

Nitrobacterias en reactores biológicos rotativos de contacto (RBC) de tres cámaras bajo diferentes cargas orgánicas

**Julio César Marín^{1,*}, Evelín Castro¹, Elisabeth Behling¹,
Gilberto Colina¹, Laugeny Díaz², Nancy Rincón¹**

¹Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA),
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería.

²Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia (LUZ),
Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela. *E-mail: jmarin@fing.luz.edu.ve

Recibido: 30-09-11 Aceptado: 01-12-11

Resumen

En esta investigación se evaluó la variabilidad en la densidad de grupos bacterianos relacionados con la dinámica del nitrógeno en la biopelícula de un reactor biológico rotativo de contacto (RBC) de tres cámaras, a escala de laboratorio, bajo diferentes cargas orgánicas (en función de la variación del tiempo de retención hidráulico, TRH). Se estudiaron tres TRH (24, 12 y 6 h), empleando un efluente sintético que contenía sacarosa y urea como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Se monitorearon los siguientes parámetros fisicoquímicos y formas de N: pH, alcalinidad total, oxígeno disuelto, demanda química de oxígeno (DQO), NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ y N-total (métodos estándares), así como la densidad de bacterias nitrificantes (oxidadoras de NH_4^+ y de NO_2^-), desnitrificantes, fijadoras de N_2 ; por la técnica de tubos múltiples con medios de cultivo selectivos, y conteo de heterótrofos. Las densidades de nitrobacterias estuvieron entre $1,2 \times 10^6$ y $>2,5 \times 10^{10}$ NMP/100 g peso seco. Los resultados muestran que la abundancia de bacterias estuvo afectada tanto por la carga orgánica, como por posición en las cámaras del reactor. Se evidenció la ocurrencia del proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea, mediante la detección de ambos grupos bacterianos en la biopelícula.

Palabras clave: bacteria, carga orgánica, nitrógeno, reactor RBC, tratamiento biológico.

Nitrobacteria in three stages rotating biological contactor (RBC) reactors under different organic loads

Abstract

Research was undertaken to evaluate the variability in densities of bacterial groups related to nitrogen dynamic in biofilm of a rotating biological contactor (RBC) reactor of three stages, in laboratory conditions, under different organic loads (based on the variation of hydraulic retention time, HRT). Three HTR were studied (24, 12 and 6 h), using a synthetic effluent that contained saccharose and urea, as sources of carbon and nitrogen, respectively. The following physico-chemical parameters and N forms were

monitored: pH, total alkalinity, dissolved oxygen, chemical oxygen demand (COD), NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ and N-total (standard methods), as well as the density of nitrifying (NH_4^+ and NO_2^- oxidizing bacteria), denitrifying, N_2 fixing bacteria, by multiple tubes technique with selective culture media, and heterotrophs count. The nitrobacteria densities were between $1,2 \times 10^6$ and $>2,5 \times 10^{10}$ MPN/100 g dry weight. The results show that the bacteria abundance was affected so much by the organic load, as by position in the reactor stages. The occurrence of the simultaneous nitrification-denitrification process was verified, by means of the detection of both bacterial groups in the biofilm.

Key words: bacteria, biological treatment, nitrogen, organic load, RBC reactor.

Introducción

La necesidad de prevenir daños ambientales a los cuerpos receptores ha llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan la eliminación de los nutrientes presentes en las aguas residuales, especialmente aquellos producidos por las actividades humanas. Entre estas tecnologías se pueden mencionar los reactores biológicos rotativos de contacto (RBC), los cuales, debido a que permiten un mejor desarrollo de una comunidad bacteriana heterogénea capaz de degradar al mismo tiempo materia orgánica y nutrientes como el nitrógeno, proporcionan una mejor eficiencia durante el tratamiento de efluentes complejos. En el caso del nitrógeno, las bacterias responsables de su transformación son de crecimiento lento y frecuentemente se ven desplazadas por grupos de heterótrofos de rápida proliferación [18]. Otra de las ventajas que ofrecen los reactores RBC, es que los grupos bacterianos del nitrógeno tienen una mayor probabilidad de desarrollarse puesto que la edad de la biopelícula puede alcanzar valores mayores que en otros sistemas y no se enfrentan al riesgo de ser lavadas [12].

Debido a los serios problemas que conlleva la contaminación por nutrientes, así como a la importancia de las bacterias asociadas con la transformación del nitrógeno en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y al auge que tienen actualmente los biodiscos como alternativa para ayudar a cumplir con los límites de descarga que cada día son más restrictivos, resulta evidente efectuar estudios encaminados a comprender los procesos que tienen lugar dentro de estos sistemas biológicos, explicando los mecanismos de remoción de los diferentes contaminantes. En tal sentido, en el presente estudio se evaluó la variabilidad de bacterias asociadas a la transformación del nitrógeno en la biopelícula de un reactor RBC de tres cámaras, sometido a diferentes cargas orgánicas. La ventaja de la compartimentalización (diferentes cámaras o etapas) en reactores RBC, obedece a la maximización de la remoción de la DBO_5 y del nitrógeno amoniacal (NH_4^+) [6].

Parte Experimental

Descripción del reactor RBC de tres cámaras

El sistema RBC de tres cámaras (Figura 1) fue construido en acrílico transparente y cada cámara estuvo separada por una lámina del mismo material, la cual contaba con tres aberturas de 2 cm de diámetro cada una para permitir el paso del efluente en tratamiento. Los discos de acrílico lijado giraban con la ayuda de un eje tipo tornillo sin fin de aproximadamente 90 cm de largo, conectado a un motor de rotación acoplado a un controlador de velocidades. El volumen total del reactor fue de 9 L (con los discos) y cada cámara tenía un volumen de 3 L (Tabla 1). 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.

Figura 1. Representación del reactor RBC de tres cámaras empleado en el presente estudio. C1, C2 y C3: cámaras.

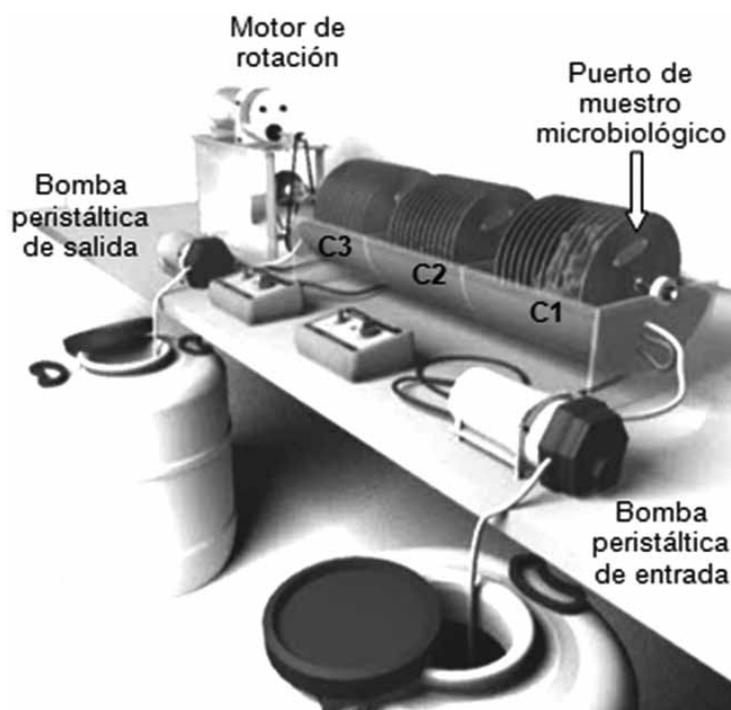


Tabla 1. Dimensiones y características del reactor RBC de tres cámaras, empleado en el presente estudio.

Característica	Valor
Diámetro del disco (cm)	18
Diámetro del tanque (cm)	23
Área total de contacto (m ²)	1,836
Porcentaje de sumergencia (%)	40
Número de cámaras	3
Número de discos por cámara	12
Espaciamiento entre discos (cm)	1
Diámetro del eje (pulg)	3/8"
Longitud total del reactor (cm)	61
Volumen útil del reactor (L)	9
Velocidad de giro del disco (rpm)	10
Tiempo de retención hidráulica (h)	24, 12, 6

Etapas de experimentación

Se utilizó un efluente industrial sintético preparado de acuerdo a lo propuesto por Gupta y 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) (1.000 mg/L) como fuente de carbono, urea agrícola (400 mg/L) como fuente de nitrógeno, así como también Na₂HPO₄ (75 mg/L), KH₂PO₄ (37,5 mg/L) y MgSO₄

(25 mg/L). Debido a que el proceso de nitrificación produce iones H^+ , fue necesario sustentar el efluente con $NaHCO_3$ (1.500 mg/L), con la finalidad de aumentar la alcalinidad y así proveer una buena capacidad amortiguadora.

El inóculo para el RBC se obtuvo de una planta de tratamiento aerobio de la región Zuliana. Este lodo fue mezclado con el efluente industrial sintético y dispuesto dentro del reactor para estimular el crecimiento de la microflora sobre los discos. El sistema fue alimentado de manera discontinua a un tiempo de contacto de 24 h con efluente sintético, hasta observar una carga microbiana adecuada y lograda la estabilidad de los parámetros operacionales. Posteriormente, el RBC operó bajo la modalidad de flujo continuo, estableciéndose las condiciones que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Fases de experimentación en el sistema RBC de tres cámaras alimentado con el efluente industrial sintético (sacarosa+urea).

Etapa	Días de experimentación	CO _{aplicada} 1 ^{ra} cámara (gDQO/m ² .d)	CO _{aplicada} global (gDQO/m ² .d)	TRH (h)
I	33	14,71	4,90	24
II	30	29,42	9,80	12
III	36	58,82	19,60	6

CO: carga orgánica, DQO: demanda química de oxígeno, THR: tiempo de retención hidráulica

Diariamente se efectuaron mediciones de pH, oxígeno disuelto y alcalinidad total en la entrada (influyente) y en las salidas (efluentes) de las tres cámaras del reactor (C1, C2 y C3: Figura 1). Tres veces por semana se realizaron análisis de demanda química de oxígeno (DQO) (reflujo cerrado), NO_2^- (método colorimétrico), NO_3^- (método de reducción en columna de cadmio), NH_4^+ (método potenciométrico directo) y nitrógeno total Kjeldahl (NTK) (método volumétrico), siguiendo los métodos estándares [2]. Las concentraciones de nitrógeno total (N-total) fueron estimadas según: $N\text{-total} = NTK (N\text{-orgánico} + NH_4^+) + N\text{-inorgánico} (NO_2^- + NO_3^-)$.

Nitrobacterias

En cuanto a la abundancia de los grupos microbianos relacionados con la dinámica del nitrógeno (nitrobacterias), se empleó la técnica de tubos múltiples para estimar el NMP/100g peso seco (PS) [2, 14, 16, 17], utilizando medios selectivos para cada grupo particular (Tabla 3). La composición de la solución de elementos traza utilizada para la preparación de estos medios fue la siguiente: 0,1 g/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,2 g/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,002 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,02 g/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ [16, 17].

Una porción conocida de la biopelícula adherida a los “puertos de muestreo” de cada cámara (Figura 1), fue mezclada con 100 mL de solución buffer fosfato, compuesta por 0,139 g de K_2HPO_4 y 0,027 g KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada a pH = 7 [1]. Se efectuaron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-4} con solución buffer fosfato y se inocularon 3 series de 4 tubos cada una, usando los medios de cultivos correspondientes (Tabla 3). La incubación se realizó a temperatura ambiente ($\approx 28^\circ C$) durante 21 d. Las transformaciones bioquímicas llevadas a cabo en cada uno de los medios de cultivo, se corroboraron usando cepas controles ATCC positivas y negativas. Otra porción de la biopelícula adherida a los puertos se utilizó para la estimación del peso seco (PS) mediante secado a $105^\circ C$ durante 24 h, lo cual permitió expresar los resultados en NMP/100 gPS.

Tabla 3. Medios selectivos utilizados para el cultivo de nitrobacterias en el presente estudio [16, 17].

Compuesto (g/L)	Medio libre de N (bacterias fijadoras de N ₂)	Medio amonio (bacterias oxidadoras de NH ₄ ⁺)	Medio nitrito (bacterias oxidadoras de NO ₂ ⁻)	Medio nitrato (bacterias desnitrificantes)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,5	-	-
KNO ₂	-	-	0,01	-
KNO ₃	-	-	-	0,02
NaHPO ₄	0,189	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	1,0	1,0	1,0
KH ₂ PO ₄	0,011	0,027	0,027	0,027
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,006	0,03	0,03	0,03
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,3	0,1	0,1
CaCO ₃	-	7,5	1,0	1,0
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,02	-	-	-
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	-	-	-
NaHCO ₃	0,05	-	-	-
CaCl ₂	-	0,01	0,3	0,3
Solución elementos traza	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
pH	7,8	7,5	7,5	7,5

Los tubos destinados a la estimación de bacterias fijadoras de nitrógeno fueron forrados con papel aluminio para evitar el crecimiento de cianobacterias, mientras que los utilizados para bacterias desnitrificantes se incubaron en campanas anaerobias marca Merck con sobres de anaerobiosis Anaerocult[®] C marca Merck e indicador de anaerobiosis Anaerotest[®]. El resto de los grupos microbianos fue incubado bajo condiciones aerobias.

Al final del período de incubación se seleccionaron los tubos positivos para cada grupo bacteriano, tomando una alícuota de 1 mL de cultivo y adicionando el reactivo correspondiente. Para las bacterias fijadoras de nitrógeno, se agregó 0,5 mL de reactivo de color para nitritos (compuesto por sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina dihidrocloruro) [2], con el fin de observar la presencia de NO₂⁻ y en otra alícuota de cultivo 0,5 mL de reactivo de Nessler (compuesto por HgI₂, KI y NaOH) para observar la presencia de NH₄⁺. Para determinar los tubos positivos de bacterias oxidadoras de amonio, oxidadoras de nitritos y desnitrificantes, se detectó la presencia de NO₂⁻ con el reactivo de color.

También se realizó un conteo de heterótrofos usando la técnica de placa vertida [2] con agar conteo Hi-Media. Para ello, una porción conocida de la biopelícula adherida a los “puertos de muestreo” de cada cámara (Figura 1), fue suspendida en 100 mL de solución peptonada salina estéril (compuesta por 1 g de peptona/L y 8 g de NaCl/L), a partir de la cual se efectuaron diluciones apropiadas. Las placas fueron incubadas a 35°C por 48 h. Otra porción de la biopelícula adherida a los puertos se utilizó para la estimación del peso seco (PS) mediante secado a 105°C durante 24 h, lo cual permitió expresar los resultados en UFC/gPS [2].

Resultados y Discusión

Parámetros fisicoquímicos y formas de nitrógeno

La Tabla 4 muestra los valores medios y desviaciones estándares para los parámetros fisicoquímicos y las diferentes formas de nitrógeno monitoreadas durante el presente estudio. Los valores de pH, alcalinidad total y oxígeno disuelto se mantuvieron dentro de los rangos establecidos para garantizar un sistema de amortiguamiento y el desarrollo de una comunidad microbiana mixta en la biopelícula del reactor [9]. Se observó una elevada remoción de materia orgánica en la primera cámara del reactor para todos los TRH aplicados (% remociones globales de DQO de 92,8; 96,2 y 94,5%, para TRH de 24, 12 y 6 h, respectivamente). El contenido inicial de N-orgánico del influente fue rápidamente hidrolizado y transformado por las bacterias a NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ . El N-total fue eficientemente removido en el sistema, con un 74,1% de reducción en la primera cámara bajo el TRH de 24 h; los aspectos relativos a la transformación microbiológica de las formas de N serán discutidos posteriormente. Elevadas concentraciones de NO_3^- fueron obtenidas en el efluente final, particularmente para el TRH de 6 h ($261,27 \pm 112,88 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$) (Tabla 4).

Nitrobacterias

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

Bacterias nitrificantes

En la Figura 2 se presentan las densidades de bacterias oxidadoras de NO_2^- y de NH_4^+ durante las diferentes etapas del período experimental. Los mayores valores fueron obtenidos en C3 bajo un TRH de 6 h ($> 2,5 \times 10^{10}$ y $2,2 \times 10^{10}$ NMP/100 gPS), mientras que los menores se presentaron en C1 (TRH de 6 h) ($1,9 \times 10^8$ NMP/100 gPS) y en C2 (TRH de 12 h) ($2,1 \times 10^7$ NMP/100 gPS), respectivamente.

Se observó que la disminución de la carga orgánica produjo un incremento de la densidad de bacterias oxidadoras de NH_4^+ en C1 ($r = -0,9605$) y C2 ($r = -0,9307$), pero ocasionó su descenso en C3 ($r = 0,9993$). El paso del influente a través de las cámaras del reactor provocó un aumento en la densidad de estos microorganismos durante todas las etapas experimentales (Figura 2).

Figura 2. Densidades de nitrobacterias (NMP/100 gPS) y heterótrofos (UFC/gPS) en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras bajo diferentes cargas orgánicas. A: bacterias oxidadoras de NO_2^- , B: bacterias oxidadoras de NH_4^+ , C: bacterias desnitrificantes, D: bacterias fijadoras de N_2 y E: heterótrofos. C1, C2 y C3: cámaras. TRH: tiempo de retención hidráulica.

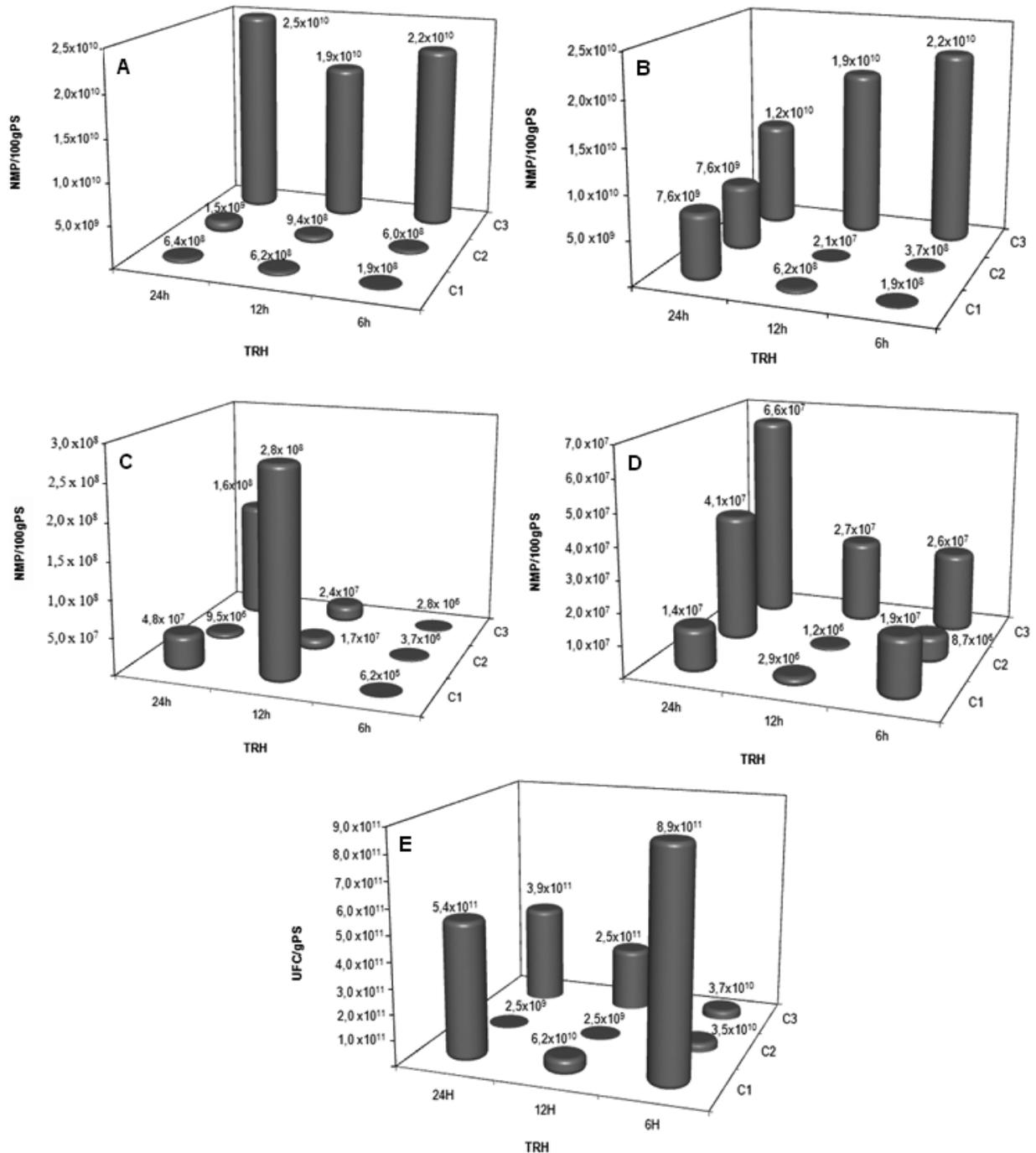


Tabla 4. Valores medios y desviaciones estándares de los parámetros fisicoquímicos y formas de nitrógeno evaluados durante el tratamiento del efluente industrial sintético (sacarosa+urea) en el sistema RBC de tres cámaras, con respecto al tiempo de retención hidráulica aplicado (TRH) y las cámaras (C1, C2 y C3).

Etapa	TRH (h)	pH	AT (mgCaCO ₃ /L)	OD (mg/L)	DQO (mg/L)	NO ₂ ⁻ (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-total (mg/L)
I	24	8,02±0,45	975,4±43,5	6,01±0,84	1.244,86±93,43	1,34±0,12	1,89±0,25	17,53±11,26	215,90±6,45
C1		8,26±0,34	960,9±87,5	6,12±0,67	81,32±4,12	26,54±8,47	22,79±10,37	5,87±0,72	55,83±12,32
C2		8,40±0,33	930,2±102,6	6,82±0,44	66,57±11,45	29,29±6,85	31,07±8,62	4,20±0,86	65,18±10,69
C3		8,44±0,34	920,9±106,5	6,78±0,41	90,22±4,25	30,42±6,87	36,46±8,58	3,94±0,88	71,43±10,46
I	12	8,12±0,26	972,9±109,2	6,34±1,09	1.190,93±85,97	1,22±0,20	2,01±0,33	17,24±8,24	226,60±4,21
C1		8,19±0,15	995,5±64,9	3,74±1,11	48,94±9,35	3,91±1,30	36,35±2,96	7,11±1,27	80,70±8,30
C2		8,34±0,16	937,7±80,8	4,40±0,47	42,73±14,90	7,07±1,08	42,11±8,30	5,66±1,10	80,49±8,72
C3		8,34±0,10	924,6±59,8	4,42±0,26	44,92±6,83	15,67±2,30	45,20±7,33	4,98±1,40	83,96±7,79
I	6	8,18±0,06	970,0±54,3	6,22±1,20	1.222,23±87,81	1,28±0,25	1,93±0,66	17,68±7,32	221,74±7,33
C1		8,28±0,09	1.190,5±77,8	0,09±0,03	153,57±22,67	1,51±0,41	1,99±0,64	73,01±5,10	87,31±5,19
C2		8,37±0,06	1.160,0±69,1	1,35±0,72	75,47±16,60	3,35±1,02	52,92±13,24	63,04±4,30	136,98±14,22
C3		8,38±0,06	1.112,5±44,4	3,38±0,50	66,87±13,61	8,96±3,44	261,27±112,88	54,26±6,67	340,55±111,28

I: influente, AT: alcalinidad total, OD: oxígeno disuelto, n = 28 (TRH=24 h), 25 (TRH=12 h), 31 (TRH=6 h).

En cuanto a las bacterias oxidadoras de NO_2^- , la disminución de la carga orgánica tuvo un efecto negativo sobre su abundancia en todas las cámaras ($r = -0,7810$; $-0,9987$ y $-0,6546$ para C1, C2 y C3, respectivamente). De igual manera, el paso del influente a través del reactor RBC (desde C1 hasta C3), originó la proliferación de estas bacterias ($r = 0,8811$; $0,8735$ y $0,8741$ para los TRH de 24, 12 y 6 h, respectivamente). El incremento en la densidad de bacterias oxidadoras de NO_2^- de una cámara a otra, correspondió con las variaciones en las concentraciones de NO_3^- (Figura 2, Tabla 4), alcanzando una alta proporción ($2,2 \times 10^{10}$ NMP/100 gPS) en C3 al TRH de 6 h. Dicho hallazgo explica las altas concentraciones de NO_3^- encontradas en esta cámara al TRH indicado (Tabla 4).

La abundancia de bacterias nitrificantes (crecimiento lento) [13, 18] pudo haber sido influenciada por la proliferación de heterótrofos, los cuales muestran un crecimiento rápido en presencia de altas concentraciones de materia orgánica, superando a las nitrificadoras autótrofas [14], particularmente en C1. Dicho comportamiento puede ser visualizado en la Figura 2, donde se observa una mayor densidad de bacterias nitrificantes cuando la población de heterótrofas disminuye.

El efecto de la relación C:N sobre la nitrificación en reactores RBC, ha sido reportado por Okabe *et al.* [14], utilizando una razón C:N = 1,5. Ellos indicaron que las bacterias heterótrofas desplazan a las nitrificantes en las capas superficiales de la biopelícula, debido a la disponibilidad de oxígeno disuelto y de espacio, pero en la parte más interna ambos grupos pueden coexistir. También establecieron que a medida que el cociente C:N aumenta, se da una fuerte estratificación de la biopelícula y la nitrificación queda inhibida. 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 muchas variables. Chen *et al.* [4], establecieron que más de 20 parámetros físicos, químicos y biológicos pueden afectar el crecimiento o el suministro de sustrato en sistemas de biofiltros.

Bacterias desnitrificantes

La enumeración de bacterias desnitrificantes reportada en el presente trabajo corresponde a la de todas aquellas que presentan nutrición quimiolitotrófica y respiración anaerobia, considerando que las pruebas de tubos múltiples se efectuaron sin aporte de materia orgánica y bajo anaerobiosis [16, 17]. También es importante señalar que dicha determinación incluye no sólo las bacterias que desnitrifican hasta N_2 , sino incluso las que pueden hacerlo hasta formas intermedias de N [15].

Se observó una gran variación de este grupo no sólo entre las cámaras del reactor sino también con relación a la carga orgánica aplicada. La máxima densidad de obtuvo en C1 al TRH de 12 h ($2,8 \times 10^8$ NMP/100 gPS) (Figura 2). De manera global, se observó una menor abundancia de bacterias desnitrificantes donde se alcanzaron las mayores concentraciones de NO_3^- (Tabla 4). Igualmente, el incremento en la carga orgánica repercutió significativamente en la reducción de la densidad de estos microorganismos ($r = -6620$).

Diferentes estudios en reactores RBC han mostrado la influencia del grosor de la biopelícula sobre la abundancia de bacterias desnitrificantes [11, 14], lo cual ayuda a explicar los resultados presentados en este trabajo. La estratificación y la ubicación de estas bacterias en los lugares más profundos del biofilm, donde existe menor concentración de oxígeno disuelto, estimulan su multiplicación y crecimiento óptimo [7, 8, 14]. En tal sentido, las mayores densidades de bacterias desnitrificantes obtenidas en C1 (particularmente a los TRH de 24 y 12 h), resultan de la alta concentración de materia orgánica disponible, la cual genera un engrosamiento de la biopelícula por crecimiento microbiano.

La remoción de N en sistemas biológicos envuelve dos procesos independientes: la nitrificación y la desnitrificación. Estos procesos pueden ocurrir frecuentemente en diferentes espacios de la biopelícula, debido a que requieren diferentes hábitats, especialmente en términos de disponibilidad de aceptores de electrones. La nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS), proceso no convencional grandemente

estudiado y difundido [8, 11], puede ocurrir sólo bajo las siguientes condiciones: *i*) por presencia de bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras en el biofilm y *ii*) por condiciones de crecimiento adecuado para cada una de las cepas bacterianas responsables, las cuales deben crearse en algún lugar de la biopelícula [4]. En este sentido y considerando los resultados presentados, el proceso de NDS fue evidenciado en el reactor RBC de tres cámaras estudiado.

Bacterias fijadoras de nitrógeno

El grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno cuantificadas durante la etapa experimental corresponde a aquellas que presentan una respiración aerobia y nutrición quimiolitotrofa [16, 17]. Dichas densidades se encontraron entre $1,2 \times 10^6$ (C2 al TRH de 12 h) y $6,6 \times 10^7$ NMP/100 gPS (C3 al TRH de 24 h) (Figura 2). Si bien estas bacterias se mostraron como el grupo menos representado, fue notorio su incremento en los discos a medida que el efluente recorría el reactor desde C1 hasta C3. El incremento de la concentración de N-total en C3 (principalmente como N-inorgánico) (Tabla 4), podría resultar de la fijación de N_2 , de la acumulación de sólidos suspendidos en el efluente, así como de la degradación de N-orgánico a N-inorgánico (mineralización). El proceso de fijación implica la transformación del N molecular del aire (N_2) en NH_4^+ , para su posterior asimilación e incorporación a la biomasa [8].

Las densidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y de nitrificantes (tanto oxidadoras de NO_2^- como de NH_4^+), presentaron una tendencia similar, donde los mayores valores fueron encontrados en C3 para todas las cargas orgánicas aplicadas. Esto se debió, principalmente, al metabolismo quimiolitotrofo que tienen en común dichas bacterias. Boller et al. [3], establecieron que estos grupos microbianos tienden a favorecerse en condiciones donde la materia orgánica biodegradable ya ha sido removida.

Finalmente, la variabilidad en la densidad de heterótrofos encontradas en este estudio se presenta en la Figura 2, cuyos valores se hallaron entre $2,5 \times 10^9$ UFC/gPS (C2 a 24 y 12 h de TRH) y $8,9 \times 10^{11}$ UFC/gPS (C1 a 6 h de TRH). Dichos resultados son análogos a los reportados por Chuang y Ouyang [5], quienes establecieron que en un reactor RBC, los heterótrofos suelen ser una comunidad importante y responsable de la mayor producción de biomasa. Por otra parte, los cambios en la carga orgánica no afectó la densidad de heterótrofos en C1 ($p > 0,05$); sin embargo, la mayor abundancia se obtuvo al TRH de 6 h ($8,9 \times 10^{11}$ UFC/gPS), cuando la carga orgánica aplicada al reactor era la más alta. La densidad de heterótrofos en C3 fue proporcional a la carga orgánica aplicada (Figura 2). De manera general, el comportamiento de la comunidad de heterótrofos está relacionado con la naturaleza de su metabolismo, el cual es dependiente de la oxidación de materia orgánica para la obtención de energía [14].

Conclusiones

Las bacterias oxidadoras de NO_2^- fueron el grupo más numeroso en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras, seguido de las oxidadoras de NH_4^+ , desnitrificantes y fijadoras de N_2 . Las características fisicoquímicas del influente y las condiciones de operación del reactor favorecieron la coexistencia de los distintos grupos de nitrobacterias. La abundancia de estas bacterias estableció la calidad del efluente tratado.

La densidad de las bacterias del nitrógeno fue dependiente de la carga orgánica, de las cámaras (C1, C2 y C3) y de la interacción entre ambas variables, lo cual determinó las remociones de C y N en el reactor RBC.

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. De igual manera, la abundancia de heterótrofos determinó la remoción de materia orgánica con relación a la carga aplicada.

Agradecimiento

Este estudio fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia.

Referencias bibliográficas

1. Alexander M., Clark F., Nitrifying Bacteria, Cornell University and the Soil and Water Conservation Research Division, USA, (1965), 1322-1477.
2. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, Washington DC, USA, (1998).
3. Boller M., Gujer W., Tschui M., Parameters affecting nitrifying biofilm reactors, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 29, No. 10-11, (1994), 1-11.
4. Chen S., Ling J., Blancheton J.P., Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors, *Aquacult. Eng.*, Vol. 34, (2006), 179-197.
5. Chuang S.H., Ouyang C.F., The biomass fractions of heterotrophs and phosphate-accumulating organisms in a nitrogen and phosphorus removal system, *Wat. Res.*, Vol. 34, No. 8, (2000), 2283-2290.
6. Cortéz S., Teixeira P., Oliveira R., Mota M., Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, Vol. 7, (2008), 155-172.
7. Garzón M., González S., Biological phosphate and nitrogen removal in a biofilm sequencing batch reactor, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 43, No. 1, (1996), 1293-1301.
8. Garzón M., Mecanismos no convencionales de transformación y remoción del nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales, *Ingeniería Hidráulica en México*, Vol. 20, No. 4, (2005), 137-149.
9. Guinea A., Martin M., Serrano S., Biofilm communities and operational monitoring of a rotating biological contactor system, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 43, (2000), 247-253.
10. Gupta A., Gupta S., Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm, *Wat. Res.*, Vol. 33, No. 2, (1999), 555-561.
11. Holman J.B., Wareham D.G., COD, ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process, *Biochem. Eng. J.*, Vol. 22, No. 2, (2005), 125-133.
12. 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, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 70, No. 3, (2004), 1641-1650.
13. Liu, Y., Capdeville B., Specific activity of nitrifying biofilm in water nitrification process, *Wat. Res.*, Vol. 30, No. 7, (1996), 1645-1650.
14. 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.*, Vol. 30, No. 7, (1996), 1563-1572.
15. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J., Jetten M., Strous M., New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater, *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 27, (2003), 481-492.
16. Verhagen F., Duyts H., Laambroek H., Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58, No. 10, (1992), 3303-3311.

17. Verhagen F., Laanbroek H., Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, No. 11, (1991), 3255-3263.
18. Yang P.Y., Zhang Z.Q., Proceedings of the UNESCO-University of Tsukuba International Seminar on Traditional Technology for Environmental Conservation and Sustainable Development in the Asian-Pacific Region, Tsukuba, Japon, (1995), 145-158.