



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVIDAD ANAMMOX EN LODOS PROCEDENTES DE UN
HUMEDAL NATURAL UBICADO EN LA PRESA JOSÉ ANTONIO ÁLZATE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ANEL VALENCIA NAVA

ASESOR:

DRA. GEHOVANA GONZÁLEZ BLANCO

COASESOR:

DRA. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ

NOVIEMBRE 2017

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México. Fue beneficiada con la beca COMECyT con el folio 17ABTL0029.

AGRADECIMIENTOS

En primera estancia quiero agradecer a la Universidad Autónoma del Estado de México, la cual ha sido mi segundo hogar por muchos años, también agradecer a todos los profesores, compañeros y amigos que dentro de esta institución han sido parte importante en mi formación. De manera muy especial quiero agradecer a mis asesoras de tesis, ya que sin su guía y apoyo este trabajo no hubiese sido posible, principalmente me quiero dirigir a la Dra. Gehovana, la cual ha sido más que una asesora para mí, se ha convertido en alguien a quien le he tomado cariño, admiración y respeto ya que me ha brindado su apoyo y orientación en todo momento.

Pero sobre todo quiero agradecer profundamente a mis padres, Sotero y Yolanda, los cuales han sido mi eterno apoyo y ejemplo a seguir, gracias por su labor diaria de educarme para ser mejor persona, gracias por las risas, las palabras de aliento, y por todo el amor brindado. Gracias a mi hermana Jaqueline, quien ha sido mi más sincero amor y la razón principal de seguir adelante, gracias por estar a mi lado cuando necesite apoyo o motivación. Gracias al resto de mi familia por todo el amor otorgado. También quiero agradecer a mi prometido, el cual ha llenado mi vida con inmensas alegrías y amor, gracias por todo apoyo, paciencia y amor en todo momento.

Finalmente, quiero agradecer a todos los involucrados de manera directa o indirecta en este trabajo de tesis. ¡Gracias a todos!.

DEDICATORIAS

Con mucho amor a mis padres,

Sotero y Yolanda.

A mi hermana Jaqueline.

A mi prometido, Rodolfo.

Los amo inmensamente, este trabajo está dedicado a ustedes.

RESUMEN

La Presa José Antonio Álzate (PJAA) ubicada en el municipio de Toluca, es un sistema que presenta humedales a lo largo de su cauce. La presa ha sido reportada como una zona con alto grado de contaminación a causa del vertido de aguas residuales domésticas e industriales, las cuales se caracterizan por contener compuestos nitrogenados y metales pesados, entre otros contaminantes. Hasta hace pocos años, se reportaba que los compuestos nitrogenados eran eliminados en los sistemas de humedales por dos mecanismos: 1) por la absorción por la flora del lugar y 2) por la actividad microbiana nitrificante y desnitrificante, sin embargo, la modificación del ciclo del nitrógeno en este siglo sugiere la participación de los microorganismos anammox (oxidación anaerobia del amonio) en tal proceso. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad anammox en lodos obtenidos del rizoma de *Typha* sp., humedal natural localizado en la PJAA. En cultivo en lote se evaluaron cinco concentraciones de N-NO_2^- (15, 30, 50, 70 y 100 mg/L), manteniendo constante la concentración de N-NH_4^+ en 100 ± 10 mg/L. En todos los ensayos, la oxidación del amonio estuvo acoplada a la reducción del nitrito, con producción de N_2 . Las eficiencias de consumo de nitrito para las concentraciones de 15 a 50 mg/L de N-NO_2^- fueron mayores a 95%, mientras que las eficiencias de amonio aumentaron de 14 a 48%. En los ensayos con 70 y 100 mg/L de N-NO_2^- , el consumo de nitrito fue de 74 y 58%, con velocidades específicas de consumo de 0.51 a 0.44 mg N-NO_2^- /g SSV respectivamente, indicando un fenómeno de inhibición por sustrato. Una vez comprobada la actividad anammox de los lodos, estos fueron expuestos a cinco concentraciones de cromo hexavalente (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 mgCr(VI)/L). Los cultivos fueron monitoreados 120 horas y en ninguno de los casos se observó consumo de los sustratos. Por lo que se procedió a realizar estudios de recuperación con la finalidad de discernir un efecto tóxico o inhibitorio del Cr(VI) sobre el cultivo. Para la

concentración expuesta a 0.1 mg Cr(VI)/L, el consumo de sustratos u actividad se observó después de 122 hrs de cultivo, mientras que para la concentración de 2 mg/L se presentó hasta las 166 hrs. En términos de eficiencias se observó una disminución del 25 hasta del 89% con respecto al cultivo control, no obstante, el rendimiento fue cercano a uno, a excepción de la concentración de 2 mgCr(VI)/L, donde no se detectó producción de biogás. La recuperación de la actividad del cultivo evidencian que el Cr(VI) provocó un efecto inhibitorio y no tóxico.

El estudio proporciona información nueva y útil sobre la actividad anammox de lodos procedentes de humedales, los cuales pueden ser utilizados como inóculo potencial para el tratamiento de aguas residuales en reactores anammox y/o humedales construidos.

ABSTRACT

The José Antonio Álzate Dam (PJAA) In the municipality of Toluca, there is a system that presents wetlands along its channel. The dam has been reported as an area with a high degree of pollution due to domestic and industrial wastewater discharges, which are characterized by nitrogen compounds and heavy metals, among other contaminants. Until a few years ago, it was reported that the nitrogen compounds were eliminated in the wetland systems by two mechanisms: 1) by the absorption by the local flora and 2) by the nitrifying and denitrifying microbial activity, however, the modification of the cycle of nitrogen in this century suggests the involvement of anammox (ammonium oxidation-anaerobic) microorganisms in such a process. So, in the present work the anammox activity in sludge of the rhizome of *Typha* sp., natural wetland located in the PJAA was evaluated. Five concentrations of N-NO_2^- (15, 30, 50, 70 and 100 mg/L) were evaluated in batch culture, keeping the N-NH_4^+ concentration constant at 100 ± 10 mg/L. In all trials, the ammonium oxidation was coupled to nitrite reduction, N_2 production. Nitrite consumption efficiencies at concentrations of 15-50 mg / L of N-NO_2^- were greater than 95%, while ammonium efficiencies increased from 14 to 48%. Nitrogen consumption of 74 and 58%, with specific consumption measures of 0.51 to 0.44 mg of N-NO_2^- /g SSV respectively, were tested in 70 and 100 mg / L N-NO_2^- indicating a phenomenon of substrate inhibition. Once the anammox activity of the sludge was verified, they were exposed to five concentrations of hexavalent chromium (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mgCr(VI)/L). The cultures were monitored for 120 hours and in none of the cases did the substrate consumption appear. Therefore, it was processed to perform recovery studies in order to discern a toxic or inhibitory effect of Cr(VI) on the culture. For the concentration exposed to 0.1 mg of Cr(VI)/L, the consumption of substrates or activity was after 122 hours of culture, whereas for the concentration of 2 mg/L it was presented up to 166 hours. In

terms of efficiencies, up to 89% can be compared with the control of the crop, however, the yield was close to an exception of the concentration of 2 mg Cr(VI)/L, where no biogas production was detected. The recovery of the activity of the culture evidences that Cr(VI) caused an inhibitory and non-toxic effect.

The study provides new and useful information on the anammox activity of wetland sludge, which can be used as potential potential for the treatment of wastewater in anammox reactors and/or constructed wetlands.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 Panorama actual del agua.....	2
1.2 Problemática del Río Lerma y la Presa José Antonio Álzate	3
1.3 Fuentes de contaminación.....	4
1.4 Ciclo del nitrógeno	8
1.4.1 Nitrificación.....	11
1.4.2 Desnitrificación	12
1.4.3 Oxidación anaerobia del amonio (anammox).....	13
1.5 Humedales y el ciclo del nitrógeno	20
1.6 Trabajos realizados en la PJAA.....	23
1.7 Humedales construidos y naturales.....	24
II. JUSTIFICACIÓN.....	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS.....	31
5.1 General.....	31
5.2 Específicos.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Colecta y conservación del consorcio microbiano.....	32
6.2 Cultivo en lote o discontinuo	32
6.3 Métodos analíticos.....	35
6.3.1 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles por gravimetría, método APHA	35
6.3.2 Cuantificación de amonio por un electrodo selectivo	36
6.3.3 Cuantificación de nitrato y nitrito por espectrofotometría UV-VIS.....	37
6.3.4 Cuantificación de nitrógeno molecular por desplazamiento de biogás y cromatografía de gases.....	38
6.3.5 Cuantificación de cromo hexavalente por espectrofotometría UV-VIS, MNX-AA-044-SCFI-2014	40
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41

7.1 Ensayos de actividad anammox	41
7.2 Ensayos con cromo hexavalente	45
VII. CONCLUSIONES GENERALES	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXO 1: ARTÍCULO PUBLICADO	68

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Hasta finales de los años ochenta fueron los efectos negativos de las descargas de agua residual con altas cargas de nitrógeno (Weier y col., 1993), por lo que el interés por la búsqueda de procesos y técnicas que permitieran la eliminación de los compuestos nitrogenados en aguas contaminadas cobro gran importancia, dentro de los tratamientos más utilizados sobresale el uso de sistemas biológicos. Hasta hace pocos años el principal proceso de eliminación biológica de los compuestos nitrogenados era la nitrificación acoplada a la desnitrificación, lo cual involucraba elevados gastos de operación debido a que los procesos se llevaban a cabo en unidades experimentales separadas y al suministro de aire en el reactor nitrificante y de materia orgánica en el reactor desnitrificante. Sin embargo, el descubrimiento del proceso anammox (oxidación anaerobia del amonio) ha dado pie a su uso en el tratamiento de agua residuales, este proceso biológico destaca por su eficacia en la eliminación de los compuestos nitrogenados y sus bajos costos comparado con el acoplamiento de los procesos de nitrificación-desnitrificación (Cárdenas y Sánchez, 2013). No obstante, hasta el momento la mayoría de los estudios del proceso anammox se han centrado en obtener biomasa de sistemas terrestres (Zopfi y col., 2009), manglares (Li y col., 2011b; manglares (Li y col., 2011a; Li y col., 2011b; Meyer y col., 2005; Wang y col., 2012), campos petrolíferos (Li y col., 2010), sistemas de tratamiento de aguas residuales (Wang y col., 2010), y ecosistemas marinos y dulces (Schmid y col., 2007; Hirsch y col., 2011; Hong y col., 2011), pero existe poca información sobre la actividad de los microorganismos anammox en sistemas fitorremediadores como lo son los humedales. La posible actividad anammox habrá una gran posibilidad de su uso en el campo de la biología ambiental y biotecnología, como posible fuente de inóculo para la biorremediación, por lo que se vuelve necesaria la generación de información al respecto.

1.1 Panorama actual del agua

El agua es un recurso indispensable para la supervivencia en el planeta, es la sustancia más abundante en la biosfera. Se calcula que existen mil cuatrocientos millones de km³ de agua, de los cuales el 97.5% es agua salada contenida en mares y océanos, y el 2.5% restante es agua dulce. Del agua dulce sólo el 0.03% se encuentra disponible para uso humano a través de la explotación de los mantos superficiales (ríos, lagos, presas, lagunas, etc.) (Camargo y col., 2005; Dapena 2007; López 2009).

En México, se estima que el 77% del agua de consumo es utilizada para la agricultura, 14% para el abastecimiento público, 5% para el funcionamiento de fuentes hidroeléctricas y 4% para actividades industriales (CONAGUA, 2014). Con el aumento demográfico tanto la demanda de consumo como la contaminación han incrementado, provocando el decaimiento de los cuerpos receptores: ríos, lagos, lagunas, presas, estuarios, etc.; lo que se traduce en la desaparición de la vegetación, así como en la muerte de peces y demás animales acuáticos. Por otra parte, la descarga directa a cuerpos de agua de las aguas residuales generadas en las actividades productivas, limita el uso del recurso para su manejo en actividades productivas como el riego, la pesca y la agricultura, para el consumo (agua potable) y recreación de contacto.

La falta de un tratamiento adecuado y reúso de las aguas residuales generadas; conducen a la sobre explotación del recurso, la contaminación de ecosistemas, la degradación de los suelos y un impacto negativo sobre la seguridad alimentaria. Ante esta problemática, el saneamiento de las aguas residuales adquiere más importancia para asegurar su tratamiento y adecuada disposición en los cuerpos receptores, en condiciones que no perjudiquen al medio ambiente y la salud de la población (de la Peña y col., 2013).

1.2 Problemática del Río Lerma y la Presa José Antonio Álzate

En el Estado de México, la mayor parte de descargas de agua residual en cuerpos de agua natural se realiza sin un tratamiento o con un tratamiento deficiente previo que ocasiona problemas de contaminación en los cuerpos receptores, uno de los casos más relevantes es el relacionado al Río Lerma que registra un alto grado de contaminación (Barceló-Quintal y col., 2002; Loyd y col., 2003).

El Río Lerma nace de tres lagos interconectados ubicados en el valle de Toluca; Chignahuapan, Chimaliapan y Chiconahuapan, cuenta con una longitud de 738.30kilómetros y una superficie de 5,354 km², presenta elevaciones que fluctúan entre los 2,420 y superiores 4,500 msnm, encuentra su primer cuerpo regulador en la Presa José Antonio Álzate (PJAA) (del Águila, Lugo y Vaca, 2005; García-Aragón y col., 2003; García-Aragón y col., 2007; García-Aragón y col.,2013; Gobierno del Estado de México, (2015).

La PJAA se ubica en los municipios de Almoloya de Juárez e Ixtlahuaca, a 25km al norte de Toluca, fue construida entre los años 1960 y 1962 con el fin de ser utilizada como reserva de agua para irrigación durante los meses de Noviembre a Abril y como depósito para el control de inundaciones durante los meses de Mayo a Octubre, cuenta con un caudal de 2 m³/s en época de estiaje y de 40 m³/s en épocas de lluvia (Barceló-Quintal y col., 2002; García y col., 2007; Rosas de Alva y col., 2010; Barceló-Quintal y col., 2012a). Los valores acerca de la calidad del agua en la presa presentan variaciones anuales de modo directo a la cantidad de embalaje, en los meses de Mayo y Agosto la dilución decrece de manera significativa, por lo que la cantidad de sólidos se incrementa causando una mayor actividad en procesos anerobios, en temporadas con mayor

embalaje debido al aumento en la disolución los procesos que requieren de oxígeno se ven favorecidos (Barceló, 2000).

Entre los principales contaminantes registrados en la presa sobresalen compuestos carbonados y nitrogenados, así como metales pesados (cromo, cobre, plomo, cadmio, entre otros) (Barceló-Quintal y col., 2002; García-Aragón y col., 2003; García-Aragón y col., 2007; López-Galván, 2009; Barceló-Quintal y col., 2012a). La presencia de estos compuestos ha provocado condiciones sépticas y peligrosas para la salud lo que limita el uso de esta agua (Rosas de Alva y col., 2010), no obstante, cabe señalar que las comunidades aledañas a la presa continúan utilizando el agua para el riego de cultivos y para el consumo de animales de corral y ganado (Gobierno del Estado de México, 2015).

1.3 Fuentes de contaminación

Los contaminantes son definidos como compuestos orgánicos e inorgánicos que se encuentran en suspensión o disueltos en exceso por un período de tiempo tal, que afecte de manera negativa la salud de los ecosistemas y del humano (Olmos y col., 2004). De acuerdo con Pérez y Camacho (2011), los contaminantes pueden clasificarse en grupos, los cuales incluyen diversas sustancias procedentes de diferentes fuentes (Cuadro 1). Su clasificación concuerda con reportes nacionales e internacionales, que consideran que la contaminación por compuestos carbonatados y metales pesados es ocasionada principalmente por descargas industriales, mientras que los nutrientes como los compuestos nitrogenados proceden de efluentes domésticos, agrícolas e industriales (Fondo para la comunicación y la educación ambiental, *s.f.*; López, 2009; FAO, 2016).

Cuadro 1 Clasificación de los contaminantes por tipo de sustancia y procedencia.

TIPO DE CONTAMINACIÓN	EFFECTO Y PROCEDENCIA
Sustancias químicas inorgánicas	Incluye ácidos, sales y metales pesados provenientes de industrias. Estos son recalcitrantes y en el caso de los metales pueden ser bio-acumulables. Presentan afectos tóxicos a largo plazo.
Nutrientes vegetales inorgánicos	Dentro de estos se encuentran compuestos nitrogenados y fosfatos, los cuales son utilizados en sectores agrícolas como fertilizantes y pesticidas (sulfatos). Suelen disminuir la potabilidad del agua.
Compuestos orgánicos	Envuelve moléculas orgánicas procedentes de petróleo, gasolina, disolventes (hidrocarburos), los cuales proceden de diversas industrias. Estos compuestos en exceso suelen causar problemas de toxicidad y disminución de la biota del lugar.

(Modificado de Pérez y Camacho, 2011).

Los metales pesados son definidos como cualquier elemento químico metálico con una alta densidad que es tóxico, inclusive en concentraciones bajas. Entre los metales pesados más comunes se encuentran: mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), plomo (Pb), entre otros (Lucho y col., 2005). Estos metales suelen estar de manera natural en la corteza terrestre, sin embargo, no pueden ser degradados con facilidad debido a que no son necesarios para funciones metabólicas específicas en los seres vivos. El principal problema asociado a los metales pesados es su tendencia a la bioacumulación en tejidos animales y vegetales, lo cual, ocurre tras la ingesta directa o indirecta de los mismos a través del agua y los alimentos (Abollino y col., 2002; Angelova y col., 2004; Lucho y col., 2005).

De acuerdo con Prieto-Mendéz y col. (2009) el uso de fertilizantes con compuestos nitrogenados aportan al suelo nutrientes que permiten el desarrollo de plantas, las cuales pueden aumentar su capacidad acumulativa en presencia de nitrato de amonio, permitiendo un aumento en la biodisponibilidad de los metales pesados (Rodríguez-Ortiz y col., 2007).

Los compuestos nitrogenados, son de los contaminantes más comunes en el agua residual y presentan diferentes estados de oxidación: -3, -1, 0, +1, +2, +3, +5 para el amonio o amoníaco (NH_4^+ o NH_3), hidroxilamina (NH_2OH), nitrógeno molecular (N_2), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), respectivamente.

El amonio (NH_4^+) es la forma más oxidada de los compuestos nitrogenados, su forma no ionizada es el amoníaco (NH_3), el cual, es un gas. Su presencia en los cuerpos de agua provoca un decrecimiento de la concentración de oxígeno disuelto debido a la oxidación biológica de dichos compuestos, también son asociados al fenómeno de eutrofización que causa la proliferación desmesurada de algas y productores primarios provocando la muerte de la vida acuática. Algunos de los efectos tóxicos reportados son la asfixia en peces debido a la destrucción del epitelio branquial y alteraciones en la regulación de la actividad osmorreguladora de hígado y riñones; la toxicidad en humanos es a partir su especie no ionizada (amoníaco), la cual causa irritaciones de las membranas mucosas, úlceras y problemas del tracto respiratorio (Camargo y col., 2005). Debido a los efectos descritos, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacional, determina como límite máximo permisible un valor de 40 mg/L de nitrógeno total para descargas de aguas a cuerpos receptores (Diario Oficial de la Federación, 1997), mientras que la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estado Unidos, establece un límite máximo permisible de 10 mg N- NH_4^+ /L para garantizar la salud.

El nitrito tanto en forma ionizada (NO_2^-) como no ionizada (ácido nitroso, HNO_2) son considerados como tóxicos, su forma no ionizada contribuye principalmente con la acidificación del agua superficial. Ambas formas químicas provocan la disminución de la biodiversidad acuática y de su hábitat (Galoway y col., 2008). Los iones nitrito en organismos acuáticos pueden causar hipoxia y

muerte debido a que promueve la conversión de hemoglobina a metahemoglobina, la cual es una molécula incapaz de transferir oxígeno a los tejidos. De acuerdo con Camargo y col. (2005), la salud humana puede ser también afectada, ya que estos compuestos pueden reaccionar con aminas y amidas secundarias en el organismo y producir nitrosaminas, compuestos reportados como potencialmente cancerígenos.

El nitrato (NO_3^-) es el segundo compuesto nitrogenado más abundante en sistemas acuáticos, tiene efectos similares al nitrito debido a que el nitrato se reduce a nitrito (Cheng y Cheng, 2002). Como resultado de su baja permeabilidad, el nitrato presenta menor toxicidad en comparación a los dos compuestos anteriores, sin embargo, se tiene reportes que indican que el nitrato tiene efectos adversos en anfibios, peces e invertebrados. En los anfibios este compuesto ocasiona una reducción en la capacidad de nado, descenso del tamaño corporal y reducción en la tasa de fecundación (Birge y col., 2000).

En el caso de los seres humanos, la ingestión directa de aguas contaminadas por compuestos nitrogenados induce la formación de metahemoglobina, la cual suele afectar a niños menores de cuatro meses ocasionando el síndrome de bebé azul, este padecimiento se caracteriza por la pérdida de la capacidad de transporte de oxígeno en sangre debido a que la hemoglobina se encuentra en su forma oxidada, metahemoglobina, la cual presenta una baja afinidad por el oxígeno (Wolfe y Patz, 2002). El consumo de nitrito y nitrato favorece a la formación de nitrosaminas, las cuales presentan un alto potencial cancerígeno y mutagénico, lo que puede ocasionar deformaciones en recién nacidos (Gupta y col., 2000; Cerhan y col., 2001; Fwetrell, 2004). Además, la eutrofización de las aguas puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades infecciosas como la malaria, encefalitis y cólera. La ingesta de agua o alimentos con contenidos de toxinas algales también puede dar lugar a

trastornos fisiológicos como náuseas, vómitos, diarrea, gastroenteritis, neumonía, dolores musculares, entre otros y diversos síntomas de intoxicación (Busse y col., 2006). No obstante, pese al alto grado de toxicidad de los nitratos, la normatividad mexicana no contempla un límite máximo permisible para estos compuestos, sin embargo, agencias internacionales con la EPA establece como límite máximo permisible de descarga o presencia de 1 mg N-NO₂/L y de 10 mg N-NO₃/L.

Actualmente para eliminar el amonio, nitrato y nitrito de las aguas residuales se utilizan tanto métodos físico-químicos como biológicos, que se combinan o acoplan entre sí en trenes de tratamiento. Los métodos fisicoquímicos a pesar de tener altas eficiencias de eliminación, generalmente no resuelven el problema, ya que en realidad trasladan la contaminación de un sitio a otro, además de tener altos costos de operación, que incluye el costo de disposición del residuo sólido generado, así como el mantenimiento del sistema. Los procesos biológicos como la nitrificación (la oxidación del amonio a nitrato vía nitrito), la desnitrificación (reducción biológica de nitrato a nitrógeno molecular), y más recientemente la oxidación anaerobia del amonio (anammox), se han combinado para llevar a cabo la eliminación eficiente de estos contaminantes.

1.4 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial requerido por los seres vivos para llevar a cabo la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos y moléculas fundamentales implicadas en el metabolismo (Vitousek y Howarth, 1991; Martínez, 2009). Es el principal componente de la atmósfera(79%), sin embargo, esta cifra no está biodisponible para la mayoría de los seres vivos debido a que se encuentra en su forma molecular (N₂), la cual debido al triple enlace entre sus

átomos es aprovechada por algunas bacterias (Madigan y col., 2009). De manera natural el nitrógeno suele estar presente en diferentes estados de oxidación (Cuadro 2) y de acuerdo con Kartal y colaboradores (2008), los compuestos que poseen los estados de oxidación -3 (NH_4^+) a +5 (NO_3^-) pueden ser transformados de uno a otro a través de la actividad microbiana involucrada en el ciclo biológico del nitrógeno.

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes, incluye procesos naturales y antropogénicos involucrados en el equilibrio del nitrógeno en la biósfera y en la transformación química del mismo para su biodisponibilidad en formas asimilables y de fácil fijación para los seres vivos. Durante las diversas fases del ciclo, los microorganismos involucrados llevan a cabo reacciones anabólicas (asimilación del nitrato y fijación del nitrógeno), catabólicas (nitrificación, desnitrificación, reducción del nitrato y oxidación anaerobia del amonio) y de amonificación (Dapena, 2007; Beristain y col., 2009; Sánchez y Sanabria, 2009). De manera similar los compuestos y los estados redox de los mismos sufren modificaciones durante las diversas fases del ciclo (Figura 1).

Cuadro 2 Compuestos del Nitrógeno y sus estados de oxidación

FÓRMULA	NOMBRE	ESTADO DE OXIDACIÓN
$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	Amoniaco/Ion amonio	-3
N_2H_4	Hidracina	-2
NH_2OH	Hidroxilamina	-1
N_2	Nitrógeno molecular	0
N_2O	Óxido nitroso	+1
NO	Óxido nítrico	+2
$\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$	Ácido nitroso / Ion nitrito	+3
NO_2	Dióxido de nitrógeno	+4
$\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$	Ácido nítrico/Ion nitrato	+5

Modificado de López, 2009.

Para poder llevar a cabo la transformación del nitrógeno molecular (N_2) en compuestos asimilables para otros organismos (amonio y nitratos) es necesaria la participación de organismos especializado tales como algunas cianobacterias y bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Frankia*. La fijación del N_2 por estos microorganismos permite la incorporación de compuestos solubles (NH_4^+ y NO_3^-) utilizados para el crecimiento y desarrollo de otros seres vivos. De manera inmediata los organismos autótrofos transforman estos compuestos en nitrógeno orgánico (N_{org}).

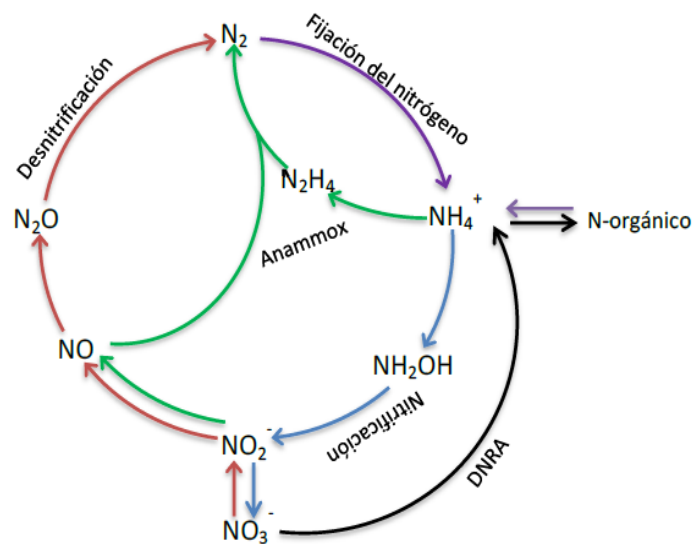


Figura 1. Ciclo de nitrógeno. Tomado de González, 2014.

En la amonificación el N_{org} es liberado como amonio (NH_4^+) por organismos heterótrofos (Kadlec y Knight 1996; Canfield y col., 2005; Paredes y col., 2007), el cual en presencia de oxígeno se convierte en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-) mediante el proceso de nitrificación, de manera subsecuente el nitrito es transformado en nitrógeno molecular bajo condiciones anóxicas y mediante el consumo de materia orgánica por el proceso desnitrificante. Sin embargo, en estudios recientes se han identificado microorganismos nombrados como anammox, los cuales de modo similar al proceso desnitrificante liberan nitrógeno molecular (N_2) a la atmósfera

mediante la oxidación anaerobia del amonio, este proceso se diferencia del desnitrificante porque no requiere del consumo de materia orgánica y utiliza al nitrito como aceptor final de electrones (Mulder 1992: Mulder y col., 1995).

Los procesos nitrificantes, desnitrificantes y anammox han demostrado eficiencia en la eliminación de compuestos nitrogenados contaminantes de aguas residuales, por ello a continuación se describen de forma más detallada poniendo énfasis en el proceso anammox por ser objeto de estudio en el presente trabajo.

1.4.1 Nitrificación

En los métodos biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales el proceso de nitrificación suele ser la primera etapa, es un proceso estrictamente aerobio que es catalizado por la nitrogenasa presente en microorganismos pertenecientes al Filo Proteobacteria. Este proceso involucra la oxidación del amonio a nitrato, la cual se realiza en dos etapas (Figura 2) (Bernet y Spérandio, 2009).



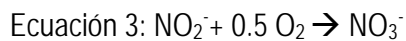
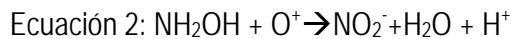
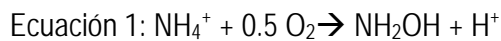
Figura 2. Ruta global del proceso de nitrificación.

La primera etapa consta de la oxidación del amonio a nitrito por las bacterias amonio oxidantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobu* y *Nitrosovibrio*), la segunda etapa, consta de la oxidación de nitrito a nitrato por las bacterias nitrito oxidantes (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*) (Bock y col., 1991; López, 2009; Madigan y col., 2009). Bock y

colaboradores (1991) indican que las bacterias amonio oxidantes presentan tiempos que oscilan entre 7 a 24 horas mientras que las nitrito oxidantes requieren de 10 hasta 140 horas de cultivo.

Estos microorganismos aerobios utilizan los compuestos reducidos del nitrógeno (amonio y nitrito, respectivamente) como fuente de energía, al CO₂ como fuente de carbono y al oxígeno como aceptor de electrones.

El proceso global de la nitrificación se realiza de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



La primera etapa del proceso involucra la oxidación del amonio a hidroxilamina por medio de la enzima mono-oxigenasa (AMO) (Ecuación 1) y la posterior oxidación de la hidroxilamina a nitrito, la cual es catalizada por la enzima hidroxilamina-reductasa (HAO) (Ecuación 2) (Szatkowska y Paulsrud, 2014). En la segunda etapa del proceso de nitrificación, las bacterias nitrito oxidantes emplean el complejo enzimático nitrito óxido reductasa (NOR) para la oxidación del nitrito (NO₂⁻) a nitrato (NO₃⁻) (Ecuación 3).

1.4.2 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso heterotrófico y anóxico en el que el nitrato (NO₃⁻) se reduce a compuestos nitrogenados gaseosos, principalmente a nitrógeno molecular (N₂) por medio de diversas enzimas (Madigan y col., 2009). Tal proceso requiere de una fuente de materia orgánica como donador de electrones y utiliza los óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones. Los

principales géneros microbianos encargados de la reducción del nitrato a nitrógeno molecular son: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera* (Cervantes y col., 2000).

La desnitrificación en términos globales es la reducción de nitrato a nitrógeno molecular (Ecuación 4), este proceso consta de etapas sucesivas catalizadas por diversos sistemas enzimáticos, formando productos intermedios como nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Tandukar y col., 2009).

El proceso desnitrificante requiere de diversas enzimas encargadas de catabolizar distintas etapas del proceso, por ejemplo, la enzima nitrato reductasa (Nar) es la encargada de la reducción del nitrato a nitrito, la nitrito reductasa (Nir) reduce el nitrito a óxido nítrico, la óxido nítrico reductasa (Nor) cataliza la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso, finalmente la óxido nitroso reductasa (Nos) reduce el óxido nitroso a nitrógeno molecular.



El rendimiento del proceso está relacionado directamente con la concentración del donador de electrones. Helmer y colaboradores (2002) expusieron que en aguas residuales con baja relación C:N es necesario adicionar fuentes externas que adhieran materia orgánica para que el proceso de desnitrificación sea completado, si la relación de C:N es superior a 4, la tasa desnitrificante aumenta (Cervantes y col., 2000; González, 2014).

1.4.3 Oxidación anaerobia del amonio (anammox)

En 1977 Broda postuló la existencia de microorganismos capaces de realizar la oxidación anaerobia del amonio a nitrógeno molecular. En la década de 1990 se obtuvieron indicios

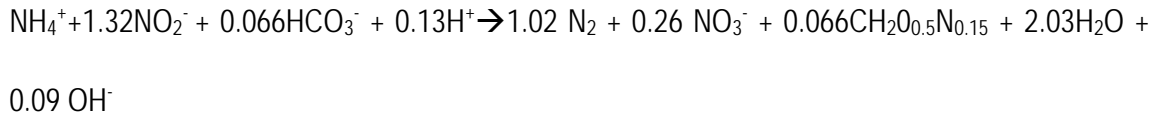
experimentales al observar en un reactor de lecho fluidizado de la planta de tratamiento de aguas residuales de Gist-Brocades (Países Bajos) la eliminación simultánea de amonio y nitrato en condiciones anóxicas, que eran transformados en nitrógeno molecular (N_2). Este proceso fue clasificado como un sistema desnitrificante litotrófico (Mulder, 1992), el cual fue patentado como anammox en 1992 (EP0327184A1, USA).

Años posteriores se confirmó la teoría de Broda sobre la eliminación simultánea de amonio y nitrato con la producción de nitrógeno molecular en condiciones anaerobias (Mulder y col., 1995). Posteriormente Van de Graaf y colaboradores (1995) demostraron que el proceso anammox es un proceso biológico debido a que la velocidad de consumo de nitrito y amonio es proporcional a la concentración de biomasa disponible en el sistema. Además, mediante ensayos con trazadores demostraron que el aceptor de electrones era el nitrito y que los microorganismos encargados de realizar el proceso anammox son bacterias anaerobias obligadas quimioautotróficas. Strous y col.(1998), propusieron a partir de estudios experimentales en un SBR (*Sequencing Batch Reactor*), la estequiometría del proceso anammox (Ecuación 5), en donde se observa que la relación molar nitrito:amonio es de 1.32 moles de (NO_2^-) por mol de (NH_4^+), y que no hay eliminación total del nitrógeno hasta N_2 , debido a que los productos finales de la oxidación del amonio y reducción del nitrito son: N_2 y NO_3^- . De acuerdo con Strous y col. (1998) la producción del nitrato (NO_3^-) está relacionado con la oxidación parcial del nitrito (NO_2^-) en condiciones anaerobias.

Algunos autores describen que el amonio podría oxidarse del sistema mediante dos vías: 1) indica que el amonio es oxidado hasta hidroxilamina, la cual es oxidada a nitrito por la enzima hidroxilamina oxido-reductasa (HAO), posteriormente el amonio y el nitrito son convertidos hasta

N₂ (Kuenen, 2008), y 2) el nitrito es reducido por la nitrito oxido-reductasa a hidroxilamina, la cual reacciona con el amonio produciendo N₂, con hidracina como intermediario (Jetten y col., 2001)

Ecuación 5:



1.4.3.1 Cinética del proceso anammox

El proceso realizado por las bacterias anammox es quimiolitotrófico, lo cual implica que la tasa de crecimiento y rendimiento sea baja debido a la cantidad de energía libre de Gibbs implicada ($\Delta G^\circ = -372.34$ KJ/ reacción). El crecimiento de la biomasa suele ser lento, con una baja velocidad específica de crecimiento máxima (0.065 d⁻¹), por consiguiente, un tiempo de duplicación que va desde 1.8 días (Isaka y col., 2006) hasta 20 días (Oshiki y col., 2011), aunque se maneja como tiempo promedio 11 días, lo cual se asocia a la conversión del sustrato (Strous y col., 1998; STOWA, 2001). De acuerdo con Strous (2000) la velocidad específica máxima depende del pH y temperatura, mientras que la actividad está influenciada por las especies bacterianas usadas, las condiciones del afluente y la configuración del proceso llevado a cabo.

La tasa de crecimiento anammox (μ) se calcula considerando factores como el consumo y dependencia de las mismas al sustrato en un tiempo dado, siguiendo así la ecuación de Monod:

Ecuación 6:
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} - k_d$$

Dónde: μ = tasa de crecimiento (d⁻¹)

μ_{\max} = tasa máxima de crecimiento de los microorganismos (d⁻¹)

K_s = constante de saturación media (g/L)

S= concentración de sustrato (g/L)

Kd= constante de decaimiento (g/g.L)

Con base en la función limitante de los sustratos la fórmula inicial cambia, así para el caso de que el sustrato limitante sea el amonio se tiene la Ecuación 7 y en caso de que sea el nitrito, la Ecuación 8.

Ecuación 7:
$$\mu = \mu_{\max} \frac{[\text{NH}_4^+]}{K_s + [\text{NH}_4^+]} - k_d$$

Ecuación 8:
$$\mu = \mu_{\max} \frac{[\text{NO}_2^-]}{K_s + [\text{NO}_2^-]} - k_d$$

La baja tasa de crecimiento de los microorganismos anammox se traduce en un periodo de tiempo más largo para la puesta en marcha de dichos sistemas, pero a su vez es considerada como una solución viable debido a la baja cantidad de lodo final producido (Dapena, 2007).

1.4.3.2 Microbiología del proceso anammox

Las bacterias anammox han sido clasificadas dentro del Dominio Bacteria, perteneciente al Filo Planctomycetes y en el Orden de los Planctomycetales, a partir de estudios con técnicas moleculares de ADN y PCR (Fuerst, 1995; Strous y col., 1999b; Fuerst, 2005). La estructuración celular de éstas bacterias consta de tres compartimentos separados por membranas bícapa, del exterior al interior la célula cuenta con una pared celular proteica, parifoplasma, riboplasma y el anammoxosoma (ocupa la mayor parte del volumen celular). De acuerdo con diversos estudios, la oxidación del amonio y la generación de protones para la síntesis de ATP tiene lugar en el anammoxosoma (Jetten y col., 2009; Fuerst y Sagulenko, 2011; Van Niftrik y Jetten, 2012).

Una característica sobresaliente sobre las bacterias anammox es su división por gemación, en contraste con la división por fisión de la mayoría de las bacterias (Van Niftrik y col., 2004; Fuerst, 2005). Entre los géneros bacterianos que realizan el proceso anammox sobresalen *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jettenia* y *Candidatus Scalindua*, de los cuales los tres primeros fueron encontrados en plantas tratadoras de aguas residuales (Strous y col., 1999a; Schmidt y col., 2003; Kartal y col., 2004; Kartal y col., 2007), el género *Candidatus Jettenia* fue aislado de un reactor operado bajo condiciones anammox (Quan y col., 2008), mientras que el género *Candidatus Scalindua* fue localizado en ambientes marinos como el Mar Negro y el Mar de Arabia. Dentro de cada género se han reportado diversas especies (Cuadro 3). Entre los géneros más reportados se encuentran *Candidatus Brocadia* y *Candidatus Kuenenia*. En sistemas de humedales se ha identificado géneros de *Candidatus* y *Anammoxoglobus* (Zhu y col., 2011; Waki y col., 2015).

Cuadro 3. Localización de especies anammox

LOCALIZACIÓN	ESPECIE	REFERENCIA
Plantas de tratamiento de aguas residuales	<i>Ca. Brocadia Anammoxidans</i>	Strous y col., 1999a.
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Kartaly col., 2004.
	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Schmidt y col., 2004.
	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	Kartaly col., 2007.
Ambientes marinos	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>	Kuypers y col., 2003.
	<i>Ca. Scalindua brodae</i>	Schmidt y col., 2003.
	<i>Ca. Scalindua wagneri</i>	Schmidt y col., 2003.
	<i>Ca. Scalindua arabica</i>	Woebken y col., 2008.

Tomado de López, 2009.

1.4.3.3 Factores que afectan el proceso anammox

Las bacterias anammox son sensibles a diversas alteraciones que intervienen en el proceso, algunos factores pueden ser de carácter fisicoquímico (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, etc.), otros están en función de los propios sustratos y productos del proceso.

Efecto del pH

El pH es considerado como un parámetro operativo importante debido a sus efectos en la cinética de procesos biológicos (Lu y col. 2017). De acuerdo con Carvajal y colaboradores (2014) el rango óptimo para el desarrollo de lodos anammox oscila entre un pH 7.3-7.5, debido a los efectos directos del pH en los microorganismos anammox y a las especies reactivas dependientes del pH (amoníaco y ácido nitroso) que suelen actuar como agentes tóxicos para el proceso anammox (Fernández y col., 2012).

Chen y col. (2010) demostraron que el rendimiento y eficacia del proceso anammox se veía afectada con un pH inferior a 6.5. Por otro, Puyol y col. (2014) demostró que un pH superior a 7.6 sumado a amoníaco ocasiona la inhibición del proceso anammox en condiciones alcalinas.

Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura en el proceso anammox ha sido ampliamente estudiado (Strous y col., 1999b; Strous, 2000; Egli y col., 2001). La mayoría de las investigaciones concluyen que son microorganismos mesófilos y establecen que un rango de temperatura óptima de crecimiento y de actividad oxidativa se alcanza a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ y que la relación entre la velocidad de oxidación anaeróbica del amonio y la temperatura se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius en un rango de 20-30°C. También establecen que a bajas temperaturas ($\leq 10^\circ\text{C}$) la actividad anammox es nula.

Efecto de la concentración de oxígeno disuelto

Van de Graaf y col. (1996), mediante ensayos en discontinuo, establecieron que el oxígeno disuelto inhibía completamente el proceso anammox. Strous y col. (1999b) establecieron que en condiciones micro-aerobias (0.5% de saturación del aire) el proceso presenta inhibición, sin

embargo, tras restablecer las condiciones anaerobias la actividad anammox se recupera, asimismo, Egli y col. (2001) registraron que tras una eliminación de 0.25, 0.5 y 1% de oxígeno disuelto, la actividad se recupera por completo, lo cual indica que la inhibición del proceso por cantidad de oxígeno disuelto es reversible.

Efecto de la concentración de materia orgánica

Gran cantidad del agua residual tratada contiene fracciones de materia orgánica, lo cual puede ocasionar inconvenientes en los reactores anammox, esto es debido a que la entrada de materia orgánica puede favorecer el desarrollo de biomasa heterotrófica desnitrificante, la cual compite por el sustrato con la biomasa anammox, la problemática de ello es la baja afinidad por el sustrato que presenta la biomasa anammox y la alta afinidad por parte de los microorganismos heterotróficos (Jetten y col., 1999; Ahn y col., 2004). En 2004 Ahn y col., concluyeron que la biomasa anammox puede coexistir con los microorganismos heterotróficos, pero ello ocasiona una disminución en la cantidad de amonio oxidado en condiciones anaerobias. Años después, Kartal y col. (2007), descubrieron una especie anammox nueva, *Anammoxoglobus propionicus*, la cual podía competir contra las bacterias desnitrificantes heterotróficas por la oxidación del propionato en presencia de amonio, nitrito y nitrato, lo cual indicaba que las bacterias anammox eran capaces de competir con otros microorganismos. Por contraparte, en el estudio dirigido por Toh y Ashbolt en 2002, se observó una inhibición de la actividad anammox a causa de la adición de cargas elevadas de fenol, sin embargo, al retirar las cantidad altas de fenol la actividad se recuperó, caso similar a esto fue el expuesto por Guven y colaboradores (2005) en donde se registró que los alcoholes como el etanol y metanol inhiben el proceso, por su parte el etanol causa una inhibición reversible, sin embargo, el metanol a una concentración de 0.5 mM es tóxico para la biomasa anammox.

Efecto de la concentración de sustrato y producto

Sobre el rendimiento de la actividad anammox con base en las concentraciones de sustratos (amonio y nitrito) y producto (nitrato) se ha reportado que a concentraciones elevadas de amonio y nitrato la actividad no presenta inhibición. Sin embargo, en concentraciones superiores a 100 mg N-NO₂⁻· L⁻¹ la actividad puede ser inhibida (Strous y col., 1999). Dapena y col. (2007) en estudios en cultivo lote concluyeron que a 25 mM de nitrito se producía un 50% de pérdida de la actividad específica, mientras que para el amonio y nitrato, las concentraciones para este mismo efecto fueron de 55 y 45 mM respectivamente.

Efecto de metales pesados

De acuerdo con la literatura, algunos de los metales pesados estudiados en el proceso anammox son Cd(II), Hg(II), Pb(II), As(III) y Cr(VI), se consideran los 5 principales tóxicos. De acuerdo con Yu y colaboradores (2016), la biomasa de anammox tiene una alta capacidad de acumulación de metales pesados, lo que provoca el cese o inhibición de la actividad microbiana. En el caso del cromo, se reporta que la reducción microbiana de Cr(VI) a Cr(III) se puede llevar a cabo dentro de los gránulos, para evitar o aminorarla inhibición de Cr(VI) bajo concentraciones inferiores a 8.96 mg/L.

1.5 Humedales y el ciclo del nitrógeno

De acuerdo a la ley de Aguas Nacionales artículo 3, inciso XXX, los humedales son definidos como "zonas de transición entre sistemas acuáticos y terrestres que constituyen áreas de inundación temporal o permanente, sujetas o no a la influencia de mareas, como pantanos, ciénagas y marismas, cuyos límites los constituyen el tipo de vegetación hidrófila de presencia permanente o estacional, las áreas en donde el suelo es predominantemente hídrico; y las áreas

lacustres o de suelos permanentemente húmedos por la descarga natural de acuíferos” (SEMARNAT, 2013). Con base en lo anterior, las características edafológicas, geográficas, hídricas, climatológicas y bióticas deben ser consideradas para su clasificación (Zepeda y col., 2012; SEMARNAT, 2013). De acuerdo con el INEGI, los humedales se clasifican por el tipo de vegetación en humedal tular-popal, manglar, bosque de galería, vegetación de dunas costeras y humedal con vegetación halófila, por otro lado, la SEMARNAT considera humedales arbóreos/arbustivos y humedales con vegetación asociada.

La presa José Antonio Álzate a lo largo de su cauce presenta humedales de monocotiledóneas (*Typha*, *Juncus* y *Eichhornia*); que como se ha dicho, son zonas de amortiguamiento, que en condiciones normales (sin altos niveles de contaminación) son capaces de mantener una buena calidad de los cuerpos de agua reduciendo los niveles de nutrientes y contaminantes, al incorporarlos a su metabolismo (Fisher y Acreman, 2004, Ramírez Carrillo y col., 2010, Wang y Gu, 2013). En varios estudios se ha demostrado la capacidad de los humedales para eliminar materia orgánica, nitrógeno, fósforo, sólidos en suspensión, patógenos y metales pesados (Fisher y Acreman 2004; Waki y col., 2015). Esta capacidad se atribuye a la diversidad biológica que poseen, por ejemplo, se ha informado de que el mecanismo de eliminación de nitrógeno se lleva a cabo por: 1) la asimilación de amonio por las plantas y 2) la actividad microbiana a través de los procesos de nitrificación seguida de la desnitrificación (Verhoeven y Meuleman, 1999; Vymazal, 2007, Knox y col., 2008, Lee y col., 2009). Sin embargo, también se puede suponer que los microorganismos anamóxicos contribuyen a la remoción de nitrógeno, pero hay relativamente poca literatura sobre la actividad anammox en los humedales naturales y construidos (Zhu y col., 2010).

En el caso de la eliminación de metales se reporta que la zona de raíces es donde se lleva a cabo la interacción microbiana-metal más activa. Las interacciones que se reportan indican que los microorganismos concentran los metales por dos procesos principales: 1) el proceso activo que es dependiente de la energía y llamado bioacumulación, y 2) el proceso pasivo que no depende de la energía y que se denomina bioabsorción (Unz y Shuttleworth, 1996). En los humedales construidos, los microorganismos influyen en los atributos de los metales pesados de las siguientes maneras: 1) especiación del metal, 2) bioabsorción, 3) precipitación por reducción de sulfato, y 4) metilación de metales pesados (Kosolapov y col., 2004). Marchand y col., 2010, indican que en las raíces de las plantas es donde las bacterias y hongos simbióticos desempeñan un papel protector al mitigar la toxicidad de los metales y aumentar la eficiencia de la fitorremediación acumulando metales en los tejidos vegetales.

Cheung y Gu (2007), mencionan que los microorganismos aerobios y anaeróbicos son capaces de reducir el Cr(VI). En condiciones aerobias, la reducción de los metales es llevada a cabo por la acción catalítica de enzimas solubles, o por reductasas asociadas a la membrana. La reductasas ChrR y YieF, purificadas de *Pseudomonas putida* MK1 y *Escherichia coli*, respectivamente, muestran distintos procesos de reducción del Cr(VI). Para el caso de la enzima ChrR, está cataliza una lanzadera inicialmente de un electrón seguido de una transferencia de dos electrones a Cr(VI), con la formación Cr(V) o Cr(IV) como intermediario antes de una reducción a Cr(III), mientras que la reductasa YieF, realiza una transferencia de cuatro electrones que reduce de forma directa el Cr(VI) a Cr(III). Mientras que en condiciones anaeróbicas, se reporta que tanto enzimas solubles como las asociadas a la membrana transfieren electrones para la reducción de Cr(VI), acoplado a la oxidación de un sustrato donador de electrones. En este proceso, se cree

que el Cr(VI) sirve como aceptor de electrones terminal de una cadena de transferencia de electrones que frecuentemente involucra citocromos.

1.6 Trabajos realizados en la PJAA.

En 2009 López-Galván y col. evaluaron y calcularon el grado de contaminación y riesgo ecológico de nueve metales pesados (Cd, Cu, Cr, Fe, K, Pb, Mg, Mn, Na y Pb) en la PJAA. Los autores seleccionaron diversos puntos de muestreo donde evaluaron parámetros físico-químicos, el grado de contaminación y riesgo ecológico de acuerdo a la metodología de Hakanson. De acuerdo con los autores los resultados obtenidos sugirieron un riesgo moderado de contaminación por metales pesados en la presa. Algunas zonas evaluadas presentaban un grado de contaminación considerable asociada a Cd, Cr, Pb, Na, Mg, K y Fe, principalmente. Tras considerar factores como el flujo hidráulico, la concentración de metal en partículas y la baja oxigenación, los autores describieron al Cd, Pb y Cr como metales de alto riesgo ecológico en la zona.

En 2010 Barceló-Quintal y col. estudiaron los sedimentos de la PJAA con el objetivo de definir la importancia y su influencia en el yacimiento de metales pesados. Los autores cuantificaron los metales pesados (Cd, Cu y Pb) en función de la distribución geoquímica y la capacidad de movilidad de los metales en dilución utilizando un esquema de extracción secuencial química. Todos los metales evaluados registraron una alta abundancia en una fracción residual, sin embargo, en el resto de los sitios la concentración de los metales presentaba variaciones de acuerdo a cada metal. Los análisis geoquímicos y fisicoquímicos permitieron observar la distribución de cada metal en los sedimentos, permitiendo identificar zonas de riesgo para cada uno. Los autores observaron un riesgo bajo para Cu y Pb en la mayoría de las zonas, pero para Cd consideraron la afección de alto riesgo en la mayoría de las zonas.

Barceló-Quintal y col.(2012a) evaluaron la calidad del agua en sitios de la PJAA utilizando como variables pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto, amoníaco, nitritos, sulfatos, sulfuros y concentraciones de dos metales pesados (Cu y Pb). Los autores se apoyaron en el uso del software MINEQL para el cálculo de la especiación química de los metales pesados en fase acuosa. Los resultados obtenidos indicaron que el río Lerma proporcionaba la mayoría de M.O. y contaminantes metálicos debido a la baja saturación de oxígeno. En las condiciones de reducción que predominantes a lo largo de la presa y de los resultados de la especiación química de la fase acuosa, encontraron que las especies asociadas al sulfuro metálico eran las más predominantes, y que la saturación de oxígeno del río Lerma mejora después de la temporada de lluvias, pero decae durante la estación seca. Debido a la topografía irregular, la pequeña pendiente que prevalece en el río Lerma, y el flujo de agua casi inexistente, se forman zonas con diferentes características dentro de la presa.

1.7 Humedales construidos y naturales

Los sistemas de humedal actúan como un intermediario entre los ecosistemas acuáticos y terrestres, que se caracterizan por tener una capa freática que se encuentra en o cerca de la superficie del suelo periódica o permanentemente. Como resultado, los suelos de los humedales suelen estar bajo condiciones inundadas durante el tiempo suficiente para desarrollar condiciones anóxicas, que teóricamente proporcionan hábitats adecuados para las bacterias anammox. Sin embargo, hasta ahora, sólo unos pocos estudios han informado de la distribución y la actividad de las bacterias Anammox en los humedales naturales de agua dulce.

En 2007 Erler y col. demostraron que la desnitrificación no era la única vía para la producción de N_2 en humedales construidos, para ello realizaron ensayos de incubación con lodos anaeróbicos con el objetivo de cuantificar las tasas potenciales de anammox en sedimentos obtenidos de un

humedal construido de flujo superficial con recepción secundaria de agua residual tratada. El proceso anammox fue registrado en dos de los cuatro sitios evaluados con una velocidad máxima de $199.4 \pm 18.7 \text{ mol m}^{-2} \text{ hr}^{-1}$, lo cual representó el 24% del total de N_2 producido. Por otro lado el proceso de desnitrificación demostró ser el principal productor de N_2 al registrar una velocidad máxima de $965.3 \pm 122.8 \text{ mol N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1}$. Los autores atribuyen el bajo rendimiento del proceso anammox a la falta de regulación del oxígeno en humedal construido, sin embargo, demostraron la intervención del mismo en la producción de N_2 .

En 2013 Wang y Gu compararon comunidades procariontas oxidantes de amonio (AOPs) en un humedal de agua dulce construido ubicado en Yuen Long ($22^\circ 27' 20''\text{N}$, $114^\circ 2' 43'' \text{ E}$) y un humedal marino costero natural ubicado en Tai O ($22^\circ 14' 59''\text{N}$, $113^\circ 51' 43'' \text{ E}$), Hong Kong. De acuerdo con la información proporcionada por los autores, el humedal construido era alimentado por escorrentías de colinas adyacentes mezcladas con pequeñas fracciones de agua residual procedente de aldeas cercanas, además contaba con tres especies dominantes de macrófitas acuáticas: *Phragmites australis*, *Typha angustifolia* y *Cyperus malaccensis*, por otro lado el humedal natural costero presentaba a *Kandelia obovata* como especie dominante. Con el objetivo de identificar los efectos de las macrófitas en las comunidades de AOPs se recolectaron muestras de sedimentos a diversas profundidades (0-2, 4-6, 9-11, 14-16, 19-21, 24-26, 29-31 y 39-41 cm) en sitios con y sin vegetación al final de la estación seca, de igual manera recolectaron agua superficial de los sitios muestreados para análisis fisicoquímicos, para los análisis de filogenia y diversidad de AOPs utilizaron la técnica de biomarcadores moleculares con fragmentos amplificados del gen rRNA 16S, para la determinación de abundancia en los sedimentos utilizaron la técnica cuantitativa de PCR, los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y potencial redox en los sedimentos fueron medidos *in situ* con ayuda de un

medidor de pH IQ160 (con electrodo de ORP) (IQ Scientific Instruments, Inc.). Como resultado los autores registraron una distribución más heterogénea, mayor diversidad de comunidades y una alta gama de filotipos de AOPs en el humedal de agua dulce comparado con el humedal costero. También observaron los efectos de la vegetación en las comunidades de AOPs encontrando que *Typha angustifolia* mejoraba la abundancia de las comunidades en la rizósfera, *Phragmites australis* y *Cyperus malaccensis* mostraron efecto en las estructuras comunitarias de las bacterias oxidantes de amonio, finalmente *Kandelia obovata* no presentó algún efecto en los AOPs, lo que sugiere que los humedales de agua dulce y costera presentan diferentes contribuciones en la remoción de N inorgánico debido a las variaciones en sus comunidades de AOPs y vegetación.

Wojciechowska y col. (2015), indican que el uso de humedales es el proceso más eficaz en el tratamiento de aguas residuales con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal y materia orgánica recalcitrante. Estos autores realizaron un estudio en humedales construidos, que contenían concentraciones de 200 y 145 mg/L de nitrógeno total y reportaron una eficiencia de eliminación de nitrógeno total del 40 al 86 %. Los autores indican que la eliminación sucede por una secuencia de los procesos de nitrificación y desnitrificación, e indican que este último proceso es limitante debido a un suministro de carbono.

Paranychianakis y col. (2016), mencionan que los humedales construidos de una sola etapa se caracterizan por un bajo potencial de remoción de nitrógeno y que la comprensión de las vías que regulan el ciclo del nitrógeno, así como su dependencia de las variables ambientales, podría mejorar el potencial de los humedales para la remoción de compuestos nitrogenados y dar lugar a herramientas más precisas para su tratamiento. Estos autores realizaron un estudio empleando marcadores genéticos de los microorganismos que regulan las vías claves del ciclo del nitrógeno

incorporando a los microorganismos anammox para desentrañar su importancia relativa en el ciclo. Sus resultados indicaron que la nitrificación-desnitrificación fue la principal vía de eliminación de nitrógeno, mientras que anammox no tuvo una fuerte contribución cuando se analizó la actividad microbiana de *Phragmites communis*, mientras que cuando se utilizó *Typha latifolia* el rendimiento en términos de eliminación de nitrógeno fueron superiores aunque no se indica el porcentaje. Concluyendo que las especies de plantas estimulan la eliminación de nitrógeno mediante una regulación positiva de las velocidades de las vías bioquímicas responsables que operan, probablemente aumentando el suministro de oxígeno.

Shen y col. (2016), realizaron un estudio sobre la distribución y actividad de las bacterias anammox en un humedal natural de agua dulce, ubicado en el sureste de China, mediante el uso de isótopos de N-15, ensayos cuantitativos de PCR y gen 16S rRNA. Los autores reportaron velocidades anammox de entre 2.5 y 25.5 nmol de N₂/g día (8.4-3.5 mgN₂/g h), y hasta 20% de producción de gas de nitrógeno molecular atribuido al proceso anammox. El análisis filogenético de los genes 16S rRNA mostró que las bacterias anammox relacionadas con *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Anammoxoglobus* y dos nuevos grupos de anammox coexistieron en los núcleos de suelo recogidos, siendo *Candidatus Brocadia* y *Candidatus Kuenenia* los géneros anammox dominantes. La PCR cuantitativa de los genes de la hidrazina sintasa mostró que la abundancia de bacterias anammox varió de $2,3 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^6$ copias/g de suelo, en los núcleos de suelo examinados. Los análisis de correlación sugirieron que la concentración de amonio en el suelo tenía una influencia significativa en la actividad de las bacterias anammox. Sobre la base de la tecnología de rastreo N-15, se estimaron una pérdida total de 31.1 g N/m² al año que podría vincularse con el proceso anammox en el humedal examinado. Los autores citados, señalan la importancia de determinar el proceso anammox en el

ciclo del nitrógeno en los sistemas de humedales construidos y naturales con la finalidad de utilizar este proceso en el tratamiento y depuración de las aguas residuales.

II. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México, la Presa José Antonio Álzate ubicada en el municipio de Toluca, ha sido reportada como una zona con alto grado de contaminación a causa del vertido de agua residual proveniente de las industrias anexas a la zona (metalúrgicas, textiles, químicas y farmacéuticas). Se sabe que ciertos tipos de efluentes industriales y domésticos, se caracterizan por contener grandes cantidades de compuestos nitrogenados que ocasionan problemas de toxicidad, acidificación y eutrofización en las zonas de descarga.

Hasta hace pocos años, se reportaba que los compuestos nitrogenados eran eliminados en los sistemas lacustres por dos mecanismos: 1) absorción por la flora del lugar y 2) por la actividad microbiana nitrificante y desnitrificante propia del ciclo del nitrógeno. Sin embargo, en los últimos años se ha debatido sobre la participación de la actividad anammox en tal proceso.

Debido a la escasa información sobre la actividad anammox en humedales naturales contaminados se hace necesaria la generación de información que permita entender la dinámica funcional de los microorganismos anammox para su uso o aprovechamiento por ello, en el presente trabajo se evaluará la actividad anammox en lodos provenientes de un humedal natural ubicado en la Presa José Antonio Álzate.

III. HIPÓTESIS

Los lodos extraídos del rizoma de plantas *Typha* sp. procedentes de un humedal de la presa José Antonio Álzate presentarán actividad anammox por ser parte del ciclo global del nitrógeno y tendrán la capacidad de eliminar contaminantes presentes en la presa debido a que han estado expuestos a altas concentraciones de contaminantes antropogénicos.

IV. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la actividad anammox en lodos extraídos del rizoma de plantas *Typha* sp. procedentes de un humedal natural contaminado ubicado en la Presa José Antonio Álzate, México.

5.2 Específicos

- Evaluar la actividad específica anammox, en cultivos en lote con cinco diferentes concentraciones de nitrito inicial.
- Determinar la velocidad específica de consumo de sustratos del consorcio microbiano.
- Evaluar la actividad anammox en presencia de cromo hexavalente como indicador de tolerancia a exposición de contaminantes antropogénicos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta y conservación del consorcio microbiano

El material vegetal fue colectado de cinco zonas con humedales de *Typha* sp., presente en la presa. Las plantas se tomaron con una porción de suelo desde la raíz (lodo) (Leander, 1972). Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas para su traslado al laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México. En el laboratorio las muestras fueron colocadas en bandejas de plástico y el lodo obtenido se colocó en matraces Erlenmeyer con 1000 mL de solución isotónica estéril (cloruro de sodio 0.90%). La mezcla se homogeneizó por 20 minutos, y después fue colocada en un cono Imhoff para permitir la sedimentación del lodo. Esta operación se realizó en cinco ocasiones, con la finalidad de eliminar grasas, basura, materia flotante, etc., y para poder determinar la cantidad de sólidos suspendidos totales (SSV).

Los SSV se determinaron siguiendo el método establecido por APHA (2005), que se basa en la determinación de diferencia de pesos de los sólidos orgánicos e inorgánicos presentes en la muestra, obteniendo una medida indirecta de la concentración celular. La concentración de biomasa cuantificada fue de $4,7 \pm 0,2$ g VSS/L, el lodo obtenido se resguardo en refrigeración a 8°C y se utilizó como fuente de inóculo para todos los ensayos en cultivo discontinuo.

6.2 Cultivo en lote o discontinuo

Los cultivos discontinuos se realizaron en botellas serológicas de 125 ml que contenían 60 ml de medio basal formulado con los siguientes compuestos (mg/L): NaHCO₃ (2500); NaH₂PO₄·H₂O (57.5); CaCl₂·2H₂O (100); MgSO₄·7H₂O (200); y 1.5 mL/L de solución de elementos traza. Los elementos traza contenían (mg/L): FeSO₄ (5000) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

(5000); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (430); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (240); MnCl_2 (629); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (250); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (220); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (190); MgCl_2 (500). La concentración inicial de lodo en cada unidad experimental fue de $2 \pm 0,01$ g de VSS/L. Al líquido y al espacio de cabeza de cada unidad se les colocó con mezcla de He/CO_2 (80/20,v/v) durante 3 min, para excluir el oxígeno de los ensayos. Todas las botellas se sellaron con tapones de goma butílica y sellos de aluminio.

Los controles abióticos que carecían de inóculo se llevaron a cabo en paralelo para determinar la posible eliminación abiótica de los sustratos. También se incluyeron controles bióticos que carecían de nitrito o amonio para corregir las pérdidas de compuestos no asociadas con el proceso anammox. Todos los ensayos abióticos o bióticos se realizaron por duplicado en un agitador orbital 150 rpm y 35°C . El pH inicial para todos los cultivos discontinuos fue de 7.5 ± 0.2 .

Se evaluaron cinco concentraciones de N-NO_2^- (15, 30, 50, 75 y 100 mg/L) y la concentración de donador de electrones permaneció constante a 100 ± 10 mg N-NH_4^+ / L. La actividad microbiana se evaluó en términos de eficiencia de consumo (E%) [(mg sustrato consumido/ mg sustrato inicial)*100%], rendimiento de producto (Y) [mg de producto /mg de sustrato consumido * unidad de volumen] y las velocidades específicas de consumo de sustrato (qs) o formación de producto (qp) [mg sustrato o producto/mg biomasa * unidad de tiempo]. Estas variables proporcionaron información sobre el proceso biológico general (Cuadro 4). Los parámetros cinéticos tales como las tasas específicas se calcularon utilizando el modelo de Gompertz y el programa de regresión no lineal (OriginPro 8.0). Cada botella fue una unidad experimental independiente, que se sacrificó después del muestreo. Para la determinación de N_2 , se midió el desplazamiento de biogás con el método de columna invertida con solución saturada de cloruro de sodio y rojo de metilo como indicador, para su posterior análisis por cromatografía de gases. Las muestras líquidas se filtraron ($0.45 \mu\text{m}$) para la determinación de amonio, nitrito y nitrato.

Una vez determinada la mayor velocidad específica anammox se realizaron ensayos en presencia de cromo hexavalente (Cr (VI)) evaluando cuatro concentraciones de cromo (0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 mg Cr(VI) /L), de forma simultánea manteniendo las mismas condiciones de cultivo que para los cultivos de actividad anammox. Para determinar la toxicidad o inhibición de los cultivos se realizaron cinco lavados con solución isotónica estéril (cloruro de sodio 0.90%), con la finalidad de retirar el Cr(VI) del cultivo. Después de este procedimiento los lodos expuestos a las diferentes concentraciones de cromo fueron puestos en condiciones óptimas (pH de 7.5, temperatura de 30°C, eliminación de oxígeno, etc.) de cultivo y bajo condiciones estequiométricas anammox (75 mg N-NH₄⁺/ L:100 mg N-NO₂⁻/L).

Cuadro 4. Variables de respuesta utilizadas para evaluar el proceso anammox.

VARIABLES DE RESPUESTA	DEFINICIÓN	UNIDADES
Eficiencia del consumo de sustratos		
$E_{N-NO_2^-}$	$E_{N-NO_2^-} = \left[\frac{(\text{mg N-NO}_2^- \text{ inicial /L}) - (\text{mg N-NO}_2^- \text{ final /L})}{\text{mg N-NO}_2^- \text{ inicial /L}} \right] \times 100$	%
$E_{N-NO_3^-}$	$E_{N-NO_3^-} = \left[\frac{(\text{mg N-NO}_3^- \text{ inicial /L}) - (\text{mg N-NO}_3^- \text{ final /L})}{\text{mg N-NO}_3^- \text{ inicial /L}} \right] \times 100$	%
$E_{N-NH_4^+}$	$E_{N-NH_4^+} = \left[\frac{(\text{mg N-NH}_4^+ \text{ inicial /L}) - (\text{mg N-NH}_4^+ \text{ final /L})}{\text{mg N-NH}_4^+ \text{ inicial /L}} \right] \times 100$	%
$E_{Cr(VI)}$	$E_{Cr(VI)} = \left[\frac{(\text{mg Cr(VI) inicial /L}) - (\text{mg Cr(VI) final /L})}{\text{mg Cr(VI) inicial /L}} \right] \times 100$	%
Rendimiento de productos		
Y_{N_2}	$Y_{N_2} = \frac{\text{mg N - N}_2 \text{ producido/L}}{\text{mg N - N}_{\text{total}} \text{ consumido/L}}$	$\frac{\text{mg N - N}_2}{\text{mg N - N}_{\text{total}}}$
Velocidad específica de producción q_p		
q_{N_2}	$q_{N_2} = \frac{\text{mg N}_2 \text{ producido/L}^*t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N}_2 \text{ producido}}{\text{g SSV}^*t}$
Velocidades específicas de consumo		
$q_{N-NO_2^-}$	$q_{N-NO_2^-} = \frac{\text{mg N - NO}_2^- \text{ consumido/L}^*t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N - NO}_2^- \text{ consumido}}{\text{g SSV}^*t}$
$q_{N-NO_3^-}$	$q_{N-NO_3^-} = \frac{\text{mg N - NO}_3^- \text{ consumido/L}^*t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N - NO}_3^- \text{ consumido}}{\text{g SSV}^*t}$
$q_{N-NH_4^+}$	$q_{N-NH_4^+} = \frac{\text{mg N - NH}_4^+ \text{ consumido/L}^*t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N - NH}_4^+ \text{ consumido}}{\text{g SSV}^*t}$

$$q_{Cr(VI)} = \frac{\text{mg Cr(VI) consumido/L} \cdot t}{[X]} = \frac{\text{mg Cr(VI) consumido}}{\text{g SSV} \cdot t}$$

Donde [X] es la biomasa como SSV/L y *t*, hace referencia al tiempo.

6.3 Métodos analíticos

6.3.1 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles por gravimetría, método APHA

Para la determinación de los SSV, se llevaron a peso constante los crisoles, para ello fueron colocados en una estufa 105°C por una hora, transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador por diez minutos, para su posterior registro de peso. El procedimiento se realizó en tres ocasiones hasta tener un coeficiente de variación menor al 1% en el peso de cada crisol. Teniendo a peso constante los crisoles, en cada uno se colocó 10 mL de muestra homogénea (lodo) y se dejó evaporar el líquido de la muestra sobre en una parrilla a baja temperatura para evitar ebullición y disminución de la muestra. La muestra deshidratada, se colocó en una estufa a 105°C por una hora, transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en un desecador por 15 minutos, subsecuentemente se pesaron en una balanza analítica y se obtuvo el peso de los sólidos suspendidos totales (SST). Posteriormente los crisoles con las muestras secas se colocaron en una mufla a 505°C por 45 minutos, después se colocaron en un desecador por 20 minutos y transcurrido el tiempo se determinó el peso y de este modo se obtuvo el peso de los sólidos suspendidos fijos (SSF).

Los datos registrados de sólidos suspendidos totales (SST) (Ecuación 9) y sólidos suspendidos fijos (SSF) (Ecuación 10) permitieron la obtención sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Ecuación 11) de la siguiente manera:

Ecuación 9: $g \frac{SST}{L} = (B - A)/V$

Ecuación 10: $g \frac{SSF}{L} = (C - A)/V$

Ecuación 11: $\frac{gSSV}{L} = \frac{gSST}{L} - \frac{gSSF}{L}$

Donde:

A: peso constante del crisol (g)

B: A+ peso del crisol (g) con el residuo secado a 105°C

C: A+ peso del crisol con el residuo incinerado a 505°C

V: volumen de la muestra (L)

6.3.2 Cuantificación de amonio por un electrodo selectivo

La medida de amonio está determinada por el uso de un electrodo de gas de amonio (HI 4101 Hanna), diseñado para la medición de amoniaco en soluciones acuosas, el cual consta de un sensor de pH de vidrio interno, con solución de referencia Ag/AgCl y membrana de PTFE permeable al gas. La especie medida es el gas amoniaco (NH₃). Se prepararon curvas estándar amonio con el medio mineral utilizado en cultivos discontinuos para reducir las interferencias. Antes del muestreo, todas las muestras líquidas se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45 µm.

Se elaboró la curva estándar para la determinación de amonio con siete concentraciones conocidas: 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 mg N-NH₄⁺/L (Figura 3). Se calculó la desviación estándar (σ) y el porcentaje del coeficiente de variación (C.V) para cada una de las curvas realizadas; obteniendo una $\sigma=3.25$ y un C.V de 5.2%.

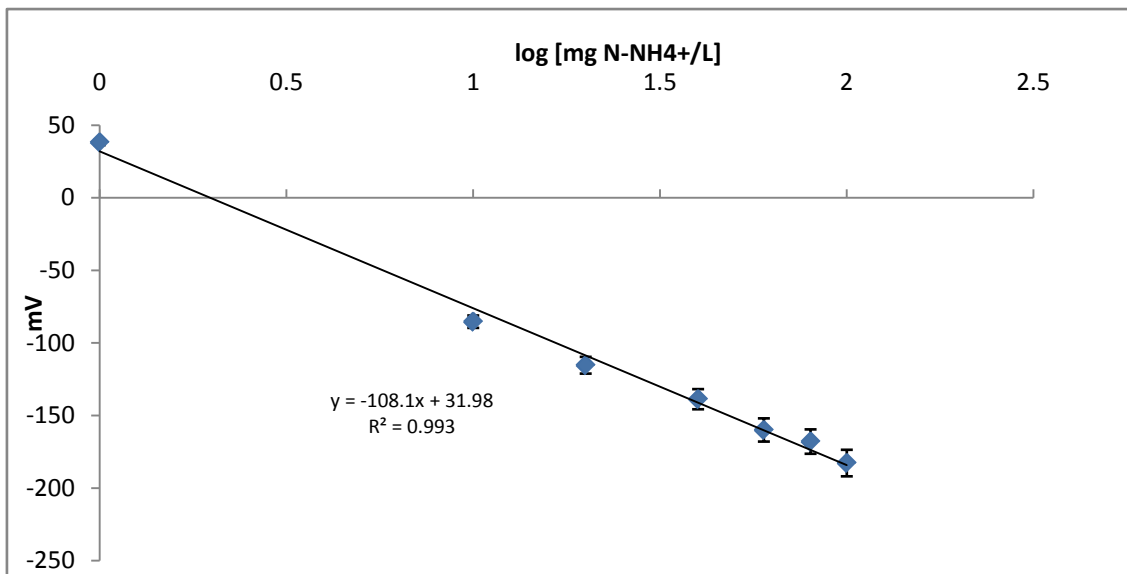


Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de amonio (NH₄⁺).

6.3.3 Cuantificación de nitrato y nitrito por espectrofotometría UV-VIS

El nitrito y el nitrato se midieron por espectrofotometría ultravioleta (Thermo Scientific, GENESYS 10S) con lámpara de xenón, a 300 y 350 nm respectivamente y celdas de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica (Modificado de APHA 2005). Se prepararon curvas estándar de nitrato y nitrito con el medio mineral utilizado en cultivos discontinuos para reducir las interferencias. Antes del muestreo, todas las muestras líquidas se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45 μm .

Las figuras 4 y 5 muestran el promedio de las curvas estándar de nitrito y nitrato respectivamente, con concentraciones conocidas: 0,10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/L. Se calculó la desviación estándar (σ) y el porcentaje del coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las curvas realizadas; obteniendo una $\sigma = 0.64$ y un C.V de 5.99%.

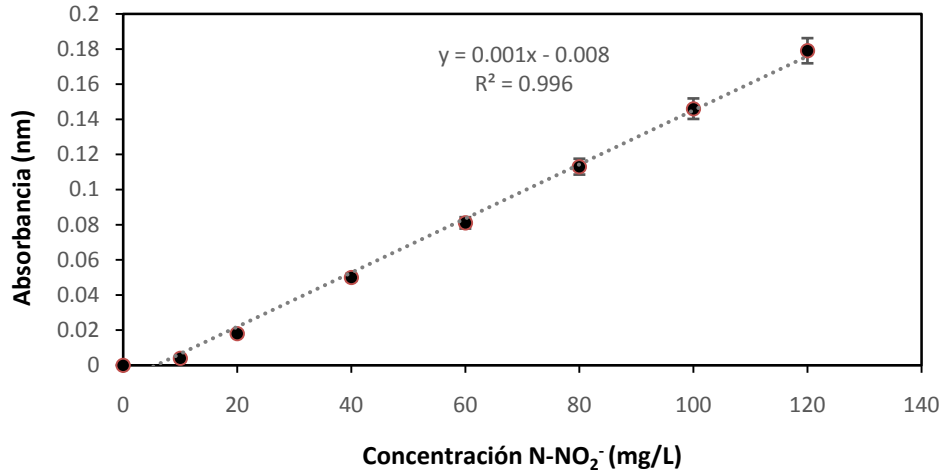


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de nitrito (NO₂⁻). Igual comentario que la grafica anterior

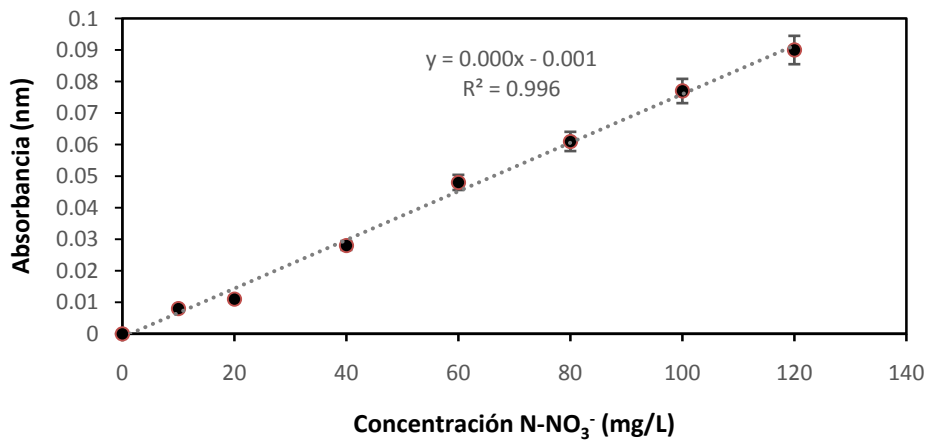


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de nitrato (NO₃⁻).

6.3.4 Cuantificación de nitrógeno molecular por desplazamiento de biogás y cromatografía de gases

La producción de biogás se midió utilizando columnas con solución de NaCl (300 g/L, pH = 2) y la composición se determinó sólo al final de la cinética mediante cromatografía de gases (Gow Mac modelo 550), con detector de conductividad térmica. Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 16 mL/min, con una columna de acero de 1.20 m de largo, empacada con Porapak Q malla 80 -

100. Las condiciones de temperatura fueron: para la columna, 50°C; inyector, 100°C; detector, 100°C; filamento, 135°C y un volumen de inyección de 0.2 mL.

El volumen de gas generado se contuvo en las columnas de gas para ser inyectado y para los cálculos de producción de biogás se consideró la presión atmosférica de la ciudad de Toluca (0.74 atm) y la temperatura de operación de los cultivos (35°C). Se calculó la producción volumétrica de N₂ (mol N₂/L d) y se expresó finalmente en mg/L d.

Para medir los gases en los ensayos en lote se construyó una curva estándar de mg/L vs área, basada en la ecuación de los gases ideales ($n=PV/RT$). Se prepararon una serie de botellas con un volumen de fase gaseosa conocido. Se purgaron con helio y se inyectó una cantidad conocida de N₂ (2, 5, 10, 15 mL, etc.) para construir la curva de calibración. En la Figura 6, se muestra la curva de calibración para la determinación de nitrógeno molecular.

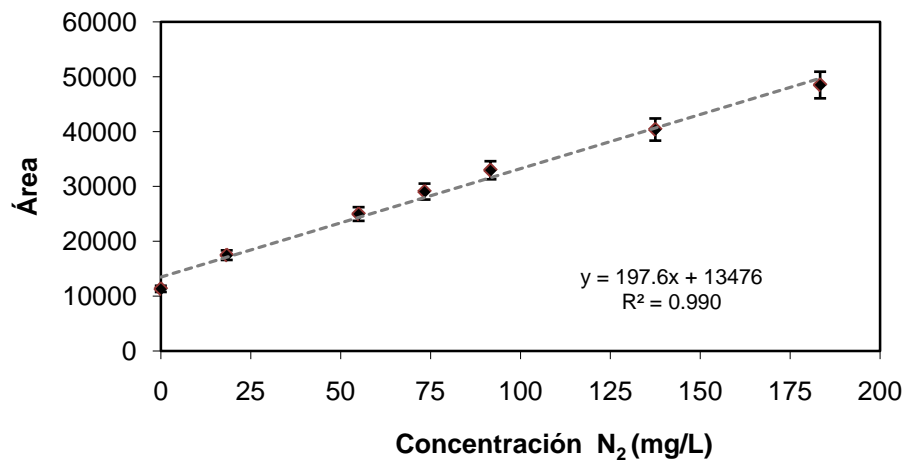


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de gas nitrógeno (N₂).

6.3.5 Cuantificación de cromo hexavalente por espectrofotometría UV-VIS, MNX-AA-044-SCFI-2014

Por su parte, la cuantificación y preparación de Cr(VI) se realizó con base en la norma mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014. Procedimiento: se tomaron 2 mL de la muestra filtrada, posteriormente se realizaron diluciones con un volumen final de 25 mL (para la dilución no se utilizó un volumen mayor al 10% de la muestra), se ajustó el pH a $2(\pm 0.5)$ con HCl 3M aproximadamente y se agregaron 0.5 mL de difenil-carbazida, después de ello se dejó reposar durante 15 minutos la muestra y finalmente se colocaron las muestras tratadas en celdas de cuarzo de 2 ml a 540 nm para su medición mediante espectrofotometría.

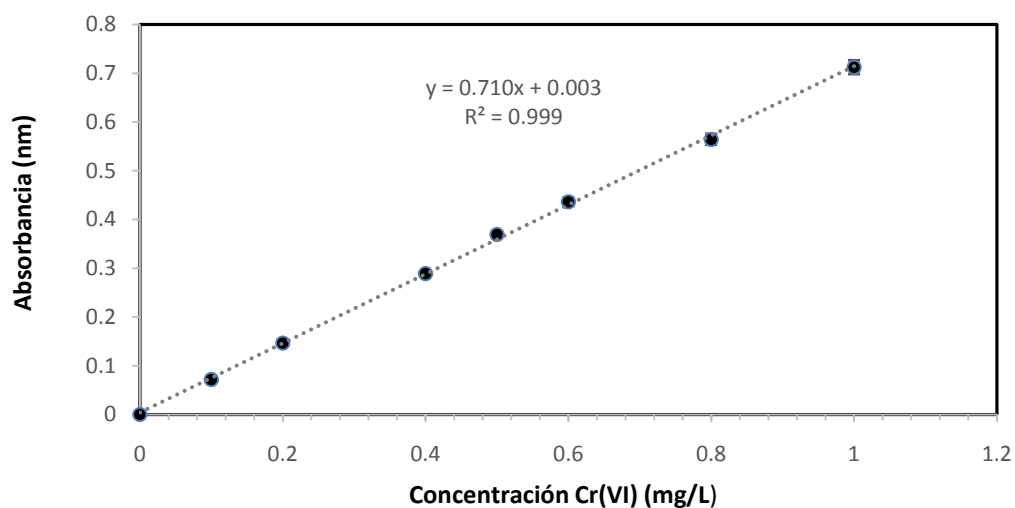


Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación de cromo hexavalente (Cr(VI)).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Ensayos de actividad anammox

La Figura 8 muestra el tiempo transcurrido en el consumo de compuestos nitrogenados. En los cultivos discontinuos, se puede observar que la concentración de 15 mg N-NO₂⁻/L presenta una fase de retardo de 2 horas; Mientras que los cultivos con 70 y 100 mg N-NO₂⁻/L, muestran una fase de retraso alrededor de las 5 horas en el consumo de nitrito. Sin embargo, el consumo de amonio no presentó una fase de retraso, este fenómeno pudo estar asociado al metabolismo endógeno que fue observado en los cultivos abióticos (González-Blanco y col., 2013). No obstante, después de las fases de retardo y para todas las concentraciones probadas de nitrito, la oxidación de amonio estuvo siempre asociada a la reducción de nitrito, teniendo como producto principal al nitrógeno molecular, con eficiencias y rendimientos significativos.

Las eficiencias de consumo de nitrito para las concentraciones evaluadas de 15 a 50 mg/L N-NO₂⁻ fueron superiores al 95% (Cuadro 5), mientras que el consumo de amonio aumentó del 14 al 48%, lo que implica que la concentración inicial de nitrito mejoró el consumo de amonio. Estos resultados coinciden con los valores de rendimiento de producción de N₂ que son cercanos a 1, lo que indica que el nitrógeno total consumido se recuperó principalmente como nitrógeno molecular. Mientras que las bajas eficiencias para el consumo de amonio podrían sugerir que la concentración inicial de nitrito no fue suficiente para convertir todo el amonio hasta N₂.

En los ensayos con 70 y 100 mgN-NO₂⁻/L, las eficiencias de consumo de nitrito fueron 74 y 58% respectivamente y las de amonio fueron del 46 y 55%, respectivamente para cada concentración. Estas eficiencias bajas podrían estar asociadas a problemas de inhibición. Por ejemplo, existen trabajos que indican que el proceso anammox puede ser inhibido por sus sustratos (nitrito y

amonio) y también por el nitrato producido. El nitrito es el inhibidor más importante, ya que ha reportado una IC_{50} para la actividad específica de nitrito que oscila entre 98 y 350 $N-NO_2^-$ mg/L. Rowe y col. (1979) y Rake y Eagon (1980) sugirieron que el nitrito es un desacoplador de la cadena respiratoria. En el caso del amonio, la IC_{50} oscila entre 770-980 $N-NH_4^+$ mg/L y para el nitrato se reporta un rango de concentración de 630-980 $N-NO_3^-$ mg/L (Strous et al., 1999, Dapena-Mora et al., 2007). El nivel de inhibición está fuertemente relacionado con varios factores tales como la concentración celular en los cultivos, la historia del inóculo, entre otros.

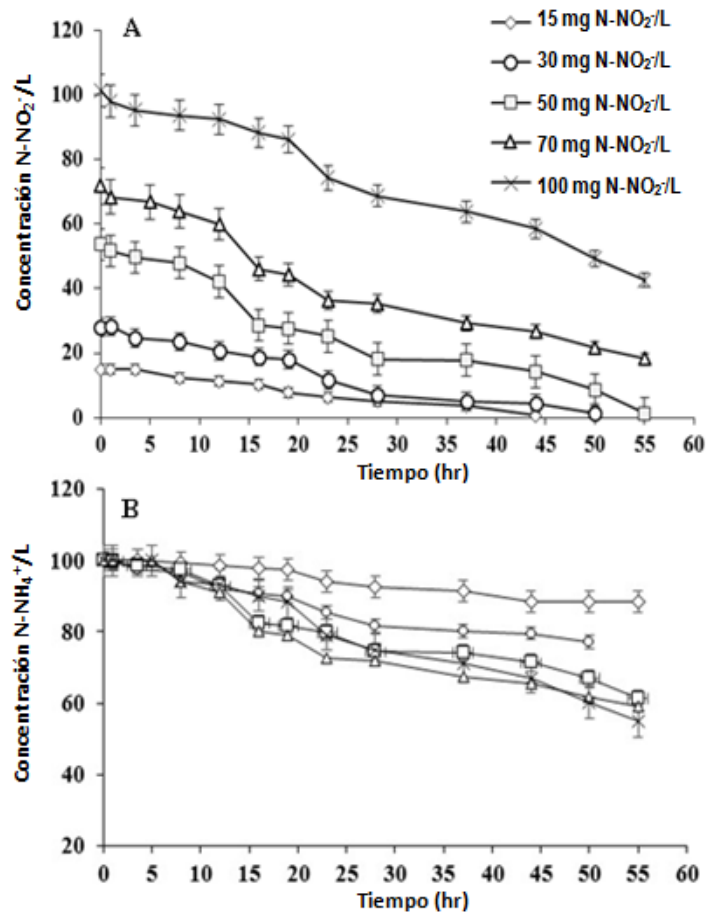


Figura 8. Perfiles de consumo sustratos: (A) $N-NO_2^-$ y (B) $N-NH_4^+$, a las diferentes concentraciones de nitrito evaluadas en el cultivo anammox.

Cuadro 5. Eficiencias de consumo, rendimiento N₂ y tasas de consumo específico de nitrito a diferentes concentraciones de N-NO₂⁻ evaluado.

N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	%Ef N-NO ₂ ⁻	%Ef N-NH ₄ ⁺	Y _{N₂}	*q _s N-NO ₂ ⁻	R ²
15.2 ± 0.6	99.6 ± 1.1	14.5 ± 0.8	0.98 ± 0.06	0.54 ± 0.03	0.98
30.3 ± 0.7	96.7 ± 0.9	28.2 ± 0.4	0.96 ± 0.05	0.56 ± 0.02	0.98
50.1 ± 0.5	97.3 ± 1.7	48.7 ± 0.3	0.98 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.91
70.2 ± 0.6	74.7 ± 1.2	46.3 ± 0.6	0.94 ± 0.06	0.51 ± 0.03	0.92
100.0 ± 0.6	58.9 ± 1.2	55.7 ± 1.2	0.81 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.94

*q_s tasa específica de consumo de sustrato obtenida ajustado al modelo de Gompertz.

La disminución en las velocidades de consumo específico de nitrito indicó efectos inhibitorios, como puede verse en la Figura 9. La última concentración inicial de nitrito evaluada estaba en el intervalo de inhibición descrito por Dapena-Mora y col., 2007. A una concentración de 100 mg N-NO₂⁻/L, el nitrito afectó más fuerte el proceso anammox, ya que el consumo de nitrito disminuyó, impactando en la producción de N₂, la cual disminuyó hasta 0.81. Este valor sugirió que el 19% del nitrógeno total consumido seguía otro destino metabólico. El nitrógeno que falta podría estar en forma de anammox intermedios como hidroxilamina o hidrazina (Jetten y col., 1999).

Hu y col. (2016), reportan velocidades 11.75 nmol N/g/h (1.64 mgN/g/h), con eficiencia de eliminación de 55.6-60.0%, por el proceso de anammox en un sistema de humedal construido, que si bien no se puede comparar con el sistema aplicado en este estudio por las diversas condiciones de cultivo del sistema estudiado en este trabajo, por la diferencia en las condiciones de cultivo, nos indica que el proceso anammox en humedales podría competir con los procesos obtenidos en cultivos extraídos de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

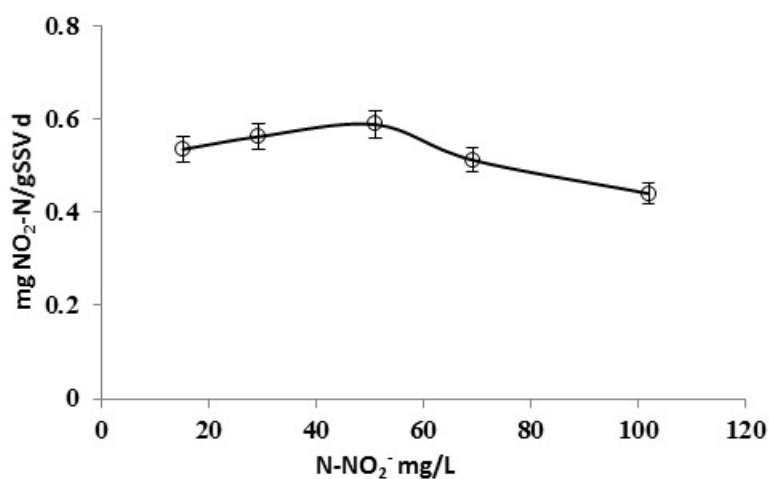


Figura 9. Velocidad de consumo de N-NO₂⁻ evaluada en cultivos en lote. Los cultivos discontinuos se realizaron por duplicado.

Sun y col., 2011, señalan que la actividad del proceso anammox puede ser corroborada a partir de la estequiometría del proceso. Strous y col., (1998) establecieron una relación estequiométrica anammox $1\text{NH}_4^+ : 1.32\text{NO}_2^-$, como puede verse en la Ecuación 5. Las proporciones molares estequiométricas en los ensayos anammox de este estudio fueron consistentes con la estequiometría de la reacción anammox, independientemente de la concentración inicial de nitrito. Las proporciones de consumo de nitrito y amonio fueron muy cercanas al valor de referencia de la estequiometría de anammox a 1.32 (Cuadro 6). En general, los resultados indicaron que el anammox fue el proceso dominante en los cultivos.

Estos resultados revelan que el lodo extraído de las raíces de *Typha* sp. Presenta la capacidad metabólica para llevar a cabo el proceso anammox y la eliminación de nitrógeno en el humedal natural.

Cuadro 6. Balance de Nitrógeno, relación estequiométrica del cultivo a diferentes concentraciones de nitrito evaluadas.

Concentración inicial N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	Consumo N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Consumo N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	NO ₂ ⁻ eliminado/NH ₄ ⁺ consumido Relación (mol/mol)
15.2 ± 0.6	10.5 ± 0.7	15.1 ± 0.2	1.39 ± 0.3
30.3 ± 0.7	21.1 ± 0.5	29.3 ± 0.8	1.38 ± 0.2
50.1 ± 0.5	36.5 ± 0.5	48.7 ± 1.1	1.33 ± 0.4
70.2 ± 0.6	34.9 ± 1.2	52.4 ± 0.9	1.51 ± 0.3
100.0 ± 0.6	41.7 ± 0.9	58.3 ± 0.5	1.40 ± 0.3

7.2 Ensayos con cromo hexavalente

La evaluación de Cr(VI) con diversas concentraciones fue evaluada inicialmente a una concentración de 2.0 mg/L, la cual, se encontraba por debajo del CI50 reportado en 9,84 mg/L (Yu y col., 2016). Al no registrar actividad anammox se midieron concentraciones inferiores de Cr(VI) en los cultivos (1.5, 1, 0.5 y 0.1 mg/L Cr(VI)), sin embargo, no se observó actividad en las concentraciones evaluadas durante 180 horas de cultivo. Por lo que se realizaron ensayos de recuperación, los cuales consisten en realizar lavados con solución fisiológica de los lodos expuestos a Cr(VI) para retirar el cromo de los cultivos, los cuales, fueron puestos a condiciones anammox ideales para su evaluación con el objetivo de descartar un efecto tóxico del Cr(VI) en los cultivos anammox.

Tras la evaluación de los ensayos de recuperación se pudo observar el restablecimiento en el consumo de NO₂⁻ y NH₄⁺ para todos los cultivos expuestos a Cr(VI) (Figura 10 A y B). Para la concentración expuesta a 0.1 mg Cr(VI)/L, el consumo de sustrato se observó después de 122 horas de cultivo, mientras que para la concentración de 2 mg/L el consumo de amonio se

presentó hasta las 176 horas (Cuadro 7) con producción de nitrógeno gaseoso. Sin embargo, en términos de eficiencias de eliminación los cultivos se vieron afectados con respecto al cultivo control (Cuadro 7). La producción de nitrógeno molecular sólo se midió al finalizar la cinética y de acuerdo con los resultados el rendimiento fue cercano a uno, a excepción de la concentración más alta (expuesto a 2 mgCr(VI)/L), donde no se detectó producción de biogás por el método establecido. Estos resultados indican que la presencia de cromo provocó un efecto inhibitorio y no tóxico en los cultivos. Los resultados coinciden con lo observado por Cheung y Gu (2007), quienes indican que ocurren fenómenos de inhibición por Cr(VI), tanto en cultivos aerobios como anaerobios.

Por otro lado, los resultados difieren de lo reportado por Yu y col. (2016), quienes reportan un concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) calculada de 9.84 ± 0.61 mgCr/L, para el cultivo anammox. No obstante, cabe señalar que los mismo autores indican que la concentración de Cr en los ensayos fue indetectable después de 8 horas de cultivo por fenómenos de absorción en la biomasa de anammox, cuando se probó una concentración de 0.9 mg Cr/L, lo que indicó que la eliminación de cromo reportada es debido a la retención de los metales pesados por la biomasa anammox y no por actividad microbiana. Los autores también indican que el efecto inhibitorio depende de la concentración de biomasa en el cultivo, así como de la concentración del metal en la solución.

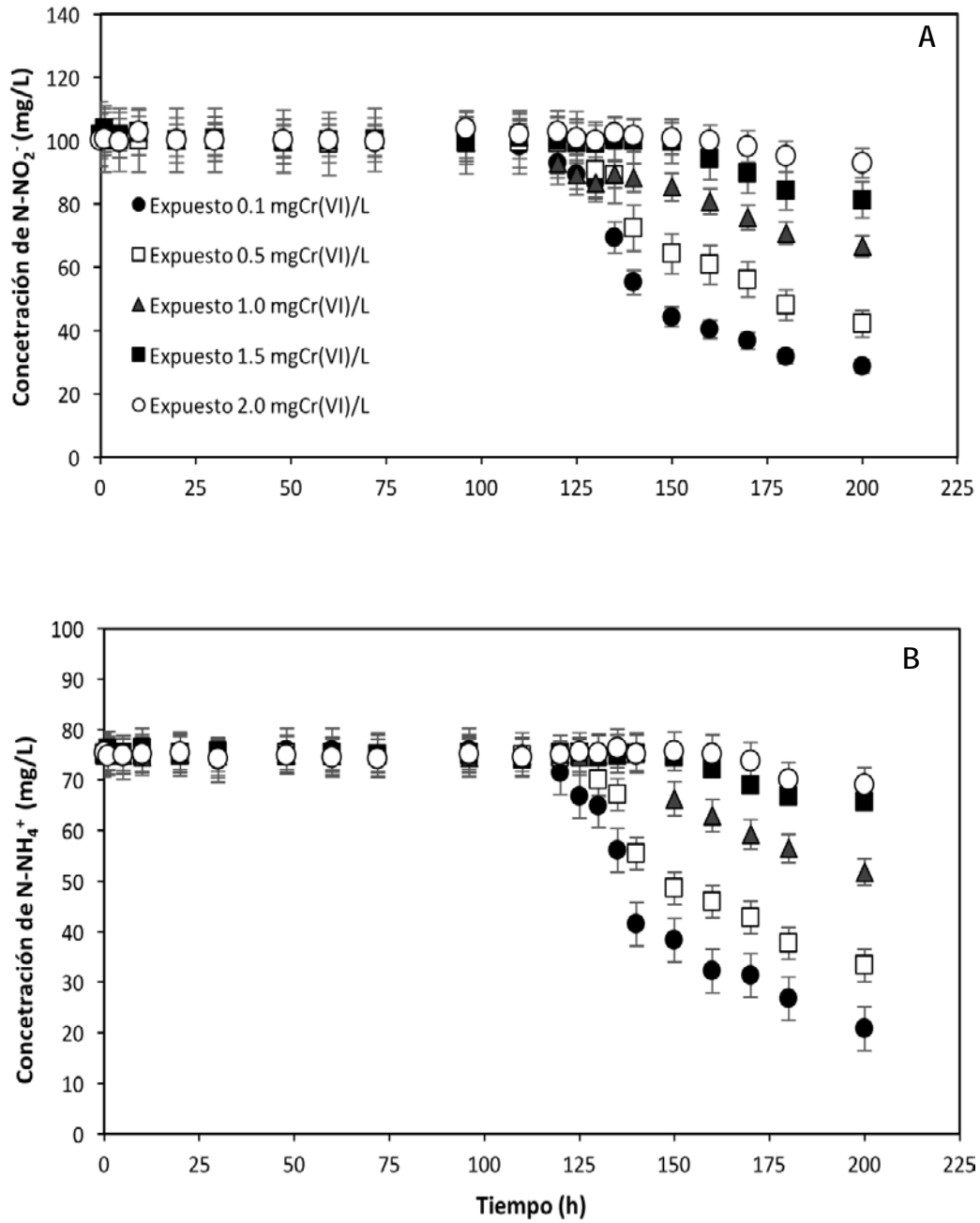


Figura 10. Perfil de recuperación de consumo de: A) N-NO₂⁻ y B) N-NH₄⁺, de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de Cr(VI).

Cuadro 7. Eficiencias de consumo, rendimiento de N₂ y tiempo de inicio de actividad anammox de los lodos expuestos a diferentes concentraciones de Cr(VI) evaluadas.

Exposición (Cr(VI) mg/L)	%Ef N-NO ₂ ⁻	%Ef N-NH ₄ ⁺	Y _{N₂}	Tiempo de respuesta (hr)
Control	97.3 ± 1.7	95.7 ± 0.8	0.98 ± 0.03	
0.1 ± 0.01	72.7 ± 0.8	70.9 ± 1.1	0.97 ± 0.04	120
0.5 ± 0.01	59.8 ± 1.1	55.8 ± 0.4	0.98 ± 0.05	134
1.0 ± 0.02	32.7 ± 1.4	31.0 ± 1.3	0.98 ± 0.04	152
1.5 ± 0.01	15.1 ± 1.2	12.6 ± 0.8	0.92 ± 0.03	160
2.0 ± 0.01	11.2 ± 0.7	8.45 ± 1.1	NA	176

De acuerdo con Kosolapov y col. (2004), los microorganismos suelen realizar sólo la absorción de los metales en su material celular y este se puede controlar mediante múltiples mecanismos e interacciones que pueden incluir intercambio iónico, quelación, adsorción y atrapamiento. Algunas bacterias pueden acumular metales dentro de sus células formando inclusiones minerales amorfas (Vainshtein y col., 2002). También pueden inmovilizar los metales tóxicos precipitándolos, ya sea como resultado de una reducción desasimilatoria o interacciones del metabolismo microbiano (Kosolapov y col., 2004).

En este trabajo los cultivos control tanto bióticos como abióticos, revelaron que las concentraciones de cromo probadas siempre se encontraron en la fase acuosa del cultivo. Lo que garantiza que los lodos estuvieron expuestos a las concentraciones reportadas. De acuerdo con Yu y col. (2016), de forma biológica la reducción de Cr(VI) podría llevarse a cabo bajo condiciones anammox debido a que los microorganismo anammox contienen la enzima oxidorreductasa, y citocromos (citocromo b y citocromo c), que se reportan como catalizadores de la reducción de Cr(VI). Bajo las condiciones probadas en este estudio no se midió la reducción del

Cr(VI), Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren un fenómeno de inhibición y no tóxico del Cr(VI) en los cultivos (Lotti y col., 2012; Ren-Cun y col., 2012).

VII. CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio se determinó la presencia de actividad anammox en lodos obtenidos del rizoma de *Typha* sp., ubicado en humedal natural de la Presa José Antonio Álzate. En todas las concentraciones evaluadas se observó la oxidación del amonio asociada a la reducción de nitrito con producción de nitrógeno molecular, lo que evidencia el metabolismo anammox.

A concentraciones de 15 a 50 mg N-NO₂⁻/L, las eficiencias de consumo de nitrito fueron superiores al 95%, acoplada a la oxidación del amonio con un incremento del 14 al 48% respectivamente, con una correlación estequiométrica cercana a la teórica (1NH₄⁺:1.3NO₂⁻). En los ensayos con 70 y 100 mg N-NO₂⁻/L, la eficiencia de consumo de nitrito fue inferior al 80% y estuvo acoplada a la oxidación de amonio en un 46 y 55%, respectivamente, lo que sugiere posibles efectos inhibitorios por el incremento en la concentración de nitrito.

Al evaluar la actividad anammox en presencia de distintas concentraciones de Cr(VI) (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) no se registró actividad en los cultivos. Los ensayos de recuperación mostraron un efecto inhibitorio de la actividad anammox, ya que se registró nuevamente consumo de amonio y nitrito en los lodos expuestos a Cr(VI), después de 122 horas de cultivo en lodos expuestos a la concentración más baja probada (0.1 mg Cr(VI)/L), mientras que a la máxima concentración (2 mg Cr(VI)/L), la actividad se recuperó hasta las 176 horas de cultivo, lo que descarta un efecto tóxico en el proceso.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abollino O., Aceto M., Malandrino M.E, Mentaste E., Sarzanini C. y R. Barberis. (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution*.119: 177.
- Ahn Y.H., Hwang I.S. and K.S. Min. (2004). Anammox and partial desnitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Water Science & Technology*.49 (5-9):145-153.
- American Public Health Association (APHA) (2005). Standard Methods for the examination of water and wastewater, Washington DC, USA. 21 ed.
- Angelova V., Ivanova R., Delibaltova V. and K. Ivanov.(2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial crops and products*. 19: 197–205
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. and E.G. Srinath. (1976). Inhibition of nitrification by ammonio and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 48(5): 835-852.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A. Campos J.L. and R. Méndez. (2006). Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *Journal of Biotechnology*.12:453-563.

B

- Barceló-Quintall. (2000). Estudio de la movilidad de Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en sedimentos de la presa José Antonio Álzate en el Estado de México. Tesis (doctoral). Facultad de Ingeniería- Universidad Autónoma del Estado de México.
- Barceló I., Laure A., Solís H., Ávila P. Carapta L y L.A. Barrios. (2002). Evaluación de los contaminantes metálicos de los sedimentos de la presa José Antonio Álzate en el Estado de México. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún. México.1-3.

- Barceló-Quintal I., Solís-Correa H., Ávila-Pérez P, López-Galván E. and S. Gómez-Salazar. (2012a). Determinations of distributions of Cd, Cu, and Pb concentrations in sediments of a Mexican reservoir to infer their environmental risk. *Biological Trace Element Research*. 148(1): 122-130.
- Barceló-Quintal I., López-Galván E., Solís-Correa, Domínguez-Mariani E. and S. Gómez-Salazar. (2012b). Water quality assessment of Jose Antonio Alzate Dam, the Lerma river and its tributaries in the state of Mexico, Mexico. *Journal of Environmental Protection*. (3): 878-888.
- Beristain-Cardoso R., Texier AC., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. and J. Gómez. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S by nitrification/denitrification: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 83: 325-342.
- Bernet N. and M. Spérandio. (2009). Principles of nitrifying processes. *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*. IWA Publishing, London. 1: 23-39.
- Birge W.J., Westerman A.G. and J.A. Spromberg. (2000). Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola SETAC: 727-792.
- Bock E, Koops H.P., Harms H and B. Ahler. (1991). The biochemistry of nitrifying organisms. Variations in autotrophic life. *Academic Press*. San Diego. 171-200.
- Broda E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Allg. Mikrobiol*. 17(6): 491-493.
- Busse L.B., Venrick E.L., Antrobus R., Miller P.E., Vigilant V., Silver M.W., Mengelt C., Mydiarz L. and B.B., Prezelin. (2006). Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA. *Harmful Algae*. 5: 91-101.

C

- Cárdenas-Calvachi L. y I. Sánchez-Ortiz. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y salud*. 15(1): 72-82.

- Camargo J.A., Alonso A. and A. Salamanca. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 58: 1255-1267.
- Canfield D.E., Kristensen E. and Thamdrup B. (2005). The nitrogen cycle. *Advances in Marine Biology*.48: 205-267.
- Carvajal-Arroyo J., Puyol D., Li G., Sierra-Álvarez R. and Field J. (2014). The role of pH on the resistance of resting- and active anammox bacteria to NO₂ inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. 111:1949–1956.
- Cerhan J.R., Weyer P.J., Janney C.A., Lynch C.f. and A.R., Folsom. (2001). Association of nitrate levels in municipal drinking water and diet with risk of coronary heart disease mortality: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology* 12: 457.
- Cervantes-Carrillo F., Pérez J. y J. Gómez. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 82-87.
- Cheng S.Y. and Chen J.C. (2002). Study of the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology*.61; 181-193.
- Cheung, K. H., &Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59(1):8-15.
- Chen J., Zheng P., Tan C. and Y., Yu. (2010). Effect of low pH in the performance of High-loaded anammox reactor. *Bioresource Technology*.101(8).
- CONAGUA. (2014). Estadísticas del agua en México. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2014. México.

D

- Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B. and Acuña-González, J. (2003). N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*.422, 606-608.
- Dapena-Mora, A. (2007). Wastewater treatment by anammox process: A short-circuit in the natural nitrogen cycle. Tesis(doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. España.
- den Camp, H., Kartal, B., Guven, D., van Niftrik, L., Haaijer, S.C.M., van der Star, W.R.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Cabezas, A., Ying, Z., Schmid, M.C., Kuypers, M.M.M., van de Vossenberg, J., Harhangi, H.R., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2006). Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochemical Society Transactions*.34:174-178.
- De la Peña, M.E., Ducci J. y V. Zamora. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México. *Banco Iberoamericano de Desarrollo*. México.
- Diario Oficial del la Federación. (1997). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Consulta en línea el día 14 de febrero de 2017 en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997
- del Águila-Juárez P., Lugo-de la Fuente J. y R. Vaca-Paulín. (2005). Determinación de factores de enriquecimiento y geoacumulación de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, y Zn en suelos de la cuenca alta del río Lerma. *Ciencia Ergo Sum*. 12(2):155-161.

E

- Erler, D. V., Eyre, B. D., & Davison, L. (2008). The contribution of anammox and denitrification to sediment N₂ production in a surface flow constructed wetland. *Environmental Science & Technology*. 42(24):9144-9150.

F

- FAO. (2016). El agua. Documentos de depósito de la FAO. Consulta en línea el día 25 de Julio en: <http://www.fao.org/docrep/006/W1309S/w1309s06.htm>
- Fernández I, Dosta J, Fajardo C, Campos JL, Mosquera-Corral A and R. Méndez. (2012). Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the anammox process. *Environ Manage.* 95:170–174.
- Fisher, J. and Acreman, M. C. (2004). Wetland nutrient removal: a review of the evidence. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions.* 8(4):673-685.
- Fondo para la comunicación y la educación ambiental.(s.f). Contaminación de cuerpos de agua. Consultado el día 20 de Julio de 2016 en: http://www.agua.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=3236&catid=28&Itemid=53
- Fuerst J.A. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology.* 141:1493-1506.
- Fuerst J.A. (2005). Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annual Review of Microbiology.* 59: 299-328.
- Fuerts J.A. and E. Sanulenko. (2011). Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology.*9:403-413.
- Fwetrell L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental Health Perspectives.*112: 1371-1374.

G

- Galloway J., Townsend A., Willem J., Bekunda M., Cai Z., Freney J., Martinelli L., Seitzinger S. and A. Sutton. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, question, and potential solutions. *Science.* 320: 889-892.

- Ganigué R., López H., Balaguer M.D. and J. Colprim. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Wares Res.* 41(15): 3317-1136.
- García-Aragón J., Ávila-Pérez P., Díaz-Delgado C., Zarazúa G., Morales P. y S. Tejeda.(2003). Concentración de metales en sedimento y su relación con patrones de deposición en la presa J.A. Álzate, Edo. de México. *Ingeniería Hidráulica en México.* 18(4): 55-62.
- García-Aragón J.A, Díaz Delgado C., Quentin and E., Hunt J. (2007). Watershed level analysis of sediment filling in a mexicanhighland reservoir. *Limnetica.* 26(2): 209-217.
- García-Aragón J.A., Zarazúa-Ortega G., Díaz-Palomarez V., Tejeda-Vega S. and P. Ávila-Pérez.(2013). Modelo del transporte y deposición de Fe y Mn en el curso alto del río Lerma. *Ingeniería Investigación y Tecnología.* 14(3): 355-367.
- Gobierno del Estado de México. (2015). *Comisión de la Cuenca del Río Lerma.* Secretaría de Infraestructura y Subsecretaría del Agua y Obra Pública. Consulta en línea el día 20 de Octubre de 2017 en: http://cuencalerma.edomex.gob.mx/datos_geograficos.
- Gómez J., Méndez J.R. and J.M. Lema. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sluge. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 88:1-12.
- González-Blanco G., Cuervo-López F., Cervantes F. y R. Beristain-Cardoso. (2013). Nitrite as oxidizing power for *p.cresol* removal using a denitrifying sludge: kinetic study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 88(22).
- González-Blanco G. (2014). Caracterización cinética de la eliminación simultánea de *p-cresol* y amonio por un lodo desnitrificante. Tesis (doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Gupta S.K., Gupta R.C., Gupta A.B., Seth A.K., Bassin J.K. and A., Gupta. (2000). A recurrent acute respiratory infections in areas with high nitrate concentrations in drinking waters. *Environmental Health Perspect.* 108: 363-366.

- Guven D., Dapena A., Kartal B., Schmid M.C., Maas B., Van de Pas-Schoonen K., Sozen S., Mendez R., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M. Strous M and I. Schmidt. (2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 71(2): 1066-1071.

H

- Helmer-Madhok C., Schmid M., Filipov E., Gaul T., Hippen A., Rosenwinkel K.H. Seyfried C.F., Wagner M. and S. Kunst. (2002). Deammonification in biofilm systems: population structure and function. *Water Science & Technology*. 46 (2): 226-231.
- Hirsch M.D., Long Z.T. and B. Song. (2011) Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (hzoA/hzoB). *Microbiology Ecology*. 61(2):264–276.
- Hong Y.G., Li M., Cao H. and J.D. Gu . (2011). Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the south China sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters. *Microbiology Ecology* .62(1):36–47
- Humbert, S., Zopfi, J., & Tarnawski, S. E. (2012). Abundance of Anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*. 4(5):484-490.

I

- INEGI. (2015). *Mapa Digital Interactivo*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consulta el Línea el día 20 de Octubre de 2017 en: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/?v=bGF00jE5LjQ0OTA0LGxvbjotOTkuNjY2MzMsejoxMSxsOmM0MTZ8YzQyNA=>
- Isaka K., Date Y., Sumino T., Yoshie S. and S. Tsuneda. (2006). Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtered reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70(1): 47-52.

J

- Jetten M.S.M., Strous M., Van de Pas- Schoonen K., Shalk J., Van Dongen L., Van de Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., Van Loosdrecht M.C.M. and J.G. Kuenen. (1999). The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiology Letters*. 22(5):421-437.
- Jetten M. S.M, Wagner M., Fuerst J., van Loosdrecht M., Kuenen G. and M. Strous. (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox process). *Current opinion in biotechnology*. 12(3): 283-288.
- Jetten M.S.M., Niftrik L., Strous M., Kartal B., Keltjens J.T. and H.J. Op den Camp. (2009). Biochemistry and molecular biology of Anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.44:65-84.

K

- Kadlec R.H. and R.L. Knight.(1996). Treatment Wetlands. *Lewis Publishers*.373-379.Kartal M.B., Van Niftrik L.A.M.P., Sliemers, A.O., Schmid M.C., Schmidt I., Van de Pas S.K.T., Cirpus I., Van de Star W., Van Loosdrecht M., Abma W., Kuenen J.G., Mulder J.W. Jetten M.S.M., Op de Camp H.J.M., Strous M. and J. Van de Vossenberg. (2004). Application ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 3(3): 255-264.
- Kartal B., Kuypers M., Lavik G., Schalk J., Op den Camp H, Jetten M.S.M. and M. Strous. (2007). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology*. 9(3): 635-642.
- Kartal B, Van-Niftrik L., Rattray J., Van de Vossenberg JLCM, Schmid M.C., Sinninghe-Damse J., Jetten MSM and M. Strous. (2008). *Candidatus Brocadia fulgida*: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*.63: 46-55.

- Knox A.K., Dahlgren R.A., Tate K.W. and E.R., Atwill. (2008). Efficacy of natural wetlands to retain nutrient, sediment and microbial pollutants. *Journal of Environmental Quality*. 37(5):1837-1846.
- Kosolapov, D.B., Kuschik, P., Vainshtein, M.B., Vatsourina, A.V., Wießner, A., Kästner, M. and Müller, R.A. (2004), Microbial Processes of Heavy Metal Removal from Carbon-Deficient Effluents in Constructed Wetlands. *Engineering in Life Sciences*.4: 403–411. doi:10.1002/elsc.200420048.
- Kuenen J.G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*. 6(4):320 326.
- Kuypers M.M.M., Sliekers A.O., Lavik G., Schmid M., Jorgensen B.B., Kuenen J.G., Sinninghe D., Strous M. and M.S.M Jetten. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*. 422:608-611.

L

- Lee, C.G., Fletcher, T.D. and Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*. 9(1):11-22.
- Li M. Hong Y., Klotz M.G. and J.D. (2010) A comparison of primer sets for detecting 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments. *Applied Microbiology Biotechnology*. 86(2):781–790
- Li M., Hong Y.G., Cao H.L. and J.D. Gu . (2011) Mangrove trees affect the community structure and distribution of anammox bacteria at an anthropogenic-polluted mangrove in the Pearl River Delta reflected by 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (HZO) encoding gene analyses. *Ecotoxicology*. 20(8):1780–1790
- Lloyd B.J., Letner A.R., Vorkas C.A. and R.K. Gunganesharajah. (2003). Under-performance evaluation and rehabilitation strategy for waste stabilization ponds in Mexico. *Water Science and Technology*. 48(2):35-43.
- López, H. (2009). Desarrollo del proceso Anammox para el tratamiento de lixiviados: puesta en marcha y aplicación. Tesis (doctoral). Universidad de Girona. España.

- López-Galván, E., Barceló-Quintal, I., Solís-Correa, H.E., Bussy, A.L., Ávila-Pérez, P., and Delgadillo, S.M. (2010). Calculation of the ecological risk Index in the José Antonio Alzate Dam, state of Mexico, Mexico. *Biological trace element research*. 135(1-3):121-135.
- Lotti T., Cordola M., Kleerebezem R., Caffaz S., Lubello C. and M.C.M. van Loosdrecht. (2012). Inhibition effect of swine wastewater heavy metals and antibiotics on Anammox activity. *Water Science & Technology*. 66 (7): 1519.
- Lu X., Yin Z., Sobotka D., Wisniewski K., Czerwionka K., Xie L., Zhou Q. and J. Makinia. (2017). Modeling the pH effects on nitrogen removal in the Anammox- enriched granular sludge. *Water Science and Technology*. 75(2): 378-386.
- Lucho C.A., Álvarez M., Beltrán R.I., Prieto F. and H. Poggi. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International*, On Line: 0160- 4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002.

M

- Madigan M.T., Martiko J.M., Dunlap P.V. y D.P. Dunlap. (2009). Brock Biología de los microorganismos. 12 ed. Pearson Prentice Hall. Person Education S.A.
- Martínez-Bastida JJ. (2009). En nitrógeno en las aguas subterráneas de la comunidad de Madrid: descripción de los procesos de contaminación y desarrollo de herramientas para la designación de zonas vulnerables. Tesis (doctoral).Cambio global y desarrollo sostenible-Departamento interuniversitario de Ecología. Universidad de Alcalá de Henares.
- Metcalf and Eddy. (2003). Wastewater engineering treatment and reuse. Fourth edition. McGraw-Hill. New York.
- Mulder A.(1992).Anoxic ammonium oxidation US patent 427849 (5078884).

- Mulder A., Van de Graaf A., Robertson L.A. and J.C. Kuenen. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*. 16:177-184.

O

- Olmos A., Olguin P., Fajardo C., Razo E. and O. Monroy. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour water from Mexican oil refineries. *Energy & Fuels*. 18:302-303.
- Oshiki M., Shimokawa M., Fujii N., Satoh H. and S. Okabe. (2011). Physiological characteristics of the anaerobic ammoniumoxidizing bacterium *Candidatus Brocadia sinica*. *Microbiology*. 157: 1706-1713.

P

- Peng, Y. and Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied microbiology and biotechnology* 73(1), 15-26.
- Pérez-Alarcón, F. y L. Camacho-Alcalá. (2011). Tecnologías para el tratamiento de aguas servidas. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. México.
- Prieto-Méndez J., González-Ramírez C.A., Román-Gutiérrez A. y F. Prieto-García. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(1):29-31.
- Puyol D., Carvajal-Arroyo J.M., Li G.B., Dougless A., Fuentes-Velasco M., Sierra-Alvarez R and J.A. Field. (2014). High pH (and not free ammonia) is responsible for Anammox inhibition in mildly alkaline solutions with excess of ammonium. *Biotechnology Letters*. 10.1007/s10529-014-1564-8.

Q

- Quan Z.X., Rhee S.K., Zuo J.E., Yang Y., Bae J.W., Park J.R., Lee S.T. and Y.H. Park.(2008). Diversity of ammonium oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-Oxidizing (Anammox) reactor. *Environmental Microbiology*. 10:3130-3139.

R

- Rake, J. B., & Eagon, R. G. (1980). Inhibition, but not uncoupling, of respiratory energy coupling of three bacterial species by nitrite. *Journal of bacteriology*. 144(3):975-982.
- Ramírez-Carrillo, H. F., Luna-Pabello, V. M., & Arredondo-Figueroa, J. L.(2009). Evaluation of an intermitent artificial vertical flow wetland, to obtain good quality water for aquaculture. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(1):93-99.
- Ren-Cun J., Guang-Feng Y., Jin.Jin Y. and Ping-Zheng.(2012). The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal*.197: 67-79.
- Rodríguez-Ortíz J., Valdez-Cepeda R.D., Lara-Mireles J.L., Rodríguez-Fuentes Vázquez-Alvarado H.R.E., Magallanes-Quintanar R. and J. L. García-Hernández. (2007). Soil Nitrogen Fertilization Effects on Phytoextraction of Cadmium and Lead by Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal*.10: Vol. 10.
- Rosas de Alva, S.G., Barceló-Quintanal I., Bussy-Beaurain A. y E. López-Galván. (2010). Propuesta técnica sobre el tratamiento del influente de la presa José Antonio Álzate a través de un sistema lagunar aerobio. *Investigación y Tecnología*. 6 (1): 113-125.
- Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B., and Eagon, R.G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*. 2(1):51-54.

S

- Sánchez J. and J. Sanabria. (2009). Microbial metabolisms over advanced process for nitrogen removal a prospective review. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(1): 114-124.

- Schmidt I., Sliemers O., Schmidt M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G, Jetten M.S.M. and M. Strous. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(4): 4811-492.
- Schmid M.C., Risgaard-Petersen N., van de Vossenberg J., Kuypers M.M., Lavik G., Petersen J., Hulth S., Thamdrup B., Canfield D., Dalsgaard T., Rysgaard S., Sejr M.K., Strous M., den Camp H.J. and M.S. Jetten. (2007) Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiology*. 9(6):1476–1484.
- SEMARNAT (2013). Decreto por el cual se aprueba el Programa Sectorial de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2013-2018. Diario Oficial de la Federación 12/12/2013.
- Singh BGD. (2008).Evaluación de la potencialidad tóxica de cadmio y cobre en sedimentos de la zona 'E' de la presa José Antonio Álzate, Edo. de México. Tesis (doctoral).Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, México. 65–75.
- STOWA. (2001). The combined Sharon/Anammox process: a sustainable method for N- removal from sludge wachter. L.G.J.M. Van Dongen M.S.M., Jetten M.C.M and Van Loosdrecht. Report n° 2000-25. STOWA, Utrecht (the Netherlands).
- Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G. and M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*. 50(5): 589-596.
- Strous M., Gerven E.V., Zheng P., Kuenen J.G and M.S.M Jetten. (1999a). Ammonium removal from concentrated waste streams with the Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*. 31(8): 1955-1962.
- Strous M., Van Gerven E. ,Kuenen J.G and Jetten M.S.M.(1999b). Effects of aerobic and micro-aerobic conditions on anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) sludge. *Applied Environ Microbiology*. 63(6):2446-2448.

- Strous M. (2000). Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. Thesis (post doctoral). Technical University of Delft, The Netherlands
- Sun, W., Banihani, Q., Sierra-Alvarez, R., and Field, J. A. (2011). Stoichiometric and molecular evidence for the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria from wastewater treatment plant sludge samples. *Chemosphere*. 84(9):1262-1269.
- Szatkowska B. and B. Paulsrud. (2014). The Anammox process for nitrogen removal from wastewater – achievements and future challenges. *Vannforeningen*. (02): 186-192.

T

- Tandukar M., Pavlostathis S.G. and S.G. Cervantes. (2009). Autotrophic denitrification for the removal of nitrogenous and sulphurous contaminants from wastewaters. In: Cervantes F.J. (Ed). *Environmental technologies to treat nitrogen pollution: principles and engineering*. IWA. London. 324-377.
- Téllez-Pérez, S.K., Silva, C.D., and Texier, A.C. (2013). Simultaneous ammonium and p-hydroxybenzaldehyde oxidation in a sequencing batch reactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(1):97-104.
- Thamdrup, B. and Dalsgaard, T. (2002). Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied Environmental and Microbiology*. 68:1312-1318.
- Toh S.K. and N.J. Ashbolt. (2002). Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology Biotechnology*. 59:344-352.
- Torá, J.A., Baeza, J.A., Carrera, J. and Oleszkiewicz, J.A. (2011). Denitrification of a high-strength nitrite wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chemical Engineering Journal*. 172:994-998.
- Trepel, M. (2010). Assessing the cost-effectiveness of the water purification function of wetlands for environmental planning. *Ecological Complexity*. 7(3):320-326.

V

- Vainshtein, M., Suzina, N., Kudryashova E. & Ariskina, E. (2002). New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. *Biology of the cell*. 94:29-35.10.1016 / S0248-4900 (02) 01179-6
- Van de Graaf A.A., Mulder P., de Bruijn P., Jetten M.S.M., Robertson L.A. and J.G. Kuenen. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied Environmental and Microbiology*. 61:1246-1251.
- Van de Graaf A.A., De Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M. and J.G. Kuenen. (1996). Autrophic growth of anaerobic ammonium- oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*. 41: 2187-2196.
- Van Niftri L., Fuerst J.A., Sinningue Damsté J.S., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. and M. Strous. (2004). The Anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in Anammox bacteria. *FEMS Microbiology*. 233:7-13.
- Van Niftri L. and M.S.M. Jetten.(2012). Anaerobic ammonium oxidizing bacteria: unique microorganism with exceptional properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(3):585.
- Verhoeven A. and A. Meuleman. (1999). Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological Engineering*. 12:5-12.
- Vitousek P. M. and R. W. Howarth. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea how can it occur?. *Biogeochemistry*. 13: 87-115.
- Vymazal J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*. 380: 48-65.

W

- Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Komada, M. and Abe, K. (2015). Distribution of Anammox bacteria in a free-water-surface constructed wetland with wild rice (*Zizania latifolia*). *Ecological Engineering*. 81:165-172.
- Wang C.C., Lee P.H., Kumar M., Huang Y.T., Sung S. and J.G. Lin. (2010). Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *Journal Hazard Mater*. 175(1–3):622–628.
- Wang Y.F., Feng Y.Y., Ma X., J. D. Gu. (2012). Seasonal dynamics of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in oxic and anoxic wetland sediments of subtropical coastal mangrove. *Applied Microbiology & Biotechnology*.10.1007/s00253-012-4510-5
- Wang, Y.F., and Gu, J.D. (2013). Higher diversity of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in constructed freshwater wetland than natural coastal marine wetland. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(15):7015-7033.
- Weir K.L., Doran J.M., Power J.F. and D.T. Walters.(1993). Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America*. 10.2136/sssaj1993.03615995005700010013x
- Woebken D., Lam P., Kuypers M., Wajih, Kartal B., Strous M., Jetten M.S.M., Fuchs B. and R. Amann. (2008). A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*. 10(11).
- Wolfe A.H. y J.A. Patz. (2002). Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio*. 31: 120-125.

Y

- Yu, C., Song, Y. X., Chai, L. Y., Duan, C. S., Tang, C. J., Ali, M., & Peng, C. (2016). Comparative evaluation of short-term stress of Cd (II), Hg (II), Pb (II), As (III) and Cr (VI) on Anammox granules by batch test. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 122(6):722-729.

Z

- Zepeda-Gómez C., Lot-Helgueras A., Nemiga Xanat A., y D. Madrigal-Uribe. (2012). Florística y diversidad de las ciénegas del río Lerma estado de México, México. *Acta botánica mexicana*. (98):23-43.
- Zhu G., Jetten M.S.M., Kushk P., Ettwing K.F. and C. Ying. (2010). Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 1043-1055.
- Zhu G, Wang S, Feng X, Fan G, Jetten MSM & Yin C (2011) Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland. *Environmental Science & Technology*. 45:9951-9958.
- Zhu G., Wang S., Wang W., Wang Y., Zhou L., Jiang B., & Hefting M. M. (2013). Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nature Geoscience*. 6(2):103-107.
- Zopfi A., Humbert S., Bagnoud A., Tarnawski S., Conen F. and B. Seth.(2009). Anammox in terrestrial ecosystems: distribution, diversity and activity. *Geochim Cosmochim Acta*. 73(13): 1538–1538.

ANEXO 1: ARTÍCULO PUBLICADO

Revista Mexicana de Ingeniería Química

ACTIVIDAD ANAMMOX EN LOS LODOS PROCEDENTES DE MONOCOTILEDÓNEAS DE HUMEDALES (*TYPHA SP.*): ESTUDIO CINÉTICO

ANAMMOX ACTIVITY OF SLUDGE COMING FROM WETLAND MONOCOTS (*TYPHA SP.*): KINETIC STUDY

G. González-Blanco¹, A. Valencia-Nava¹, R. Beristain-Cardoso², C. Jaimes-Hernández¹, J. Orozco-Villafuerte^{3*} and L. Buendía-González¹

¹Facultad de Ciencias, ³Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo, Piedras Blancas Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 15.5, Toluca, Edo de Méx., C.P. 50200.

²Departamento de Recursos de la Tierra, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Lerma. Av. Hidalgo Pte. 46, Col. Estación, Lerma de Villada, Edo de Méx., C.P. 52006.

Fecha de envío: 06, 09, 2016

Resumen:

Se evaluó la actividad de oxidación anaerobia de amonio (anammox) usando un lodo obtenido del rizoma de *Typha sp.*, de un humedal natural localizado en la presa José Antonio Álzate, en el valle de Toluca, México. Se evaluaron cinco concentraciones de N-NO_2^- (15, 30, 50, 70 y 100 mg / L) manteniendo constante la concentración de N-NH_4^+ en 100 ± 10 mg/L. Todos los cultivos presentaron una fase lag en el consumo de amonio, concluida esta fase, la oxidación del amonio estuvo acoplada a la reducción del nitrito, con producción de N_2 . Las eficiencias de consumo de nitrito para las concentraciones de 15 a 50 mg/L de N-NO_2^- fueron mayores a 95%, mientras que las eficiencias de amonio aumentaron de 14 a 48%. En los experimentos con 70 y 100 mg/L de N-NO_2^- , el consumo de nitrito fue de 74 y 58%, respectivamente observando un fenómeno de inhibición, reflejado en la disminución de las velocidades específicas (0.51 a 0.44 mg N-NO_2^- /g SSV d). El estudio proporciona información nueva y útil sobre la actividad anammox en lodos procedentes de humedales, los cuales pueden ser utilizados como inóculo potencial para el tratamiento de aguas residuales en reactores anammox ó en humedales construidos.

Palabras claves: Anammox, humedales, actividad específica, nitrito, *Typha*.

Abstract:

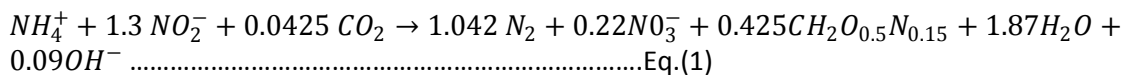
The anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity was evaluated using sludge obtained from the rhizome of *Typha* sp., found in a natural wetland localized in the José Antonio Álzate dam, Toluca Valley, Mexico. Five NO₂⁻-N concentrations (15, 30, 50, 70 and 100 mg/L) were evaluated and the ammonium remained constant at 100 ± 10 mg N/L. All cultures presented a lag phase in the ammonium consumption. Nevertheless, after the phase lag the ammonium oxidation was linked to nitrite reduction, producing N₂. The nitrite consumption efficiencies for the concentrations evaluated from 15 to 50 mg/L of NO₂⁻-N were above 95%, while the ammonium consumption efficiency increased from 14 to 48%. In experiments with 70 and 100 mg/L of NO₂⁻-N, nitrite consumption efficiencies were 74 and 58% respectively. The higher nitrite concentrations tested inhibited the anammox process since the specific rates diminished at 0.51 and 0.44 mg NO₂⁻-N/g VSS d respectively. This study provides new and useful information about the anammox activity in sludges coming from wetlands, and these can be used as potential inoculum to treat wastewaters into anammox reactors, or in constructed wetlands.

Keywords: Anammox, wetlands, specific activity, nitrite, *Typha*.

*Autor para la correspondencia. E-mail: jov202001@yahoo.com.mx
Tel. 01-722-217-51-09; 217-38-90*

1. Introduction

The Anaerobic Ammonia Oxidation (anammox) process was discovered in a denitrifying pilot plant (Mulder et al., 1995). The anammox reaction involves the oxidation of ammonium coupled to the reduction of nitrite to produce the main product, molecular nitrogen, and a minor product, nitrate (Eq. 1) (Strous et al., 1998) under anoxic conditions. The biological reaction is catalyzed by chemolithoautotrophic bacteria which have been identified as a distinct phylogenetic order, the Brocadiales, which is part of the phylum Planctomycetes (Kartal et al., 2008; Jetten et al., 2009). Since its discovery, it has gained attention due to its importance in the global nitrogen cycle that has been estimated accounts for over 50% of nitrogen loss in marine ecosystems (de Camp et al., 2016). Anammox has mainly been investigated in wastewater treatment plants, enrichment cultures, in sediments and water columns (Dalsgaard et al., 2003; Zhu et al., 2013). However, there is few information of anammox in natural and constructed freshwater wetlands (Zhu et al., 2010).



The José Antonio Álzate Dam (JAAD) in the Toluca Valley, Mexico, receives wastewaters of origin domestic and industrial, through the Lerma River (Barceló-Quintal et al., 2012a, 2012b). The uncontrolled wastewaters discharges from municipal and industrial activities, as well as from agricultural runoffs, untreated or partially treated; induce contamination of water sources, risking more and more its complete use becoming a potential source of diseases. The main pollutants contained in the dam are organic matter, metals, phosphorous and reactive nitrogen (3 at 60 mg/L) (López-Glaván et al., 2010; Barceló-Quintal et al., 2012a). Nitrogen removal is necessary because of the environmental impact, such as eutrophication, acidification and toxicity to aquatic life (Télliz-Pérez et al., 2013). The dam has wetlands with

monocots (*Typha*, *Juncus* and *Eichhornia*), the wetlands are buffer zones between land and waters that maintain good water quality for reducing nutrients and pollutants (Fisher and Acreman, 2004; Ramírez-Carrillo et al., 2009; Trepel 2010; Wang and Gu, 2013). It has been shown in several studies the capacity of wetlands to remove organic matter, nitrogen, phosphorus, suspended solids, pathogens and heavy metals (Fisher and Acreman, 2004; Humbert et al., 2012; Waki et al., 2015). This capability is attributed to biological diversity they possess, for instance, it has been reported that the mechanism of nitrogen removal was conducted by: 1) ammonium assimilation by plants and 2) microbial activity through nitrification followed by denitrification (Verhoeven and Meuleman, 1999; Vymazal, 2007; Knox et al., 2008; Lee et al., 2009). However, the participation of anammox microorganisms, can also be assumed to contribute to nitrogen removal, but there is relatively little literature about the anammox activity in natural and constructed wetlands (Zhu et al., 2010).

Most of the studies that have been conducted were focused on evaluating the diversity of anammox bacteria, abundance and population dynamics (Zhu et al., 2011; Humbert et al., 2012), distribution patterns (Waki et al., 2015) but knowledge about the specific activity of anammox bacteria is scarce and particularly in soils wetland. Therefore, the goal of this study was focused on the respiratory activity of anammox process using anoxic sludge as inoculum potential in the treatment of dam's water. So in this paper the anammox activity was evaluated using sludge taken from the rhizome of *Typha* sp. of this natural wetland in the dam Jose Antonio Alzate from the Lerma River.

2. Materials and Methods

2.1 Collection and preservation of microbial consortium

Ten plants of *Typha* sp. were collected of five sample points of the natural wetland present in the dam. It was collected with a portion of soil at the roots (Leander, 1972). These were carried at room temperature in plastic bags. The sludge obtained was spiked in an Erlenmeyer flask with 1000 mL of sterile isotonic solution (sodium chloride 0.90%). The mixing was homogenized at 20 min., and it allowed settling the sludge in an Imhoff cone. This operation was performed three times in order to determine the amount of total suspended solids (SSV). The biomass concentration quantified was 4.7 ± 0.2 g VSS/L (APHA, 2005).

2.2 Batch cultures

Batch cultures were conducted in 125 mL serological bottles containing 60 mL of basal medium formulated with the following compounds (mg/L): NaHCO_3 (2500); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (57.5); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200); and 1.5 mL/L of trace element solution. Trace element solution contained (in mg/L) FeSO_4 (5000) and ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) (5000); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (430); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (240); MnCl_2 (629); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (250); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (220); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (190); MgCl_2 (500). The initial sludge concentration was 2 ± 0.01 g of VSS/L. the liquid and headspace were flushed during 3 min, with He/ CO_2 mixture (80/20, v/v) to exclude oxygen from the assays. All bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum crimp seals. Separate bottles were set up for gas phase measurements of N_2 . Abiotic controls

lacking inoculum were run in parallel to monitor the possible abiotic elimination of the substrates. Biotic controls lacking nitrite or ammonium were also included to correct for compound losses not associated with anammox. All assays either abiotic or biotic were carried out by duplicate in an orbital shaker 150 rpm and 35°C. The initial pH for all batch cultures was of 7.5 ± 0.2 . Five concentrations of N-NO_2^- (15, 30, 50, 70 and 100 mg/L) were evaluated and the concentration of electron donor remained constant at 100 ± 10 mg N-NH_4^+ /L. Microbial activity was evaluated in terms of consumption efficiency (Eq. 2), production yield (Eq. 3) and a specific consumption rate (Eq. 4). The kinetic parameters such as the specific rates were calculated using the Gompertz model and non-linear regression program (OriginPro 8.0). Each bottle was an independent experimental unit, which was sacrificed after sampling. Samples were filtered (0.45 μm) and analyzed for ammonium, nitrite, and nitrate determination.

$$\%E_N = \frac{\text{mg N initial /L} - \text{mg N final /L}}{\text{mg N consumed /L}} \times 100 \dots \text{Eq. (2)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{mg produced /L}}{\text{mg substrate consumed /L}} \dots \text{Eq. (3)}$$

$$q_{\text{N-NO}_2^-} = \frac{\text{mg NO}_2^- \text{-N consumed}}{\text{biomass g*t}} \dots \text{Eq. (4)}$$

2.3 Analytical methods

Ammonium was analyzed by a selective electrode (Phoenix electrode company, USA). Nitrite and nitrate were measured by ultraviolet spectrophotometry (Thermo Scientific, GENESYS 10S) with xenon lamp provides high intensity at 300 and 350 respectively and quartz cells 1 cm optical path (Modified of APHA 2005). Standard curves of nitrate and nitrite were prepared with the mineral medium used in batch cultures to reduce interferences. Before sampling, all liquid samples were filtered through a 0.45- μm nylon membrane. Biogas production was measured using columns with NaCl solution (300 g/L, pH = 2) and the composition was determined only at the end of the kinetic by gas chromatography with thermal conductivity detector (Gow Mac model 550). Temperatures for the column, injector, and detector were 50, 100, and 110 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 16 mL/min. The stainless steel column (Porapak Q mesh 100-80) was of 1.20-m long and 1/8 diameter.

3. Results and Discussion

3.1 Control Assays

Batch assays were performed for a period of approximately 55 h. Abiotic cultures spiked with $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ did not show any chemical reaction, because at the end of the batch experiments the initial concentrations remained without change. Regarding to inoculated treatments, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ consumption without electron donator ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) and vice versa were evaluated in order to observe contribution of a possible endogenous metabolism. At the end of the batch assays ammonium was almost completely recovered ($\sim 98\%$), while for the nitrite

assays it showed a consumption of 8%, this can be attributed to the endogenous metabolism or the presence of residual organics in the culture favoring the denitrification process (Peng and Zhu, 2006; Torà et al., 2011). Finally, these experimental data showed that consumption of both substrates were mainly associated to the anammox activity of the sludge.

3.2 Anammox activity assays

Figure 1 shows the time-course of nitrogen compounds consumption. In batch cultures spiked with 15 mg/L NO_2^- -N, it presented a lag phase of 2 h; while batch cultures with 70 and 100 mg/L NO_2^- -N displayed lag phases around 5 h. Nonetheless, nitrite consumption did not present lag phase. Nitrite was consumed from the beginning, due to the endogenous metabolism as was described above. In overall, in all batch cultures the ammonium oxidation was linked to nitrite reduction, being the main product, N_2 . For instance, the nitrite consumption efficiencies for the concentrations evaluated from 15 to 50 mg/L of NO_2^- -N were above 95% (Table 1). The ammonium consumption efficiency increased from 14 to 48%, this means, that initial nitrite concentration improved the ammonium consumption. The values obtained for the N_2 production yield indicated that total nitrogen consumed was recovered mainly as molecular nitrogen. The low efficiencies for ammonium consumption might suggest that initial nitrite concentration was not enough to convert all ammonium up to N_2 .

In batch assays evaluated with 70 and 100 mg/L of NO_2^- -N, nitrite consumption efficiencies were 74 and 58% respectively. The ammonium consumption efficiencies were 46 and 55%, respectively. At these initial nitrite concentrations the substrate affected was the nitrite profile, due to ammonium consumption continued increasing. These low efficiencies might be associated to inhibitory troubles. For example, there are works indicating that anammox process can be inhibited by their substrates (nitrite and ammonium) and also for the nitrate produced. Nitrite is the most important inhibitor, because it has reported an IC_{50} for the nitrite specific activity ranging from 98 to 350 NO_2^- -N mg/L. Rowe et al. (1979) and Rake and Eagon (1980) suggested that nitrite is an uncoupler of the respiratory chain. In the case of ammonium, the IC_{50} reported ranges from 770-980 NH_4^+ -N mg/L and for nitrate of 630-980 NO_3^- -N mg/L (Strous et al., 1999; Dapena-Mora et al., 2007). The level of inhibition is strongly related to several factors such as cell concentration in the cultures, history of inoculum, among others.

The diminishing in the specific consumption rates for nitrite indicated inhibitory effects, as can be seen in the Figure 2. The last initial nitrite concentration evaluated was in the range of inhibition reported by Dapena-Mora et al., 2007. At concentration of 100 mg/L of NO_2^- -N, nitrite affected stronger the respiratory process of anammox, since nitrite consumption diminished, and also the N_2 production diminished up to 0.81; this value suggested that 19% of total nitrogen consumed followed another metabolic fate. The nitrogen missing might be in form of anammox intermediates like hydroxylamine or hydrazine (Jetten et al., 1999).

According to Sun et al., 2011, the activity of anammox process can be corroborated from the stoichiometry of the process. Strous et al., (1998) established the stoichiometry of the anammox

reaction, as can be seen in Eq. (1). The stoichiometric molar ratios in the anammox assays of this study were consistent with the stoichiometry of anammox reaction regardless of initial concentration of nitrite. The reactant ratios of NO_2^- consumption to NH_4^+ consumption were all very near the benchmark value of anammox stoichiometry at 1.32 (Table 2). Overall, the results indicated that anammox was the dominant process in the cultures.

Finally, the sludge taken from the roots of *Typha* sp. showed the metabolic capability for carrying out the anammox process. In this work, the characterization of the bacterial microflora was not possible. Nonetheless, phylogenetic studies in natural and artificial wetlands have identified anammox bacterial like *Candidatus* and *Anammoxoglobus* genus (Zhu et al., 2011; Waki et al., 2015).

4. Conclusions

The sludge taken from the roots of *Typha* sp. showed the potential to carry out the anammox biological process. At initial nitrite concentrations below to 70 mg/L were obtained high consumption efficiencies for nitrite, whereas for above, the consumption efficiencies for nitrite diminished. At higher nitrite concentrations was observed an inhibitory phenomenon, however, the reaction time was relatively short. Therefore, the use of this kind of sludge might shorten the start-up process. The anaerobic ammonium oxidation is an emerging technology for nitrogen removal that provides a more environmentally sustainable and cost effective alternative compared to conventional biological treatments.

Acknowledgements

The first author acknowledges the support of the National Council for Science and Technology (CONACyT) through a scholarship to attend the post-doctorate within the Postgraduate Sciences of the Autonomous University of the State of Mexico, State of Mexico.

Nomenclature

<i>Anammox</i>	Anaerobic Ammonia Oxidation
$\%E_N$	efficiency of consume of NO_2^- -N or NH_4^+ -N, %
JAAD	Jóse Antonio Álzate dam
$q_{\text{NO}_2\text{-N}}$	specific substrate consumption rate mg of N consumed/g VSS h
VSS	volatile suspended solids, g/L
$Y_{P/S}$	Anammox yield, mg of N_2 produced/mg of N consumed

References

American Public Health Association (APHA) (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington DC, USA. 21 ed.

Barceló-Quintal, I., López-Galván, E., Solís-Correa, H., Domínguez-Mariani, E., and Gómez-Salazar, S. (2012a). Water quality assessment of José Antonio Alzate dam, the Lerma River and its tributaries in the State of Mexico, Mexico. *Journal of Environmental Protection* 3, 878-888.

Barceló-Quintal, I.D., Solís-Correa, H.E., Avila-Pérez, P., López-Galván, E., Gómez-Salazar, S., and García-Albortante, J. (2012b). Determination of distributions of Cd, Cu, and Pb concentrations in sediments of a Mexican reservoir to infer their environmental risk. *Biological trace element research*, 148(1), 122-132.

Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B. and Acuña-González, J. (2003). N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422, 606-608.

Dapena-Mora, A., Fernández, I, Campos, J.L., Mosquera-Corral, A, Méndez, R. and 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 Technol* 40 (4), 859-865.

den Camp, H., Kartal, B., Guven, D., van Niftrik, L., Haaijer, S.C.M., van der Star, W.R.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Cabezas, A., Ying, Z., Schmid, M.C., Kuypers, M.M.M., van de Vossenberg, J., Harhangi, H.R., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2006). Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochemical Society Transactions* 34, 174-178.

Fisher, J. and Acreman, M. C. (2004). Wetland nutrient removal: a review of the evidence. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* 8(4), 673-685.

Humbert, S., Zopfi, J., & Tarnawski, S. E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports* 4(5), 484-490.

Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, L., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Review* 22, 421-437.

Jetten, M.S.M., Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J.T. and Op den Camp, H.J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44, 65-84.

Kartal, B., Van Niftrik, L., Rattray J., Van De Vossenberg, J.L.C.M., Schmid, M.C., Sinnighe-Damste, J., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2008). *Candidatus Brocadia fulgida*: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology* 63, 46-55.

Knox, A.K., Dahlgren, R.A., Tate, K.W. and Atwill, E.R. (2008). Efficacy of natural wetlands to retain nutrient, sediment and microbial pollutants. *Journal of Environmental Quality* 37(5), 1837-1846.

Kuypers, M.M., Sliekers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B.B., Kuenen, J.G., ...and Jetten, M. S. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422(6932), 608-611.

- Lee, C.G., Fletcher, T.D. and Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences* 9(1), 11-22.
- Leander, J. (1972). Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens, Ed. Burgess Publishing, USA, p.p. 37-57.
- López-Galván, E., Barceló-Quintal, I., Solís-Correa, H.E., Bussy, A.L., Avila-Pérez, P., and Delgadillo, S.M. (2010). Calculation of the Ecological Risk Index in the José Antonio Alzate Dam, State of Mexico, Mexico. *Biological trace element research*, 135(1-3), 121-135.
- Mulder, A., Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16(3), 177-184.
- Peng, Y. and Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied microbiology and biotechnology* 73(1), 15-26.
- Rake, J. B., & Eagon, R. G. (1980). Inhibition, but not uncoupling, of respiratory energy coupling of three bacterial species by nitrite. *Journal of bacteriology*, 144(3), 975-982.
- Ramírez-Carrillo, H. F., Luna-Pabello, V. M., & Arredondo-Figueroa, J. L. (2009). Evaluation of an intermittent artificial vertical flow wetland, to obtain good quality water for aquaculture. *Revista mexicana de ingeniería química*, 8(1), 93-99.
- Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B., and Eagon, R.G. (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2(1), 51-54.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammoniumoxidizing microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 50, 589-596.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400 (6743), 446-449.
- Sun, W., Banihani, Q., Sierra-Alvarez, R., and Field, J. A. (2011). Stoichiometric and molecular evidence for the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria from wastewater treatment plant sludge samples. *Chemosphere* 84(9), 1262-1269.
- Télez-Pérez, S.K., Silva, C.D., and Texier, A.C. (2013). Simultaneous ammonium and p-hydroxybenzaldehyde oxidation in a sequencing batch reactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 97-104.
- Thamdrup, B. and Dalsgaard, T. (2002). Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied environmental and microbiology* 68, 1312-1318.

Torà, J.A., Baeza, J.A., Carrera, J. and Oleszkiewicz, J.A. (2011). Denitrification of a high-strength nitrite wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chemical Engineering Journal* 172, 994-998.

Trepel, M. (2010). Assessing the cost-effectiveness of the water purification function of wetlands for environmental planning. *Ecological Complexity* 7(3), 320-326.

Verhoeven, J.T. and Meuleman, A.F. (1999). Wetlands for wastewater treatment: opportunities and limitations. *Ecological engineering* 12(1), 5-12.

Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the total environment* 380(1), 48-65.

Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Komada, M. and Abe, K. (2015). Distribution of anammox bacteria in a free-water-surface constructed wetland with wild rice (*Zizania latifolia*). *Ecological Engineering* 81, 165-172.

Wang, Y.F., and Gu, J.D. (2013). Higher diversity of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in constructed freshwater wetland than natural coastal marine wetland. *Applied microbiology and biotechnology* 97(15), 7015-7033.

Zhu, G., Jetten, M.S.M., Kusch, P., Ettwig, K.F. and Yin, C. (2010). Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems. *Applied microbiology and biotechnology* 86, 1043-1055.

Zhu G, Wang S, Feng X, Fan G, Jetten MSM & Yin C (2011) Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland. *Environmental Science & Technology* 45, 9951-9958.

Zhu, G., Wang, S., Wang, W., Wang, Y., Zhou, L., Jiang, B., & Hefting, M. M. (2013). Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nature Geoscience* 6(2), 103-107.

List of legends of tables and figures

Table 1. Efficiencies consumption, performance N_2 and specific consumption rates nitrite at different concentrations of $N-NO_2^-$ evaluated.

$NO_2^- -N$ (mg /L)	% E_N $NO_2^- -N$	% E_N $NH_4^+ -N$	Y_{N_2}	$q NO_2^- -N^*$	R^2
15.2 ± 0.6	99.6 ± 1.1	14.5 ± 0.8	0.98 ± 0.06	0.535	0.98
30.3 ± 0.7	96.7 ± 0.9	28.2 ± 0.4	0.96 ± 0.05	0.562	0.98
50.1 ± 0.5	97.3 ± 1.7	48.7 ± 0.3	0.98 ± 0.04	0.588	0.91
70.2 ± 0.6	74.7 ± 1.2	46.3 ± 0.6	0.94 ± 0.06	0.512	0.92
100.0 ± 0.6	58.9 ± 1.2	55.7 ± 1.2	0.81 ± 0.03	0.440	0.94

qs * specific substrate consumption rate obtained by adjusting Gompertz.

Table 2. Nitrogen Balance, stoichiometric relation of culture to different concentrations of nitrite evaluated.

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ Consumptions (mg/L)	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ Consumptions (mg/L)	NO_2^- removed/ NH_4^+ consumed Relations (mol/mol)
10.5 ± 0.7	15.1 ± 0.2	1.39 ± 0.3
21.1 ± 0.5	29.3 ± 0.8	1.38 ± 0.2
36.5 ± 0.5	48.7 ± 1.1	1.33 ± 0.4
34.9 ± 1.2	52.4 ± 0.9	1.51 ± 0.3
41.7 ± 0.9	58.3 ± 0.5	1.40 ± 0.3

Figure 1. Profiles of consume of an anammox enrichment culture to different concentrations of nitrite evaluated (A) $\text{NO}_2^-\text{-N}$; (B) $\text{NH}_4^+\text{-N}$

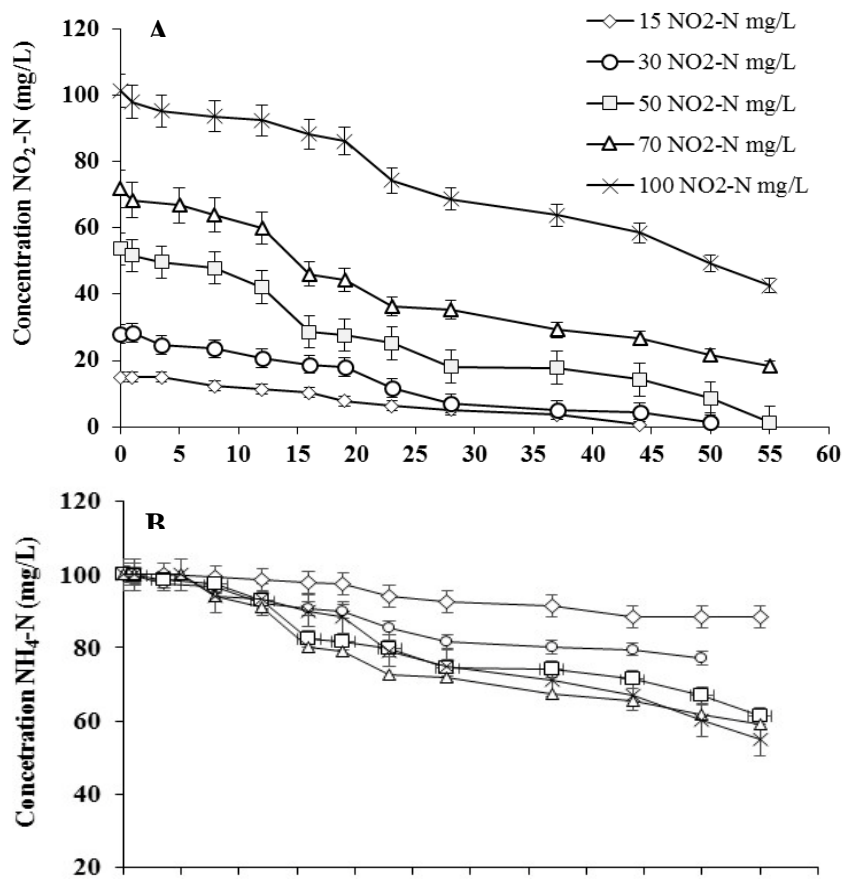


Figure 2 NO_2^- -N consumption rate evaluated in batch cultures. Batch cultures were carried out in duplicate. Error bars represent the standard deviation.

