esta solución base se esteriliza previamente en autoclave ($1 \text{ atm } 121^\circ\text{C} \times 15 \text{ min}$) para evitar la presencia de actividad microbiana en el afluente.

Tabla 2. Valores medios de los parámetros principales que caracterizan la calidad del residual empleado para la preparación del medio de alimentación.

DQO ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	DBO ₅ ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	OD ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Nitrógeno ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)			P total ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Turbiedad (NTU)	SST ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	pH	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
			NH_4^+	Orgánico	Total					
38 ± 26	15 ± 13	2.7 ± 0.9	7 ± 4	1.9 ± 0.9	15 ± 6	2.0 ± 0.9	15 ± 9	4 ± 3	7.9 ± 0.3	27 ± 2

Reactor y operación

El reactor consiste en un recipiente de vidrio de cinco litros (22-26 cm), sellado en la parte superior con aperturas apropiadas para la ubicación de las sondas. Se realiza la medición y el control del OD, el pH y la toma de muestra. El sistema se opera en batch, pero no de forma cíclica (24 h), pues se alimenta según las necesidades del medio, al observarse disminución de los nutrientes. De esta forma se evita que se alcancen

concentraciones superiores a los 200 mg N-NO₂⁻·l⁻¹, lo que propicia la inhibición del proceso anammox. Con cada alimentación es propensa la intrusión de oxígeno, requiriendo además una desoxigenación para evitar la inhibición del sistema.

En los días iniciales, la concentración de las especies nitrogenadas en el reactor se mantiene alrededor de los 50 mgN·l⁻¹ tanto para el N-NH₄⁺ como para el N-NO₂⁻. Según el comportamiento de la carga de nitrógeno removida en el reactor, se va ajustando la carga de nitrógeno aplicada al mismo. Una vez que la concentración de N-NO₂⁻ comienza a disminuir, el ciclo de carga al reactor se mantiene en función de la remoción de éste. La concentración de nitrógeno total con que se carga el sistema al inicio del ciclo se va aumentando siempre y cuando el nitrito sea removido completamente. No se mantiene un control estricto de la temperatura, equilibrándose a las condiciones ambientales. La agitación se realiza por medio de barras magnéticas, con velocidades inferiores a 200 rev·min⁻¹, evitando grandes turbulencias en el volumen de la suspensión.

Ensayos de actividad

Para determinar la actividad de las bacterias anammox se emplearon dos procedimientos: la clásica medición *in situ* de las concentraciones de las especies nitrogenadas en los reactores para seguir su cinética (Dapena-Mora *et al.*, 2004) y los ensayos manométricos que se realizan con una muestra de biomasa de los reactores (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

Para la ejecución de este ensayo manométrico, primero se selecciona el volumen de la solución de nitrito a dosificar al inicio del ensayo, de manera tal que la concentración de nitrito no sea limitante ni inhibidora. Típicamente, una concentración inicial de nitrito de 50 a 75 mg N.l⁻¹ es adecuada cuando se trata de evaluar una biomasa anammox que proviene de un lodo cultivado bajo condiciones no limitantes del nitrito. Se inicia la adquisición y el registro de los datos manométricos y la lectura de datos cada 30 a 60 min hasta observar el punto de ruptura en la curva de sobrepresión, que corresponde al agotamiento del nitrito. Para el cierre, se verifica el pH final y se toma una última muestra para determinar la concentración de SSVLM. Para el análisis, los datos recogidos durante los primeros 10 a 15 min del ensayo se deben desechar, ya que puede haber varios fenómenos superponiéndose, lo que afecta la sobrepresión.

Este ensayo manométrico se realiza en un sistema comercial disponible en el mercado (WTW OxiTop OC-110), con recipiente de vidrio de 500 ml de volumen. Para mayor detalle sobre la metodología para la determinación de la actividad y el procedimiento del ensayo, consultar la literatura (Lotti, van der Star, Kleerebezem, Lubello, & van Loosdrecht, 2012; López-Vázquez, Menéndez, & Fall, 2019).

Procedimientos analíticos

Todas las muestras se filtraron con membranas ($< 0.45 \mu\text{m}$) previo a la determinación de los componentes solubles (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , DQO), empleando un espectrofotómetro UV-visible (DR6000, HACH LANGE, Alemania). La determinación de los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se midieron gravimétricamente empleando filtros de fibras de vidrio ($< 1.2 \mu\text{m}$). Todos los métodos y análisis empleados para determinar los parámetros necesarios en la caracterización de las muestras del agua residual se encuentran referidos en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA, & WEA, 2012). Las mediciones de oxígeno disuelto (OD) y pH se hicieron con un equipo multiparamétrico (Multi 3 430, WTW, Germany).

Resultados y discusión

Los perfiles de las concentraciones removidas de las especies nitrogenadas (N-NO_2^- y N-NH_4^+), así como de la producción de nitrato en los cinco experimentos de enriquecimientos estudiados con los diferentes inóculos presentan un comportamiento similar. Para una mejor comprensión del proceso de enriquecimiento que se está llevando a cabo en el reactor, se describen las etapas observadas, tomando como ejemplo los resultados obtenidos durante el experimento 1 con lodo procedente de la PTAR Luyanó (Figura 1). Igualmente, se siguen las relaciones estequiométricas entre las distintas especies nitrogenadas, uno de los

criterios más empleados para evaluar el enriquecimiento de biomasa con bacterias anammox (Ni, Lee, Fessehaie, Gao, & Sung, 2010b; Zhang *et al.*, 2010; Sánchez-Guillén *et al.*, 2015a). Después se compararán las principales diferencias observadas entre los diferentes experimentos.

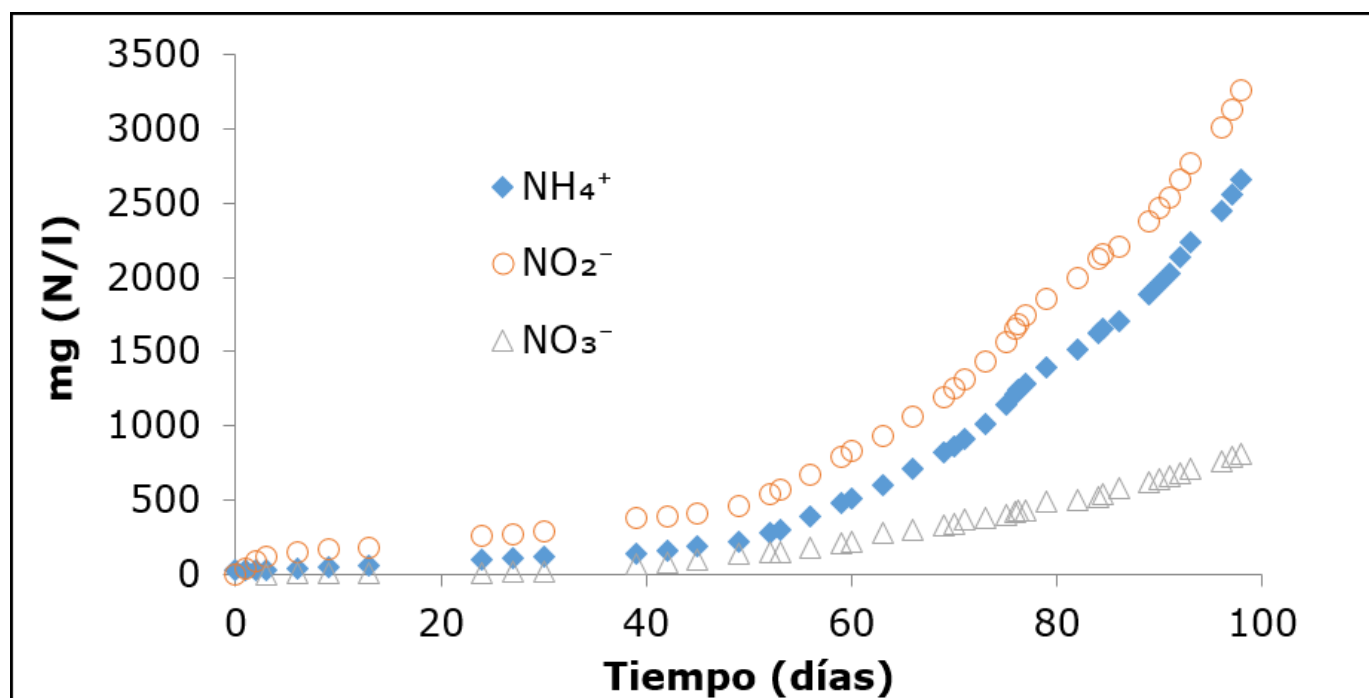


Figura 1. Acumulado de N-NO_2^- y N-NH_4^+ removido y N-NO_3^- producido en el enriquecimiento con el inóculo de la PTAR Luyanó (experimento 1).

Al menos tres etapas o fases diferentes se pueden apreciar en el comportamiento de las especies nitrogenadas, similar a lo discutidos en otros reportes de puesta en marcha o enriquecimiento de biomasa con bacterias anammox (Figura 1), ya sea para sistemas en suspensión, granular o en biopelícula (Araujo *et al.*, 2011; Tang, Zheng, Mahmood, &

Chen, 2009; Dapena-Mora *et al.*, 2004; Strous *et al.*, 1998; Sánchez-Guillén *et al.*, 2015a).

En la primera etapa, inmediatamente después de la inoculación, de pocos días de duración (0-6 días, para el caso de la Figura 1), se observa un aumento en el acumulado del N-NO_2^- removido, sin embargo, no se observa remoción del N-NH_4^+ acumulándose en el sistema. No se advierte variación en el acumulado de nitrato en el reactor. En estos días iniciales el sistema no se alimentado de nuevo, se mantiene cerrado y aislado. La remoción de las especies oxidadas del nitrógeno (N-NO_x^-) y el aumento del N-NH_4^+ es indicativo de fenómenos de desnitrificación heterótrofa, siempre y cuando se tenga en el sistema materia orgánica biodegradable (Araujo *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2009). La mayor parte de la materia orgánica y amonio lo aportan los fenómenos de muerte de la biomasa activa, lisis celular y fenómeno de endogénesis (Dapena-Mora *et al.*, 2004). Al cambiar el ambiente de la biomasa, de uno aerobio a uno anóxico, sin materia orgánica extracelular, se produce la muerte de los organismos heterótrofos y los autótrofos aeróbicos. Durante este proceso también aumenta la concentración del nitrógeno orgánico biodegradable, que se convierten en su mayoría en N-NH_4^+ soluble (Chen *et al.*, 2020), explicando su incremento en el sistema. Una vez que cesen los fenómenos asociados con la muerte celular, la remoción de nitrito es menor, al igual que la producción de amonio.

La segunda etapa se caracteriza por niveles de remoción pequeños e irregulares del N-NO_2^- sin remoción de N-NH_4^+ prácticamente. Al final de esta etapa comienza la remoción de ambas especies (N-NH_4^+ y N-NO_2^-), lo cual indica el comienzo de la actividad de bacterias anammox. Esta

fase es más prolongada que la anterior, en correspondencia con el lento crecimiento de este grupo bacteriano. Ello permite una selección adecuada de la población de bacterias anammox, favorecidas por un permanente suministro de sustrato. Durante esta etapa no se observa la reacción propia de las bacterias anammox; para el caso de la Figura 1 tiene un tiempo de duración aproximada de 50 días (del día 6 al 55).

Conjuntamente se sigue el comportamiento de las relaciones estequiométricas entre las distintas especies nitrogenadas involucradas en el proceso de remoción de nitrógeno. Para la construcción del gráfico mostrado en la Figura 2 y Figura 3 no se tienen en cuenta las relaciones estequiométricas durante la primera etapa. En la Figura 3 se puede observar que para la segunda etapa las relaciones estequiométricas entre el N-NO_2^- y el N-NH_4^+ removido por día disminuyen con rapidez hasta que el comportamiento de dicha relación tiende a permanecer constante en el tiempo, aproximadamente después de finalizada la segunda etapa. En el final de esta fase se evidencia un ligero crecimiento en la producción de nitrato (Figura 1), aumentando el acumulado del N-NO_3^- producido y la correspondiente relación estequiometría entre el N-NO_3^- producido; el N-NH_4^+ removido cada día tiende a disminuir (Figura 3).

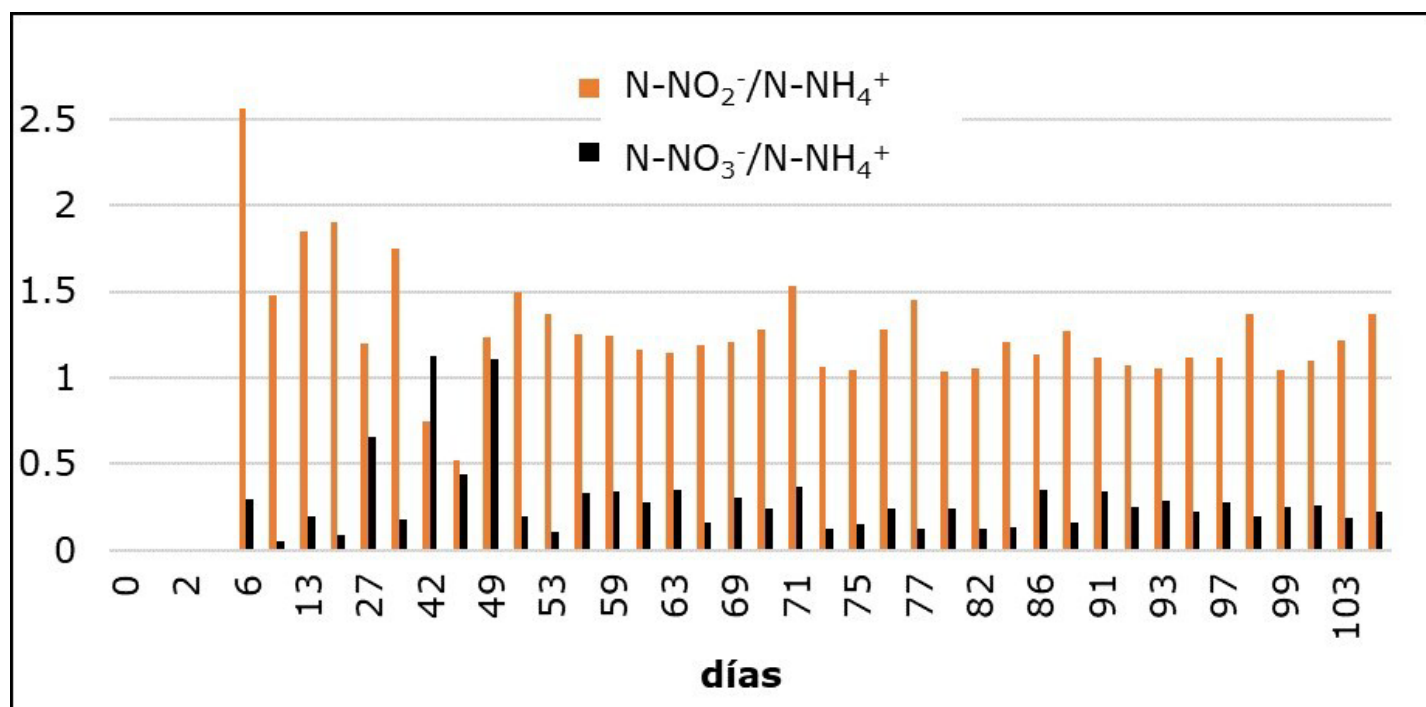


Figura 2. Relaciones estequiométricas $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ y $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ determinadas a partir de la remoción (N-NO_2^- y N-NH_4^+) y producción (N-NO_3^-) por día de las especies nitrogenadas.

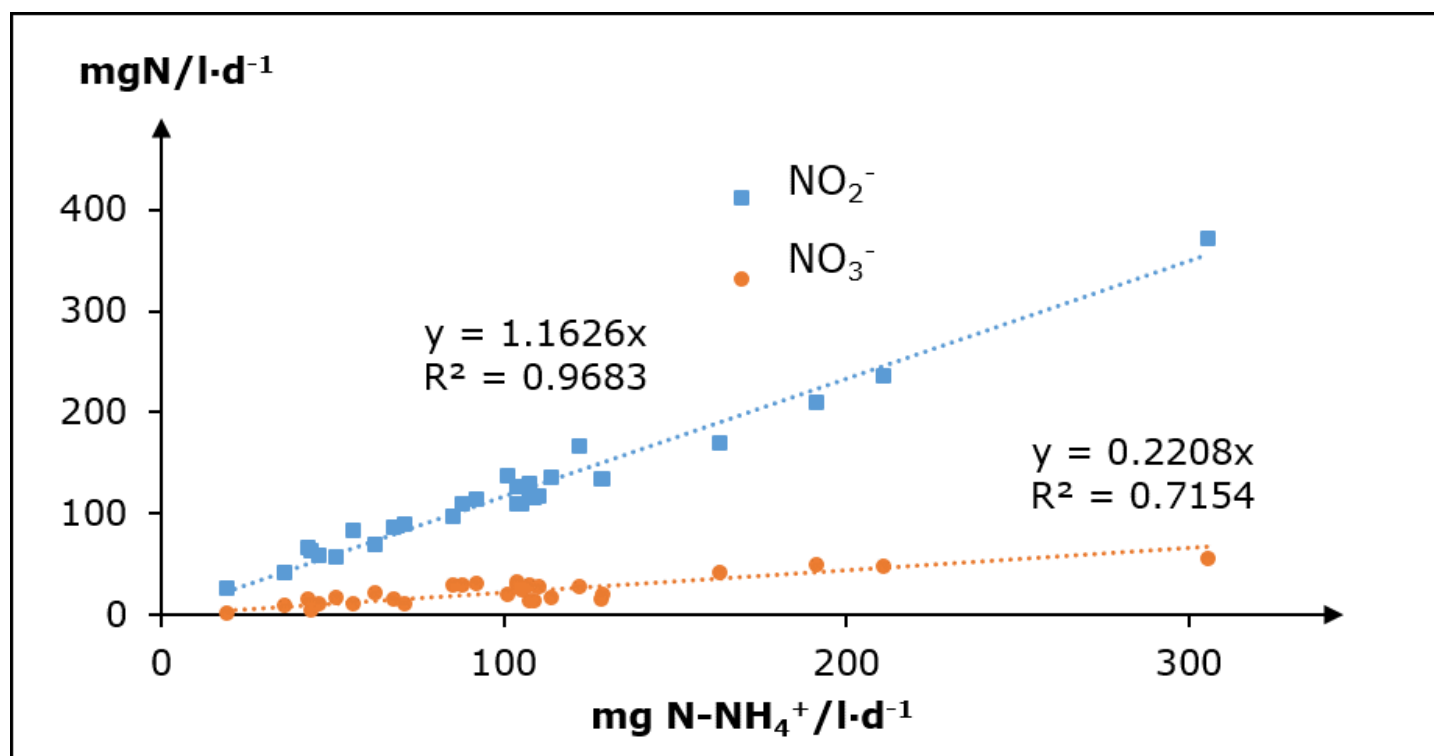


Figura 3. Correlación de la remoción de N-NO₂⁻ y producción N-NO₃⁻ con respecto a la producción de N-NH₄⁺.

El punto de inicio de la tercera etapa (posterior al día 55), además de una remoción de N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻, se caracteriza por la aparición de una espuma en la parte superior de la fase líquida del reactor, indicativo de desprendimiento gaseoso. En esta fase se aprecia un aumento exponencial del acumulado del N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻ removido, además comienza un aumento del acumulado del N-NO₃⁻ producido (Figura 1). En cuanto al comportamiento de las relaciones estequiometrias, se observa que el decrecimiento en su valor se hace cada vez menor (Figura 2), acercándose a un valor asintótico. Los valores promedios estimados para las relaciones estequiométricas N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻/N-NH₄⁺ en esta

etapa son de 1.16 y 0.22, respectivamente (Figura 3). Tales valores son similares a los valores típicos para la reacción anammox (1.32 y 0.26, respectivamente) reportados por primera vez (Strous *et al.*, 1998).

Comparación entre diferentes enriquecimientos

Aunque todos los enriquecimientos estudiados en el presente trabajo presentan un comportamiento similar al mostrado en la Figura 1, observándose al menos las tres primeras etapas, no en todos se logra una etapa de establecimiento o estacionaria en la cual se puedan realizar estudios para caracterizar la biomasa. Esto solo fue posible para los enriquecimientos con inóculos de la PTAR Luyanó. Durante la fase estacionaria se observa un cambio marcado en la coloración del lodo de marrón a rojizo, color característico de la biomasa con actividad anammox. En el espectro visible del efluente (Figura 4) se observa un hombro entre los 400 y 480 nm, y una pequeña señal entre los 520 y 550 nm, atribuidas al citocromo c (Dosta *et al.*, 2008), que se presenta en grandes cantidades para las bacterias anammox, y que juegan un importante papel en su metabolismo (Ni & Zhang, 2013). También se observa la formación de partículas o gránulos (aproximadamente 1 mm de diámetro) de color rojo con gran capacidad de sedimentación ($SS_{\text{efluente}} < 40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Se ha reportado por varios autores que las bacterias anammox se caracterizan por formar agregados en formas de pequeños gránulos que favorecen su capacidad de sedimentación (Ni *et al.*, 2010a; van der Star *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2017).

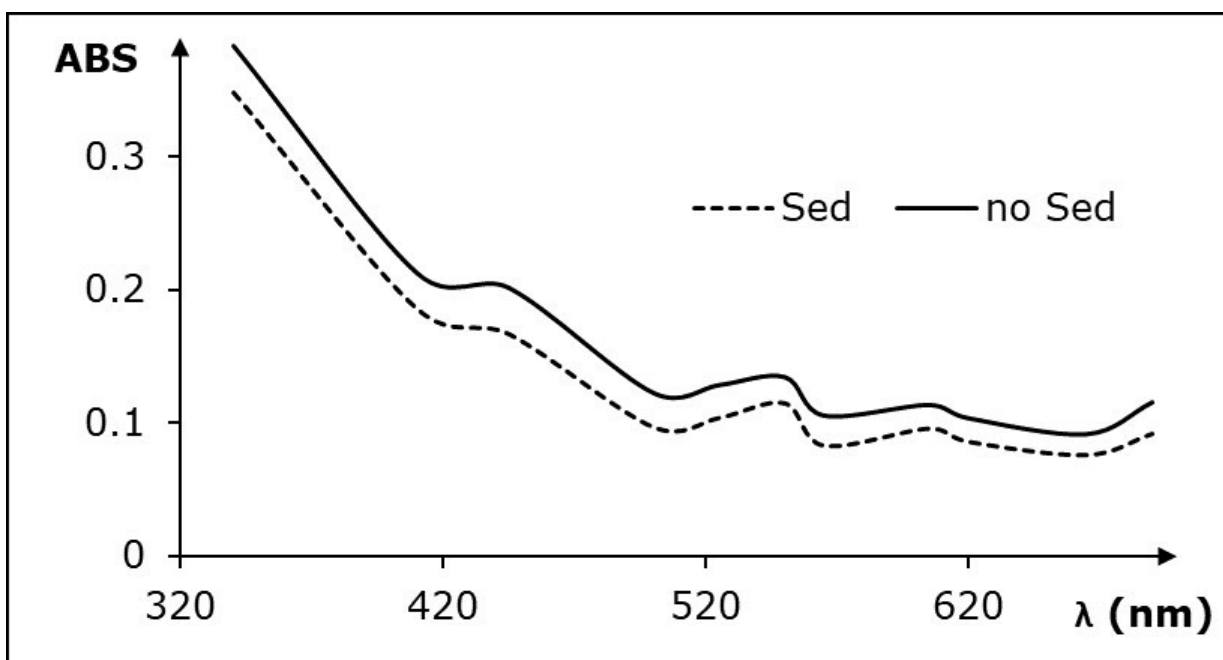


Figura 4. Espectro de absorbancia visible del efluente.

Todos los inóculos empleados para los enriquecimientos se caracterizan por ser lodos nitrificados (Tabla 1), con excepción del sistema de Hicacos, donde debido a las altas temperaturas en ambientes tropicales (28 °C promedio), la desnitrificación ocurre de forma descontrolada en el sedimentador secundario. En los otros sistemas de tratamiento existe una etapa previa de desnitrificación. Las pequeñas diferencias en las condiciones ambientales solo se deben a la temperatura del proceso de enriquecimiento. Los reactores se operan a temperatura ambiente (23-30 °C) sin ambiente controlado.

En la Tabla 3 se reportan algunos de los parámetros característicos para la biomasa resultante en cada uno de los experimentos de los enriquecimientos evaluados. Las diferencias en la duración de la primera

etapa no se reportan. El comportamiento de esta etapa depende básicamente de las características propias de cada inóculo, fundamentalmente de la cantidad de materia orgánica biodegradable extracelular y del grado de envejecimiento de la biomasa (Araujo *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2009). El tiempo en que inicia la tercera etapa o comienzo de la fase de propagación de la actividad anammox es variable (Tabla 3). En la literatura se reporta que la actividad anammox no se evidencia antes de los 60 días para enriquecimientos con inóculos provenientes de sistemas municipales de tratamiento de aguas residuales y con biomasa en suspensión operados en discontinuo y a 35 °C (Araujo *et al.*, 2011; Dapena-Mora *et al.*, 2004).

Tabla 3. Comparación entre diferentes enriquecimientos con inóculos de lodos activados.

Origen del lodo		Fase III		máxima remoción (mgN _r ·l ⁻¹ ·d ⁻¹)	SSV (g·l ⁻¹)	Temperatura (°C)	μ _{ap} (d ⁻¹)
		t inicio (día)	t final (día)				
Luyanó	Exp. 1	45-50	150	401	2.50	25 - 28	0.085
	Exp. 2	55-60	90	80	3.68	23 - 26	0.077
	Exp. 3	35-45	120	202	3.20	27 - 30	-
Hicacos		85-88	145	127	3.50	28 - 31	0.056
MBR		106-127	120	95	3.00	23 - 26	0.052

El tiempo en que se evidencia la actividad anammox también se afecta con la presencia de OD durante los enriquecimientos. Varios autores han reportado que es necesario superar los 85 días para lograr actividad anammox cuando se mantienen condiciones microaerófilas ($OD < 0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) en la fase de propagación (Laureni *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013). Evidentemente este parámetro depende de la cantidad inicial de bacterias anammox presente en el inóculo, de la temperatura y de las condiciones del medio de crecimiento que se emplee. Como se observa en la Tabla 3, para enriquecimientos con inóculos procedente de la PTAR Luyanó este parámetro tiende a disminuir con un aumento ligero de la temperatura del sistema. Lo anterior está en correspondencia con la mayor actividad anammox a valores de temperatura entre 35 y 40 °C (Hoekstra *et al.*, 2017; Dosta *et al.*, 2008).

La velocidad de crecimiento aparente de las bacterias anammox (μ_{ap}) es uno de los parámetros cinéticos que también varía en función de las condiciones en las que se realizan los enriquecimientos (Zhang *et al.*, 2011; Ni & Zhang, 2013; Van Hulle *et al.*, 2010). Los valores de este parámetro en los enriquecimientos evaluados en este trabajo (0.085-0.052 d^{-1}) equivalen entre 8 y 13 días para duplicar la concentración de biomasa activa de las bacterias anammox, en correspondencia con el valor típico (11 días) reportado en la literatura para condiciones de enriquecimiento similares a las de este estudio (Strous *et al.*, 1998). Otros reportes indican que se puede aumentar la velocidad de crecimiento de las bacterias anammox, alcanzando de 5.5 a 7.5 días para duplicar la concentración de la biomasa activa anammox si se logra disminuir la

pérdida de la biomasa en las extracciones del efluente con el empleo de biorreactores de membrana (van der Star *et al.*, 2008).

Actividad anammox de la biomasa enriquecida

La actividad máxima específica (AME) es otro de los parámetros comúnmente empleado para determinar el grado de enriquecimiento de la biomasa con bacterias anammox. La evolución de este parámetro, determinado a partir de la suma del consumo de N-NH_4^+ y N-NO_2^- para el enriquecimiento del inóculo de la PTAR Luyanó (Exp. 1) se muestra en la Figura 5. La AME comienza a aumentar de forma exponencial desde el inicio de la tercera etapa (45 días) hasta alcanzar un máximo en el día 100. Tal comportamiento en la fase de propagación también se ha reportado por otros autores (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Trigo, Campos, Garrido, & Méndez, 2006) y se relaciona con el crecimiento de las bacterias anammox.

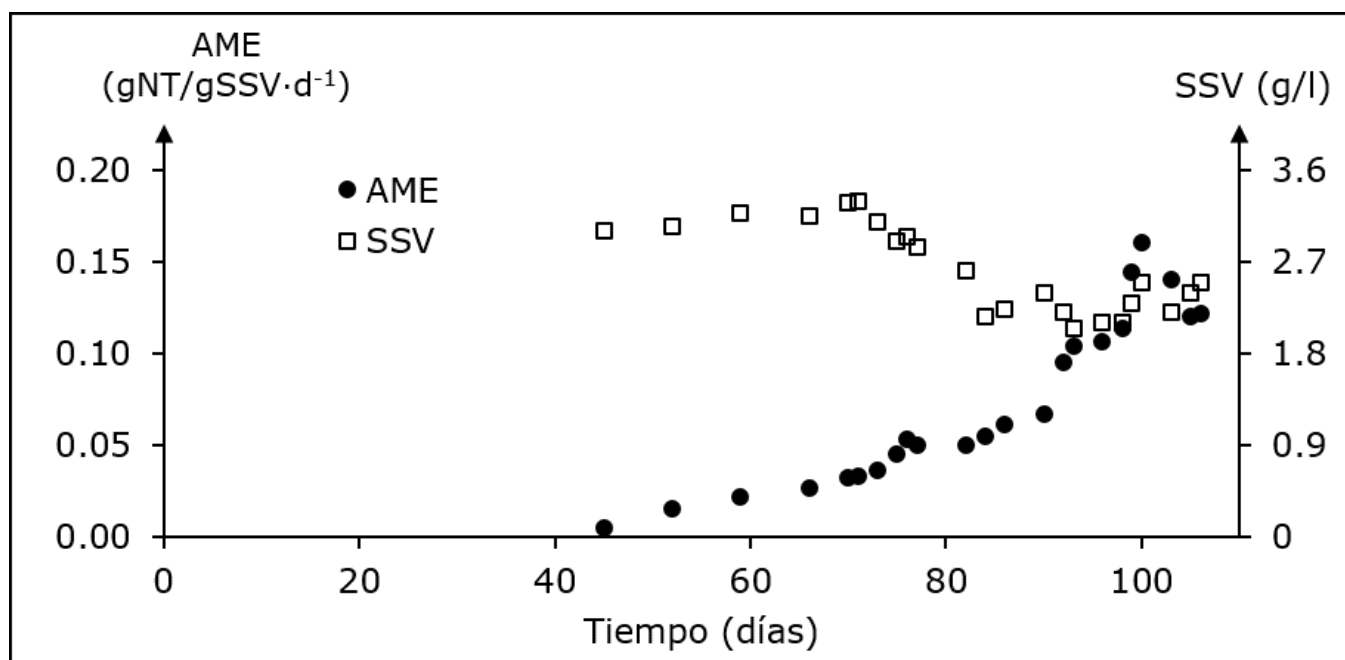


Figura 5. Comportamiento de la AME (actividad máxima específica) de las bacterias anammox en la biomasa y de los SSV durante el enriquecimiento con el inóculo de la PTAR Luyanó (experimento 1).

El aumento de la actividad anammox es un indicador del incremento de este grupo bacteriano en la biomasa. Sin embargo, el comportamiento de los SSV en el licor mezclado presenta una tendencia hacia la disminución (Figura 5) después que se evidencia la actividad de este grupo bacteriano. Lo anterior indica que conjuntamente a la fracción activa de los SSV se debe analizar la fracción inerte para explicar el comportamiento de los SSV en licor mezclado (Dapena-Mora *et al.*, 2004). Esta última fracción se afecta por el aporte debido a la muerte celular y por las extracciones de los SSV del sistema (Chen *et al.*, 2020).

Como se observan en el perfil de los SSV (Figura 5), cuando se evidencia la actividad anammox, los SSV aumentan de forma ligera desde 3.00 hasta 3.30 g·l⁻¹ durante la tercera etapa del enriquecimiento (45-70 día). En este intervalo de tiempo solo se realizaron tres extracciones del efluente en el sistema (aproximadamente 2.5 l por vez), por lo que no existe una pérdida apreciable de SSV. Lo anterior, en conjunto con el crecimiento de la biomasa anammox, explica la ligera alza en los SSV. Después del día 70, los SSV comienzan a disminuir, alcanzando un mínimo en 2.05 g·l⁻¹ en el día 90. Esto se debe a un aumento en más del doble de la frecuencia en las extracciones del efluente (dos veces por semana), provocando una baja en la concentración de los SSV inertes. También se afecta la concentración de la biomasa activa; al parecer ésta no aumenta, pues la carga removida de nitrógeno (N-NH₄⁺ + N-NO₂⁻) permanece prácticamente sin variación (110-120 mgNT·l⁻¹·d⁻¹). Por tanto, la AME con respecto a los SSV aumenta como se observa en la Figura 5. Después del día 90 se disminuye a dos veces por semana la frecuencia en la extracción del efluente (aproximadamente 1.5 l por vez). La carga afluente de las especies nitrogenadas va aumentando según sube la remoción de nitrito, operando con una carga removida de nitrógeno entre 150 y 350 mgNT·l⁻¹·d⁻¹ y la eficiencia media de remoción de nitrito es de 93.8%. Durante esta etapa se logra la mayor AME y también se observa un ligero incremento de los SSV (de 2.05 a 2.50 g·l⁻¹), lo cual sugiere que el crecimiento de la biomasa anammox supera la pérdida por muerte de la biomasa y las pérdidas de SSV por extracción.

Una vez estabilizado el sistema —capaz de operar con tasas de remoción superiores a los 200 g (N-NH₄⁺ + N-NO₂⁻)·l⁻¹·d⁻¹— se realizan

ensayos manométricos para la determinación de la AME. En este ensayo se mide la presión generada por el gas N_2 que se libera en la reacción anammox, considerando un comportamiento de gas ideal para estimar los moles de N_2 que se producen. Conjuntamente se sigue la cinética de las diferentes especies nitrogenadas en el reactor (Figura 6). En ambos casos, las mediciones de AME se realizaron cuando el $N-NH_4^+$ y $N-NO_2^-$ no se encontraban en concentraciones limitantes y el oxígeno disuelto (OD) se ha eliminado por medio de la desoxigenación con N_2 gas. Los resultados obtenidos en la determinación de la AME en ambos experimentos son similares (Tabla 4) y no presentan grandes diferencias con los valores calculados a partir de la remoción promedio diaria. En la Tabla 4 también se reportan los valores obtenidos para las relaciones estequiométricas entre las diferentes especies nitrogenadas, que no difieren de forma apreciable de las reportadas en la literatura (Strous *et al.*, 1998).

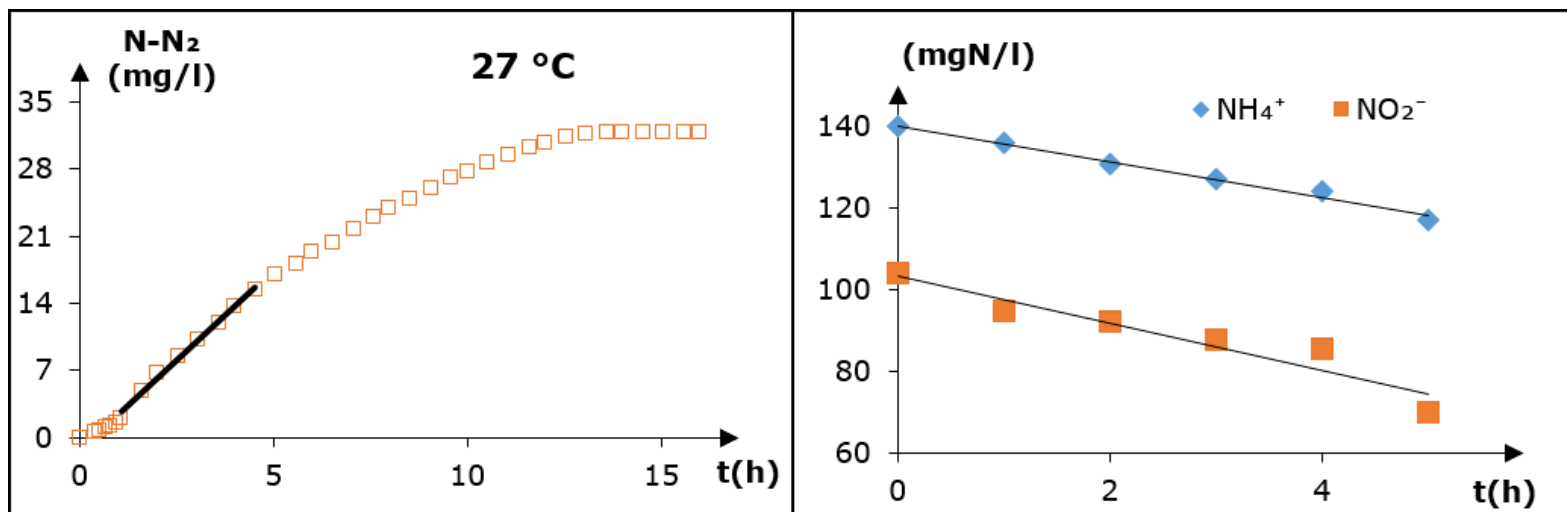


Figura 6. Experimentos manométricos y en el reactor para la determinación de la actividad anammox en la biomasa enriquecida con el inóculo de la PTAR Luyanó (experimento 1).

Tabla 4. Velocidad de remoción y relación estequiometría para la reacción anammox de la biomasa enriquecida con el inóculo de la PTAR Luyanó (experimento 1).

Especies nitrogenadas (X)	Día 76 (2.95 gSSV·l ⁻¹)		Día 106 (2.50 gSSV·l ⁻¹)	
	(mgN-X·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	N-X/N-NH ₄ ⁺	(mgN-X·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	N-X/N-NH ₄ ⁺
N ₂ (manométrico)	4.5 ± 0.6	0.97	4.6 ± 0.4	1.03
NH ₄ ⁺ (reactor)	4.6 (5.5) *	1.00	4.4 (5.3) *	1.00
NO ₂ ⁻ (reactor)	5.6 (7.1) *	1.22 (1.29) *	5.8 (7.7) *	1.32 (1.45) *
NO ₃ ⁻ (reactor)	(1.6) *	(0.29) *	(1.9) *	(0.35) *

*Determinaciones realizadas a partir de las variaciones en 24 horas de las concentraciones de las especies nitrogenadas en el reactor.

Inhibición de la actividad anammox

Una vez que se logra establecer una biomasa con actividad anammox es necesario operar los reactores con concentraciones superiores a los 100 mg N-NO₂⁻·l⁻¹. Varios autores han reportado que la actividad de estas bacterias se inhibe de modo irreversible cuando el sistema supera estos niveles de concentración (Strous *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 2010b). No obstante, otros autores reportan que es posible el crecimiento de bacterias anammox a concentraciones tan alta como 300 mgN-NO₂⁻·l⁻¹

solo con inhibición parcial de la actividad (Dapena-Mora *et al.*, 2007; Lotti *et al.*, 2012). De ahí que una alternativa para aumentar la carga de operación, en nuestro caso, es incrementar la concentración de las especies nitrogenados en el afluente, superando los $100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$.

Los enriquecimientos con inóculos de Luyanó son realizados con un aumento gradual de las concentraciones de las especies nitrogenadas, hasta alcanzar valores de $300 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ y $350 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$. En estas condiciones se alcanza el mayor valor de AME anammox para la biomasa enriquecida con el inóculo del Exp. 1 ($0.160 \text{ gNT} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Aunque en los 15 días siguientes al máximo de AME anammox disminuye un 40%. En los 15 días posteriores del mínimo alcanza un 85% de la AME con respecto al máximo. La pérdida de la AME anammox y su posterior recuperación se vuelve a observar en otro ciclo, incluso con valores porcentuales similares. En ambos casos, la disminución de la actividad comienza cuando se recarga el reactor con un 50% del volumen afluente; esto provoca una inhibición reversible, con pérdida de actividad por 24 a 48 horas. Al parecer, este fenómeno está más relacionado con la inhibición reversible debida al OD que una toxicidad por N-NO_2^- .

Durante la pérdida de actividad anammox en el reactor (Luyanó Exp. 1) se observa una disminución del pH, consumo de alcalinidad y N-NH_4^+ , con un aumento de los niveles de N-NO_2^- , que indican actividad de organismos autótrofos oxidantes del amonio (OAA) (Metcalf & Eddy, 2014). La AME anammox se restablece y comienza a subir al limitar la extracción del efluente, realizándose solo cuando la eficiencia de remoción de N-NO_2^- en el reactor supera el 85%. La recarga al reactor se hace con apenas un litro de residual afluente cada 3 o 5 días, manteniéndose la

carga de nitrógeno afluente con altas concentraciones de las especies nitrogenadas ($600 \text{ mgNT} \cdot \text{l}^{-1}$). Estas condiciones de operación solo minimizan la intrusión de OD al sistema, favoreciendo la recuperación de la AME anammox.

El efecto inhibitorio reversible del OD también se observa en los restantes enriquecimientos con inóculos de Luyanó y en los ensayos manométricos cuando no se efectúa la desoxigenación (Figura 7). En estos ensayos se observa una disminución de la presión en la primera etapa de los experimentos manométricos asociada con un consumo de un componente gaseoso. También en este periodo disminuye el pH y aumenta la concentración de N-NO_2^- con el consumo correspondiente de N-NH_4^+ . Todo esto indica nitrificación, posiblemente debido a la actividad de las OAA; a la vez, se inactivan las bacterias anammox por la presencia de OD.

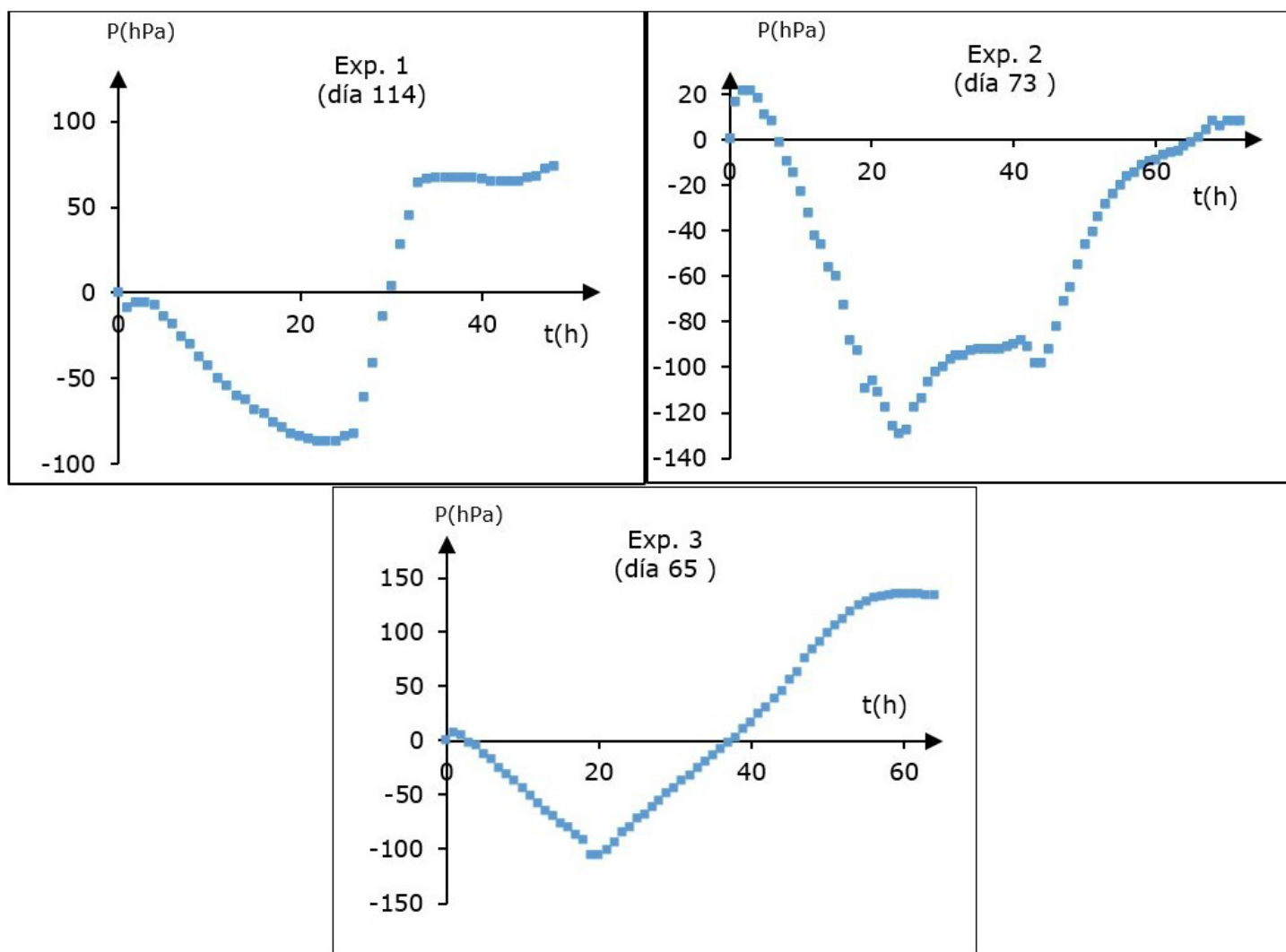


Figura 7. Variación de la presión durante los ensayos manométricos, sin desoxigenación del sistema, para los diferentes enriquecimientos con inóculos de la PTAR Luyanó.

La presión mínima promedio (100 hPa) en los ensayos similares a la Figura 7 se alcanza entre las 20 y 22 horas. Este comportamiento es prácticamente constante en todos los casos, cuando la fase líquida de partida presenta actividad anammox y de las OOA. La caída de presión

observada se debe a que el sustrato limitante para los OAA es el OD y sus niveles en la fase acuosa (cerrado y con volumen constante) se ven limitados en particular por la difusión de la fase gaseosa a la acuosa. Una vez que se consiguen niveles muy bajos de OD (valores mínimos de presión) se restablecen condiciones anaeróbicas que favorecen la actividad anammox, produciéndose N_2 (aumento de la presión en los experimentos manométricos); a partir del consumo de $N-NH_4^+$ y $N-NO_2^-$, sube el pH y se produce $N-NO_3^-$.

La alternativa para aumentar la carga en los enriquecimientos con inóculos de Hicacos y del MBR piloto fue incrementar la frecuencia de extracción del efluente en los reactores, pero de tal forma que no se superaran los niveles de nitritos considerados como tóxicos ($100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot l^{-1}$). Esto trae consigo un alza de la frecuencia de recarga del afluente, que contiene suficiente OD y provoca inhibición reversible de la actividad anammox. El OD en el reactor se consume debido sobre todo a la actividad OAA. Cuando en solución solo se tiene la presencia de nitrito no se observa una caída apreciable del OD, lo que indica que no hay actividad de las bacterias autótrofas nitrificantes del nitrito (OAN). Una vez que el OD alcanza niveles muy bajos se detiene la actividad de los OAA (estrictamente aeróbicos) y se tienen condiciones favorables para las bacterias anammox.

El control del pH para los enriquecimientos con inóculos de Luyanó se sigue muy de cerca, impidiendo que éste disminuya y se alcancen pH ácidos. La actividad de los OAA provoca una disminución del pH, un efecto poco deseable si los valores disminuyen a niveles inferiores a 7.0. Es conocido que a pH ligeramente ácidos puede formarse HNO_2 en

concentraciones suficientemente perjudiciales para el medio debido a su gran efecto tóxico (Van Hulle *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2012). Probablemente, debido a la inexperiencia en los primeros enriquecimientos (inóculos de Hicacos y MBR), se propiciaron niveles de OD en el licor mezclado que afectaron de forma negativa la actividad anammox y favorecieron la actividad de los OAA. Para estos dos casos se observa la pérdida progresiva de actividad anammox en cada ciclo, después que sube la frecuencia de extracciones y recargas. En conjunto, la biomasa cambia su coloración de rojizo a marrón. También se observa la disminución del pH, alcanzando en algunas ocasiones valores inferiores a 6.5. Estas señales de pérdida evidente de la actividad anammox sugieren condiciones tóxicas, por lo que se realiza el lavado de la biomasa con residual afluyente en ausencia de N-NO_2^- . Al parecer, el afluyente empleado para el lavado presenta suficiente OD, lo que condiciona a un nuevo ciclo que favorece la actividad de los OAA en presencia de suficiente N-NO_2^- y N-NH_4^+ , en detrimento de los anaeróbicos. Bajos estas condiciones se dejaron los sistemas 30 días y nunca más se recuperó la actividad anammox.

Conclusiones

El enriquecimiento de bacterias anammox se logra a temperatura ambiente ($\approx 26^\circ\text{C}$) y a partir de inóculos de lodos de sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales de climas tropicales (Cuba), operando reactores en discontinuo con biomasa en suspensión y manteniendo condiciones anaeróbicas y con alimentación de un residual

sintético. Esto se logra a partir de la similitud de los resultados obtenidos para las relaciones estequiométricas ($\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$ y $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ de 1.16 y 0.22, respectivamente) con las reportadas en la literatura para la reacción anammox. También la actividad máxima específica ($0.160 \text{ gNT} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y la eficiencia media de remoción de nitrito (93.8%) que se logra en los inóculos evaluados es similar a estudios con temperaturas controladas reportados por otros autores.

En este estudio se confirma con ensayos manométricos —cuando no se realiza la desoxigenación al sistema— el efecto inhibitorio reversible del OD en la actividad anammox. La presencia de OD provoca retardo en el comienzo de la fase de propagación de la actividad anammox, la cual no se evidencia antes de los 40 días aproximadamente para los enriquecimientos evaluados en este estudio. Además, se comprueba que la actividad anammox se pierde de modo irreversible cuando el sistema alcanza pH ácidos (< 6.5) por inadecuado control de la alcalinidad y una mayor actividad de la OAA sobre las bacterias anammox.

Referencias

Ali, M., Shaw, D. R., & Saikaly, P. E. (2020). Application of an enrichment culture of the marine anammox bacterium “Ca. Scalindua sp. AMX11” for nitrogen removal under moderate salinity and in the presence of organic carbon. *Water Research*, 170(1). DOI: 10.1016/j.watres.2019.115345

- APHA, AWWA, & WEA, American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2012). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (22nd ed.). Washington, DC, USA: American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation.
- Araujo, J. C., Campos, A. C., Correa, M. M., Silva, E. C., Matté, M. H., Matté, G. R., Von Sperling, M., & Chernicharo, C. A. L. (2011). Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science & Technology*, 64(7), 1428-1434. DOI: 10.2166/wst.2011.632
- Cao, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Daigger, G. T. (2017). Mainstream partial nitritation-anammox in municipal wastewater treatment: Status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1365-1383. DOI: 10.1007/s00253-016-8058-7
- Chen, G. M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2020). *Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design*. London, UK: IWA Publishing.
- Chen, X., Liu, L., Bi, Y., Meng, F., Wang, D., Qiu, Ch., Yu, J., & Wang, Sh. (2023). A review of anammox metabolic response to environmental factors: Characteristics and mechanisms. *Environmental Research*, 223. DOI: 10.1016/j.envres.2023.115464

- Dapena-Mora, A., van Hulle, S. W. H., Campos, J. L., Méndez, R., Vanrolleghem, P. A., & Jetten, M. (2004). Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1421-1428. DOI: 10.1002/jctb.1148
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., & Jetten, M. S. M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 859-865. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.06.018
- Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J. R., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Mata-Álvarez, J., & Méndez, R. (2008). Short and long-term effects of temperature on the anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 688-693. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.10.082
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J. J., Siegrist, H., van der Meer, J. R., & Zehnder, A. J. B. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 175, 198-207. DOI: 10.1007/s002030100255
- García-Ruíz, M. J. (2018). *Desarrollo de una nueva tecnología de eliminación de nitrógeno basada en procesos de nitrificación parcial-anammox mediante biofiltración en lecho fijo* (tesis de doctorado). Universidad de Granada, Granada, España.

- Gómez, A., Arrieta, F. J., Del Molino, F., Larrea, L., Escudero, J., Simón, P., & Lardín, C. (2020). Tratamiento anammox en línea principal: experiencia piloto en la EDAR de Jumilla. *Tecnoaqua*, 46, 70-77.
- Hoekstra, M., De Weerd, F. A., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2017). Deterioration of the anammox process at decreasing temperatures and long SRTs. *Environmental Technology*, 39(5), 658-668. DOI: 10.1080/09593330.2017.1309078
- Jin, R.-C., Yang, G.-F., Yu, J.-J., & Zheng, P. (2012). The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79. DOI: 10.1016/j.cej.2012.05.014
- Kamp, A., Mørck, L. D., Thøgersen, N. B., Revsbech, N. P., Thamdrup, B., & Andersen, M. H. (2019). Anammox and partial nitrification in the mainstream of a wastewater treatment plant in a temperate region (Denmark). *Water Science & Technologic*, 797, 1397-1405. DOI: 10.2166/wst.2019.141
- Kartal, B., Maalcke, W. J., De Almeida, N. M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op-den-Camp, H. J. M., Harhangi, H. R., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H. G., Keltjens, J. T., Jetten, M. S. M., & Strous, M. (2011). Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479, 127-131. DOI: 10.1038/nature10453
- Kuenen, J. G. (2008). Anammox bacteria: From discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 320-326.

- Lackner, S., Gilbert, E. M., Vlaeminck, S. E., Joss, A., Horn, H., & van Loosdrecht, M. C. M. (2014). Full-scale partial nitrification/anammox experiences. An application survey. *Water Research*, 55, 292-303. DOI: 10.1016/j.watres.2014.02.032
- Laureni, M., Weissbrodt, D. G., Szivák, I., Robin, O., Nielsen, J. L., Morgenroth, E., & Joss, A. (2015). Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Water Research*, 80, 325-336. DOI: 10.1016/j.watres.2015.04.026
- Li, B., Zhang, W., Yan, X., Huang, X., Li, J., & Li, Y. (2017). Startup and performance stability of a nitrification-anammox reactor using granular sludge. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(1), 173-180. DOI: 10.15244/pjoes/64497
- Li, W., Li, J., Liu, Y., Gao, R., Deng, L., Kao, C., & Peng, Y. (2022). Mainstream double-anammox driven by nitrification and denitrification using a one-stage step-feed bioreactor with real municipal wastewater. *Bioresourse Technology*, 343, 126-132. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126132
- Lotti, T., van der Star, W. R. L., Kleerebezem, R., Lubello, C., & van Loosdrecht, M. C. M. (2012). The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, 46(8), 2559-2569. DOI: 10.1016/j.watres.2012.02.011
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Lubello, C., & van Loosdrecht, M. C. M. (2014). Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Research*, 60, 1-14. DOI: 10.1016/j.watres.2014.04.017

- López-Vázquez, C. M., Menéndez, C., & Fall, C. (2019). *Métodos experimentales para el tratamiento de aguas residuales* (2nd ed.). London, UK: IWA Publishing.
- Metcalf and Eddy. (2014). *Wastewater engineering. Treatment and resource recovery* (5th ed.). New York, USA: McGraw-Hill Education.
- Ni, B.-J., Hu, B.-L., Fang, F., Xie, W.-M., Kartal, B., Liu, X.-W., Sheng, G.-P., Jetten, M., Zheng, P., & Yu, H.-Q. (2010a). Microbial and physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2652-2656. DOI: 10.1128/AEM.02271-09
- Ni, S.-Q., Lee, P.-H., Fessehaie, A., Gao, B.-Y., & Sung, S. (2010b). Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor. *Bioresource Technology*, 101, 1792-1799. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.10.050
- Ni, S.-Q., & Zhang, J. (2013). Anaerobic ammonium oxidation: From laboratory to full-scale application. *BioMed Research International*. DOI: 10.1155/2013/469360
- Peralta, J. S., & Serrato, M. G. (2016). *Potencial del tratamiento anammox en la eliminación de amonio de medio sintético a escala de laboratorio a partir de inóculos de ambientes tropicales* (tesis de grado). Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.

- Sánchez-Guillén, J. A., Cuéllar, P. R., López-Vázquez, C. M., De Oliveira, L. M., Brdjanovic, D., & van Lier, J. B. (2015a). Anammox cultivation in a closed sponge-bed trickling filter. *Bioresource Technology*, 186, 252-260. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.073
- Sánchez-Guillén, J. A., Jayawardana, L. K. M. C. B., López-Vázquez, C. M., De Oliveira, L. M., & van Lier, J. B. (2015b). Autotrophic nitrogen removal over nitrite in a sponge-bed trickling filter. *Bioresource Technology*, 187, 314-325. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.140
- Schalk, J., Oustad, H., J. Kuenen, G., & Jetten, M. S. M. (1998). The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 61-67. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12801.x
- van de Graaf, A. A., De Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., & Kuenen, J. G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142, 2187-2196. DOI: 10.1099/13500872-142-8-2187
- van der Star, W. R. L., Abma, W. R., Blommers, D., Mulder, J. W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C., & van Loosdrecht, M. C. M. (2007). Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, 41, 4149-4163. DOI: 10.1016/j.watres.2007.03.044
- van der Star, W. (2008). *Growth and metabolism of anammox bacteria* (tesis de doctorado). Technological University of Delft, Delft, Netherlands.

- van der Star, W. R. L., Miclea, A. I., van Dongen, U. G. J. M., Muyzer, G., Picioreanu, C., & van Loosdrecht, M. C. M. (2008). The membrane bioreactor: A novel tool to grow Anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 286-294. DOI: 10.1002/bit.21891
- Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G., & Jetten, M. (1997). Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2446-2448. DOI: 10.1128/aem.63.6.2446-2448.1997
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3248-3250. DOI: 10.1128/AEM.65.7.3248-3250.1999
- Tang, Ch.-J., Zheng, P., Mahmood, Q., & Chen, J.-W. (2009). Start-up and inhibition analysis of the Anammox process seeded with anaerobic granular sludge. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36(8), 1093. DOI: 10.1007/s10295-009-0593-0
- Trigo, C., Campos, J. L., Garrido, J. M., & Méndez, R. (2006). Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 475-487. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.05.008

- Van Hulle, S. W. H., Vandeweyer, H. J. P., Meesschaert, B. D., Vanrolleghem, P. A., Dejans, P., & Dumoulin, A. (2010). Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal*, 162(1), 1-20. DOI: 10.1016/j.cej.2010.05.037
- Zhang, L., Jiachun, Y., Ma, Y., Li, Z., Fujii, T., Zhang, W., Takashi, N., & Furukawa, K. (2010). Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 72-78. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.12.005
- Zhang, L., Yang, J., Hira, D., Fujii, T., Zhang, W., & Furukawa, K. (2011). High-rate nitrogen removal from anaerobic digester liquor using an up-flow anammox reactor with polyethylene sponge as a biomass carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 306-311. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.10.010
- Zhang, L., Narita, Y., Gao, L., Muhammad, A., Oshiki, M., & Okabe, S. (2017). Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Research*, 116, 296-303. DOI: 10.1016/j.watres.2017.03.027
- Zhang, X., Li, D., Liang, Y., He, Y., Zhang, Y., & Zhang, J. (2013). Autotrophic nitrogen removal from domestic sewage in MBR-CANON system and the biodiversity of functional microbes. *Bioresource Technology*, 150, 113-120. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.067