

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Diversidad y flexibilidad metabólica de consorcios nitrificantes y desnitrificantes usados en el tratamiento de aguas residuales

Diversity and metabolic flexibility of nitrifying and denitrifying consortia used in wastewater treatment

José Juan Ramírez-Muñoz[✉], Omar Oltehua-López[✉], Flor de María Cuervo-López[✉], Anne-Claire Texier^{*✉}

Recibido: 15 de junio de 2023.

Aceptado: 22 de septiembre de 2023.

Publicado: diciembre de 2023.

RESUMEN

Antecedentes. Los procesos de la nitrificación y desnitrificación forman parte del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Los microorganismos que los llevan a cabo son empleados en los sistemas dedicados al tratamiento de aguas residuales para eliminar un contaminante muy común; el amonio (NH_4^+), y liberar nitrógeno molecular (N_2). **Objetivo.** Mostrar la diversidad y flexibilidad metabólica de consorcios nitrificantes y desnitrificantes usados en la eliminación de nitrógeno de aguas residuales. **Resultados.** En estos microorganismos taxonómicamente diversos, las bacterias son las mejor estudiadas. Se las divide y nombra según el proceso principal que realizan. Aunque en realidad gracias a los genes que comparten, pueden presentar una diversidad y flexibilidad metabólica, que las capacita para sobrevivir en condiciones cambiantes y con funciones distintas del proceso que canónicamente se les atribuye. Los genes característicos de estos procesos son empleados como marcadores moleculares en estudios de comunidades. Sin embargo, taxones conocidos canónicamente como nitrificantes pueden tener genes funcionales propios del proceso desnitrificante. Microorganismos catalogados como típicamente desnitrificantes pueden tener genes funcionales del proceso nitrificante. Los consorcios (flóculos, gránulos y biopelículas) empleados en la eliminación de NH_4^+ son un ejemplo de comunidades que pueden tener capacidades superiores o distintas de las que tienen sus integrantes individualmente. **Conclusiones.** La presente revisión conjunta información fisiológica, genética y ecológica que contribuye a entender mejor la gran diversidad y flexibilidad metabólica de los consorcios nitrificantes y desnitrificantes. Se destaca que, en los sistemas artificiales, un mayor conocimiento de los taxones participantes, así como de sus relaciones tróficas, metabólicas y de comunicación posibilitaría un mejor control de los procesos nitrificante y desnitrificante para que estos sean más eficientes y estables.

Palabras clave: Ciclo del nitrógeno, consorcio, diversidad y flexibilidad metabólica, proceso desnitrificante, proceso nitrificante.

ABSTRACT

Background. Nitrification and denitrification processes are part of the biogeochemical nitrogen cycle. The microorganisms that carry them out are used in wastewater treatment systems to remove a very common pollutant; ammonium (NH_4^+) and release molecular nitrogen (N_2). **Objective.** Show the diversity and metabolic flexibility of nitrifying and denitrifying consortia used in the elimination of nitrogen from wastewater. **Results.** Among these taxonomically diverse microorganisms, bacteria are the best studied. They are divided and named according to the main process they carry out. Although thanks to the genes they share, their diversity and metabolic flexibility can enable them to survive under changing conditions and through functions different from the process that is canonically attributed to them. The characteristic genes of these processes are used as molecular markers in community studies. However, taxa known canonically as nitrifying may have functional genes of the denitrifying process. Microorganisms classified as typically denitrifying may have functional genes of the nitrifying process. The consortia (flocules, granules and biofilms) used in the elimination of NH_4^+ are an example of communities that can have superior or different capacities than those of their individual

Laboratorio de Fisiología Microbiana, Departamento de Biotecnología, División CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1A Sección, Iztapalapa, Ciudad de México, 09310. México

***Corresponding author:**

Anne-Claire Texier: e-mail: actx@xanum.uam.mx

To quote as:

Ramírez-Muñoz, J. J., O. Oltehua-López, F. de M. Cuervo-López & Anne-Claire Texier. 2023. Diversidad y flexibilidad metabólica de consorcios nitrificantes y desnitrificantes usados en el tratamiento de aguas residuales. *Hidrobiológica* 33 (3): 339-351.

DOI:10.24275/KHRA1340

members. **Conclusions.** This review compiles physiological, genetical, and ecological information that contributes to a better understanding of the great diversity and metabolic flexibility of nitrifying and denitrifying consortia. It stands out that in artificial systems, a better knowledge of the participating taxa and their trophic, metabolic and communication relationships, would allow a better control of the nitrifying and denitrifying processes for making them more efficient and stable.

Keywords: Consortium, denitrifying process, diversity and metabolic flexibility, nitrifying process, nitrogen cycle.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera del planeta Tierra (78%) y uno de los principales elementos de la célula como integrante de ácidos nucleicos, aminoácidos. Sin embargo, este elemento no es fácilmente accesible para la mayoría de los organismos, debido a que el triple enlace del nitrógeno molecular (N_2) resulta en una molécula poco reactiva. Al nitrógeno elemental que se une a un átomo distinto y que forma compuestos orgánicos o iones como el amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), se le conoce como nitrógeno reactivo o biológicamente disponible (Elser, 2011; Boyle, 2017). En la naturaleza, la mayor parte del nitrógeno reactivo se origina mediante procariontes fijadores de nitrógeno atmosférico (diazótrofos) mientras que una pequeña parte es generada por rayos. Sin embargo, actualmente las fuentes antropogénicas de nitrógeno reactivo (combustión de hidrocarburos, desechos de crianza de animales, fertilizantes nitrogenados) exceden las contribuciones naturales, liberando gases de efecto invernadero (óxido nitroso: N_2O , óxido nítrico: NO , dióxido de nitrógeno: NO_2), deteriorando la calidad del agua, la salud y alterando el ciclo global del nitrógeno (Ren *et al.*, 2017; Beekman *et al.*, 2018; Scheer *et al.*, 2020).

En los cuerpos de agua, la presencia de compuestos nitrogenados puede llegar a ser tóxica, conducir a la eutrofización, hipoxia y pérdida del hábitat y de la biodiversidad (Ahmed *et al.*, 2017; Stevens, 2019). El principal contaminante nitrogenado en los cuerpos de agua es el NH_4^+ y sus compuestos asociados como son NO_3^- y nitrito (NO_2^-). Para eliminar estos y otros contaminantes, así como el carbono de la materia orgánica, se ha recurrido a procesos físicos, químicos o biológicos, siendo estos últimos los que se emplean preferentemente en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Karri *et al.*, 2018). La eliminación biológica de nitrógeno se basa en dos procesos microbiológicos que forman parte del ciclo del nitrógeno: la nitrificación y la desnitrificación. Son llevados a cabo por las bacterias y arqueas, así como por otros grupos microbianos, como algas y hongos desnitrificantes, siendo el grupo de las bacterias el mejor estudiado (Ferrera & Sánchez, 2016; Yin *et al.*, 2018). A pesar de la amplia diversidad taxonómica y capacidad metabólica de los microorganismos transformadores del nitrógeno (MTN), tradicionalmente se les ha agrupado, por ejemplo, como “nitrificantes” o “desnitrificantes” según el proceso respiratorio principal que realicen para obtener energía, sin tener en cuenta otros procesos metabólicos que puedan efectuar (Kuypers *et al.*, 2018). Para que la eliminación biológica de nitrógeno y otros contaminantes se lleve a cabo a pesar de las variaciones en la composición del influente y otras alteraciones medio ambientales, los microorganismos, de forma individual o en comunidades, deben ser resistentes y resilientes. Deben contar, por ejemplo, con vías metabólicas alternativas que les permitan seguir cumpliendo un proceso o sobrevivir, es decir, deben ser metabólicamente flexibles (Kuypers *et al.*, 2018). La comprensión de la estabilidad funcional de

los ecosistemas microbianos y su respuesta ante cambios son temas fundamentales en el estudio y el control de estos sistemas (Isobe & Ohte, 2014). Al conjunto de poblaciones microbianas con sus distintas especies interactuando para realizar una función o un proceso de nuestro interés y que a las poblaciones por separado se les dificulta o no son capaces de realizar, se le llama consorcio microbiano (Congestri *et al.*, 2020; Shahab *et al.*, 2020). Gracias al avance en la ciencia y en particular al desarrollo de la biología molecular y las ciencias ómicas, como la transcriptómica y genómica, es posible conocer qué tipo de microorganismos y en qué proporción están presentes en un sistema natural o artificial (Qin *et al.*, 2018), en otras palabras, conocer la estructura de las comunidades y asociar un cambio en las comunidades con el cambio en algún parámetro medio ambiental a través del tiempo (Ferrera & Sánchez, 2016; Dangi *et al.*, 2019). No está de más recordar la sinergia positiva que puede darse entre la ecología, fisiología microbiana y biología molecular, por un lado, para dar respuestas a interrogantes ecológicas, metabólicas, genéticas y evolutivas, y por otro lado, para la ingeniería de los sistemas diseñados y lograr que las comunidades de microorganismos realicen un proceso eficiente, seguro y estable (McMahon *et al.*, 2007; Sharma & Shukla, 2020; Biswas *et al.*, 2022).

El objetivo de este trabajo es mostrar evidencia de la diversidad y flexibilidad metabólica de las bacterias y consorcios involucrados en la eliminación de NH_4^+ y sus compuestos asociados de aguas residuales por los procesos de nitrificación y desnitrificación en ecosistemas artificiales. La información recopilada fue analizada principalmente a través de tres enfoques: ecología, fisiología microbiana y biología molecular, abordando aspectos de formación de comunidades, estabilidad de estas ante cambios del medio, diversidad metabólica y genética de los microorganismos relacionados con los procesos de la nitrificación y desnitrificación.

DISCUSIÓN

Procesos biológicos en el ciclo del nitrógeno. El ciclo del nitrógeno (Figura 1) se compone de los siguientes procesos biológicos: la fijación de N_2 , la amonificación, la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (por sus siglas en inglés DNRA: dissimilatory nitrate reduction to ammonium), la oxidación anaerobia de NH_4^+ (en inglés anammox: anaerobic ammonium oxidation), la oxidación completa del amoníaco (NH_3) (en inglés comammox: complete ammonia oxidation), la nitrificación y la desnitrificación. La formación de NH_3/NH_4^+ puede realizarse por la fijación o reducción biológica del N_2 , por la mineralización de la materia orgánica, por la DNRA o en menor proporción de manera abiótica a través de rayos (Stein & Klotz, 2016; Takai, 2019). La fijación biológica del nitrógeno ($N_2 \rightarrow NH_3$) es un proceso fundamental en el ciclo del nitrógeno porque genera nitrógeno bioaccesible a partir de una molécula muy poco reactiva. Para combinar N_2 con H_2 y obtener NH_3 se necesitan de 300-400 °C y una presión de ~300 atm, mientras que las bacterias y arqueas diazótroficas con sus nitrogenasas catalizan esta reacción a temperatura y presión ambiental (Lee *et al.*, 2014; Soumare *et al.*, 2020; Zehr & Capone, 2020). La amonificación es parte de la mineralización de la materia orgánica que comienza con la ruptura de proteínas a aminoácidos (aminación) y la posterior conversión de los grupos amino (NH_2) a NH_3 (Stein & Klotz, 2016). El proceso de DNRA sirve de vínculo entre la oxidación de compuestos nitrogenados y su reducción, y es un proceso reportado en diversos ambientes anaerobios como suelos, sedimentos de humedales marinos o de estuario y re-

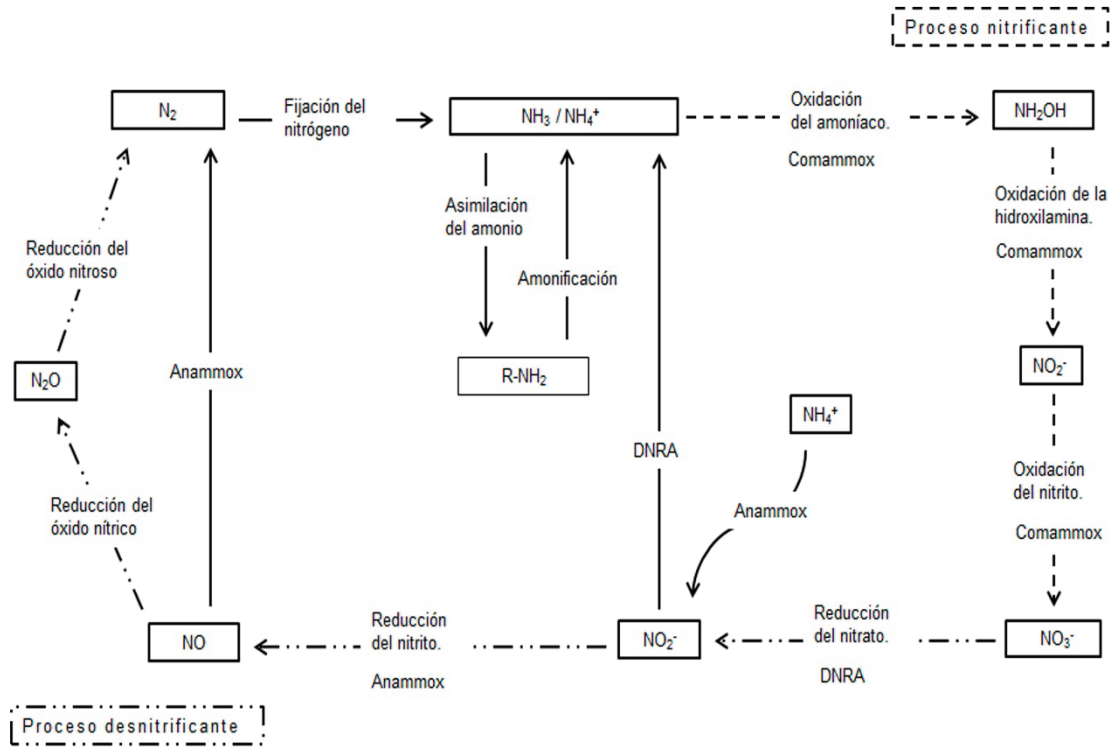


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. N_2 : nitrógeno molecular, NH_3 : amoníaco, NH_4^+ : amonio, $R-NH_2$: amina, NH_2OH : hidroxilamina, NO_3^- : nitrato, NO_2^- : nitrito, NO : óxido nítrico, N_2O : óxido nitroso. Comammox: oxidación completa del amoníaco. DNRA: Reducción desasimilatoria del nitrato a amonio. Anammox: oxidación anaerobia del amonio.

cientemente en la interfaz óxica-anóxica de zona ribereña, así como en sistemas artificiales (Wang *et al.*, 2020a, b). El proceso anammox utiliza el NH_4^+ como donador de electrones y al NO_2^- como aceptor final, con los intermediarios NO e hidrazina (N_2H_4) para formar N_2 (Kuenen, 2020; Weralupitiya *et al.*, 2021). En el proceso comammox, la nitrificación u oxidación del NH_3 hasta NO_3^- , es efectuada por un solo microorganismo (*Nitrospira* spp.), a diferencia del proceso nitrificante en el que participan dos grupos bacterianos distintos (Daims *et al.*, 2016; Mehrani *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022). La nitrificación (Figura 2) es un proceso respiratorio aerobio donde el NH_4^+ y el NO_2^- sirven como donadores de electrones y el oxígeno (O_2) se emplea como aceptor final de electrones, y canónicamente se le ha atribuido principalmente a dos grupos de bacterias quimiolitotótrofas filogenéticamente no relacionadas entre sí, donde la parte de la nitrificación ($NH_4^+ \rightarrow$ hidroxilamina (NH_2OH) $\rightarrow NO_2^-$) la llevan a cabo las bacterias amonio oxidantes (AOB) así como arqueas amonio oxidantes (AOA), y la parte de la nitratación ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$) las bacterias nitrito oxidantes (NOB) (Stein & Klotz, 2016; Takai, 2019). El proceso desnitrificante (Figura 2) por su parte comprende una serie de reducciones enzimáticas donde se emplean compuestos orgánicos o inorgánicos como donadores de electrones para reducir el NO_3^- o NO_2^- hasta N_2 : $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$, y ocurre generalmente cuando la concentración de O_2 disuelto es menor que 0.2 mg O_2/L (Zumft, 1997; Seitzinger *et al.*, 2006; Takai, 2019).

Bacterias nitrificantes. Taxonómicamente las bacterias nitrificantes AOB y NOB se agrupan en el phylum Proteobacteria (clases *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gamaproteobacteria*), en cuatro phyla de Deltaproteobacteria y en el caso del género *Nitrospira*, pertenece

al phylum Nitrospirae (Waite *et al.*, 2020). Varios de estos microorganismos especializados poseen una alta diversidad filogenética y metabólica (Garrity & Holt, 2015; Spieck & Bock, 2015). En plantas de tratamiento de aguas residuales, además de bacterias nitrificantes, se han encontrado AOA, la mayoría de la clase *Nitrososphaeria*, phylum Thaumarchaeota (Kerou *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021) o Thermoproteota (Rinke *et al.*, 2021). Las condiciones ambientales (temperatura, concentración de O_2 disuelto) y características de las aguas residuales (por ejemplo, concentración de NH_4^+ y materia orgánica) influyen en determinar cuáles grupos son los dominantes tanto en las AOB como en las AOA (Lang *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2018). La composición en cuanto a microorganismos participantes de una comunidad y la función de esta pueden no estar relacionadas, microorganismos filogenéticamente cercanos pueden presentar diferentes características metabólicas y, por el contrario, la capacidad de oxidar el NH_4^+ o de reducir NO_3^- a N_2 puede presentarse en microorganismos filogenéticamente distantes. Es por esto que, al abordar el estudio de un grupo de microorganismos en cuanto a caracterización y cuantificación, es preferible hacerlo desde un punto de vista funcional a través de genes marcadores funcionales, cuyas secuencias puedan ser utilizadas para crear cebadores o sondas genéticas que puedan presentar una alta especificidad y poder de resolución. De esta forma, sería posible relacionar la presencia de estos genes con características del entorno o función de las poblaciones en una comunidad (Petersen *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021). Es posible que los genes de los principales ciclos biogeoquímicos hayan surgido y diseminado por transferencia horizontal o lateral, mientras que las presiones de selección de tipo nutricional o energético

hayan promovido su permanencia en los MTN en diferentes entornos (Alvarez *et al.*, 2011; Khadka *et al.*, 2018; Parsons *et al.*, 2021).

Enzimas amonio monooxigenasa (AMO, gen *amoA*) e hidroxilamina oxidorreductasa (HAO, gen *hao*). En el primer paso del proceso nitrificante (Figura 2), la oxidación de $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$ es catalizada por la metaloenzima amonio monooxigenasa (AMO) de 283 kDa (Gilch *et al.*, 2009; Lehnert *et al.*, 2018). La enzima AMO está ligada a la membrana plasmática y contiene cobre, hierro y zinc, siendo el cobre el elemento clave en la oxidación del NH_3 . La AMO bacteriana está formada por las subunidades AmoA, AmoB y AmoC, codificadas respectivamente por los genes *amoA*, *amoB* y *amoC*. Estos genes se presentan en una o múltiples copias, la mayoría agrupados en operones *amoCAB* (Norton *et al.*, 2002, 2008). Otros genes que forman parte del *amoCAB* son el *amoD* y el *amoE*, con proteínas cuya función está aún por determinarse (Musiani *et al.*, 2020). La enzima AMO además de ser clave en el proceso nitrificante es importante porque es capaz de participar en la eliminación de muchos otros compuestos (Sayavedra-Soto *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2021). El sitio activo de la enzima AMO se sitúa en el polipéptido producido por el gen *amoA*, donde el acetileno, un inhibidor de la AMO, se une de manera irreversible (Gilch *et al.*, 2009). El gen *amoA* está altamente conservado y puede presentarse en las AOB en varias copias por célula (Norton *et al.*, 2002; Musiani *et al.*, 2020). Cabe señalar que la enzima AMO es poco conocida a nivel estructural y de procesos (Lehnert *et al.*, 2018). La enzima bacteriana periplásmica hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) interviene en el paso $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$ y su gen *hao* puede ser utilizado también como un marcador molecular alternativo para las AOB (Caranto & Lancaster, 2017). Se debe considerar que el gen *hao* también está presente en los organismos no amonio oxidantes, incluidas

las bacterias oxidantes de metano y otros microorganismos (Junier *et al.*, 2010; Lehnert *et al.*, 2018). Las AOA codifican distintos genes homólogos a las subunidades de la AMO y se han propuesto genes (*amoX*, *amoY*, *amoZ*) que podrían codificar las subunidades AmoX, AmoY, AmoZ (Tolar *et al.*, 2017; Hodgskiss *et al.*, 2023). Al no encontrarse un gen homólogo de la hidroxilamina oxidorreductasa (pero sí la presencia de NH_2OH como intermediario), el paso de oxidación del NH_3 a NO_2^- en las AOA no está aún definido (Vajjala *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020). Las AOA serían un grupo dominante en ambientes con una baja concentración de NH_3 , de O_2 disuelto, baja carga orgánica, temperaturas altas o bajas y en aguas residuales salinas (Yin *et al.*, 2018).

Enzima nitrito oxidorreductasa (NXR, genes *nxrA*, *nxrB*). El paso de nitratación (Figura 2): $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$, es llevado a cabo por la enzima nitrito oxidorreductasa (NXR). La enzima NXR consta de tres subunidades codificadas por el gen *nxr*: alfa (*nxrA*), beta (*nxrB*) y gamma (*nxrC*). La subunidad alfa (NxrA) que se une al sustrato puede encontrarse orientada en dos formas, hacia el citoplasma o al periplasma. La forma orientada hacia el citoplasma se presenta por ejemplo en *Nitrobacter* y la forma orientada al periplasma en *Nitrospira* (Lücker *et al.*, 2010). Las NXR citoplásmicas están afiliadas filogenéticamente con las enzimas nitrato reductasas y las formas periplásmicas con la familia de enzimas de unión a cofactores de molibdopterina de tipo II (Pester *et al.*, 2014). Los genes *nxrA*, y en particular el *nxrB*, son usados como marcadores genéticos para las NOB, así como para las bacterias de *Nitrospira* que llevan a cabo la oxidación completa del NH_3 (comammox). El gen *nxrB* también se presenta en múltiples copias. Por ejemplo, *Nitrospira marina* Watson *et al.* 1986 (Schoch *et al.*, 2020) puede contener hasta seis copias. *Nitrospira* y *Nitrobacter* son NOB comunes en las plantas

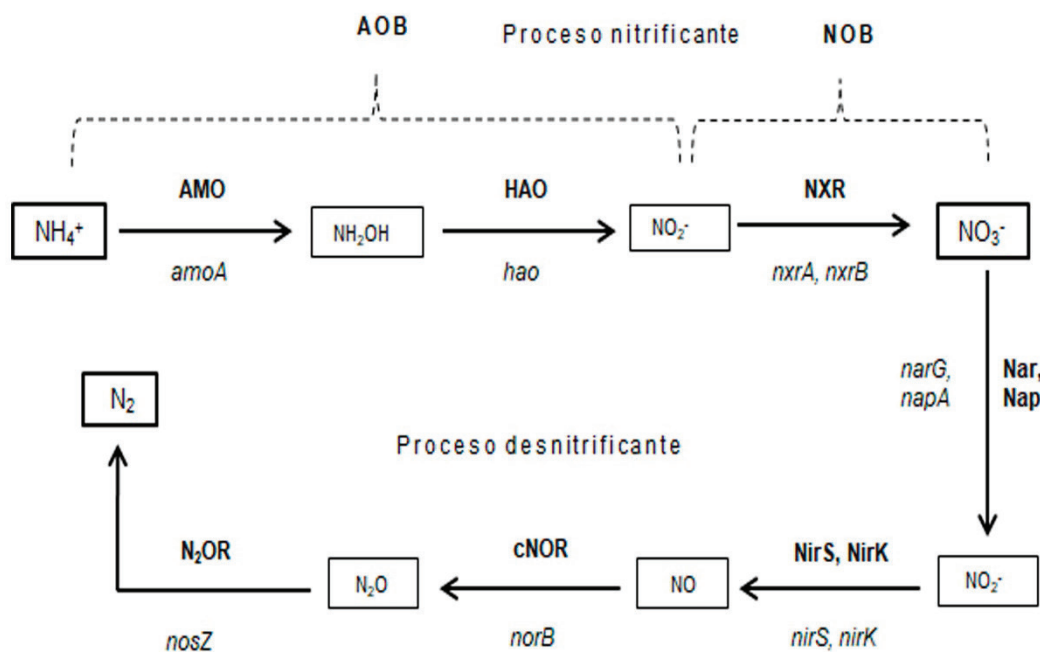


Figura 2. Procesos nitrificante y desnitrificante. **AOB:** bacterias amonio oxidantes. **NOB:** bacterias nitrito oxidantes. **AMO:** amonio monooxigenasa, gen *amoA*. **HAO:** hidroxilamina oxidorreductasa, gen *hao*. **NXR:** nitrito oxidorreductasa, genes *nxrA*, *nxrB*. **Nar, Nap:** nitrato reductasa, genes *narG*, *napA*. **NirS, NirK:** nitrito reductasa, genes *nirS*, *nirK*. **cNOR:** óxido nítrico reductasa, gen *norB*. **N₂OR:** óxido nitroso reductasa, gen *nosZ*.

de tratamiento de aguas residuales, pero *Nitrospira* es el género más diverso y abundante en este y muchos otros ambientes (Mehrani *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020). *Nitrospira* puede ser dominante en medios con bajas concentraciones de NO_2^- y *Nitrobacter* en ambientes con altas concentraciones de NO_2^- . Por su importancia ecológica, biotecnológica y su diversidad filogenética y metabólica, es necesario continuar avanzando en el estudio de las NOB (Daims *et al.*, 2016; Vijayan *et al.*, 2021).

Bacterias desnitrificantes. El proceso desnitrificante (Figura 2) es llevado a cabo por grupos taxonómicos tan diversos como bacterias (proteobacterias, α , β , γ , δ), arqueas (Euryarchaeota, Crenarchaeota) y hongos (Lu *et al.*, 2014; Buratti *et al.*, 2022). Algunas especies de haloarqueas han mostrado capacidades de desnitrificación, lo que puede indicar un papel determinante en la reducción del NO_3^- a N_2 en suelos o cuerpos de agua salinos tanto naturales como artificiales (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017). Si bien es común la distinción entre “sistemas naturales” y “sistemas artificiales”, esto es sólo por precisión de tema ya que los microorganismos no hacen distinción de un entorno u otro, y así, por ejemplo, pueden hallarse organismos propios del suelo en la composición de las comunidades de los llamados sistemas artificiales (Pholchan *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2018). En las plantas de tratamiento de aguas residuales, los genes marcadores de la desnitrificación se usan ampliamente en la caracterización de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas participantes (Lu *et al.*, 2014; Castellano-Hinojosa *et al.*, 2020).

Enzima nitrato reductasa (Nar, Nap, genes *narG*, *napA*). Con la reducción del NO_3^- inicia el proceso de desnitrificación y la enzima que cataliza la reacción $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ es la nitrato reductasa (Figura 2). En bacterias, hay dos enzimas reductasas que difieren en localización y propiedades, una orientada hacia el citoplasma (Nar) y la situada del lado del periplasma (Nap). La enzima Nar es una enzima heterotrimérica (NarGHI) que contiene el sitio activo en la subunidad NarG (gen *narG*) ubicada hacia el citoplasma, la subunidad NarH con la función de transferencia de electrones y la subunidad NarI que sirve de unión a la membrana (González *et al.*, 2006; Kraft *et al.*, 2011). La enzima Nap es una enzima soluble formada por una subunidad mayor NapA y una menor NapB, donde NapA (gen *napA*) contiene la actividad catalítica, mientras que NapB es esencial en la transferencia de electrones a NapA. Además, puede presentarse la proteína NapC integrada en la membrana, la cual libera electrones a NapB. El orden y presencia de los genes del operón *nap* es variable dependiendo de la especie, así por ejemplo puede haber expresión de NapABCGH entre otras combinaciones. Un microorganismo puede presentar el gen *narG* o *napA* (y sus enzimas correspondientes), o los dos genes. Estas y otras nitrato reductasas son molibdeno dependientes (González *et al.*, 2006; Asamoto *et al.*, 2021). Es probable que en ambientes con alto contenido en NO_3^- la enzima Nar sea más eficiente, pero con una baja afinidad, mientras que la enzima Nap con mayor afinidad, pero menos eficiente, se presentaría preferentemente en entornos donde el NO_3^- es limitado (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2013; Asamoto *et al.*, 2021). El O_2 puede inhibir a la enzima Nar (sensible a este gas), o bien inhibir la actividad de los transportadores de NO_3^- al interior de la célula. La enzima Nap en cambio se considera que no es afectada por el O_2 y no requiere un transporte de NO_3^- ya que se sitúa en el espacio periplásmico. Ambos genes, *narG* y *napA*, pueden emplearse como marcadores genéticos (Ma *et al.*, 2019), aunque el gen *napA* puede ser particularmente útil en identificar desnitrificantes aerobio tolerantes (Zhao *et al.*, 2018).

Enzima nitrito reductasa (NirS, NirK, genes *nirS*, *nirK*). En el proceso desnitrificante (Figura 2), la reducción de NO_2^- a NO puede catalizarse por dos enzimas periplásmicas que tienen funciones homólogas, pero distinta estructura, la enzima NirK que contiene cobre y es codificada por el gen *nirK*, y la enzima NirS (citocromo cd₁) que contiene hierro y tiene por origen al gen *nirS*. Generalmente, en un microorganismo, se presenta el gen *nirK* o el *nirS*, aunque hay excepciones, es decir, especies desnitrificantes que pueden presentar ambos genes (Wittorf *et al.*, 2018). La enzima NirK tiene dos centros Cu, uno perteneciente a la subclase de proteínas con Cu de tipo I y el otro de tipo II, siendo en este último donde se produce la unión del sustrato (Rinaldo & Cutruzzolà, 2007). La presencia de Cu puede ser un elemento clave en determinar los niveles de expresión del gen *nirK*. En el caso de NirS, el sitio activo es d₁ y la síntesis de la enzima puede depender de la presencia de NO_3^- (Wittorf *et al.*, 2018). Ambos genes se han utilizado como marcadores moleculares y se han encontrado en diversos grupos bacterianos (Proteobacteria, Nitrospirae, Actinobacteria, entre otros filos) así como en Archaea (Wei *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019; Miralles-Robledillo *et al.*, 2021).

Enzima óxido nítrico reductasa (cNOR, gen *norB*). La enzima óxido nítrico reductasa (NOR) que cataliza la reducción del NO a N_2O , es una enzima oxidasa con hierro, localizada en la membrana. En bacterias desnitrificantes comúnmente se encuentra en la forma cNOR (“complejo NorBC”), un dímero formado por las subunidades NorB que contiene el sitio activo y NorC, que son codificadas por los genes *norB* y *norC*, respectivamente (Matsumoto *et al.*, 2012; Shiro, 2012). Esta forma acepta electrones del citocromo c o de la azurina. La enzima qNOR de subunidad única (gen *qnor*, *qnorB* o *norZ*) es otra forma de la enzima NOR presente en bacterias, arqueas y microorganismos no desnitrificantes en los cuales la función de NOR se relaciona con la detoxificación del citotóxico NO. Otra forma de la enzima NOR reportada en el género *Bacillus* es la Cu_ANor , con el citocromo c551 como donador de electrones (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017). El NO es un gas que puede contribuir a generar o ser sumidero de ozono y la oxidación del NO resulta en ácido nítrico, componente de la lluvia ácida (Pilegaard, 2013). Los genes *norB* y *qnor* se han empleado para detectar desnitrificantes óxido nítrico reductores en diferentes ambientes (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2019; Castellano-Hinojosa *et al.*, 2020).

Enzima óxido nitroso reductasa (N_2OR , gen *nosZ*). El último paso en el proceso desnitrificante corresponde a la reducción del N_2O a N_2 (Figura 2) y es catalizado por la enzima óxido nitroso reductasa (N_2OR) (Jones *et al.*, 2013). El gen *nosZ* codifica la subunidad catalítica. Se han identificado dos tipos de enzimas que realizan este paso. La llamada N_2OR clado I es una metaloenzima periplásmica que contiene múltiples átomos de cobre, con dos dominios, un centro de transferencia de electrones (Cu_A) y un centro catalítico (Cu_Z). El gen *nosZ* se presenta en el grupo de genes *nos* comúnmente en el arreglo *nosRZDFYL* (el gen *nosX* puede presentarse antes o después). Los otros genes de este conjunto están implicados por ejemplo en la regulación de la expresión y maduración de la enzima N_2OR (Carreira *et al.*, 2017). La enzima N_2OR clado II difiere en que está asociada probablemente a la membrana y tiene un dominio adicional hemo C en el extremo C terminal. El gen *nosZ* forma parte del arreglo *nosCZ-ORF-nosDVF-ORF*, y los genes *nosX* y *nosR* no se presentan. Aparte del dominio bacteria, las arqueas también pueden presentar estos tipos de enzimas (Ma *et al.*, 2019; Keeley *et al.*, 2020). Debido a la modularidad del proceso desnitrificante, puede no presentarse el gen *nosZ* en una población microbiana, de forma

que se libere el gas N_2O de efecto invernadero, o por el contrario una población puede expresar la enzima N_2OR , y la comunidad de la cual forma parte puede tener la capacidad de eliminar el N_2O del entorno. El gen *nosZ* se ha empleado como marcador en diversos estudios a fin de identificar los grupos capaces de reducir el N_2O a N_2 bajo diferentes condiciones ambientales (Conthe *et al.*, 2019; Castellano-Hinojosa *et al.*, 2020; Bernabeu *et al.*, 2021). Cabe mencionar que es posible que se presente más de una copia de algunos de los genes desnitrificantes mencionados en un mismo microorganismo o cepa. Se han encontrado copias múltiples del *nirS* en el genoma de especies del género *Thauera* (Wang *et al.*, 2020c).

Diversidad y flexibilidad metabólica de bacterias nitrificantes y desnitrificantes. La ubicuidad, abundancia, diversidad taxonómica y metabólica del dominio bacteria es enorme. Se ha estimado que pueden existir en nuestro planeta de millones a miles de millones de especies del dominio bacteria y arqueas (Pallen *et al.*, 2021), de los cuales solo 150000 genomas han sido secuenciados y almacenados en Genome Taxonomy Database. Sin embargo, de ellos el 40% carece de una asignación taxonómica específica (Parks *et al.*, 2020). La cantidad de secuencias que esperan ser clasificadas continúa en aumento día a día (Overmann *et al.*, 2019; Pallen *et al.*, 2021). Otro problema asociado con esta diversidad es que no existe un concepto de especie para procariontes que sea ampliamente aceptado. Siendo microorganismos asexuales y con un habitual intercambio horizontal de material genético, puede resultar en una imprecisión al tratar de distinguir una especie de otra. Se ha optado por una solución pragmática y más bien dirigida a especies cultivables, con hibridación DNA-DNA del 70% como límite entre especies (Gevers *et al.*, 2005; Doolittle & Rapke, 2006) o por la propuesta enfocada a los microorganismos no cultivables con el promedio de similitudes de nucleótidos (ANI: average nucleotide similarities) entre genomas, donde un ANI < 90% es un criterio para distinguir poblaciones coexistentes (Doolittle & Rapke, 2006; Overmann *et al.*, 2019; Parks *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta la búsqueda de orden mediante la categorización de la gran diversidad microbiana, se comprende que la clasificación de los microorganismos de acuerdo con un solo proceso (“fijador de nitrógeno”, “nitrificante”, “desnitrificante”) haya sido desde un inicio artificial y no refleje completamente la diversidad y versatilidad metabólica de los MTN (Stein & Klotz, 2016; Kuypers *et al.*, 2018).

La Tabla 1 presenta ejemplos de la diversidad y versatilidad metabólica de algunas bacterias nitrificantes y desnitrificantes clasificadas tradicionalmente de acuerdo con un proceso respiratorio único. Por ejemplo, la bacteria *Nitrosomonas europaea* Winogradsky 1892 (Schoch *et al.*, 2020) se ha clasificado como un quimiolitotrofo obligado que obtiene energía para su crecimiento de la oxidación del NH_3 a NO_2^- en presencia de O_2 y que cubre su necesidad de carbono mediante la fijación de dióxido de carbono (CO_2). Sin embargo, *N. europaea* puede consumir y crecer con sustratos orgánicos como fructosa y piruvato usados como únicas fuentes de carbono, si bien sigue necesitando el NH_3 como fuente de energía (Chain *et al.*, 2003; Hommes *et al.*, 2003). Otras AOB también han sido reportadas como capaces de utilizar la vía heterotrófica utilizando sustratos orgánicos como fuentes de carbono para su crecimiento (Kjeldal *et al.*, 2014). Además, en *N. europaea*, una representante típica de las bacterias amonio oxidantes, se han encontrado secuencias homólogas de los genes *nirK* y *norB* y sus enzimas correspondientes. Esto le permite realizar parte del proceso desnitrificante en ambientes con bajas concentraciones de O_2 y altas en NO_2^- . Puede decirse que *N. europaea* es también una bacteria desnitrificante

(Schmidt, 2004; Yu & Chandran, 2010). *Nitrobacter hamburgensis* Bock *et al.* 2001 cepa X14 (Schoch *et al.*, 2020) (Tabla 1) es una bacteria que obtiene su energía de la oxidación del NO_2^- y el carbono del CO_2 , pero también es capaz de tener un crecimiento mixotrófico con NO_2^- y D-lactato como fuentes de energía, nitrógeno y carbono, o un crecimiento organotrófico sin NO_2^- , pero con NH_3/NH_4^+ como fuente de nitrógeno y con D-lactato como fuente de energía y carbono (Starkenbug *et al.*, 2008a, b). Si bien el lactato se asimila y metaboliza hasta CO_2 , se requiere la exposición al CO_2 atmosférico o la adición de carbonato de sodio tanto en el crecimiento mixotrófico como en el organotrófico, en este último caso a fin de obtener un crecimiento óptimo. Otros *Nitrobacter* como *N. agilis* (actualmente *N. winogradsky* Winslow *et al.* 1917) y *N. vulgaris* Bock *et al.* 2001 también tienen la capacidad de crecimiento quimiorganotrófico (Bock, 1976; Bock *et al.*, 1990; Schoch *et al.*, 2020). Es posible que la utilización de compuestos orgánicos sea una estrategia empleada para complementar requerimientos energéticos ya que el NO_2^- es un sustrato energéticamente pobre (Starkenbug *et al.*, 2008a). La ubicuidad de los nitrificantes en diversos sistemas se podría explicar en parte por la capacidad de emplear como donadores de electrones tanto compuestos específicos como compuestos orgánicos (Bock, 1976). *Acinetobacter* sp. ND7, *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann & Neuman 1896) (actualmente *Stutzerimonas stutzeri*) cepa UFV5 y *Vibrio diabolicus* Raguns *et al.* 1997 cepa SF16 (Schoch *et al.*, 2020) (Tabla 1) son cepas bacterianas que han sido reportadas como capaces de realizar el proceso de nitrificación heterotrófica y desnitrificación en condiciones aerobias (proceso HN-AD). Es decir, que en condiciones aerobias y utilizando compuestos orgánicos como fuente de carbono y electrones, estas bacterias tienen la capacidad de eliminar $N-NH_4^+$, donde una parte de estos compuestos puede ser asimilada y otra puede ser liberada como N_2 , y como CO_2 respectivamente. *Acinetobacter* sp. ND7 es una cepa que elimina eficientemente NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- respectivamente o en combinación: NH_4^+ y NO_3^- , como fuentes de nitrógeno y con acetato como fuente de carbono. Otras fuentes con las que ND7 es capaz de eliminar nitrógeno eficientemente son el succinato o el citrato (Xia *et al.*, 2020). Es necesaria la presencia de una fuente de carbono orgánico para que se realice la eliminación de NH_4^+ . En el balance de nitrógeno (NH_4^+ y acetato como sustratos iniciales), el 56.5% del $N-NH_4^+$ inicial se convirtió en N_2 , el 40.9% se incorporó en biomasa y 2.1% en intermediarios. Los genes clave que se presentan en esta cepa y cuyas enzimas intervienen en el proceso HN-AD son: *hao*, importante en el proceso nitrificante heterotrófico, *nap*, interviene en la reducción del NO_3^- en condiciones aerobias, y *nirS*, amplificado con frecuencia de bacterias desnitrificantes aerobias (Zhao *et al.*, 2018). *P. stutzeri* UFV5 es capaz de eliminar el NH_4^+ de forma eficiente cuando se emplean fuentes de carbono (relación C/N: 6-12, salinidad de 0-3%) como piruvato o citrato entre otros compuestos que forman parte del ciclo de los ácidos tricarbónicos. A través del balance de nitrógeno empleando citrato, se calcula que 47% del $N-NH_4^+$ se incorpora en biomasa y 53% puede convertirse en N_2 . Los compuestos NH_2OH , NO_2^- y NO_3^- productos de la nitrificación, las enzimas AMO, HAO y sus genes *amoA* y *haoF* no se detectaron en la cepa UFV5, probablemente debido a que participan enzimas y genes distintos a los involucrados en la nitrificación autotrófica (Silva *et al.*, 2020). En cambio, las enzimas y los genes de la desnitrificación anaerobia sí se encontraron presentes. En el proceso HN-AD, el NH_4^+ no se emplea como fuente de electrones para generar energía, y se considera que su eliminación posiblemente sea una forma de retirar un compuesto que es percibido como tóxico por *P. stutzeri* UFV5 (Silva *et al.*, 2020). *V. diabolicus* SF16 es una bacteria halófila con

la capacidad de eliminar eficientemente NH_4^+ y NO_3^- respectivamente con 1-5% de salinidad y con acetato como fuente de carbono. Puede usar de igual forma otras fuentes de carbono como citrato, glucosa o sacarosa (Duan *et al.*, 2015). A través de un balance de nitrógeno (3% de salinidad), se calcula que 35.8% de N-NH_4^+ se incorpora en biomasa, 53.9% puede liberarse como N_2 y 0.2% como NO_2^- y NO_3^- . La cepa SF16 presenta el gen *napA*. En los tres casos mencionados de las bacterias que realizan el proceso HN-AD, la eliminación del NH_4^+ está asociada al crecimiento bacteriano. En el balance de nitrógeno, más de la mitad del N-NH_4^+ se libera como N_2 y menos de la mitad se incorpora en biomasa, lo que resulta conveniente si se considera al bajo volumen de lodos que se pudieran producir. Así también la diversidad en sustratos, vías metabólicas y condiciones que pueden tolerar (por ejemplo, en cuanto a salinidad) vuelve a estos microorganismos un grupo de interés por su posible uso en el tratamiento de aguas residuales (Duan *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020).

Otro ejemplo de diversidad metabólica recientemente descubierta en MTN es la capacidad de *Candidatus Nitrospira inopinata* Daims *et al.* 2015 (Oren *et al.*, 2020; Schoch *et al.*, 2020) (Tabla 1) para realizar el proceso nitrificante de forma completa ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) en condiciones aerobias. *Ca. N. inopinata* posee una alta afinidad por NH_4^+ , un alto rendimiento de crecimiento en comparación con los nitrificantes canónicos y una tasa máxima de oxidación de NH_4^+ relativamente baja. Lo anterior sugiere que *Ca. N. inopinata* es un organismo propio de ambientes oligotróficos donde presenta un lento crecimiento. *Ca. N. inopinata* posee homólogos de las enzimas AMO y HAO propias de la oxidación del NH_4^+ de las AOB y la enzima NXR que oxida el NO_2^- en las NOB (Daims *et al.*, 2015; Kits *et al.*, 2017).

Los ejemplos previamente descritos ilustran que existe una amplia gama de combinaciones funcionales que pueden presentarse en los MTN, que tiene explicación en el conjunto de genes y su regulación, las relaciones que se establecen entre los microorganismos de una comunidad, así como la necesidad de supervivencia y desarrollo en una gran variedad de ambientes (Stein & Klotz, 2016; Kuypers *et al.*, 2018). Sin embargo, hacen falta más estudios dirigidos a la fisiología, metabolismo, ecología y genética de los MTN para poder entender, controlar y emplear de forma eficiente su actividad a fin de obtener procesos biológicos óptimos o alternativos en la eliminación de nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales.

Ecología de comunidades. Una comunidad es un conjunto formado por distintas especies, donde los organismos viven e interactúan entre sí y su entorno en un área específica. Esta organización compleja multispecífica se presenta en una gran diversidad de ambientes y funciones, estas últimas relacionadas por ejemplo con la agricultura, industria, salud humana y ciclos biogeoquímicos. Al formarse una comunidad, esta puede adquirir comportamientos y características propias (propiedades intrínsecas) que no son identificables en los individuos participantes y que no surgen de la simple adición de las características de sus integrantes (Konopka, 2009; Fierer *et al.*, 2012; Madsen *et al.*, 2018; Trego *et al.*, 2021). En una comunidad microbiana, las diferentes especies se presentan en proporciones relativas y los distintos microorganismos contribuyen con su genoma a dotarla de una diversidad metabólica. Hay poblaciones microbianas que constituyen la parte activa de la comunidad, y el cambio en la riqueza o diversidad de estas poblaciones clave puede alterar la función de esta (Brenner *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2015; Goldford *et al.*, 2018). Si bien la diversidad

de especies no asegura la integridad y permanencia de la comunidad, sí posibilita en general un mejor desempeño ante cambios ambientales y nutricionales (Brenner *et al.*, 2008; Awolusi *et al.*, 2015; Widder *et al.*, 2016). Las comunidades microbianas son sistemas dinámicos con la capacidad inherente de soportar perturbaciones, es decir de ser estables por ejemplo ante eventos repentinos que puedan modificar su función (Arnoldi *et al.*, 2019). Las interacciones entre los miembros son fundamentales en la formación, estabilidad y funcionamiento de la comunidad. Estas interacciones son variadas y comprenden: interacciones a nivel trófico; competencia por recursos; metabólicas (sintrofia, bienes públicos); de señalización (quorum sensing); estructurales físicas o metabólicas (biopelículas, flóculos, gránulos) y de intercambio de material genético (transferencia horizontal de genes) (Brockhurst *et al.*, 2008; Konopka, 2009; Widder *et al.*, 2016; Madsen *et al.*, 2018). Los consorcios microbianos en forma de flóculos, gránulos y biopelículas son las comunidades más frecuentes en los sistemas empleados en la eliminación de contaminantes de aguas residuales. Para la formación y permanencia de estas comunidades, se requiere entre sus participantes comunicación, interacción y coordinación (comportamiento colectivo coordinado). La proximidad espacial de los taxones en estos bioagregados multitróficos posibilita una mejor comunicación entre los microorganismos a través de moléculas autoinductoras, así como el montaje de una respuesta por parte de la comunidad. La diversidad y flexibilidad metabólica de los taxones explicaría por qué el consumo de metabolitos, la eliminación de contaminantes y agentes antimicrobianos muestran ser más eficientes en consorcios que en los microorganismos planctónicos o de vida libre (Flemming *et al.*, 2016; Maddela *et al.*, 2019; Cai, 2020; Trego *et al.*, 2021). De esta forma, si en una comunidad algunos microorganismos presentan solo partes de vías metabólicas, los pasos faltantes o vías complementarias pueden estar en organismos próximos, como en el caso de los procesos nitrificante y desnitrificante que se efectúan en gránulos donde las poblaciones pueden localizarse en la estructura de estos de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes y O_2 (Cordero & Datta, 2016; Di Capua *et al.*, 2022).

Conclusiones. Los procesos microbiológicos de nitrificación y desnitrificación forman parte del ciclo del nitrógeno y acoplados tienen la función de regresar el nitrógeno de compuestos como el NH_4^+ a la atmósfera en forma de N_2 . Los organismos involucrados en estos procesos se utilizan en los sistemas artificiales de tratamiento de aguas residuales. Lo que se conoce de su metabolismo y fisiología se basa en estudios realizados en unos cuantos microorganismos cultivables. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos microorganismos pueden estar presentes en ambientes muy diversos y que la cantidad de taxones que aún quedan por descubrirse es enorme. En el futuro y con la ayuda de la bioinformática y las ciencias “ómicas”, la extensa diversidad metabólica de bacterias, arqueas y otros MTN será mejor comprendida. La información contenida en esta revisión destaca que un organismo identificado como nitrificante o desnitrificante puede tener la capacidad de acuerdo con su genoma y condiciones del entorno, de efectuar otros procesos y funciones. Los genes funcionales que codifican las principales enzimas de los procesos de la nitrificación y desnitrificación se presentan en diversos taxones y a través de su empleo como genes marcadores, es posible caracterizar y cuantificar un grupo de organismos con una función común. Es conveniente que el análisis de la transcripción y traducción de los genes funcionales sea incluido de manera más amplia en los estudios de los consorcios usados en el tratamiento

Tabla 1. Ejemplos de diversidad y flexibilidad metabólica en bacterias nitrificantes y desnitrificantes. Metabolismo: fuente de energía/aceptor final de electrones/aerobio o anaerobio/fuente de carbono. Coi: compuestos orgánicos e inorgánicos. Co: compuestos orgánicos. BAF: filtro biológico aireado.

Bacteria	Sistema experimental	Metabolismo convencional	Metabolismo alternativo o complementario	Resultados	Información genética	Referencias
Amonio oxidante						
<i>Nitrosomonas europaea</i> Winogradsky 1892	Ensayos en lote	NH ₃ /O ₂ /aerobio/CO ₂	NH ₃ /O ₂ /aerobio/fructosa o piruvato	Crecimiento con fructosa o piruvato como única fuente de carbono	Secuencia del genoma completo	Hommes <i>et al.</i> , 2003; Chain <i>et al.</i> , 2003
Nitrito oxidante						
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> Bock <i>et al.</i> 2001, cepa X14	Ensayos en lote	NO ₂ /O ₂ /aerobio/CO ₂	D-lactato/O ₂ /aerobio/D-lactato, CO ₂	Crecimiento organotrófico a partir de D-lactato	Secuencia del genoma completo	Starkenborg <i>et al.</i> , 2008a, b
Desnitrificante						
<i>Acinetobacter</i> sp., cepa ND7	Ensayos en lote	Acetato y otros Coi/ NO ₃ / anaerobio/acetato y otros Co	Con NH ₄ ⁺ como única fuente adicionada de N: Acetato y otros Co/NO ₃ /aerobio/acetato y otros Co	Asimilación de N-NH ₄ ⁺ . Producción de N ₂ y CO ₂	Genes amplificados <i>hao</i> , <i>napA</i> , <i>nirS</i>	Xia <i>et al.</i> , 2020
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Lehmann & Neuman 1896), cepa UFV5	Ensayos en lote	Piruvato y otros Coi/ NO ₃ / anaerobio /piruvato y otros Co	Con NH ₄ ⁺ como única fuente adicionada de N: Piruvato y otros Co/NO ₃ /aerobio/piruvato y otros Co	Asimilación de N-NH ₄ ⁺ . Producción de N ₂ y CO ₂	Genes detectados <i>nap</i> , <i>nirS</i> , <i>norB</i> , <i>nosZ</i>	Silva <i>et al.</i> , 2020
<i>Vibrio diabolicus</i> Raguns <i>et al.</i> 1997, cepa SF16	BAF en lote. Ensayos en lote	Acetato y otros Coi/ NO ₃ / anaerobio /acetato y otros Co	Con NH ₄ ⁺ como única fuente adicionada de N: Acetato y otros Co/NO ₃ /aerobio/acetato y otros Co	Asimilación de N-NH ₄ ⁺ . Producción de N ₂ y CO ₂	Gen <i>napA</i> amplificado de desnitrificación aerobia	Duan <i>et al.</i> , 2015
Comammox						
<i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> Daims <i>et al.</i> 2015	Ensayos en lote	NO ₂ /O ₂ /aerobio/CO ₂	NH ₄ ⁺ /O ₂ /aerobio/CO ₂	Oxidación de NH ₄ ⁺ a NO ₃ ⁻ . Crecimiento celular	Genes que codifican para enzimas AMO, HAO y NXR	Daims <i>et al.</i> , 2015; Kits <i>et al.</i> , 2017

de aguas residuales. Esto permitirá relacionar las diferentes condiciones ambientales y nutricionales con los genes y su grado de expresión para la síntesis de sus correspondientes enzimas, ampliando el conocimiento de la capacidad y flexibilidad metabólica de los consorcios. Las poblaciones en general y en este caso las nitrificantes y desnitrificantes pueden reunirse para formar una comunidad o consorcio donde cada componente aporta diversidad genética y taxonómica. Estos consorcios ubicuos en sistemas naturales y artificiales comúnmente presentan capacidades mejores o distintas de las que presentan las especies participantes de manera individual y pueden contribuir a una eliminación más eficiente y estable de contaminantes del agua, como NH_4^+ .

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (398091) a José Juan Ramírez Muñoz y al Consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa por el financiamiento.

REFERENCIAS

- AHMED, M., M. RAUF, Z. MUKHTAR & N. A. SAEED. 2017. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 26983-26987. DOI:10.1007/s11356-017-0589-7
- ALVAREZ, L., C. BRICIO, M. J. GÓMEZ & J. BERENQUER. 2011. Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1352-1358. DOI:10.1128/AEM.02048-10
- ARNOLDI, J. F., M. LOREAU & B. HAEGEMAN. 2019. The inherent multidimensionality of temporal variability: how common and rare species shape stability patterns. *Ecology Letters* 22 (10): 1557-1567. DOI:10.1111/ele.13345
- ASAMOTO, C. K., K. R. REMPFERT, V. H. LUU, A. D. YOUNKIN & S. H. KOPF. 2021. Enzyme-Specific Coupling of Oxygen and Nitrogen Isotope Fractionation of the Nap and Nar Nitrate Reductases. *Environmental Science and Technology* 55 (8): 5537-5546. DOI:10.1021/acs.est.0c07816
- AWOLUSI, O. O., S. K. S. KUMARI & F. BUX. 2015. Ecophysiology of nitrifying communities in membrane bioreactors. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12 (2): 747-762. DOI:10.1007/s13762-014-0551-x
- BEECKMAN, F., H. MOTTE & T. BEECKMAN. 2018. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology* 50: 166-173. DOI:10.1016/j.copbio.2018.01.014
- BERNABEU, E., J. M. MIRALLES-ROBLEDILLO, M. GIANI, E. VALDÉS, R. M. MARTÍNEZ-ESPINOSA, & C. PIRE. 2021. In silico analysis of the enzymes involved in haloarchaeal denitrification. *Biomolecules* 11 (7): 1-22. DOI:10.3390/biom11071043
- BISWAS, T., S. BANERJEE, A. SAHA, A. BHATTACHARYA, C. CHANDA, L. M. GANTAYET, P. BHADURY & S. R. CHAUDHURI. 2022. Bacterial consortium based petrochemical wastewater treatment: from strain isolation to industrial effluent treatment. *Environmental Advances* 7: 100132. DOI:10.1016/j.envadv.2021.100132
- BOCK, E. 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Archives of Microbiology* 108 (3): 305-312. DOI:10.1007/BF00454857
- BOCK, E., H. KOOPS, U. C. MÖLLER & M. RUDERT. 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Archives of Microbiology* 153: 105-110. DOI:10.1007/BF00247805
- BOYLE, E. 2017. Nitrogen pollution knows no bounds. *Science* 356 (6339): 700-701. DOI:10.1126/science.aan3242
- BRENNER, K., L. YOU & F. H. ARNOLD. 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26 (9): 483-489. DOI:10.1016/j.tibtech.2008.05.004
- BROCKHURST, M. A., A. BUCKLING, D. RACEY & A. GARDNER. 2008. Resource supply and the evolution of public-goods cooperation in bacteria. *BMC Biology* 6: 20. DOI:10.1186/1741-7007-6-20
- BURATTI, S., C. E. GIROMETTA, R. M. BAIGUERA, B. BARUCCO, M. BERNARDI, G. DE GIROLAMO, M. MALGARETTI, D. OLIVIA, A. M. PICCO & E. SAVINO. 2022. Fungal Diversity in Two Wastewater Treatment Plants in North Italy. *Microorganisms* 10 (6): 1096. DOI:10.3390/microorganisms10061096
- CAI, Y. M. 2020. Non-surface Attached Bacterial Aggregates: A ubiquitous third lifestyle. *Frontiers in Microbiology* 11:557035. DOI:10.3389/fmicb.2020.557035
- CARANTO, J. D. & K. M. LANCASTER. 2017. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (31): 8217-8222. DOI:10.1073/pnas.1704504114
- CARREIRA, C., S. R. PAULETA & I. MOURA. 2017. The catalytic cycle of nitrous oxide reductase — The enzyme that catalyzes the last step of denitrification. *Journal of Inorganic Biochemistry* 177: 423-434. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2017.09.007
- CASTELLANO-HINOJOSA, A., P. MAZA-MÁRQUEZ, J. GONZÁLEZ-LÓPEZ & B. RODELAS. 2020. Influence of operation parameters on the shaping of the denitrification communities in full-scale municipal sewage treatment plants. *Journal of Water Process Engineering* 37: 101465. DOI:10.1016/j.jwpe.2020.101465
- CHAIN, P., J. LAMERDIN, F. LARIMER, W. REGALA, V. LAO, M. LAND, L. HAUSER, A. HOOPER, M. KLOTZ, J. NORTON, L. SAYAVEDRA-SOTO, D. ARCIERO, N. HOMMES, M. WHITTAKER & D. ARP. 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology* 185 (9): 2759-2773. DOI:10.1128/Jb.185.9.2759-2773.2003
- CONGESTRI, R., S. SAVIO, S. FARROTTI, A. AMATI, K. KRASOJEVIC, N. PERINI, F. COSTA & L. MIGLIORE. 2020. Developing a microbial consortium for removing nutrients in dishwasher wastewater: towards a biofilter for its up-cycling. *Water Science and Technology* 82 (6): 1142-1154. DOI:10.2166/wst.2020.325
- CONTHE, M., P. LYCUS, M. Ø. ARNTZEN, A. RAMOS DA SILVA, Å. FROSTEGÅRD, L. R. BAKKEN, R. KLEERBEZEM & M. C. M. VAN LOOSDRECHT. 2019. Denitrification as an N_2O sink. *Water Research* 151: 381-387. DOI:10.1016/j.watres.2018.11.087

- CORDERO, O. X. & M. S. DATTA. 2016. Microbial interactions and community assembly at microscales. *Current Opinion in Microbiology* 31: 227-234. DOI:10.1016/j.mib.2016.03.015
- DAIMS, H., E. V. LEBEDEVA, P. PJEVAC, P. HAN, C. HERBOLD, M. ALBERTSEN, M. JEHLICH, M. PALATINSZKY, J. VIERHEILIG, A. BULAEV, R.H. KIRKEGAARD, M. VON BERGEN, T. RATTEI, B. BENDINGER, P.H. NIELSEN & M. WAGNER. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528 (7583): 504-509. DOI:10.1038/nature16461
- DAIMS, H., S. LÜCKER & M. WAGNER. 2016. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology* 24 (9): 699-712. DOI:10.1016/j.tim.2016.05.004
- DANGI, A. K., B. SHARMA, R. T. HILL & P. SHUKLA. 2019. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Critical Reviews in Biotechnology* 39 (1): 79-98. DOI:10.1080/07388551.2018.1500997
- DI CAPUA, F., F. IANACONE, F. SABBA & G. ESPOSITO. 2022. Simultaneous nitrification-denitrification in biofilm systems for wastewater treatment: Key factors, potential routes, and engineered applications. *Bioresource Technology* 361: 127702. DOI:10.1016/j.biortech.2022.127702
- DOOLITTLE, W. F. & R. T. PAPKE. 2006. Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology* 7 (9): 116. DOI:10.1186/gb-2006-7-9-116
- DUAN, J., H. FANG, B. SU, J. CHEN & J. LIN. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresource Technology* 179: 421-428. DOI:10.1016/j.biortech.2014.12.057
- ELSER, J. J. 2011. A world awash with nitrogen. *Science* 334 (6062): 1504-1505. DOI:10.1126/science.1215567
- FERRERA, I. & O. SÁNCHEZ. 2016. Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: how far have we come? *Biotechnology Advances* 34 (5): 790-802. DOI:10.1016/j.biotechadv.2016.04.003
- FIERER, N., S. FERRENBURG, G. E. FLORES, A. GONZÁLEZ, J. KUENEMAN, T. LEGG, R.C. LYNCH, D. McDONALD, J.R. MIHALJEVIC, S.P. O'NEILL, M.E. RHODES, S.J. SONG & W. A. WALTERS. 2012. From animalcules to an ecosystem: application of ecological concepts to the human microbiome. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 137-155. DOI:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160307
- FLEMMING, H.-C., J. WINGENDER, U. SZEWZYK, P. STEINBERG, S. A. RICE & S. KJELLEBERG. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14 (9): 563-575. DOI:10.1038/nrmicro.2016.94
- GARRITY, G. M. & J. G. HOLT. 2015. *Nitrospirae* phy. nov. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons. Disponible en línea en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608>
- GEVERS, D., F. M. COHAN, J. G. LAWRENCE, B. G. SPRATT, T. COENYE, E. J. FEIL, E. STACKEBRANDT, Y. VAN DE PEER, P. VANDAME, F. L. THOMPSON & J. SWINGS. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3 (9): 733-739. DOI:10.1038/nrmicro1236
- GILCH, S., O. MEYER & I. SCHMIDT. 2009. A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Biological Chemistry* 390 (9): 863-873. DOI:10.1515/BC.2009.085
- GOLDFORD, J. E., N. LU, D. BAJIĆ, S. ESTRELA, M. TIKHONOV, A. SANCHEZ-GOROS-TIAGA, D. SEGRÉ, P. MEHTA & A. SANCHEZ. 2018. Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science* 361 (6401): 469-474. DOI:10.1126/science.aat1168
- GONZÁLEZ, P. J., C. CORREIA, I. MOURA, C. D. BRONDINO & J. J. G. MOURA. 2006. Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (5-6): 1015-1023. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024
- HODGSKISS, L. H., M. MELCHER, M. KEROU, W. CHEN, R. I. PONCE-TOLEDO, S. N. SAWIDES, S. WIENKOOP & C. SCHLEPER. 2023. Unexpected complexity of the ammonia monooxygenase in archaea. *The ISME Journal* 17: 588-599. DOI:10.1038/s41396-023-01367-3
- HOMMES, N. G., L. A. SAYAVEDRA-SOTO & D. J. ARP. 2003. Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose. *Journal of Bacteriology* 185 (23): 6809-6814. DOI:10.1128/JB.185.23.6809-6814.2003
- ISOBE, K. & N. OHTA. 2014. Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling. *Microbes and Environments* 29 (1): 4-16. DOI:10.1264/jsm.2.me13159
- JOHNSON, D. R., D. E. HELBLING, T. K. LEE, J. PARK, K. FENNER, H.-P. E. KOHLER & M. ACKERMANN. 2015. Association of biodiversity with the rates of micropollutant biotransformations among full-scale wastewater treatment plant communities. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2): 666-675. DOI:10.1128/AEM.03286-14
- JONES, C. M., D. R. H. GRAF, D. BRU, L. PHILIPPOT & S. HALLIN. 2013. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal* 7 (2): 417-426. DOI:10.1038/ismej.2012.125
- JUNIER, P., V. MOLINA, C. DORADOR, O. HADAS, O.-S. KIM, T. JUNIER, K.-P. WITZEL & J. F. IMHOFF. 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (3): 425-440. DOI:10.1007/s00253-009-2228-9
- KARRI, R. R., J. N. SAHU & V. CHIMMIRI. 2018. Critical review of abatement of ammonia from wastewater. *Journal of Molecular Liquids* 261: 21-31. DOI:10.1016/j.molliq.2018.03.120
- KEELEY, R. F., L. RODRIGUEZ-GONZALEZ, U. S. F. G. CLASS, G. E. BRIGGS, V. E. FRAZIER, P. A. MANCERA, H. S. MANZER, S. J. ERGAS & K. M. SCOTT. 2020. Degenerate PCR primers for assays to track steps of nitrogen metabolism by taxonomically diverse microorganisms in a variety of environments. *Journal of Microbiological Methods* 175: 105990. DOI:10.1016/j.mimet.2020.105990
- KEROU, M., R. J. ELOY ALVES & C. SCHLEPER. 2016. *Nitrososphaeria*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons. Disponible en línea en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.cbm00055>
- KHADKA, R., L. CLOTHIER, L. WANG, C. K. LIM, M. G. KLOTZ & P. F. DUNFIELD. 2018. Evolutionary History of Copper Membrane Monooxygenases. *Frontiers in Microbiology* 9: 2493. DOI:10.3389/fmicb.2018.02493

- KITS, K.D., C.J. SEDLACEK, E.V. LEBEDEV, P. HAN, A. BULAEV, P. PJEVAC, A. DAEBELER, S. ROMANO, M. ALBERTSEN, L.Y. STEIN, H. DAIMS & M. WAGNER. 2017. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature* 549: 269-272. DOI:10.1038/nature23679
- KJELDAL, H., L. PELL, A. POMMERENING-ROSER & J. L. NIELSEN. 2014. Influence of p-cresol on the proteome of the autotrophic nitrifying bacterium *Nitrosomonas eutropha* C91. *Archives of Microbiology* 196 (7): 497-511. DOI:10.1007/s00203-014-0985-z
- KONOPKA, A. 2009. What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 3: 1223-1230. DOI:10.1038/ismej.2009.88
- KRAFT, B., M. STROUS & H. E. TEGETMEYER. 2011. Microbial nitrate respiration - genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology* 155 (1): 104-117. DOI:10.1016/j.jbiotec.2010.12.025
- KUENEN, J. G. 2020. Anammox and beyond. *Environmental Microbiology* 22 (2): 525-536. DOI:10.1111/1462-2920.14904
- KUYPERS, M. M. M., H. K. MARCHANT & B. KARTAL. 2018. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology* 16: 263-276. DOI:10.1038/nrmicro.2018.9
- LANG, X., X. CHEN, A. XU, Z. SONG, X. WANG & H. WANG. 2018. Variation of bacterial and archaeal community structures in a full-scale constructed wetlands for wastewater treatment. *Archaea* 2018: 9319345. DOI:10.1155/2018/9319345
- LEE, C.C., M.W. RIBBE & Y. HU. 2014. Cleaving the N,N triple bond: the transformation of dinitrogen to ammonia by nitrogenases. In: Krockneck, P. & M. Torres (Eds.). *The metal-driven biogeochemistry of gaseous compounds in the environment. Metal ions in life sciences*. Springer, Dordrecht, Vol. 14, pp. 147-176. DOI:10.1007/978-94-017-9269-1_7
- LEHNERT, N., H. T. DONG, J. B. HARLAND, A. P. HUNT & C. J. WHITE. 2018. Reversing nitrogen fixation. *Nature Reviews Chemistry* 2: 278-289. DOI:10.1038/s41570-018-0041-7
- LU, H., K. CHANDRAN & D. STENSEL. 2014. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research* 64: 237-254. DOI:10.1016/j.watres.2014.06.042
- LÜCKER, S., M. WAGNER, F. MAIXNER, E. PELLETIER, H. KOCH, B. VACHERIE, T. RATTEI, J.S.S. DAMSTÉ, E. SPIECK, D. LE PASLIER & H. DAIMS. 2010. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (30): 13479-13484. DOI:10.1073/pnas.1003860107
- MA, Y., J. L. ZILLES & A. D. KENT. 2019. An evaluation of primers for detecting denitrifiers via their functional genes. *Environmental Microbiology* 21 (4): 1196-1210. DOI:10.1111/1462-2920.14555
- MADDELA, N. R., B. SHENG, S.YUAN, Z. ZHOU, R. VILLAMAR-TORRES & F. MENG. 2019. Roles of quorum sensing in biological wastewater treatment: A critical review. *Chemosphere*, 221: 616-629. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.01.064
- MADSEN, J. S., S. J. SØRENSEN & M. BURMÖLLE. 2018. Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Current Opinion in Microbiology*, 42: 104-109. DOI:10.1016/j.mib.2017.11.018
- MATSUMOTO, Y., T. TOSHA, A. V. PISLIAKOV, T. HINO, H. SUGIMOTO, S. NAGANO, Y. SUGITA & Y. SHIRO. 2012. Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nature Structural and Molecular Biology* 19 (2): 238-245. DOI:10.1038/nsmb.2213
- McMAHON, K. D., H. G. MARTIN & P. HUGENHOLTZ. 2007. Integrating ecology into biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 18 (3): 287-292. DOI:10.1016/j.copbio.2007.04.007
- MEHRANI, M. J., D. SOBOTKA, P. KOWAL, S. GIESIELSKI & J. MAKINIA. 2020. The occurrence and role of *Nitrospira* in nitrogen removal systems. *Bioresource Technology* 303: 122936. DOI:10.1016/j.bior-tech.2020.122936
- MIRALLES-ROBLEDILLO, J. M., E. BERNABEU, M. GIANI, E. MARTÍNEZ-SERNA, R. M. MARTÍNEZ-ESPINOSA & C. PIRE. 2021. Distribution of denitrification among haloarchaea: A comprehensive study. *Microorganisms* 9 (8): 1669. DOI:10.3390/microorganisms9081669
- MUSIANI, F., V. BROLL, E. EVANGELISTI & S. CIURLI. 2020. The model structure of the copper-dependent ammonia monoxygenase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 25 (7): 995-1007. DOI:10.1007/s00775-020-01820-0
- NORTON, J. M., J. J. ALZERRECA, Y. SUWA & M. G. KLOTZ. 2002. Diversity of ammonia monoxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology* 177: 139-149. DOI:10.1007/s00203-001-0369-z
- NORTON, J. M., M. G. KLOTZ, L. Y. STEIN, D. J. ARP, P. J. BOTTOMLEY, P. S. G. CHAIN, L. J. HAUSER, M. L. LAND, F. W. LARIMER, M. W. SHIN & S. R. STARKENBURG. 2008. Complete genome sequence of *Nitrospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (11): 3559-3572. DOI:10.1128/AEM.02722-07
- OREN, A., G. M. GARRITY, C. T. PARKER, M. CHUVOCHINA & M. E. TRUJILLO. 2020. Lists of names of prokaryotic *Candidatus* taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (7): 3956-4042. DOI:10.1099/ijsem.0.003789
- OVERMANN, J., S. HUANG, U. NÜBEL, R. L. HAHNKE & B. J. TINDALL. 2019. Relevance of phenotypic information for the taxonomy of not-yet-cultured microorganisms. *Systematic and Applied Microbiology* 42 (1): 22-29. DOI:10.1016/j.syapm.2018.08.009
- Pallen, M. J., A. Telatin & A. Oren. 2021. The next million names for Archaea and Bacteria. *Trends in Microbiology* 29 (4): 289-298. DOI:10.1016/j.tim.2020.10.009
- PARK, S.-J., A.-Ş. ANDREI, P.-A. BULZU, V. S. KAVAGUTTI, R. GHAI & A. C. MOSIER. 2020. Expanded diversity and metabolic versatility of marine nitrite-oxidizing bacteria revealed by cultivation- and genomics-based approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 86 (22): e01667-20. DOI:10.1128/AEM.01667-20
- PARKS, D. H., M. CHUVOCHINA, P.-A. CHAUMEIL, C. RINKE, A. J. MUSSIG & P. HUGENHOLTZ. 2020. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nature Biotechnology* 38 (9): 1079-1086. DOI:10.1038/s41587-020-0501-8
- PARSONS, C., E. E. STÜEKEN, C. J. ROSEN, K. MATEOS & R. E. ANDERSON. 2021. Radiation of nitrogen-metabolizing enzymes across the tree of life

- tracks environmental transitions in Earth history. *Geobiology* 19 (1): 18-34. DOI:10.1111/gbi.12419
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, I., BOHNERT, K. A., CUEBAS, M., KEDDIS, R. & VETRIANI, C. 2013. Detection and phylogenetic analysis of the membrane-bound nitrate reductase (Nar) in pure cultures and microbial communities from deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology* 86 (2): 256-267. DOI:10.1111/1574-6941.12158
- PESTER, M., F. MAIXNER, D. BERRY, T. RATTEL, H. KOCH, S. LÜCKER, B. NOWKA, A. RICHTER, E. SPIECK, E. LEBEDEVA, A. LOY, M. WAGNER & H. DAIMS. 2014. *NxrB* encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. *Environmental Microbiology* 16 (10): 3055-3071. DOI:10.1111/1462-2920.12300
- PETERSEN, D. G., S. J. BLAZEWCZ, M. FIRESTONE, D. J. HERMAN, M. TURETSKY & WALDROP, M. 2012. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environmental Microbiology* 14 (4): 993-1008. DOI:10.1111/j.1462-2920.2011.02679.x
- PHOLCHAN, M. K., J. DE C. BAPTISTA, R. J. DAVENPORT, W. T. SLOAN & T. P. CURTIS. 2013. Microbial community assembly, theory and rare functions. *Frontiers in Microbiology* 4: 68. DOI:10.3389/fmicb.2013.00068
- PILEGAARD, K. 2013. Processes regulating nitric oxide emissions from soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1621): 20130126. DOI:10.1098/rstb.2013.0126
- QIN, H., B. JI, S. ZHANG & Z. KONG. 2018. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants. *Marine Pollution Bulletin* 135: 801-807. DOI:10.1016/j.marpolbul.2018.08.010
- REN, H., Y.-C. CHEN, X. T. WANG, G. T. F. WONG, A. L. COHEN, T. M. DECARLO, M. A. WEIGAND, H.-S. MII & D. M. SIGMAN. 2017. 21st-century rise in anthropogenic nitrogen deposition on a remote coral reef. *Science* 356 (6339): 749-752. DOI:10.1126/science.aal3869
- RINALDO, S. & F. CUTRUZZOLÀ. 2007. Nitrite Reductases in Denitrification. In *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3755. DOI:10.1016/B978-0-444-52857-5.50004-7
- RINKE, C., M. CHUVOCHINA, A. J. MUSSIG, P.-A. CHAUMEIL, D. W. WAITE, W. B. WHITMAN, D. H. PARKS & P. HUGENHOLTZ. 2021. A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database. *Nature Microbiology* 6 (7): 946-959. DOI:10.1038/s41564-021-00918-8
- SAYAVEDRA-SOTO, L. A., B. GVAKHARIA, P. J. BOTTOMLEY, D. J. ARP & M. E. DOLAN. 2010. Nitrification and degradation of halogenated hydrocarbons—a tenuous balance for ammonia-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2): 435-444. DOI:10.1007/s00253-010-2454-1
- SCHER, C., K. FUCHS, D. E. PELSTER & K. BUTTERBACH-BAHL. 2020. Estimating global terrestrial denitrification from measured N₂O: (N₂O + N₂) product ratios. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 47: 72-80. DOI:10.1016/j.cosust.2020.07.005
- SCHMIDT, I. 2004. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB -deficient mutants. *Microbiology* 150 (12): 4107-4114. DOI:10.1099/mic.0.27382-0
- SCHOCH CL, S. CIUFO, M. DOMRACHEV, C. L. HOTTON, S. KANNAN, R. KHOVANSKAYA, D. LEIPE, R. MCVEIGH, K. O'NEILL, B. ROBERTSE, S. SHARMA, V. SOUSSOV, J. P. SULLIVAN, L. SUN, S. TURNER & I. KARSCH-MIZRACHI. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. DOI:10.1093/database/baaa062
- SEITZINGER, S., J. A. HARRISON, J. K. BÖHLKE, A. F. BOUWMAN, R. LOWRANCE, B. PETERSON, C. TOBIAS & G. VAN DRECHT. 2006. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications* 16 (6): 2064-2090. DOI:10.1890/1051-0761(2006)016[2064:da-lawa]2.0.co;2
- SHAHAB, R. L., S. BRETHAUER, M. P. DAVEY, A. G. SMITH, S. VIGNOLINI, J. S. LUTERBACHER & M. H. STUDER. 2020. A heterogeneous microbial consortium producing short-chain fatty acids from lignocellulose. *Science* 369 (6507): eabb1214. DOI:10.1126/science.abb1214
- SHARMA, B. & P. SHUKLA. 2020. Designing synthetic microbial communities for effectual bioremediation: A review. *Biocatalysis and Biotransformation* 38 (6): 405-414. DOI:10.1080/10242422.2020.1813727
- SHIRO, Y. 2012. Structure and function of bacterial nitric oxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817 (10): 1907-1913. DOI:10.1016/j.bbabi.2012.03.001
- SILVA, L. C. F., LIMA, H. S., T. A. DE O. MENDES, A. SARTORATTO, M. P. SOUSA, R. S. DE SOUZA, S. O. DE PAULA, V. M. DE OLIVEIRA & C. C. SILVA. 2020. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. *Scientific Reports* 10 (1): 2215. DOI:10.1038/s41598-020-59279-7
- SOUMARE, A., A. G. DIEDHIOU, M. THUITA, M. HAFIDI, Y. OUHDOUCH, S. GOPALAKRISHNAN & L. KOUISNI. 2020. Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. *Plants (Basel)* 9 (8): 1011. DOI:10.3390/plants9081011
- SPIECK, E. & E. BOCK. 2015. Nitrifying bacteria. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons. Disponible en línea en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.bm00016>
- STARKENBURG, S. R., D. J. ARP & P. J. BOTTOMLEY. 2008a. D-Lactate metabolism and the obligate requirement for CO₂ during growth on nitrite by the facultative lithoautotroph *Nitrobacter hamburgensis*. *Microbiology* 154 (8): 2473-2481. DOI:10.1099/mic.0.2008/018085-0
- STARKENBURG, S. R., F. W. LARIMER, L. Y. STEIN, M. G. KLOTZ, P. S. G. CHAIN, L. A. SAYAVEDRA-SOTO, A. T. PORET-PETERSON, M. E. GENTRY, D. J. ARP, B. WARD & P. J. BOTTOMLEY. 2008b. Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (9): 2852-2863. DOI:10.1128/AEM.02311-07
- STEIN, L. Y. & M. G. KLOTZ. 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26 (3): R94-R98. DOI:10.1016/j.cub.2015.12.021
- STEVENS, C. J. 2019. Nitrogen in the environment. *Science* 363 (6427): 578-580. DOI:10.1126/science.aav8215
- SU, Q., A. R. SCHITTICH, M. M. JENSEN, H. NG & B. F. SMETS. 2021. Role of ammonia oxidation in organic micropollutant transformation during wastewater treatment: Insights from molecular, cellular, and community level observations. *Environmental Science and Technology* 55 (4): 2173-2188. DOI:10.1021/acs.est.0c06466

- TAKAI, K. 2019. The nitrogen cycle: a large, fast, and mystifying cycle. *Microbes and Environments* 34 (3): 223-225. DOI:10.1264/jsme2.ME3403rh
- TOLAR, B. B., J. HERRMANN, J. R. BARGAR, H. VAN DEN BEDEM, S. WAKATSUKI & C. A. FRANCIS. 2017. Integrated structural biology and molecular ecology of N-cycling enzymes from ammonia-oxidizing archaea. *Environmental Microbiology Reports*, 9 (5): 484-491. DOI:10.1111/1758-2229.12567
- TORREGROSA-CRESPO, J., P. GONZÁLEZ-TORRES, V. BAUTISTA, J. M. ESCLAPEZ, C. PIRE, M. CAMACHO, M. J. BONETE, D. J. RICHARDSON, N. J. WATMOUGH & R. M. MARTÍNEZ-ESPINOSA. 2017. Analysis of multiple haloarchaeal genomes suggests that the quinone-dependent respiratory nitric oxide reductase is an important source of nitrous oxide in hypersaline environments. *Environmental Microbiology Reports* 9 (6): 788-796. DOI:10.1111/1758-2229.12596
- TREGO, A. C., S. MILLS & G. COLLINS. 2021. Granular biofilms: function, application, and new trends as model microbial communities. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51 (15): 1702-1725. DOI:10.1080/10643389.2020.1769433
- VAJRALA, N., W. MARTENS-HABBENA, L. A. SAYAVEDRA-SOTO, A. SCHAUER, P. J. BOT-TOMLEY, D. A. STAHL & D. J. ARP. 2013. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (3): 1006-1011. DOI:10.1073/pnas.1214272110
- VIJAYAN, A., R. K. VATTIRINGAL JAYADRADHAN, D. PILLAI, P. PRASANNAN GEETHA, V. JOSEPH & B. S. ISAAC SAROJINI. 2021. *Nitrospira* as versatile nitrifiers: Taxonomy, ecophysiology, genome characteristics, growth, and metabolic diversity. *Journal of Basic Microbiology* 61 (2): 88-109. DOI:10.1002/jobm.202000485
- WAITE, D. W., M. CHUVOCHINA, C. PELIKAN, D. H. PARKS, P. YILMAZ, M. WAGNER, A. LOY, T. NAGANUMA, R. NAKAI, W. B. WHITMAN, M. W. HAHN, J. KUEVER & P. HUGENHOLTZ. 2020. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (11): 5972-6016. DOI:10.1099/ijsem.0.004213
- WANG, S., C. LIU, X. WANG, D. YUAN & G. ZHU. 2020a. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in traditional municipal wastewater treatment plants in China: widespread but low contribution. *Water Research* 179: 115877. DOI:10.1016/j.watres.2020.115877
- WANG, S., Y. PI, Y. SONG, Y. JIANG, L. ZHOU, W. LIU & G. ZHU. 2020b. Hotspot of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) process in freshwater sediments of riparian zones. *Water Research* 173: 115539. DOI:10.1016/j.watres.2020.115539
- WANG, Z., W. LI, H. LI, W. ZHENG & F. GUO. 2020c. Phylogenomics of Rhodocyclales and its distribution in wastewater treatment systems. *Scientific Reports* 10 (1): 3883. DOI:10.1038/s41598-020-60723-x
- WEI, W., K. ISOBE, T. NISHIZAWA, L. ZHU, Y. SHIRATORI, N. OHTE, K. Koba, S. OTSUKA & K. SENOO. 2015. Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *The ISME Journal* 9 (9): 1954-1965. DOI:10.1038/ismej.2015.9
- WERALUPITIYA, C., R. WANIGATUNGE, S. JOSEPH, B. C. L. ATHAPATTU, T.-H. LEE, J. K. BISWAS, M. P. GINIGE, S. S. LAM, P. S. KUMAR & M. VITHANAGE. 2021. Anammox bacteria in treating ammonium rich wastewater: Recent perspective and appraisal. *Bioresource Technology* 334: 125240. DOI:10.1016/j.biortech.2021.125240
- WIDDER, S., R. J. ALLEN, T. PFEIFFER, T. P. CURTIS, C. WIUF, W. T. SLOAN, O. X. CORDERO, S. P. BROWN, B. MOMENI, W. SHOU, H. KETTLE, H. J. FLINT, A. F. HASS, B. LAROCHE, J.-U. KREFT, P. B. RAINEY, S. FREILICH, S. SCHUSTER, K. MILFERSTEDT, J. R. VAN DER MEER, T. GROBKOPF, J. HUISMAN, A. FREE, C. PICIOREANU, C. QUINCE, I. KLAPPER, S. LABARTHE, B. F. SMETS, H. WANG, ISAAC NEWTON INSTITUTE FELLOWS & O. S. SOYER. 2016. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal* 10 (11): 2557-2568. DOI:10.1038/ismej.2016.45
- WITTORF, L., C. M. JONES, G. BONILLA-ROSSO & S. HALLIN. 2018. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases. *Research in Microbiology* 169 (6): 343-347. DOI:10.1016/j.resmic.2018.04.010
- WU, L., X. CHEN, W. WEI, Y. LIU, D. WANG & B.-J. NI. 2020. A Critical Review on Nitrous Oxide Production by Ammonia-Oxidizing Archaea. *Environmental Science and Technology* 54 (15): 9175-9190. DOI:10.1021/acs.est.0c03948
- XIA, L., X. LI, W. FAN & J. WANG. 2020. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresource Technology* 301: 122749. DOI:10.1016/j.biortech.2020.122749
- XU, S., X. WU & H. LU. 2021. Overlooked nitrogen-cycling microorganisms in biological wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 15 (6): 133. DOI:10.1007/s11783-021-1426-2
- YIN, Z., X. BI & C. XU. 2018. Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) in Nitrogen Removal from Wastewater. *Archaea*, 2018: 8429145. DOI:10.1155/2018/8429145
- YU, R. & K. CHANDRAN. 2010. Strategies of *Nitrosomonas europaea* 19718 to counter low dissolved oxygen and high nitrite concentrations. *BMC Microbiology* 10: 70. DOI:10.1186/1471-2180-10-70
- ZEHR, J. P. & D. G. CAPONE. 2020. Changing perspectives in marine nitrogen fixation. *Science* 368 (6492): eaay9514. DOI:10.1126/science.aay9514
- ZHAO, B., D. Y. CHENG, P. TAN, Q. AN & J. S. GUO. 2018. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal. *Bioresource Technology* 250: 564-573. DOI:10.1016/j.biortech.2017.11.038
- ZHENG, M., S. HE, Y. FENG, M. WANG, Y.-X. LIU, C. DANG & J. WANG. 2021. Active ammonia-oxidizing bacteria and archaea in wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Sciences* 102: 273-282. DOI:10.1016/j.jes.2020.09.039
- ZHENG, M., G. MU, A. ZHANG, J. WANG, F. CHANG, J. NIU, X. WANG, T. GAO & Z. ZHAO. 2022. Predominance of comammox bacteria among ammonia oxidizers under low dissolved oxygen condition. *Chemosphere* 308 (Pt 3): 136436. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.136436
- ZUMFT, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4): 533-616. DOI:10.1128/mmb.61.4.533-616.1997