

# Procesos, bacterias y arqueobacterias involucrados en el ciclo biológico del nitrógeno para la eliminación de compuestos nitrogenados en ecosistemas de agua dulce, una revisión sistemática

Processes, bacteria and archaea involved in the biological nitrogen cycle for the removal of nitrogen compounds in freshwater ecosystems, a systematic review

Luis Alberto Galván J.\*, Leonardo Alberto Ríos O.†

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos, el intercambio de agua ya no se considera una opción adecuada para la gestión en la acuicultura, siendo entonces el interés particular evitar este recambio de agua en la generación de compuestos que contienen nitrógeno, la mejor opción para lograr evitar este recambio de agua es el ciclo biológico del nitrógeno, donde compuestos tóxicos del nitrógeno que se acumulan por los desechos del metabolismo de peces, alimentos no consumidos y materia orgánica, entre otros, son transformados a compuestos nitrogenados menos tóxicos y que se liberan a la atmósfera como gases.

### OBJETIVO

Describir los procesos, bacterias y arqueobacterias reportados en la literatura científica como participan en el ciclo biológico del nitrógeno en ecosistemas de agua dulce.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica donde se incluyeron los artículos publicados desde el 2002 hasta 2012, disponibles en las bases de datos del sistema de bibliotecas de la Universidad de Antioquia (*ScienceDirect*, *ACS*, *SpringerLink* y *PubMed*), se utilizaron las palabras claves según la base de datos de descriptores científicos "DecS", entre ellas "nitrogen cycle", "bacteria", "archaea", "freshwater", "aquatics ecosystems" y "aquarium".

### RESULTADOS

De un total de 383 artículos, se seleccionaron 54 que cumplieron con los criterios de inclusión, a partir de los cuales se describió el ciclo del nitrógeno y los procesos que en él se dan como la nitrificación, la desnitrificación y el proceso anammox, así como también se describen las bacterias y arqueobacterias que participan en estos procesos, las enzimas involucradas en cada proceso y los factores físico-químicos que influyen en el ciclo biológico del nitrógeno, adicionalmente se describen brevemente algunos métodos que han demostrado optimizar la eliminación de compuestos nitrogenados en ecosistemas de agua dulce.

### CONCLUSIÓN

La diversidad de bacterias y arqueobacterias que participan en el ciclo del nitrógeno esta subestimada, debido a la dificultad de aislarlas en el laboratorio por los métodos tradicionales, además se concluye que se necesitan estudios que demuestren las diversas interacciones de los diferentes tipos de microorganismos que participan en el ciclo del nitrógeno en otros hábitats naturales.

### PALABRAS CLAVES

Ciclo del nitrógeno, Bacterias Oxidantes de Amonio (AOB), Arqueas Oxidantes de Amonios (AOA), Bacterias Oxidantes de Nitrito (NOB), bacterias anaerobias oxidantes de amonio (anammox), ecosistemas acuáticos, agua dulce.

\*Microbiología y Bionálisis, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. †Profesor Asociado, Grupo de Investigación en Salud y Sostenibilidad, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: [leonardorios@udea.edu.co](mailto:leonardorios@udea.edu.co) / Recepción: 02-03-2014. Aceptación: 05-26-2014.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

In aquatic ecosystems, water exchange is no longer considered a suitable option for management in aquaculture. As avoidance of this water exchange in generation of nitrogen-containing compounds has become an objective in the field, the best option to achieve it is the biological nitrogen cycle, where toxic nitrogen compounds accumulated in the metabolic waste of fish, uneaten food and organic matter, among others, are processed to less toxic nitrogen compounds and are released into the atmosphere as gases.

### OBJECTIVE

To describe processes, bacteria and archeobacteria reported in scientific literature as participants in the biological nitrogen cycle in freshwater ecosystems.

### MATERIALS AND METHODS

A systematic review of scientific literature that included articles published from 2002 to 2012, available in the databases of the library system of the University of Antioquia (ScienceDirect, ACS, SpringerLink and PubMed) was carried out; the keywords employed in accordance to scientific database descriptors (DecS) were "nitrogen cycle", "bacteria", "archaea", "freshwater", "aquatics ecosystems" y "aquarium".

### RESULTS

From a total of 383, 54 articles that complied with the inclusion criteria were selected. Such articles described the nitrogen cycle and the processes that occur in it as nitrification, denitrification and anammox process, as well as bacteria and archaea involved in these processes; the enzymes involved in each process and physicochemical factors affecting the biological nitrogen cycle were also described. In addition, some methods that have been proven effective in optimizing the removal of nitrogen compounds in freshwater ecosystems are briefly described.

### CONCLUSIONS

Diversity of bacteria and archaea that are involved in the nitrogen cycle is overlooked due to the difficulty to isolate them by traditional methods in the laboratory. In addition, it is concluded that studies which show the various interactions of different types of

microorganisms that are involved in nitrogen cycle in other natural habitats are required.

### KEY WORDS

Nitrogen cycle, Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB), Ammonium Oxidizing Archaea (AOA), Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB), ammonia oxidizing anaerobic bacteria (anammox), aquatic ecosystems, fresh water.

## INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un compuesto presente en la atmósfera y se encuentra en un intercambio constante, está relacionado con la fertilidad de los suelos, que influye directamente la producción de la vida vegetal en diferentes ambientes y cuyo desequilibrio afecta la red trófica y en el agua la acumulación de productos nitrogenados orgánicos puede causar diversos problemas, tales como la eutrofización, el consumo de oxígeno en el ecosistema en el cual se encuentran, y adicionalmente formarse compuestos tóxicos y mutagénicos para los seres vivos expuestos, tales como ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ).<sup>1-4</sup> También se debe tener en cuenta que la contaminación de compuestos nitrogenados como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), amonios y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) (estos últimos aún en bajas concentraciones) en aguas superficiales es de gran preocupación, ya que puede tener efectos negativos sobre el abastecimiento de agua y sobre los ecosistemas de agua dulce y costeros.<sup>3,5,6</sup>

Dentro de los sistemas acuáticos el intercambio de agua ya no se considera una opción adecuada para la gestión en la acuicultura. Sin embargo, el interés principal de la acuicultura de alta densidad sin recambio de agua es la generación de compuestos que contienen nitrógeno, dentro de ellos el amoníaco, los nitritos (son sales o ésteres del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) y dentro de ellos también el ion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )) y nitratos (sales o ésteres del ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )), que se presentan como consecuencia del exceso de alimentos y residuos fecales, los cuales pueden afectar negativamente la productividad de la acuicultura y el medio ambiente.<sup>7</sup>

Los compuestos tóxicos del nitrógeno bioacumulados en los sistemas acuáticos, deben ser eliminados por procesos biológicos que no afecten a los peces que lo habitan,<sup>3,5</sup> por tal razón se da una eliminación de estos compuestos por medio del ciclo del nitrógeno que tiene gran relevancia en la interacción de compuestos nitro-

genados, los cuales permiten un intercambio e interacción en los distintos ambientes naturales y artificiales, a través de bacterias específicas que actúan en determinados puntos del ciclo del nitrógeno, convirtiendo compuestos tóxicos del nitrógeno en compuestos que implican menor toxicidad y/o gases volátiles que se eliminan fácilmente del sistema acuático.<sup>4,8</sup>

Es de esta forma como el ciclo del nitrógeno describe la transformación de gases de nitrógeno y otros compuestos nitrogenados en el medio ambiente, esto consiste principalmente en procesos dirigidos por microorganismos que incluyen la nitrificación (oxidación aeróbica de amonio y oxidación de nitrito), desnitrificación y oxidación anaeróbica de amonios (anammox) y la fijación, pero dentro del ciclo del nitrógeno la unión de la nitrificación con la desnitrificación son el mayor mecanismo de remoción de nitrógeno y es el más estudiado hasta hoy,<sup>3,9-11</sup> donde un proceso de nitrificación incompleta puede provocar graves riesgos ecológicos (por ejemplo, la eutrofización y la formación de espuma) y los problemas relacionados con la salud (por ejemplo, la muerte de los peces, la liberación de nitritos y/o nitratos en el agua potable y metahemoglobine-mia),<sup>12</sup> sin embargo, la vía anammox es atractiva para la eliminación completa de nitrógeno en los sistemas de acuicultura, ya que es económicamente ventajoso, porque requiere por lo menos 50% de oxígeno en comparación con el proceso convencional de nitrificación-desnitrificación, además, en esta vía no se necesita ningún donador de electrones orgánico adicional, porque es un ciclo autótrofo, donde la eliminación de nitrógeno se da por la oxidación del amonio con la hidracina ( $N_2H_4$ ) como intermediario, por medio de la enzima hidracina oxidoreductasa.<sup>13</sup> El proceso de fijación del nitrógeno es un proceso también importante dentro del ciclo del nitrógeno, ya que se transforma por medio de cianobacterias y otros microorganismos el nitrógeno inorgánico ( $N_2$ ) en fuente de nitrógeno como el amoniaco ( $NH_4^+$ ),<sup>9</sup> pero no es de interés en nuestro estudio, ya que la importancia de este estudio es la remoción de los compuestos nitrogenados dentro de los ecosistemas de agua dulce y no la fijación en estos.

Recuentos directos de bacterias en muestras ambientales, tales como agua dulce, agua de mar y sedimentos, a menudo exceden los recuentos viables en varios órdenes de magnitud, esto puede ser debido a la presencia de bacterias no cultivables o de difícil crecimiento en cultivos convencionales, lo cual puede

significar una subestimación del número de bacterias que participan en el ciclo del nitrógeno,<sup>7,14</sup> pero con el avance de las técnicas moleculares recientemente se ha demostrado que las bacterias que intervienen en el ciclo del nitrógeno están predispuestas genéticamente para utilizar el nitrógeno en sus procesos vitales (al emplear el nitrógeno o sus compuestos en funciones metabólicas), siendo estos genes empleados como marcadores funcionales, por ejemplo, las bacterias desnitrificantes son anaerobios facultativos, que pueden reemplazar el oxígeno por los óxidos de nitrógeno como receptores terminales de electrones en condiciones anóxicas gracias a que pueden sintetizar enzimas que le dan esta característica metabólica.<sup>15,16</sup>

Con la aplicabilidad del análisis del gen 16S rRNA se ha demostrado su utilidad para la taxonomía y filogenia bacteriana y procariota, además las amplias bases de datos actualmente disponibles para las secuencias de gen 16S rRNA han facilitado análisis detallados de las relaciones filogenéticas entre las bacterias no identificadas previamente. Uno de los enfoques más ampliamente adoptado para el examen de la diversidad bacteriana se basa en la detección de bibliotecas de clones del gen 16S rRNA, típicamente obtenido de bacterias, por técnicas moleculares, por ejemplo, mediante la amplificación de dicho gen por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual emplea cebadores que son específicos para el gen 16S rRNA.<sup>7,15</sup>

Los estudios moleculares indican que las  $\beta$ -proteobacterias nitrificantes son más importantes que las  $\gamma$ -proteobacterias nitrificantes en diversos entornos donde se lleva a cabo el ciclo del nitrógeno. Sin embargo, la presencia notablemente baja de  $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias nitrificantes o con sus capacidades metabólicas limitadas (es decir, la dependencia de oxígeno) ayudó a identificar nuevos grupos de nitrificantes, un hallazgo importante es la descripción de numerosas arqueas en el océano, estuarios y ecosistemas del suelo que son capaces de llevar a cabo la nitrificación y pueden ser las nitrificantes predominantes en muchos ecosistemas. Otro descubrimiento importante es un grupo de microorganismos que utilizan la vía de la oxidación anaerobia del amonio (anammox). Estos microorganismos hacen la oxidación del  $NH_4^+$  y la reducción del  $NO_2^-$  y se encuentran ampliamente distribuidos en los ambientes acuáticos anóxicos.<sup>15,17,18</sup>

Gracias a los análisis genéticos se ha logrado describir las bacterias y arqueobacterias que participan en el

ciclo del nitrógeno, adicionalmente, los estudios sobre la ecología microbiana han puesto de relieve los nuevos procesos y actores en el ciclo del nitrógeno. Razón por la cual se hace necesario comprender y caracterizar los organismos convertidores del nitrógeno, con el fin de conocer su estructura, diversidad y función<sup>19</sup> y debido a todo esto el objetivo principal de nuestra revisión es el de describir los procesos, bacterias y arqueobacterias reportados en la literatura como participantes en el ciclo biológico del nitrógeno en ecosistemas de agua dulce.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Se diseñó un estudio donde se relacionan las bacterias y arqueobacterias que intervienen en los diversos procesos del ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos aplicables al agua dulce, por medio de los diferentes estudios realizados en remoción biológica del nitrógeno y de compuestos nitrogenados, y a partir de estos estudios responder a la pregunta ¿Cuáles son los procesos, las bacterias y las arqueobacterias reportados en la literatura como participantes en el ciclo biológico del nitrógeno para la remoción de compuestos nitrogenados en ecosistemas de agua dulce?

Durante el estudio, se incluyeron los artículos publicados desde el 2002 hasta diciembre de 2012, disponibles en las bases de datos del sistema de bibliotecas de la Universidad de Antioquia (ScienceDirect, ACS y PubMed), se utilizaron las palabras claves según la herramienta DecS, que permitió encontrar el vocabulario adecuado para la búsqueda de literatura en las bases de datos. Los términos seleccionados como criterio de búsqueda fueron: “*Nitrogen cycle*”, “*bacteria*”, “*archaea*”, “*freshwater*”, “*aquatics ecosystems*” y “*aquarium*”, adicionalmente se incluyeron siete artículos de la base de datos Springerlink, los cuales eran importantes para la revisión. Fue necesario utilizar búsquedas combinadas con estas palabras (“*Nitrogen cycle*” AND (*bacteria* OR *archaea*) AND “*aquatics ecosystems*” AND “*freshwater*”), ya que con una sola guía se perdía gran cantidad de estudios necesarios para la revisión.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, se incluyeron artículos de investigación originales, en idioma inglés, que documenten bacterias y/o arqueas que participen en el ciclo del nitrógeno o remoción de compuestos nitrogenados en acuarios de agua dulce o eco-

sistemas naturales de agua dulce, así como también los artículos que describieron el ciclo del nitrógeno. Los artículos excluidos fueron aquellos artículos que no tuvieron relación con el ciclo del nitrógeno en fuentes de agua dulce o que no se relacionaban con los sistemas acuáticos convencionales en los que se lleva a cabo la crianza de peces ornamentales provenientes de ríos.

Para realizar esta revisión, los artículos de interés inicialmente fueron seleccionados por título y contenido del abstract y del cuerpo del artículo, teniendo en cuenta los criterios de inclusión establecidos. Con la búsqueda bibliográfica inicial se logró obtener un total de 383 artículos y por medio de la herramienta EndNote web se eliminaron los artículos duplicados.

Eliminando los artículos duplicados y revisiones no filtradas se obtuvo un total de 383 artículos (más siete de Springerlink que cumplieron los criterios de inclusión), luego se excluyeron aquellos que cumplían los criterios de exclusión, quedando 54 artículos (Tabla 1 y Figura 1).

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DEL NITRÓGENO

El ciclo del nitrógeno, que incluye varios grupos de microorganismos, es el proceso fundamental y el más importante en el ciclo natural,<sup>15,20,21</sup> donde la eliminación biológica del nitrógeno es de gran significación ecológica y económica.<sup>11,18</sup> El objetivo principal del ciclo es la eliminación del amoniaco, que en aguas se puede lograr por una variedad de procesos físico-químicos y biológicos, donde los procesos biológicos son preferidos porque son generalmente más rentables,<sup>22,23</sup> pero la literatura también menciona con frecuencia el efecto inhibitorio del nitrito frente a las bacterias y la vida acuática, donde el nitrito en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos.<sup>8</sup> Esto significa que en la acuicultura las comunidades de Bacterias Oxidantes de Amonio (AOB) o Arqueas Oxidantes de Amonio (AOA) convierten amonio, excretado por los peces, mediante procesos aeróbicos en nitrito, y el nitrito que también es un compuesto tóxico, debe ser eliminado o transformado en otro compuesto menos nocivo, es ahí donde participan las Bacterias Oxidadoras de Nitrito (NOB).<sup>6</sup> El ciclo del nitrógeno por esta vía nitrificación-desnitrificación hasta aquí resulta ser un proceso básicamente aeróbico,<sup>24</sup> pero el proceso no ter-

Tabla 1. Artículos analizados en el estudio.

Autor	Año	Revista	País	Título
A. Baily.	2011	Agriculture, Ecosystems & Environment.	Irlanda	Spatial and temporal variations in groundwater nitrate at an intensive dairy farm in south-east Ireland: Insights from stable isotope data.
Albert Koenig, et. al.	2005	Chemosphere.	China	Microbial community and biochemistry process in autotrophic denitrifying biofilm.
Álvaro Alonso	2009	Ecotoxicology and Environmental Safety.	España	Effects of pulse duration and post-exposure period on the nitrite toxicity to a freshwater amphipod.
Andreas C. Bryhn	2007	Ecological Modelling.	Suecia	Can nitrogen gas be deficient for nitrogen fixation in lakes?
Atreyee Sims, et. al.	2012	Water research.	EE.UU	Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands.
Bram Vanparys, et. al.	2007	Systematic and Applied Microbiology.	Bélgica	The phylogeny of the genus <i>Nitrobacter</i> based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis.
Christopher G. Peterson, et. al.	2011	FEMS Microbiol Ecol.	U.S.A.	Development of associations between microalgae and denitrifying bacteria in streams of contrasting anthropogenic influence.
Daniel N. Miller, et. al.	2009	Journal of Contaminant Hydrology.	U.S.A.	Microbial characterization of nitrification in a shallow, nitrogen contaminated aquifer, Cape Cod, Massachusetts and detection of a novel cluster associated with nitrifying Betaproteobacteria.
Daniele Nizzoli, et. al.	2010	Water Research.	Italia	Effect of organic enrichment and thermal regime on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in hypolimnetic sediments of two lowland lakes.
David D. Kuhn, et. al.	2010	Aquacultural Engineering.	U.S.A.	Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems.
David W. Graham	2010	Environmental Pollution.	U.S.A.	Correlations between <i>in situ</i> denitrification activity and <i>nir</i> -gene abundances in pristine and impacted prairie streams.
Dong Cheol Seo, et. al.	2010	Water research.	U.S.A.	Fungal and bacterial mediated denitrification in wetlands: Influence of sediment redox condition.
Féray C, et. al.	2003	Chemosphere.	Francia	Chemical and microbial hypotheses explaining the effect of wastewater treatment plant discharges on the nitrifying communities in freshwater sediment.
G. González-Blanco, et. al.	2012	Bioresource Technology.	México	Simultaneous oxidation of ammonium and p-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge.
Guibing Zhu, et. al.	2011	Environmental Science & Technology.	China	Anammox Bacterial Abundance, Biodiversity and Activity in a Constructed Wetland.
Guilherme DN. Maia, et. al.	2012	Water research.	U.S.A.	Moisture effects on greenhouse gases generation in nitrifying gas-phase compost biofilters.
Guoyuan Chen, et. al.	2010	Water Air Soil Pollut.	China	Adverse Effects of Ammonia on Nitrification Process: the Case of Chinese Shallow Freshwater Lakes.
Hans W. Paerl, et. al.	2011	Water Research.	China	Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient.
Haruo Sugita, et. al.	2005	Aquaculture.	Japón	Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish.
Ingrid A. van de Leemput, et. al.	2011	Environmental Microbiology.	Alemania	Predicting microbial nitrogen pathways from basic principles.

Continuación.

## Continuación de la Tabla 1. Artículos analizados en el estudio.

Autor	Año	Revista	País	Título
John J. Kelly, <i>et. al.</i>	2005	Water research.	U.S.A.	DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples.
Joke Geets, <i>et. al.</i>	2007	Applied Microbiology and Biotechnology.	Bélgica	Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge.
Kasige Anusha.	2008	Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.	Japón	Indirect mechanisms accelerated due to ultraviolet-B irradiation on nutrient cycling in a freshwater ecosystem.
Kozet Yapsakli, <i>et. al.</i>	2011	Journal of Environmental Management.	Turquía	Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant.
Liang Zhu, <i>et. al.</i>	2012	Environ Sci Pollut Res.	China	Characteristics of an aerobic denitrifier that utilizes ammonium and nitrate simultaneously under the oligotrophic niche.
Lieven Wittebolle, <i>et. al.</i>	2009	Water research.	Bélgica	The inoculum effect on the ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors.
Luciana Reyna, <i>et. al.</i>	2010	Environmental Pollution.	Argentina	Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquyá River basin along a nitrate gradient.
M. Robert Hamersley, <i>et. al.</i>	2009	Syst Appl Microbiol.	Alemania	Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany).
Maartje A.H.J. van Kessel, <i>et. al.</i>	2010	Aquaculture.	Holanda	Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems.
María Teresa Gutiérrez-Wing, <i>et. al.</i>	2011	Aquacultural Engineering.	U.S.A.	Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification.
Matthew D. Hirsch, <i>et. al.</i>	2011	Microbial Ecology.	U.S.A.	Anammox Bacterial Diversity in Various Aquatic Ecosystems E51 Based on the Detection of Hydrazine Oxidase Genes ( <i>hzoA/hzoB</i> ).
Michael VW. Kofoed	2012	Systematic and Applied Microbiology.	Dinamarca	Higher nitrate-reducer diversity in macrophyte-colonized compared to unvegetated freshwater sediment.
Ok-Sun Kim, <i>et. al.</i>	2011	Aquat Ecol.	Alemania	Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment–water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea (en aguas de lagos y marinas).
Puntipar Sonthiphand, <i>et. al.</i>	2011	Applied Microbiology and Biotechnology.	Tailandia	Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge.
Rima Biswas, <i>et. al.</i>	2011	Bioresource Technology.	India	Stability and microbial community structure of a partial nitrifying fixed-film bioreactor in long run.
Roey Angel, <i>et. al.</i>	2010	Microbial Ecology.	Alemania	Nitrogen Transformations and Diversity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Desert Ephemeral Stream Receiving Untreated Wastewater.
Ruoyu D. Chen, <i>et. al.</i>	2008	Process Biochemistry.	EE.UU	Enrichment of dense nitrifying bacterial communities in membrane-coupled bioreactors.
S. Boulêtreau, <i>et. al.</i>	2012	Science of The Total Environment.	Francia	Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms.
Sari Luostarinen, <i>et. al.</i>	2006	Water research.	Finlandia	Nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactors at low temperatures.
Shanyun Wang, <i>et. al.</i>	2011	Applied Microbiology and Biotechnology.	China	Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China.

Continuación.

Continuación de la Tabla 1. Artículos analizados en el estudio.

Autor	Año	Revista	País	Título
Shiro Itoi, <i>et. al.</i>	2007	Aquaculture.	Japón	Nitrite-oxidizing bacteria, <i>Nitrospira</i> , distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish <i>Carassius auratus</i> .
Simon P. Gregory, <i>et. al.</i>	2012	Aquacultural Engineering.	Reino Unido	Nitrogen removal and changes to microbial communities in model flood/drain and submerged biofilters treating aquaculture wastewater.
Sören Warneke, <i>et. al.</i>	2011	Water Research.	Nueva Zelanda	A comparison of different approaches for measuring denitrification rates in a nitrate removing bioreactor.
Tara A. Moore, <i>et. al.</i>	2011	Environmental Science & Technology.	Canadá	Prevalence of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Contaminated Groundwater.
Thomas F. Ducey, <i>et. al.</i>	2010	Bioresource Technology.	EE.UU	Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature.
Tong Zhang, <i>et. al.</i>	2011	Applied Microbiology and Biotechnology.	China	Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors.
Wang YF, <i>et. al.</i>	2012	Appl Microbiol Biotechnol.	China	Higher diversity of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in constructed freshwater wetland than natural coastal marine wetland.
Xiao-Ran Li, <i>et. al.</i>	2009	Systematic and Applied Microbiology.	China	The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community.
Xinghui Xia, <i>et. al.</i>	2009	Environmental Science & Technology.	China	Effect of Suspended-Sediment Concentration on Nitrification in River Water: Importance of Suspended Sediment-Water Interface.
M.-K.H. Winkler, <i>et. al.</i>	2012	Water Research.	Holanda	Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures.
Yan Jiao, <i>et. al.</i>	2011	Bioresource Technology.	China	Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying bacteria for <i>in situ</i> remediation of nitrogen-rich stream water.
YongTao Lv, <i>et. al.</i>	2010	Chemosphere.	China	Autotrophic nitrogen removal discovered in suspended nitrification system.
Yu Wang, <i>et. al.</i>	2012	Journal of Environmental Sciences.	China	Spatial distribution of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in the littoral buffer zone of a nitrogen-rich lake.
Zhenghui Liu, <i>et. al.</i>	2011	Microbiological Research.	China	Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in the Dongjiang River, China.

mina ahí, ya que este nitrato también es transformado en nitrógeno inorgánico, el cual se elimina del sistema acuático hacia la atmósfera<sup>25,26</sup> y es acá donde comienza la desnitrificación, que anaeróbicamente reduce el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y óxido nítrico (NO) a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y luego a gas dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ), este es el principal proceso biológico a través del cual se devuelve nitrógeno fijo de agua dulce, ambientes marinos y los ecosistemas del suelo a la atmósfera.<sup>25</sup>

Alternativamente, estos nitritos y amonios son utilizados por las bacterias anammox en zonas anóxicas para formar  $\text{N}_2$  y cumplir con la eliminación de nitrito y de amonio del sistema sin necesidad de la

desnitrificación.<sup>13</sup> Actualmente, anammox se aplica en aguas residuales que contienen altas concentraciones de amonio a temperaturas en las que estos microorganismos tienen un óptimo crecimiento.<sup>27</sup>

Recientemente, la presencia y diversidad de ambos oxidantes de amonio (anammox y AOB) fueron investigadas en ambientes anóxicos o el oxígeno limitado. Estos estudios mostraron que la cooperación entre anammox y AOB puede ser importante para la eliminación eficiente de nitrógeno en diferentes tipos de sistemas de reactores (Figura 2), ya que estos procesos combinados pueden llevar al éxito mejorado en la eliminación biológica del nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales.<sup>18</sup>

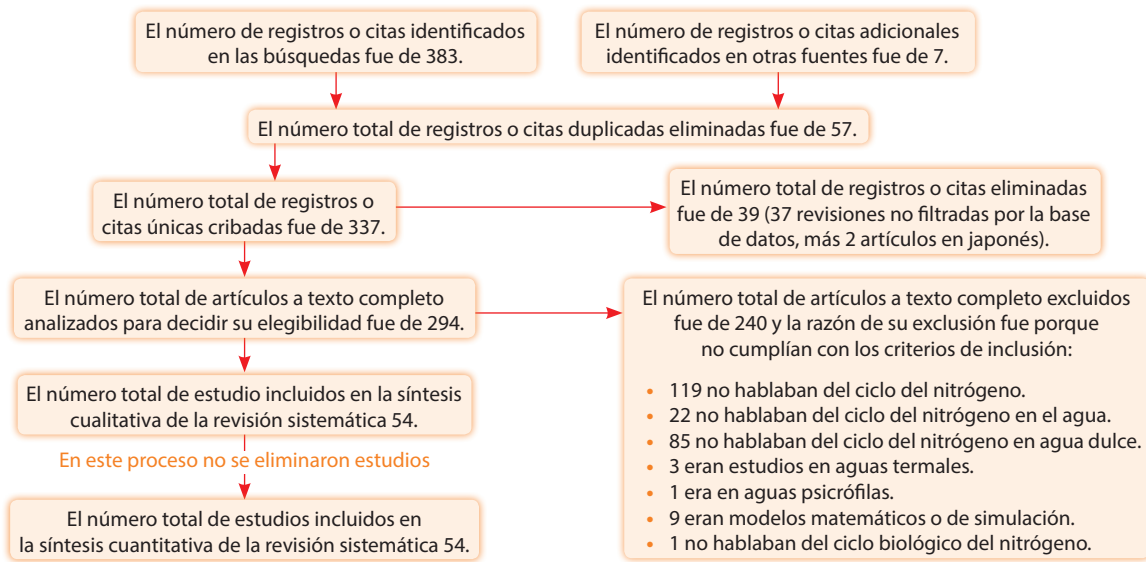


Figura 1. Información a través de las diferentes fases de esta revisión sistemática.

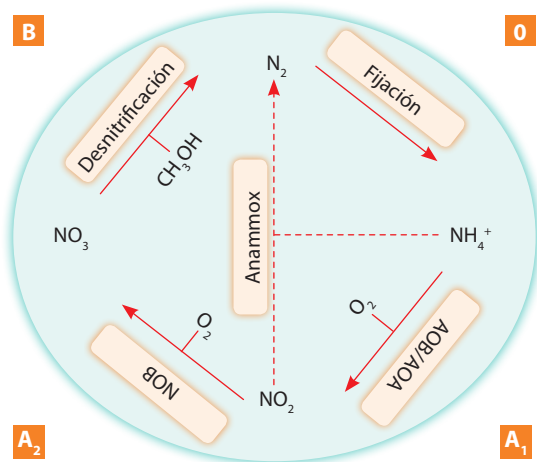


Figura 2. Ciclo del nitrógeno: en esta figura se describen los diversos procesos dentro del ciclo del nitrógeno; nitrificación-desnitrificación y anammox, donde A<sub>1</sub> (oxidación aeróbica del amoníaco por bacterias o arqueas) y A<sub>2</sub> (oxidación aeróbica del nitrito) representan el proceso de nitrificación, mientras que B representa la desnitrificación, 0 representa la fijación del nitrógeno que no es importante para el objetivo del estudio, además se presenta el proceso de oxidación anaeróbica del amoníaco por la vía anammox (Adaptado de G. González-Blanco, *et al.*<sup>8</sup>).

### PROCESO DE NITRIFICACIÓN

La eliminación biológica del nitrógeno se logra generalmente, con la nitrificación autotrófica y los sistemas de desnitrificación heterotrófica.<sup>19</sup> Donde la nitrificación aeróbica se lleva a cabo de manera conjunta por

las bacterias que oxidan el amoníaco y las que oxidan el nitrito. La nitrificación es un proceso fundamental del ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos, cuyo modelo canónico es un proceso de dos pasos,<sup>28,29</sup> en el que los amonios se convierten en nitrito y después a nitrato (Tabla 2), teniendo entonces que la reacción de nitrificación es una oxidación en dos etapas, cada etapa se realiza por un grupo distinto de bacterias,<sup>12,19</sup> la primera reacción es la oxidación del amoníaco, que es el proceso de oxidación microbiana de amoníaco a nitrato vía nitrito (Tabla 2), este primer paso es el limitante de la velocidad en la nitrificación, desempeñando un papel crítico en el ciclo del nitrógeno.<sup>21,30-32</sup> Este paso es llevado a cabo por las AOB que oxidan el amoníaco a hidroxilamina y luego a nitrito.<sup>33</sup>

Hasta hace poco, se atribuía la oxidación del amoníaco exclusivamente a las bacterias que codifican la subunidad  $\alpha$  de la enzima amoníaco monooxigenasa (amoA), en concreto los miembros de  $\beta$ -proteobacteria y  $\gamma$ -proteobacteria,<sup>34</sup> pero recientemente (año 2004) se sugirió que las AOA podrían desempeñar un importante papel en el ciclo global del nitrógeno, pero no era reconocida previamente. Desde entonces, las AOA se identificaron en entornos diferentes, tales como columnas de aguas con oxígeno limitado (aguas subóxicas), sedimentos de estuarios, aguas termales, el océano, los ecosistemas del suelo, las plantas de tratamiento de aguas y humedales.<sup>19,21</sup> Los diferentes tipos



**Tabla 2.** Reacciones y enzimas que se dan en los diversos procesos de ciclo del nitrógeno.

Proceso	Reacción	Enzima que cataliza la reacción
Oxidación aeróbica del amoníaco.	$\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$	Amoníaco monooxigenasa (AMO)
Oxidación anaeróbica del amoníaco.	$\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow \text{N}_2 + \text{NO}_3 + \text{H}_2\text{O}$	Hidrazina oxidoreductasa (HZO) + Nitrito oxidoreductasa + NO
Oxidación aeróbica del nitrito.	$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$	Nitrito oxidoreductasa (NOR)
Desnitrificación.	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	Nitrato reductasa (Nar)
	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	Nitrito reductasa (Nir)
	$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	Reductasa de óxido nítrico (Nor)
	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	Reductasa de óxido nitroso (Nos)

de estudios moleculares recientes han demostrado la prevalencia de AOA en los sistemas naturales, incluyendo suelos y diversos ambientes acuáticos, aunque el alcance de su actividad e importancia ecológica aún no se ha establecido,<sup>21,29</sup> en la actualidad se considera que los organismos oxidantes de amoníaco incluyendo AOA y AOB son esenciales en los procesos de nitrificación que oxidan amoníaco a nitrito y nitrato, durante el ciclo de eliminación del nitrógeno. AOB son a menudo considerados como los principales contribuyentes a la oxidación de amoníaco en el suelo, aunque frecuentemente se aíslan más copias de genes de AOA que de AOB en diferentes ambientes.<sup>35</sup>

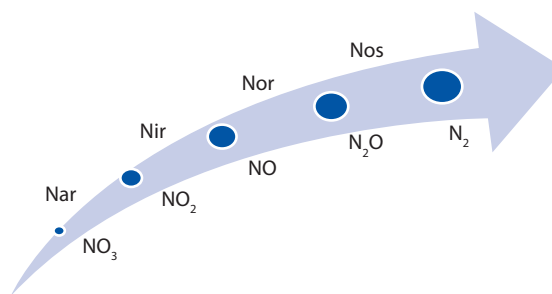
En la segunda etapa del proceso de nitrificación las NOB completan el proceso de oxidación del nitrito para convertirlo en nitrato.<sup>7,19,33</sup>

La nitrificación y especialmente la oxidación del amoníaco es un proceso sensible a la inhibición, debido a que el número de microorganismos diferentes que realizan esta función disminuye, ya que estas especies tienen bajos rendimientos de crecimiento y son sensibles a los cambios en los parámetros ambientales tales como la temperatura o el pH<sup>12</sup> y las poblaciones de bacterias que participan en la nitrificación relativamente son poco conocidas.<sup>33</sup> Por consiguiente, en los últimos decenios se han realizado muchos estudios de nitrificación en sistemas acuáticos. La nitrificación se considera un proceso de superficie basada en sistemas de agua y aguas residuales. Estudios previos indican que las bacterias nitrificantes tienden a crecer unidos a la superficie de las partículas de sedimentos. Esto es especialmente cierto en las corrientes superficiales. Cada vez hay más evidencias en diversos estudios que

demuestran el importante papel de la nitrificación en el sedimento de los ríos y de los lagos.<sup>2</sup>

#### PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN

El nitrato producido por la nitrificación está disponible para ser utilizado por una variedad de microorganismos y por lo tanto, este proceso tiene un impacto en la eliminación de nitrógeno de los sistemas de agua.<sup>2</sup> Los productos de la reducción de nitratos son  $\text{NO}_2^-$ , NO,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  (Figura 3); y cuando a través de ellos se produce  $\text{N}_2$ , el proceso se llama desnitrificación (Tabla 2).<sup>25,26</sup> Para la realización de este proceso se piensa que una  $\alpha$ -proteobacteria es la clave,<sup>17</sup> ya que esta complementa la nitrificación. La desnitrificación se lleva a cabo por bacterias anaerobias facultativas quimioheterótrofas empleando la desnitrificación heterotrófica o la desnitrificación autotrófica para reducir el



**Figura 3.** Proceso de desnitrificación: en la figura se muestra como se da la conversión de los diferentes compuestos nitrogenados dentro de la desnitrificación y las enzimas que catalizan cada reacción, en la cual se da la conversión de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  por medio de la enzima Nar, de  $\text{NO}_2^-$  por medio de la enzima Nir a NO, por medio de la enzima Nor a  $\text{N}_2\text{O}$  y finalmente de  $\text{N}_2\text{O}$  pasa a  $\text{N}_2$  catalizado por la enzima Nos.<sup>16,36,39,41</sup>

nitrito y formar  $N_2$  en condiciones anaerobias.<sup>13,19</sup> En este proceso, las condiciones anóxicas llevan al consumo de nitratos como un aceptor de electrones para la respiración anaerobia.<sup>36</sup> Ecológicamente, la desnitrificación es importante, ya que transforma una forma de nitrógeno biológicamente disponible (nitrato) en  $N_2$ , que puede liberarse a la atmósfera.<sup>36-38</sup>

La desnitrificación es el mecanismo más importante en la eliminación del nitrógeno, por medio de este proceso se fija el nitrógeno en la biosfera y regresa a la atmósfera, especialmente en los suelos de los humedales. El  $N_2$  es el principal producto de la desnitrificación y aparece el  $N_2O$  como producto intermedio, algunos de estos productos intermedios se liberan a la atmósfera. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la producción de óxido nitroso es motivo de preocupación, ya que es un importante gas de efecto invernadero que contribuye al cambio climático global.<sup>39-41</sup>

#### PROCESO ANAMMOX

Durante décadas, la oxidación de amonio en el ciclo global del nitrógeno se atribuyó exclusivamente a bacterias aerobias nitrificantes. El descubrimiento de las bacterias anammox y AOA han cambiado esta visión,<sup>15</sup> ya que a partir de 1995, el descubrimiento de la oxidación anaeróbica de amonio revolucionó el ciclo del nitrógeno mediante la demostración de que el amonio se oxida también en condiciones anóxicas. Las bacterias anammox se han identificado en muchos ambientes anóxicos de origen natural como los sedimentos marinos, de agua dulce y de estuarios, las zonas de mínimo oxígeno, los suelos, los humedales y los lagos de aguas dulces anóxicas tropicales. Además de una distribución generalizada, la actividad de las bacterias anammox en el medio ambiente, también pueden ser sustanciales, haciendo a las bacterias anammox potencialmente más importantes para la pérdida de nitrógeno que la desnitrificación y también parecen desempeñar un papel importante en el ciclo del nitrógeno de diferentes ecosistemas naturales, tales como los ambientes marinos, los sedimentos, las cuencas anóxicas en el Mar Negro, el hielo marino en el Ártico, los sedimentos de manglares subtropicales, los sistemas de aguas dulces tropicales y plantas de tratamiento de aguas residuales de altas actividades.<sup>15,18,19,27,28,42</sup>

La reacción anammox implica la oxidación acoplada de amoniaco y la reducción del nitrito para producir  $N_2$  (Tabla 2). Desde su descubrimiento inicial

en entornos de ingeniería, las bacterias anammox han sido implicadas en pérdidas sustanciales de nitrógeno fijo de una gran variedad de ambientes acuáticos y terrestres a través del acoplamiento microbiano de la oxidación del  $NH_4^+$  y la reducción de  $NO_2^-$ , en presencia de NO como activador, además este tipo de microorganismos es ampliamente utilizado para la remoción de amonios del agua contaminada con éstos, y así mismo, la eliminación de nitrógeno.<sup>10,18,28,43</sup>

La bioquímica y las vías metabólicas de anammox muestran que el amonio puede ser directamente oxidado con el nitrito como aceptor de electrones a  $N_2$  con producción de  $N_2O$ . Este proceso combinado utiliza grandes cantidades de oxígeno proveniente de donantes de electrones y potencialmente emite gases de efecto invernadero como el óxido nítrico y óxido nitroso.<sup>10,15,18</sup> Este proceso compite con la desnitrificación para la producción de  $N_2$ . Los organismos anammox pueden vivir en baja cantidad, pero son capaces de tener un crecimiento y metabolismo significativo cuando hay un cambio en los parámetros ambientales que les permita crecer.<sup>42</sup>

La aplicación de anammox es atractivo para la eliminación completa de nitrógeno en los sistemas de acuicultura y ha sido encontrado como un importante proceso biogeoquímico en el ciclo del nitrógeno en varios ecosistemas, es económicamente ventajoso, porque requiere por lo menos 50% de oxígeno en comparación con el proceso convencional de nitrificación/desnitrificación. Además, en esta vía no se necesita ningún donador de electrones orgánico adicional, porque es un ciclo autótrofo, donde la eliminación del nitrógeno se da por la oxidación del amonio por medio de la enzima hidracina oxidasa como intermediario.<sup>13,19</sup>

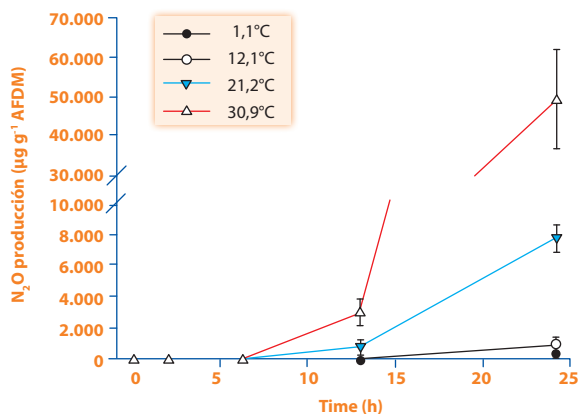
#### FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS EN EL CICLO DEL NITRÓGENO

Se ha documentado que la nitrificación por las AOB es dependiente de varios factores ambientales, siendo los más críticos la concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura,<sup>11</sup> en particular los AOB son drásticamente afectados por los cambios de temperatura, y los estudios de los distintos sistemas de gestión de residuos que emplean nitrificación han registrado un fallo durante el período invernal, donde las temperaturas son más bajas y se ha sugerido que el proceso óptimo se da a temperaturas entre los 15°C y los 35°C, ya que a temperaturas de 12°C se afecta la nitrificación en un 50% y hasta un 100% si la temperatura disminuye a 5°C,

afectándose debido a esto la formación de nitrito y nitrato,<sup>22</sup> del mismo modo la temperatura también afecta la desnitrificación, donde esta es afectada casi que totalmente desde los 12,1°C y a medida que la temperatura aumenta mejora la desnitrificación (Figura 4).<sup>26</sup>

Los cambios en las condiciones ambientales (concentración de sustrato, pH y concentración de oxígeno disuelto, en particular este último) pueden dar lugar a modificaciones de la estructura de las comunidades nitrificantes, estos cambios pueden referirse a las bacterias nitrificantes autóctonas del sedimento. Tales cambios de diversidad ya han sido observados en biopelículas de nitrito oxidantes después de descargas de aguas residuales de plantas de tratamiento. Algunas poblaciones dentro de las comunidades de amonio y nitrito oxidantes pueden exhibir diferentes actividades específicas y estos pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales.<sup>27,44</sup>

Se ha demostrado que la diversidad de las AOB puede disminuir con el aumento de la salinidad o la presencia de iones que provocan una inhibición enzimática.<sup>45</sup> Sin embargo, otros estudios muestran mayor diversidad en las profundidades del mar abierto que en sedimentos, humedales y estuarios, así como también otros estudios no encontraron diferencias entre estos ecosistemas que están influenciados por distintos niveles de salinidad, (por ejemplo la bacteria más sensible a la salinidad es *Nitrosospira tenuis*, que puede



**Figura 4.** En la figura se muestra la influencia de la temperatura en el proceso de desnitrificación durante un periodo de 24 horas (Tomado de S. Boulêtreau, et. al.), donde se compara la producción de óxido nítrico en el tiempo a diferentes temperaturas, en ella vemos como a mayor temperatura aumenta la concentración de óxido nítrico si comparamos ésta a determinados tiempos y temperaturas.<sup>26</sup>

tolerar hasta 3,5 g/L por lo tanto, los nutrientes podrían ser los principales contribuyentes de la relación con los linajes típicos de  $\beta$ -proteobacterias AOB, así como también, la cantidad y naturaleza de la fuente próxima de carbono disuelto pueden influir en que filotipos bacterianos son más activos.<sup>45,46</sup>

Otro factor importante en la diversidad y presencia de bacterias es el  $\text{NH}_3$ , que provoca la inhibición de la respiración de las AOB, donde *Nitrobacter* es afectado a concentraciones por debajo de 1 mg/L, mientras que *Nitrospira* tiene un umbral de inhibición inferior a las especies de *Nitrobacter*, al ser inhibidas a concentraciones inferiores de entre 0,04 y 0,08 mg/L.<sup>47</sup>

En cuanto a la distribución de las comunidades bacterianas desnitrificantes, estas responden a una variedad de factores ambientales, incluyendo oxígeno, nitratos, COD, nitrógeno inorgánico y los gradientes de salinidad y presencia o ausencia de ciertos iones, así como las concentraciones de nitrito y sulfuro. Los factores que influyen en la distribución de las comunidades desnitrificantes en lagos estratificados son menos conocidos.<sup>36,45</sup>

En general, las bacterias que participan en el ciclo del nitrógeno pueden estar o no presentes en ciertos ecosistemas dependiendo de las condiciones fisicoquímicas como salinidad, e igualmente para el pH, temperatura y oxígeno, puesto que se ha encontrado que estos afectan la selección de diferentes grupos de bacterias. Pero aún sin variar la diversidad bacteriana se puede disminuir la capacidad de desnitrificación real en un ecosistema acuático, esto se puede deber por ejemplo al agotamiento del oxígeno, causando así un desacople entre la nitrificación y la desnitrificación, esto es debido a que en la nitrificación se necesita de  $\text{O}_2$ , por lo tanto la disminución de este afectaría la eliminación eficiente de amonio y causaría un aumento en el reciclaje y la retención del nitrógeno mineral.<sup>27,48</sup> Así mismo, la acumulación de amonio también lleva a una tasa de nitrificación insuficiente.<sup>29</sup>

#### PROCESOS ENZIMÁTICOS INVOLUCRADOS EN EL CICLO DEL NITRÓGENO

Las Bacterias Oxidantes de Amoniaco (AOB) poseen la subunidad alfa de la enzima amoniaco monooxigenasa (AMO), que es la enzima activa de las bacterias nitrificantes y es exclusivamente de los miembros de las  $\beta$ -proteobacterias y de las  $\gamma$ -proteobacterias.<sup>30</sup> Tanto AOA como AOB tienen el mismo gen funcional *amoA* que codifica la subunidad alfa de la enzima

amoniaco monooxigenasa la cual cataliza el primer paso en la oxidación del amoniaco. La enzima es codificada por los genes *amoA*, *B*, y *C* en AOB y AOA.<sup>35</sup> Como dato adicional, respecto a esta enzima hay suficiente evidencia para sugerir que oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  pueden oxidar  $\text{CH}_4$  debido a la afinidad de este último con el sitio activo de esta enzima.<sup>41</sup>

La Oxidación de Hidrazina (HZO) es una vía exclusiva de las bacterias anammox, por tal razón ha sido propuesta como marcador genético de estas bacterias, además, la detección de estos genes *hzpA/hzpB* es ubicua en aislamientos de bacterias anammox, sin embargo los protocolos de PCR para la detección de estos genes no han sido evaluados en diferentes ambientes naturales.<sup>43</sup>

Estudios recientes han utilizado los genes nitrito reductasa como marcadores moleculares y han contribuido significativamente a la identificación de la diversidad de bacterias desnitrificantes en una variedad de hábitats y ecosistemas. El proceso de desnitrificación es catalizado por cuatro enzimas que operan secuencialmente (Figura 3): nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), reductasa de óxido nítrico (Nor), y la reductasa de óxido nitroso (Nos). Los microorganismos que poseen estas enzimas, son en gran parte conocidos como bacterias desnitrificantes, estas se encuentran dentro de una amplia gama de grupos taxonómicamente distintos de bacterias y arqueas.<sup>16,36,39,41</sup>

La enzima nitrito reductasa (Nir), que cataliza la reducción de  $\text{NO}_2^-$  al gas  $\text{NO}$ , se considera la enzima clave de la desnitrificación. Se han reportado dos nitrito reductasas evolutivamente distintas: la que contiene cobre NirK codificada por el gen *nirK* y la que contiene citocromo *cd1* NirS codificada por el gen *nirS*. Estas dos enzimas nunca se han encontrado que coexistan en el mismo organismo desnitrificante. Además, el contexto genómico de los dos genes *nir* es diferente: mientras que *nirS* es parte de un grupo de genes, *nirK* generalmente se encuentra aislado en el genoma. Diversos análisis de clones sugieren que las comunidades *nirK* de hábitats diferentes muestran una diferenciación más clara que las comunidades *nirS*, que parecen ser más afectadas por el hábitat en el mismo análisis. Esto puede indicar que las diferencias en las propiedades de las enzimas podrían desempeñar un papel importante en la determinación de los patrones de distribución de las bacterias desnitrificantes.<sup>11,36,37,39</sup> Adicionalmente, se ha indicado que la

síntesis y función de las enzimas de desnitrificación es secuencial y regulada por el  $\text{O}_2$ .<sup>41,47</sup>

El nitrato se reduce a nitrito por tres enzimas reductoras de nitrato diferentes, las enzimas nitrato reductasas asimilatorias citoplásmicas (Nas), las nitrato reductasas respiratorias unidas a la membrana (Nar) y las nitrato reductasas desasimilatorias periplásmicas (Nap). La nitrato reductasa unida a la membrana se asocia con la desnitrificación y la respiración anaeróbica de nitrato. La enzima Nar se compone de tres subunidades, dos citoplásmicas NarGH y la subunidad unida a la membrana NarI. La subunidad NarG codificada por el gen *narG*, contiene el sitio catalítico en el que la reducción de nitrato se lleva a cabo. El uso del gen *narG* es de especial interés, ya que la filogenia de este gen funcional se ha propuesto para reflejar la filogenia 16S rRNA de los organismos de los que las secuencias de genes se han recuperado, esto es debido a que se muestra alta relación y grupos coherentes en el árbol filogenético de los microorganismos aislados que presentan este gen.<sup>5,47</sup>

#### DIVERSIDAD DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN EL CICLO DEL NITRÓGENO

Las bacterias nitrificantes son típicamente sólo una pequeña fracción del total de la comunidad bacteriana y su actividad y las tasas de crecimiento son bastante lentas. Estas bacterias han demostrado ser particularmente difíciles de estudiar por técnicas de cultivo convencionales, por tal razón su cultivo es laborioso, debido además a sus largos tiempos de generación y las bajas tasas de crecimiento que pueden dar lugar a subestimaciones de sus números o concentraciones reales, por tal razón las técnicas moleculares son cada vez más utilizadas para detectar los grupos específicos de microorganismos no cultivables.<sup>14,33</sup> Está demostrado que los cultivos de bacterias que participan en el ciclo del nitrógeno en el agua de mar, agua de ríos, estuarios, agua de lagos mesófilos, sedimentos y filtros en plantas de tratamiento, son tan bajos que se sugiere que la mayoría de las comunidades asociadas al ciclo del nitrógeno todavía no se han investigado, debido a que parecen ser incultivables.<sup>49</sup>

Recientes investigaciones sobre la ecología microbiana han puesto de manifiesto los nuevos procesos y actores en el ciclo del nitrógeno. Es necesario comprender y caracterizar los organismos convertidores del nitrógeno, con el fin de conocer su estructura, su diver-

sidad y su función,<sup>19</sup> un ejemplo de esto es el descubrimiento de las bacterias implicadas en el proceso anammox alrededor de los años 90. A partir de esta fecha, el orden de *Brocadiales*, afiliados a *Planctomycetales*, han sido encontrados en diferentes ambientes y, con el posterior descubrimiento de anammox y AOA se volcó drásticamente la percepción de los microorganismos involucrados en la eliminación del nitrógeno,<sup>19</sup> debido a que entran estos nuevos microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno, bien sea por la vía clásica nitrificación-desnitrificación o por la vía anammox.

Las bacterias anammox más frecuentemente reportadas en los estudios que se incluyeron en esta revisión fueron, entre otras "*Candidatus Brocadia fulgida*", "*Candidatus Brocadia anammoxidans*", "*Candidatus Scalindua wagneri*", "*Candidatus Scalindua brodae*", "*Candidatus Scalindua sorokinii*", "*Candidatus Jettenia asiática*", "*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*", *Verrucomicrobia bacterium*, *Planctomyces maris* y "*Candidatus Kaenenia stuttgartensis*".<sup>13,15,18,19,38,42,43</sup>

Recientemente, la recuperación de secuencias de genes *amoA* de arqueas en varios ecosistemas acuáticos, tales como aguas marinas, sedimentos de estuarios, corales, esponjas, biorreactores de aguas residuales, ecosistemas terrestres, aguas termales, lagos del Ártico y plantas de producción de agua potable, indican la ubicuidad, distribución e importancia de las arqueas oxidantes de amoníaco en el ciclo del nitrógeno. Las especulaciones sobre si algunas arqueas que llevan el gen *amoA* son capaces de oxidar el amoníaco en la actualidad abundan. Hasta la fecha, los potenciales de oxidación de amoníaco por archaeas han sido confirmados por estudios genómicos, cultivos de las AOA y la actividad de transcripción del gen *amoA* arqueal. Existen datos que proporcionan evidencia de la presencia y predominio de AOA en el río Dongjiang y se sugirió que estas especies de agua dulce, pueden ser más adaptables que AOB en ambientes de agua dulce. Sin embargo, la función ecológica de las AOA en agua dulce no se entiende bien y sigue siendo un tema abierto a ser explorado por futuros estudios.<sup>30</sup>

La AOB consiste en tres géneros, *Nitrosococcus* asociado a ambientes marinos ( $\gamma$ -proteobacteria), *Nitrospira* asociada a ambientes terrestres ( $\beta$ -proteobacteria) y *Nitrosomonas* ( $\beta$ -proteobacteria), este último se divide en cinco linajes: *N. communis*, *N. cryotolerans*, *N. europaea/eutropha*, *N. marina*, y *N. oligotropha*, de los cuales el linaje *N. europaea/eutropha* es el más comúnmente

aislado de lodos activados y otros ambientes.<sup>22</sup> Aunque también hay grupos de AOB marina que se agrupan en las  $\gamma$ -proteobacteria o con el dominio Archaea. Del mismo modo, la NOB más conocida es *Nitrobacter* spp., pero las investigaciones recientes han demostrado que *Nitrospira* spp. también es importante en numerosos ambientes.<sup>33</sup>

Dentro de las AOA las más reportadas dentro de los estudios incluidos fueron (Tabla 3) "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*", "*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*", "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*", "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*",<sup>15,19-21,30,31,34</sup> entre otros clones que presentan el gen *amoA* que codifica la enzima amonio monooxigenasa, pero aún no se identifican dentro de un género o especie, debido a que no se han podido conocer sus actividades metabólicas.

La reacción de oxidación de nitrito a nitrato se lleva a cabo por las NOB, que pertenecen a cuatro géneros no relacionados filogenéticamente entre ellos: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*<sup>47</sup> y hasta la fecha se ha descrito que *Nitrobacter* y *Nitrococcus* están afiliados a las  $\alpha$  y  $\gamma$ -proteobacterias, respectivamente; *Nitrospina* está dentro de las  $\Delta$ -proteobacterias, mientras que *Nitrospira* pertenece al *phylum Nitrospirae*.<sup>7</sup> Estudios moleculares recientes han informado que los microorganismos del *Phylum Nitrospira* fueron los principales NOB y desempeñan un papel más activo que *Nitrobacter*; es evidente que las especies de *Nitrospira* pueden tener más funciones que solamente la oxidación del nitrito. Pero para entender la diferencia entre el número de genes bacterianos y sus funciones conocidas se necesitan más investigaciones con herramientas moleculares.<sup>19</sup> Los organismos metanótrofos también pueden jugar un papel importante en la nitrificación, por ejemplo, en la formación de  $N_2O$ . Aunque los metanógenos no están directamente involucrados en el proceso de desnitrificación, a excepción de algunas arqueas desnitrificantes.<sup>41</sup>

Las NOB que más se encontraron en los diferentes estudios revisados fueron *Nitrospira moscoviensis*, *Nitrospira gracilis*, *Nitrospira marina*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis* y *Nitrobacter* sp.<sup>7,11,33,49</sup>

Por otra parte, algunos investigadores encontraron que las AOA es el grupo más abundante de los oxidantes del amoníaco en el suelo y varios ecosistemas oceánicos, sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en la investigación de las diversidades metanogénicas y nitrificantes, pero en ninguno

**Tabla 3.** Bacterias reportadas en los diferentes estudios.

Microorganismo	Proceso en el que participa
<i>"Candidatus Brocadia fulgida".</i>	Anammox
<i>"Candidatus Brocadia anammoxidans".</i>	
<i>"Candidatus Scalindua wagneri".</i>	
<i>"Candidatus Scalindua brodae".</i>	
<i>"Candidatus Scalindua sorokinii".</i>	
<i>"Candidatus Jettenia asiática".</i>	
<i>"Candidatus Anammoxoglobus propionicus".</i>	
<i>Verrucomicrobia bacterium.</i>	
<i>Planctomyces maris.</i>	
<i>"Candidatus Kuenenia stuttgartensia".</i>	
<i>Nitrospira moscoviensis.</i>	NOB
<i>Nitrospira gracilis.</i>	
<i>Nitrospira marina.</i>	
<i>Nitrobacter winogradskyi.</i>	
<i>Nitrobacter hamburgensis.</i>	
<i>"Candidatus Nitrososphaera gargensis".</i>	AOA
<i>"Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii".</i>	
<i>"Candidatus Nitrosopumilus maritimus".</i>	
<i>Nitrosomonas aestuarii.</i>	AOB
<i>Nitrosomonas ureae.</i>	
<i>Nitrosomonas marina.</i>	
<i>Nitrosomonas eutropha.</i>	
<i>Nitrosomonas europea.</i>	
<i>Nitrosomonas communis.</i>	
<i>Nitrosomonas oligotropha.</i>	
<i>Nitrosomonas mobilis.</i>	
<i>Nitrosomonas nitrosa.</i>	
<i>Nitrosomonas halophila.</i>	
<i>Nitrosomonas cryotolerans.</i>	
<i>Nitrospira briensis.</i>	
<i>Nitrospira tenuis.</i>	
<i>Nitrospira multiformis.</i>	
<i>Nitrosovibrio tenuis.</i>	
<i>Nitrosococcus spp.</i>	

de estos estudios intentaron controlar la conversión de nitrógeno por microorganismos, incluyendo la presencia simultánea de AOB, NOB, AOA y anammox.<sup>19</sup>

## DISCUSIÓN

Fueron revisados completamente 54 artículos que cumplieron los criterios de inclusión y a partir de estos se cumplió el objetivo de esta revisión que fue responder la pregunta por medio del cumplimiento del objetivo de describir los procesos, mencionar las bacterias y arqueobacterias reportados en la literatura como participantes en el ciclo del nitrógeno en ecosistemas de agua dulce.

El ciclo del nitrógeno juega un papel muy importante en muchos ambientes, ya que el nitrógeno es un elemento necesario para la vida, pero además también es un productor de múltiples problemas cuando se encuentra en exceso en ciertos ambientes, ya sean naturales o artificiales, y el efecto que se produce beneficia o perjudica dependiendo de la forma y del tipo de compuesto nitrogenado y del ambiente en que se encuentra, por ejemplo la forma de amonio  $NH_4^+$  es perjudicial en la acuicultura, pero benéfica en los procesos de agricultura, ya que en esta forma el nitrógeno está disponible para ser absorbido por las plantas. Por tanto, dependiendo del ambiente en el que se realicen actividades antropológicas, se estudiará la pérdida o ganancia de compuestos nitrogenados y la influencia del ciclo del nitrógeno.<sup>37,50</sup>

Las composiciones y la abundancia relativa de las AOA y AOB varían ampliamente en muchos ambientes, pero el consenso es que las AOA pueden ser actores importantes en el ciclo del nitrógeno en condiciones ambientales desfavorables, sin embargo, la contribución a la nitrificación de AOA contra AOB sigue siendo incierta. Las conclusiones que se han elaborado en los ecosistemas terrestres y acuáticos,<sup>34</sup> describen factores como la temperatura, pH, salinidad y relaciones de C/N que pueden afectar también a la relación de AOA/AOB en los suelos de los diferentes humedales. Por ejemplo, la abundancia y diversidad del gen *amoA* arqueal incrementa con el pH del suelo, lo que indica que este incremento favorece la proliferación de las AOA.<sup>35</sup>

Sin embargo, para ilustrar la diferencia entre la oxidación del amoníaco por bacterias y por arqueas, tomaremos como referencia el estudio de Yu Wang *et*

al., donde se demuestran lo contrario,<sup>34</sup> ya que en sus resultados la tasa de nitrificación potencial (PNR) se correlaciona significativamente con la abundancia de AOB, y la abundancia de AOB se correlaciona con  $\text{NH}_4^+$ . Por otra parte, no se observó correlación significativa entre la abundancia de AOA y factores ambientales. Además, existe una correlación significativamente negativa entre el índice de la cantidad de AOA y las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  indicando que la alta concentración de  $\text{NH}_4^+$  puede deprimir la biodiversidad de AOA en el ambiente en estudio, pero al combinar todos los resultados se puede concluir que las AOA se adaptan más a la baja de nutrientes, oxígeno, condiciones de pH y el medio ambiente, y debido a la mayor abundancia de AOA en muestras profundas, se indica que las AOA pueden ser más importantes que las AOB en algunos ambientes con oxígeno disponible limitado, que implicó además por el análisis de la estimación de células específicas, donde, la distribución de AOA y AOB puede verse afectada por múltiples factores, incluyendo pH, oxígeno disponible, sustrato o nitrógeno.<sup>34</sup>

Probablemente, se pensaría que la diversidad y concentración de bacterias nitrificantes influyen en el ciclo del nitrógeno, al ser la nitrificación el paso limitante de este ciclo, pues bien los estudios realizados en cuanto a este tema sugieren que la biodiversidad de las comunidades nitrificantes es un motor importante de la funcionalidad de la nitrificación. La riqueza de especies (número de especies diferentes) y la equitatividad de las especies (abundancia relativa entre especies) son dos facetas de la biodiversidad. Se ha observado una relación positiva entre la riqueza de especies y el funcionamiento de los ecosistemas. Aunque la investigación de la relación entre la equitatividad de las especies y la productividad es escasa, se ha indicado que la disminución de la uniformidad tiene un efecto indirecto en la reducción de la productividad y la estabilidad del ecosistema. Se ha sugerido que una mayor diversidad, podría hacer que procesos como la nitrificación sean más estables.<sup>12</sup>

Otra diversidad que se debe tener en cuenta es la de las AOB/AOA y anammox, ya que es posible que en un sistema se den simultáneamente ambos procesos (anammox y nitrificación), debido a que efectivamente, se han encontrado simultáneamente bacterias anammox y bacterias nitrificantes en ambientes naturales. Esto es por la condición limitada del oxígeno en los sedimentos de aguas profundas, por tanto las rela-

ciones entre los oxidantes aeróbicos del amoníaco, incluyendo AOA y AOB y los oxidantes anaeróbicos del amonio (anammox) deben ser muy interesantes para los estudios futuros, ya que las bacterias anammox podrían tener una mayor contribución en el ciclo nitrógeno. El tratamiento anaeróbico tiene sin embargo, capacidad limitada para eliminar el nitrógeno, y una combinación de procesos aeróbicos y anaeróbicos es necesaria para lograr la eliminación total del nitrógeno,<sup>1</sup> de tal forma que un pretratamiento anaeróbico puede ser beneficioso para la eliminación biológica de nitrógeno, debido a la eliminación eficaz de la materia orgánica y la disolución de esta en partículas y se puede mejorar la nitrificación debido a la competencia de los microorganismos que utilizan menos carbono entre los nitrificantes heterótrofos y autótrofos.<sup>1</sup>

Las concentraciones de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  son de gran relevancia para el ciclo del nitrógeno, ya que el proceso de nitrificación en los sistemas acuáticos hipereutrofícos, donde el amoníaco está en concentraciones excesivas provocará el desacoplamiento de las dos etapas de nitrificación, ya que por la inhibición selectiva de la oxidación del nitrito se llega a la acumulación de éste, agravando aún más la eutrofización en forma de retroalimentación positiva.<sup>47</sup> El  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  también influyen en los patrones de distribución de especies AOB en el medio ambiente, esto se debe a las constantes de afinidad para el amoníaco entre las distintas especies, por ejemplo, los miembros de *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas communis* y el grupo *Nitrospira* son las AOB más comunes que se encuentran en ecosistemas con bajas concentraciones de amonio, mientras que los miembros del grupo *Nitrosomonas europaea* son los que se encuentran en ecosistemas con altas concentraciones de amonio.<sup>31</sup>

En busca del mejoramiento del ciclo del nitrógeno se han explorado diferentes formas de mejorar el proceso de nitrificación, entre ellas el bioaumentación que es la introducción de organismos indígenas, autóctonas, o genéticamente modificados en una comunidad microbiana de sitios contaminados de desechos peligrosos o biorreactores con el fin de acelerar la eliminación y la biodegradación de los contaminantes no deseados.<sup>51</sup>

Otro ejemplo son los sistemas de recirculación de agua que son ampliamente utilizados en sistemas de cría de peces que van desde los acuarios caseros hasta los sistemas de acuicultura comercial. Estos sistemas proporcionan un uso óptimo del espacio, la reducción

de las necesidades de agua en comparación con el sistema de agua estancada, la capacidad para altas densidades de siembra y un entorno previsible y estable para las especies en cultivo debido a las condiciones aeróbicas necesarias para la oxidación de amoníaco a nitrito por las AOB.<sup>7</sup>

Otra forma de mejorar el rendimiento del ciclo del nitrógeno es la reportada por Simon P. Gregory *et al.*, quienes basados en varios estudios de laboratorio, demostraron el funcionamiento de humedales de agua dulce usando alternativamente la inundación de las células bacterianas con aguas residuales y luego drenarlas, lo que mejora la eliminación de nitrógeno en comparación con los humedales convencionales de flujo superficial. Cuando realizaron su estudio encontraron que los períodos de drenaje relativamente largos (3 h en comparación con 1 h) en los biofiltros de agua dulce mejoró la eliminación de amoníaco sin nitrito significativo o la acumulación de nitratos. Con un solo paso del agua a través de estos biofiltros, los biofiltros de inundación/drenaje no ofrecen ventajas sobre los biofiltros sumergidos convencionales, pero la aplicación de pases repetidos demostraron la ventaja de los primeros para la eliminación de amoníaco y nitrógeno orgánico y la ventaja de los segundos para el tratamiento de nitratos/nitritos independientemente de la duración del periodo de drenaje. Entonces, basándose en estos hallazgos, se concluye que un sistema de biofiltro combinado (inundación/drenaje seguido por células sumergidas) puede ser la configuración más adecuada para la eliminación de nitrógeno eficiente y al mismo tiempo mantiene bajas concentraciones de nitrito en el tratamiento de aguas residuales, salinas y en acuicultura.<sup>4</sup> Otro proceso que se está empleando cada vez más en corrientes de efluentes y sistemas de drenaje para mejorar la eliminación de compuestos nitrogenados en los sistemas acuáticos son las camas de desnitrificación, que son recipientes grandes llenos de desechos de madera y su función es actuar como una fuente de carbono para apoyar la desnitrificación heterotrófica.<sup>52</sup>

Anusha K. y Asaeda T., mostraron otra metodología atractiva para remover el nitrógeno de los ecosistemas de agua dulce, esta consistía en acelerar el ciclo del nitrógeno en la superficie del agua, sometiendo ésta a irradiación con luz ultravioleta-B (UV-B), lo cual acelera los procesos fotosintéticos de los orga-

nismos autótrofos. Para el estudio se empleó una alta irradiación, una media y un control sin irradiación, los resultados mostraron una reducción significativa en el total de nitrato de 95,9% en la alta radiación UV-B y la diferencia con el control fue casi de 50%, adicionalmente, se consumió oxígeno y carbón en el ambiente de estudio con altas radiaciones como evidencia de nitrificación y desnitrificación por el metabolismo de las bacterias, aunque se observó un aumento significativo de amoníaco disuelto que fue atribuido a la foto-oxidación y la descomposición bacteriana de nitrógeno orgánico en el sistema.<sup>53</sup>

Finalmente, un hallazgo importante dentro de este estudio es que existe una variedad de medios acuáticos donde no se ha estudiado suficientemente el ciclo del nitrógeno, por ejemplo las aguas subterráneas (probablemente por la dificultad para acceder a ellas), en las cuales es importante estudiar el ciclo del nitrógeno debido a que durante la nitrificación, los microorganismos convierten  $\text{NH}_4^+$  en presencia de oxígeno a  $\text{NO}_3^-$  y en esta conversión podría aumentar el impacto y la magnitud de la contaminación de nitrógeno debido a la mayor movilidad de  $\text{NO}_3^-$  en comparación con  $\text{NH}_4^+$ .<sup>17,54</sup> Otro ejemplo de ambientes donde hace falta estudiar el ciclo del nitrógeno y los microorganismos que en él participan, sería la actividad y la diversidad de nitrificantes del ciclo en corrientes del desierto que sufren descargas de aguas residuales domésticas y no han sido estudiados antes,<sup>29</sup> ya que en estas aguas las condiciones de temperatura, salinidad y otros factores seguramente tienen influencia en el ciclo del nitrógeno de dichos ecosistemas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Luostarinen S, Luste S, Valentín L, Rintala J.** Nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactors at low temperatures. *Water Res.* 2006; 40(8): 1607-15.
2. **Xia X, Yang Z, Zhang X.** Effect of Suspended-Sediment Concentration on Nitrification in River Water: Importance of Suspended Sediment-Water Interface. *Environ Sci Technol* 2009; 43(10): 3681-7.
3. **Kuhn DD, Drahos DD, Marsh L, Flick Jr GJ.** Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquac Eng* 2010; 43(2): 78-82.



4. **Gregory SP, Dyson PJ, Fletcher D, Gatland P, Shields RJ.** Nitrogen removal and changes to microbial communities in model flood/drain and submerged biofilters treating aquaculture wastewater. *Aquac Eng* 2012; 50(0): 37-45.
5. **Reyna L, Wunderlin DA, Genti-Raimondi S.** Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquia River basin along a nitrate gradient. *Environ Pollut* 2010; 158(5): 1608-14.
6. **Alonso Á, Camargo JA.** Effects of pulse duration and post-exposure period on the nitrite toxicity to a freshwater amphipod. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(7): 2005-8.
7. **Itoi S, Ebihara N, Washio S, Sugita H.** Nitrite-oxidizing bacteria, *Nitrospira*, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture* 2007; 264(1-4): 297-308.
8. **González-Blanco G, Beristain-Cardoso R, Cuervo-López F, Cervantes FJ, Gómez J.** Simultaneous oxidation of ammonium and p-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge. *Bioresour Technol* 2012; 103(1): 48-55.
9. **Bryhn AC, Blenckner T.** Can nitrogen gas be deficient for nitrogen fixation in lakes? *Ecol Modell* 2007; 202(3-4): 362-72.
10. **van de Leemput IA, Veraart AJ, Dakos V, de Klein JJ, Strous M, Scheffer M.** Predicting microbial nitrogen pathways from basic principles. *Environ Microbiol* 2011; 13(6): 1477-87.
11. **Joke Geets MdC, Lieven Wittebolle, Kim Heylen, Bram Vanparys, Paul De Vos, Willy Verstraete & Nico Boon.** Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75: 211-21.
12. **Wittebolle L, Verstraete W, Boon N.** The inoculum effect on the ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors. *Water Res* 2009; 43(17): 4149-58.
13. **van Kessel MAHJ, Harhangi HR, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Flik G, Jetten MSM, et al.** Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 2010; 306(1-4): 177-84.
14. **Kelly JJ, Siripong S, McCormack J, Janus LR, Urakawa H, El Fantroussi S, et al.** DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Res* 2005; 39(14): 3229-38.
15. **Zhu G, Wang S, Feng X, Fan G, Jetten MSM, Yin C.** Anammox Bacterial Abundance, Biodiversity and Activity in a Constructed Wetland. *Environ Sci Technol* 2011; 45(23): 9951-8.
16. **Wang YF, Gu JD.** Higher diversity of ammonia/ammonium-oxidizing prokaryotes in constructed freshwater wetland than natural coastal marine wetland. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(15): 7015-33.
17. **Miller DN, Smith RL.** Microbial characterization of nitrification in a shallow, nitrogen-contaminated aquifer, Cape Cod, Massachusetts and detection of a novel cluster associated with nitrifying Betaproteobacteria. *J Contam Hydrol* 2009; 103(3-4): 182-93.
18. **Li X-R, Du B, Fu H-X, Wang R-F, Shi J-H, Wang Y, et al.** The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community. *Syst Appl Microbiol* 2009; 32(4): 278-89.
19. **Yapsakli K, Aliyazicioglu C, Mertoglu B.** Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. *J Environ Manage* 2011; 92(3): 714-23.
20. **Tong Zhang LY, Amy Hin Yan Tong, Ming-Fei Shao, Si Lok.** Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 91(4): 1215-25.
21. **Wang S, Wang Y, Feng X, Zhai L, Zhu G.** Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90(2): 779-87.
22. **Ducey TF, Vanotti MB, Shriner AD, Szogi AA, Ellison AQ.** Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresour Technol* 2010; 101(2): 491-500.
23. **Zhu L, Ding W, Feng LJ, Dai X, Xu XY.** Characteristics of an aerobic denitrifier that utilizes ammonium and nitrate simultaneously under the oligotrophic niche. *Environ Sci Pollut Res Int* 2012; 19(8): 3185-91.
24. **Biswas R, Bagchi S, Bihariya P, Das A, Nandy T.** Stability and microbial community structure of a partial nitrifying fixed-film bioreactor in long run. *Bioresour Technol* 2011; 102(3): 2487-94.
25. **Koenig A, Zhang T, Liu L-H, Fang HHP.** Microbial community and biochemistry process in autotrophic denitrifying biofilm. *Chemosphere* 2005; 58(8): 1041-7.
26. **Bouletreau S, Salvo E, Lyautey E, Mastrorillo S, Garabetian F.** Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms. *Sci Total Environ* 2012; 416: 323-8.
27. **Winkler MK, Kleerebezem R, van Loosdrecht MC.** Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures. *Water Res* 2012; 46(1): 136-44.
28. **Lv Y, Wang L, Sun T, Wang X, Yang Y, Wang Z.** Autotrophic nitrogen removal discovered in suspended nitrification system. *Chemosphere* 2010; 79(2): 180-5.

29. **Angel R.** Nitrogen Transformations and Diversity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Desert Ephemeral Stream Receiving Untreated Wastewater. *Microb Ecol* 2010; 59(1): 46-58.
30. **Liu Z, Huang S, Sun G, Xu Z, Xu M.** Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in the Dongjiang River, China. *Microbiol Res* 2011; 166(5): 337-45.
31. **Puntipar Sonthiphand TL.** Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89: 843-53.
32. **Guoyuan CH, Xiuyun C, Chunlei S, Yiyong Z.** Adverse Effects of Ammonia on Nitrification Process: the Case of Chinese Shallow Freshwater Lakes. *Water Air Soil Pollut* 2010; 210: 297-306.
33. **Chen RD, LaPara TM.** Enrichment of dense nitrifying bacterial communities in membrane-coupled bioreactors. *Process Biochem* 2008; 43(1): 33-41.
34. **Wang Y, Zhu G, Ye L, Feng X, Op den Camp HJ, Yin C.** Spatial distribution of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in the littoral buffer zone of a nitrogen-rich lake. *J Environ Sci* 2012; 24(5): 790-9.
35. **Sims A, Horton J, Gajaraj S, McIntosh S, Miles RJ, Mueller R, et al.** Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water Res* 2012; 46(13): 4121-9.
36. **Kim OS.** Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment-water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea. *Aquat Ecol* 2011; 45: 99-112.
37. **Kofoed MVW, Stief P, Hauzmayer S, Schramm A, Herrmann M.** Higher nitrate-reducer diversity in macrophyte-colonized compared to unvegetated freshwater sediment. *Syst Appl Microbiol* 2012; 35(7): 465-72.
38. **Hammersley MR, Woebken D, Boehrer B, Schultze M, Lavik G, Kuypers MM.** Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany). *Syst Appl Microbiol* 2009; 32(8): 571-82.
39. **Graham DW, Trippett C, Dodds WK, O'Brien JM, Banner EB, Head IM, et al.** Correlations between *in situ* denitrification activity and nir-gene abundances in pristine and impacted prairie streams. *Environ Pollut* 2010; 158(10): 3225-9.
40. **Seo DC, DeLaune RD.** Fungal and bacterial mediated denitrification in wetlands: Influence of sediment redox condition. *Water Res* 2010; 44(8): 2441-50.
41. **Maia GDN, Day V GB, Gates RS, Taraba JL, Coyne MS.** Moisture effects on greenhouse gases generation in nitrifying gas-phase compost biofilters. *Water Res* 2012; 46(9): 3023-31.
42. **Mooret TA.** Prevalence of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Contaminated Groundwater. *Environ Sci Technol* 2011; 45(17): 7217-25.
43. **Hirsch M, Long Z, Song B.** Anammox Bacterial Diversity in Various Aquatic Ecosystems E1Based on the Detection of Hydrazine Oxidase Genes (*hzoA/hzoB*). *Microb Ecol* 2011; 61: 264-76.
44. **Féray C, Montuelle B.** Chemical and microbial hypotheses explaining the effect of wastewater treatment plant discharges on the nitrifying communities in freshwater sediment. *France: Chemosphere* 2003; 50(7): 919-28.
45. **Gutierrez-Wing MT, Malone RF, Rusch KA.** Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification. *Aquac Eng* 2012; 51(0): 36-43.
46. **Peterson CG, Daley AD, Pechauer SM, Kalscheur KN, Sullivan MJ, Kufra SL, et al.** Development of associations between microalgae and denitrifying bacteria in streams of contrasting anthropogenic influence. *FEMS Microbiol Ecol* 2011; 77(3): 477-92.
47. **Vanparys B, Spieck E, Heylen K, Wittebolle L, Geets J, Boon N, et al.** The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* 2007; 30(4): 297-308.
48. **Nizzoli D, Carraro E, Nigro V, Viaroli P.** Effect of organic enrichment and thermal regime on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in hypolimnetic sediments of two lowland lakes. *Water Res* 2010; 44(9): 2715-24.
49. **Sugita H, Nakamura H, Shimada T.** Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* 2005; 243(1-4): 403-9.
50. **Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu G, Qin B, Li Y, et al.** Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Res* 2011; 45(5): 1973-83.
51. **Jiao Y, Zhao Q, Jin W, Hao X, You S.** Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying bacteria for *in situ* remediation of nitrogen-rich stream water. *Bioresour Technol* 2011; 102(2): 990-5.
52. **Warneke S, Schipper LA, Bruesewitz DA, Baisden WT.** A comparison of different approaches for measuring denitrification rates in a nitrate removing bioreactor. *Water Res* 2011; 45(14): 4141-51.
53. **Anusha K, Asaeda T.** Indirect mechanisms accelerated due to ultraviolet-B irradiation on nutrient cycling in a freshwater ecosystem. *J Photochem Photobiol B* 2008; 93(1): 1-8.
54. **Baily A, Rock L, Watson CJ, Fenton O.** Spatial and temporal variations in groundwater nitrate at an intensive dairy farm in south-east Ireland: Insights from stable isotope data. *Agric Ecosyst Environ* 2011; 144(1): 308-18.