

## II-224 - DIVERSIDAD BACTERIANA EN REACTORES BIOLÓGICOS DURANTE EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES INDUSTRIALES

**Julio César Marín<sup>(1)</sup>**

Licenciado en Biología (La Universidad del Zulia, LUZ, Venezuela), *Magister Scientiarum* en Ciencias Ambientales (LUZ), Doctor en Fisiología, Biología de Organismos, Poblaciones e Interacciones (Université de Caen-Basse Normandie, Francia), Profesor Titular (LUZ).

**Elisabeth Behling**

Ingeniera Civil (LUZ), *Magister Scientiarum* en Ingeniería Ambiental (LUZ), Doctora en Ingeniería Ambiental (LUZ), Profesora Titular (LUZ).

**Nancy Rincón**

Ingeniera Civil (LUZ), *Magister Scientiarum* en Ingeniería Ambiental (LUZ), Doctora en Ingeniería de Procesos y del Medio Ambiente (INSA-Narbonne, Francia), Profesora Titular (LUZ).

**Altamira Díaz**

Ingeniera Civil (LUZ), *Magister Scientiarum* en Ingeniería Ambiental (LUZ), Doctora en Ingeniería de Procesos y del Medio Ambiente (INRA-Toulouse, Francia), Profesora Titular (LUZ).

**Fernando Castro**

Licenciado en Biología y Química (Universidad del Atlántico, Colombia), *Magister Scientiarum* en Ciencias Ambientales (LUZ), Profesor Asociado (Universidad de la Guajira, Colombia).

**Dirección<sup>(1)</sup>:** Avenida Guajira con calle 67 (Cecilio Acosta), Núcleo Técnico, Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia (LUZ). Apartado postal 526, Maracaibo 4001, estado Zulia - Venezuela - Tel: (58)261-4128743 - e-mail: [jmarin@fing.luz.edu.ve](mailto:jmarin@fing.luz.edu.ve)

### RESUMEN

Existe una información muy limitada con relación a la diversidad microbólica y al equilibrio dinámico existente entre las distintas poblaciones microbianas involucradas en los procesos de degradación de la materia orgánica, particularmente en cuanto al tratamiento de aguas residuales industriales. En esta investigación se examinaron las abundancias de los grupos bacterianos presentes en la biopelícula de un reactor RBC de tres etapas, alimentado con un efluente industrial sintético (sacarosa+urea) y en el lodo granular de un reactor UASB, cargado con aguas de producción petrolera (APP), empleando la técnica de tubos múltiples, con la finalidad de aportar herramientas en la predicción y optimización de la eficiencia de dichos sistemas de tratamiento. En el reactor RBC de tres etapas las bacterias nitrificantes (oxidadoras de  $\text{NO}_2^-$  y de  $\text{NH}_4^+$ ) fungieron como el grupo más abundante en las tres cámaras, como resultado de la utilización del N en forma de  $\text{NH}_4^+$  presente en el efluente sintético. También se evidenció la ocurrencia del proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea. En el reactor UASB, por su parte, se obtuvo una elevada remoción de materia orgánica en las APP ( $75,77 \pm 7,40\%$ ), indicando que dicho tratamiento es un proceso viable para la disminución de fracciones orgánicas de hidrocarburos presentes en este tipo de muestras. Las poblaciones de bacterias se encontraron en la siguiente proporción: metanógenos > nitrato-reductoras > acetogénicas > sulfato-reductoras > fermentadoras de glucosa. Las características fisicoquímicas de los influentes de los reactores garantizaron el desarrollo de una comunidad microbiana mixta capaz de degradar los sustratos orgánicos presentes.

**PALABRAS-CLAVE:** Diversidad Bacteriana, Reactor RBC, Reactor UASB, Tratamiento Biológico, Efluentes Industriales.

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de actividades industriales ha contribuido cada vez más a la generación de residuos con elementos potencialmente contaminantes y tóxicos, los cuales en concentraciones altas pueden tener efectos nocivos sobre la salud de la población y afectaciones al equilibrio ecológico. Uno de los problemas más señalados por la sociedad a nivel mundial es la progresiva degradación de los recursos acuáticos naturales causada por la gran diversidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, resultantes de diversas actividades naturales y antropogénicas que generan un irremediable deterioro al ambiente (23).

Los tratamientos biológicos constituyen una alternativa viable para prevenir los impactos ambientales relacionados con la disposición de las aguas residuales industriales de baja toxicidad, ya que utilizan microorganismos (entre las que destacan las bacterias) para llevar a cabo la remoción de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes. La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la reducción de compuestos que contienen elementos nutريentes (N y P) (26).

Entre los sistemas de tratamiento de aguas residuales más ventajosos se encuentran: 1) los reactores biológicos rotativos de contacto (RBC), los cuales permiten un buen desarrollo de una comunidad bacteriana heterogénea capaz de degradar al mismo tiempo materia orgánica y nutrientes como el nitrógeno; paso importante del proceso ya que en muchas ocasiones la remoción del nitrógeno en sus diferentes formas es difícil, debido a que las bacterias responsables de su transformación son de crecimiento lento y son frecuentemente desplazadas por grupos de bacterias heterótrofas de rápido crecimiento (15, 17, 20, 37). Otra de las ventajas que ofrecen los RBC's, es que los grupos bacterianos del nitrógeno tienen una mayor probabilidad de desarrollarse puesto que la edad del lodo puede alcanzar valores mayores que en otros sistemas y no se enfrentan al riesgo de ser lavadas (18), y 2) los reactores anaerobios de manto de lodo de flujo ascendente (UASB), los cuales generan una baja producción de biomasa por unidad de sustrato, requiriendo menor cantidad de nutrientes; tienen un bajo consumo de energía, existiendo la posibilidad de utilizar el gas metano producido como combustible; se pueden utilizar en la degradación de desechos tóxicos provenientes de industrias y biodegradar compuestos xenobióticos, como por ejemplo hidrocarburos alifáticos clorinados; entre otras ventajas (5).

El ciclaje de nutrientes en el ambiente es un proceso complejo, en el caso particular del nitrógeno (N) muchas de las reacciones de transformación están mediadas por microorganismos. Los procesos de nitrificación, desnitrificación, fijación en inmovilización de N requieren de condiciones ambientales particulares y de grupos bacterianos específicos. La nitrificación implica una oxidación quimiolitotrofa de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  (1); es realizada principalmente por bacterias autótrofas que utilizan como fuente de energía iones inorgánicos (por ejemplo: *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*), pero también existe un grupo de bacterias nitrificantes heterótrofas que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Streptomyces* (9). La mayoría de las bacterias desnitrificantes son heterótrofas y algunas utilizan compuestos con un sólo átomo carbono, mientras que otras crecen autotróficamente en base a  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  o compuestos reducidos del sulfuro; un grupo es fotosintético y la mayoría posee las reductasas necesarias para reducir el  $\text{NO}_3^-$ , otras no las tienen y son nitrito-dependientes (19). La fijación de  $\text{N}_2$  comprende diversos géneros de bacterias de vida libre o en simbiosis. Los diversos organismos de vida libre que son capaces de llevar a cabo la fijación biológica de N comprenden cerca de 20 géneros de microorganismos no fotosintéticos aerobios como *Azotobacter* y *Beijerinckia*, y anaerobios como *Clostridium*, también se incluyen cerca de 15 géneros de cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* (16).

Durante el proceso de digestión anaerobia tienen lugar diferentes transformaciones bioquímicas como resultado de la variedad de microorganismos que intervienen en la reducción de sustratos, cuyo metabolismo no puede considerarse de forma independiente ya que la eficacia de cada grupo bacteriano depende de los otros. Una gran variedad de microorganismos coexisten dentro de un biorreactor anaerobio, y cada digestor desde un punto de vista microbiológico es diferente. Si bien el proceso de la digestión anaerobia se ha dividido en etapas (hidrólisis, acidogénica, acetogénica y metanogénicas), la realidad biológica es compleja ya que todas estas reacciones deben estar ocurriendo a la misma velocidad. Grupos funcionales especializados son los responsables de esta biodegradación, tales como: bacterias acidogénicas, acetogénicas, metanógenos, sulfato-reductoras y nitrato-reductoras (27, 31).

El objetivo de esta investigación consistió en examinar las abundancias de los grupos bacterianos presentes en la biopelícula de un reactor RBC de tres etapas, alimentado con un efluente industrial sintético (sacarosa+urea) y en el lodo granular de un reactor UASB, cargado con aguas de producción petrolera (APP), con la finalidad de aportar herramientas en la predicción y optimización de la eficiencia de dichos sistemas de tratamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A) SISTEMA RBC DE TRES CÁMARAS PARA EFLUENTE SINTÉTICO

El sistema RBC de tres cámaras (C1, C2 y C3) fue construido en acrílico transparente y cada cámara estuvo separada por una lámina del mismo material. El volumen total del reactor fue de 9 L (con los discos) y cada

cámara tenía un volumen de 3 L. El primer disco de cada cámara presentaba dos pequeños sujetadores a los cuales se les adjuntaban unos “puertos” rectangulares de plástico lijado con un área conocida, los mismos fueron utilizados para el muestreo de la biopelícula de los discos.

#### **A.1) CONTROL Y ANÁLISIS DEL SISTEMA**

Se utilizó un efluente industrial sintético preparado de acuerdo a lo propuesto por Gupta & Gupta (10), con una proporción de C:N  $\approx 5$  para garantizar la disponibilidad de C hasta la última cámara del reactor, empleando sacarosa (azúcar común) (1000 mg/L) como fuente de carbono, urea agrícola (400 mg/L) como fuente de nitrógeno, así como también  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (75 mg/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (37,5 mg/L) y  $\text{MgSO}_4$  (25 mg/L). Debido a que el proceso de nitrificación produce iones  $\text{H}^+$ , fue necesario sustentar el efluente con  $\text{NaHCO}_3$  (1500 mg/L), con la finalidad de aumentar la alcalinidad y así proveer una buena capacidad amortiguadora.

Durante la fase experimental se estableció un flujo continuo con una carga orgánica (CO) aplicada en la primera cámara de  $29,42 \text{ gDQO/m}^2\text{.d}$  y de  $9,80 \text{ gDQO/m}^2\text{.d}$  como CO global; para un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 12 h y 30 días de operación.

Diariamente se efectuaron mediciones de pH, oxígeno disuelto y alcalinidad total en la entrada (influente) y en las salidas (efluentes) de las tres cámaras del reactor. Tres veces por semana se realizaron análisis de demanda química de oxígeno (DQO) y de las formas de N, siguiendo los métodos estándares (2).

#### **A.2) CUANTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS BACTERIANOS**

En cuanto a la abundancia de los grupos microbianos, se cuantificaron las bacterias relacionadas con la dinámica del nitrógeno (nitrobacterias): fijadoras de  $\text{N}_2$ , oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$ , oxidadoras de  $\text{NO}_2^-$  y desnitrificantes, empleándose la técnica de tubos múltiples para estimar el NMP/100 g (2, 24, 33, 34), mediante el uso de medios selectivos propuestos por Verhagen *et al.* (33, 34).

#### **B) SISTEMA UASB PARA AGUAS DE PRODUCCIÓN PETROLERA**

Para estos ensayos se utilizaron dos reactores UASB a escala de laboratorio, con volumen útil de 4000 mL, inoculados con 1200 mL (23,8% del volumen total) de lodo granular anaerobio proveniente de un reactor UASB de una industria cervecera de la localidad. Fueron alimentados a flujo continuo por 60 d (2,5 mL/min), utilizando bombas peristálticas y aplicando un TRH de 24 h, a una temperatura de operación de  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **B.1) CONTROL Y ANÁLISIS DEL SISTEMA**

Luego del periodo de aclimatación (usando glucosa como fuente de carbono y energía), uno de los reactores se alimentó con APP provenientes de la extracción de petróleo liviano (31,1–39,0°API), las cuales contenían una DQO de  $712,83 \pm 146,87 \text{ mg/L}$ . El segundo reactor se continuó cargado con el afluente sintético que contenía glucosa.

Diariamente se monitorearon los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, alcalinidad total y DQO, en el efluente de los dos reactores UASB, aplicando métodos estándares (2).

#### **B.2) CUANTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS BACTERIANOS**

Todos los procedimientos aplicados durante la cuantificación de los grupos funcionales fueron realizados bajo condiciones anaeróbicas, empleando una cámara de atmósfera controlada marca PLAS LABS (Lansing, MI, USA), cuyo gas de alimentación estaba compuesto por  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (84,22; 10,79 y 4,99%, respectivamente), a una temperatura interna de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

El recuento de los grupos funcionales fue realizado por la técnica de tubos múltiples (2), estimándose el número más probable de microorganismos por cada 100 g de muestra (NMP/100 g). Los grupos funcionales estudiados, así como los medios de cultivo empleados fueron los siguientes: bacterias fermentadoras de glucosa (BFG) en

OF basal medium HIMEDIA (13, 22), bacterias acetogénicas (BAC) en reinforced clostridial broth HIMEDIA (14, 30), metanógenos (MET) en medio selectivo propuesto por Boone *et al.* (4), bacterias sulfato-reductoras (BSR) en sulphate API agar HIMEDIA (11, 28) y bacterias nitrato-reductoras (BNR) en indole nitrate medium HIMEDIA (8, 12). Todos los medios de cultivo inoculados fueron incubados en condiciones anaerobias (jarras anaerobias de MERCK® con sobres de Anaerocult® A y con Anaerotest®) y mesofílicas a 35±2°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL REACTOR RBC DE TRES CÁMARAS

Los análisis de varianza mostraron diferencias significativas ( $p<0,001$ ) para la densidad de bacterias del nitrógeno con respecto al TRH y a las diferentes cámaras del reactor (C1, C2 y C3), así como para la interacción entre ambas variables.

En la Tabla 1 se presentan las densidades de las bacterias del nitrógeno cuantificadas en el reactor RBC. Las bacterias nitrificantes (oxidadoras de  $\text{NO}_2^-$  y de  $\text{NH}_4^+$ ) fue el grupo más abundante en las tres cámaras, como resultado de la utilización del N en forma de  $\text{NH}_4^+$  presente en el efluente sintético. Los grupos bacterianos relacionados con la nitrificación están estrechamente unidos, ya que forman parte de un proceso de dos pasos, que además está afectado por numerosas variables ambientales (6, 24).

**Tabla 1: Densidades de nitrobacterias (NMP/100 g) presentes en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras.**

CÁMARA DEL REACTOR	BACTERIAS FIJADORAS DE $\text{N}_2$	BACTERIAS OXIDADORAS DE $\text{NH}_4^+$	BACTERIAS OXIDADORAS DE $\text{NO}_2^-$	BACTERIAS DESNITRIFICANTES
C1	$2,9 \times 10^6$	$>6,2 \times 10^8$	$>6,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
C2	$1,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$>9,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
C3	$2,7 \times 10^7$	$>1,9 \times 10^{10}$	$>1,9 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^7$

Las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  se presentaron en menor proporción, con una tendencia similar a las bacterias nitrificantes en las tres cámaras (valores mayores en C3), lo cual pudo resultar del metabolismo quimiolitoautótrofo que tienen en común ambos grupos bacterianos. Boller *et al.* (3), establecieron que estos microorganismos tienden a favorecerse en condiciones donde la materia orgánica biodegradable ya ha sido removida.

### DIVERSIDAD BACTERIANA EN REACTORES UASB

La abundancia de los grupos microbianos estudiados en los reactores UASB alimentados con glucosa y APP fueron significativamente diferentes ( $p<0,05$ ), exceptuando a las BNR (Tabla 2). El orden de abundancia de los grupos bacterianos fue mayor para la glucosa ( $10^8$ ) respecto a las APP ( $10^5$ ), lo cual pudiera ser indicativo de la inhibición del crecimiento debido a la presencia de sustancias tóxicas en las APP, de acuerdo con lo establecido por Chen *et al.* (7), Liu *et al.* (21) y Rincón *et al.* (25).

**Tabla 2: Abundancia de los grupos bacterianos (NMP/100 g) presentes en el lodo anaerobio de los reactores UASB alimentados con APP y glucosa.**

GRUPO BACTERIANO	REACTOR APP	REACTOR GLUCOSA
Bacterias fermentadoras de glucosa	$4,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^9$
Bacterias acetogénicas	$3,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^8$
Metanógenos	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$
Bacterias sulfato-reductoras	$2,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^8$
Bacterias nitrato-reductoras	$9,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^8$

La proporción diferencial de los grupos microbianos en ambos reactores UASB está directamente influenciada por la composición del afluente utilizado, particularmente en cuanto a las fuentes de materia orgánica se refiere. Por ejemplo, la glucosa se encuentra poco disponible en las APP a diferencia del reactor alimentado con el

efluente sintético que contenía dicho carbohidrato como única fuente de carbono y energía. En tal sentido, las BFG representaron el 61% de los grupos bacterianos estudiados en el reactor glucosa, en oposición al 1% encontrado en el reactor APP. Por su parte, los MET constituyeron el 57% de la densidad microbiana en el reactor APP, mientras que en el reactor glucosa fueron 10%, lo cual demuestra la eficiencia de estos microorganismos en la utilización de los productos hidrocarbonados presentes en las APP como fuentes de carbono, para su bioconversión a CH<sub>4</sub>. Dicho proceso es posiblemente gracias a que bajo ciertas condiciones los MET tienden a dominar por sobre otros grupos funcionales (32, 36). La degradación de los constituyentes del petróleo mediada por MET ha sido reportada en diversos estudios (29, 35).

## CONCLUSIONES

Las bacterias nitrificantes (oxidadoras de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) fueron el grupo más numeroso en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras, seguido de las desnitrificantes y fijadoras de N<sub>2</sub>. Las características fisicoquímicas del influente favorecieron la coexistencia de los distintos grupos de nitrobacterias. La abundancia de estas bacterias estableció la calidad del efluente tratado. Adicionalmente, se evidenció la ocurrencia del proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea, debido a la presencia de ambos grupos bacterianos en la biopelícula de las tres cámaras del reactor RBC.

Se obtuvo una elevada remoción de materia orgánica en las APP (75,77±7,40%), indicando que el tratamiento con reactores UASB es proceso viable para la disminución de fracciones orgánicas de hidrocarburos presentes en este tipo de muestras. Los resultados muestran diferencias significativas entre las densidades de los grupos microbianos evaluados en ambos reactores, con una proporción de BFG > BSR > MET > BAC > BNR para glucosa y de MET > BNR > BAC > BSR > BFG para APP. Por otra parte, se observó el dominio de los MET en el reactor alimentado con APP. Las características fisicoquímicas de los influentes de los reactores garantizaron el desarrollo de una comunidad microbiana mixta para degradar los sustratos orgánicos presentes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHN Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v41, p.1709-1721, 2006.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> Edition. Washington DC (USA). 1998.
3. BOLLER M., GUJER W., TSCHUI M. Parameters affecting nitrifying biofilm reactors. *Wat. Sci. Techol.*, v29, n.10-11, p.1-11, 1994.
4. BOONE D., JOHNSON R., LIU Y. Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of  $k_m$  for H<sub>2</sub> or formate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.*, v55, n.7, p.1735-1741, 1989.
5. CAMPOS J. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro. Rede Cooperativa de Pesquisas. Projeto PROSAB. 1999.
6. CHEN S., LING J., BLANCHETON J. P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult. Eng.*, v34, p.179-197, 2006.
7. CHEN Y., CHENG J., CREAMER K. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Biores. Technol.*, v.99, n.10, p. 4044-4064, 2008.
8. DOWELL V., LOMBARD F., THOMPSON F., ARMFIELD A. Media for isolation characterization and identification of obligately anaerobic bacteria. CDC Laboratory manual. Atlanta. Center for disease control. 46 p. 1977.
9. GARZON M. A. Mecanismos no convencionales de transformación y remoción del nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería Hidráulica en México*, v.20, n.4, p.137-149, 2005.
10. GUPTA A., GUPTA S. Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm. *Wat. Res.*, v.33, n.2, p.555-561, 1999.
11. HIMEDIA M309. Sulphate API agar. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
12. HIMEDIA M364. Indol nitrate medium. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>

13. HIMEDIA M395. OF basal medium. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
14. HIMEDIA M443. Reinforced clostridial broth. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
15. HOCHHEIMER J. N., WHEATON F. Biological filters: trickling and RBC desing. Proceedings of the Second International Conference on Recirculating Aquaculture. AES Tech Session 2. Libey, G. S. (Ed), Timmons, M.B. 1998.
16. HUBBELL D. H., KIDDER G. Biological nitrogen fixation. Fact Sheets of the Soil and Water Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. USA. 2003.
17. JETTEN M., WAGNER M., FUERST J., VAN LOOSDRECHT M., KUENEN G., STROUS M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ("anammox" process). Current Opinion in Biotechnology, v.12, p.283-288, 2001.
18. KINDAICHI T., ITO T., OKABE S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, p.1641-1650, 2004.
19. KNOWLES R. Denitrification. Microbiological Reviews, v.46, n.1, p.43-70, 1982.
20. LAPLANCHE A., MORVAN J., PHUONG N. The inhibition of nitrifying biofilm. Programme de Recherche Franco-Vietnam de l'Eau. Vachaud G., Dong N. 2005.
21. LIU X., HE R., SHEN D. Studies on the toxic effects of pentachlorophenol on the biological activity of anaerobic granular sludge. J. Environ. Management, v.88, n.4, p.939-946, 2008.
22. MACFADDIN J. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3<sup>rd</sup> edition. Lippincott. Williams & Wilkins, Baltimore. 800 p. 2000.
23. MOREIRA A., DUARTE M., NANDENHA J., MACEDO G. Estudio del mecanismo de remoción de hierro y cobre presentes en aceites lubricantes usados mediante bioadsorción. Inf. Tec., v.19, n.1), p.57-68, 2008.
24. OKABE S., OOZAWA Y., HIRATIA K., WATANABE Y. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. Wat. Res., v.30, n.7, p.1563-1572, 1996.
25. RINCÓN N., CHACÍN E., MARÍN J., TORRIJOS M., MOLETTA R., FERNÁNDEZ N. Anaerobic biodegradability of water separated from extracted crude oil. Environ. Technol., v.24, n.8, p.963-970, 2003.
26. RODRÍGUEZ A., LETÓN P., ROSAL R., DORADO M., VILLAR S. SANZ J. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Capítulo 2: Tecnologías convencionales. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid. pp. 16-43. 2006.
27. ROEST K. Microbial community analysis in sludge of anaerobic wastewater treatment systems: Integrated culture-dependent and culture-independent approaches. Ph.D. Dissertation. Wageningen University, The Netherlands. 2007.
28. SAND M., LA ROCK P., HODSON R. Ratio-isotope assay for the quantification of sulfate-reducing bacteria in sediments and water. Appl. Microbiol., v.9, n.5, p.626-634, 1975.
29. SATOH H., MIURA Y., TSUSHIMA H., OKABE S. Layered structure of bacterial and *Archaeal* communities and their in situ activities in anaerobic granules. Appl. Environ. Microbiol., v.73, n.22, p.7300-7307, 2006.
30. SCHÖBITZ R., URIBE C., MOLINA H., ESPINA F. Control del desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo gouda empleando diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. Agro Sur, v.33, n.1, p.48-57, 2005.
31. SOUBES M. Microbiología de la digestión anaerobia. III Taller y Seminario Latinoamericano. Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Montevideo. Uruguay. 1994.
32. STAMS A., PLUGGE C., BOK F., HOUTEN B., LENZ P., DIJKMAN H., WEIJMA J. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. Wat. Sci. Technol., v.52, n.1-2, p.13-20, 2005.
33. VERHAGEN F., DUYTS H., LAAMBROEK H. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns. Appl. Environ. Microbiol., v.8, n.10, p.3303-3311, 1992.
34. VERHAGEN F., LAAMBROEK H. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. Appl. Environ. Microbiol., v.57, n.11, p.3255-3263, 1991.

35. WATANABE K., KODAMA Y., HAMAMURA N., KAKU N. Diversity, abundance, and activity of Archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of a fan underground crude oil storage cavity. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.8, n.8, p.3899-3907, 2002.
36. WEN-TSO L., ON-CHIM C., HERBERT H. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Wat. Res.*, v.36, p.1767-1775, 2002.
37. YANG P. Y., ZHANG Z. Q. Nitrification and denitrification in the wastewater treatment system. *Proceedings of the UNESCO-University of Tsukuba International Seminar on Traditional Technology for Environmental Conservation and Sustainable Development in the Asian-Pacific Region*. pp. 145-158. 1995.