

Características de la biopelícula de un reactor RBC en presencia y ausencia de metales pesados

Julio César Marín L.*
Karelis Fernández*
Elisabeth Behling*
Sedolfo Carrasquero*
Nancy Angulo**

RESUMEN

Los efluentes industriales que contienen metales pesados causan efectos tóxicos sobre los ecosistemas naturales receptores, así como problemas de eficiencia en las plantas de tratamiento biológico. En el presente trabajo se compararon las características de la biopelícula de un reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados (Cd 5 mg/L y Cr 20 mg/L), bajo condiciones aeróbicas-mesofílicas y escala de laboratorio. La biopelícula se formó a partir de un lodo aerobio obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales de la localidad. El reactor se alimentó con un efluente industrial sintético a flujo continuo, con una carga orgánica de 5,8l gDQO/d.m². En el efluente final de cada cámara se monitorearon los parámetros fisicoquímicos: pH, alcalinidad total, oxígeno disuelto, potencial redox, demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles, concentración de Cd y Cr. La evolución de la biopelícula fue registrada fotográficamente y también se determinaron: grosor, índice de biomasa, conteo de heterótrofos y caracterización de los principales grupos bacterianos. El contenido de materia orgánica (DQO) en el efluente tratado fue significativamente menor (18,0 %) en ausencia de metales, mientras que las remociones de Cd y Cr se ubicaron en 96,7±0,2 y 57,2±1,3 %, respectivamente. Las concentraciones finales de Cr no cumplieron con el límite de descarga establecido en la normativa nacional (2,0 mg/L). La biopelícula presentó menor grosor y abundancia de heterótrofos en presencia de los metales, como consecuencia del efecto tóxico de los mismos. Las bacterias más abundantes durante el tratamiento del efluente pertenecieron a los géneros: *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*.

PALABRAS CLAVE: bacterias heterótrofas, crecimiento adherido, efluente industrial, tratamiento biológico, toxicidad.

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado postal 562, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela. *E-mail: jmarin@fing.luz.edu.ve

**Centro de Investigación del Agua (CIA), Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado postal 562, Maracaibo 4001-A, Estado Zulia, Venezuela.

Recibido: 13/12/18

Aceptado: 20/01/2019

Biofilm characteristics of a RBC reactor in presence and absence of heavy metals

ABSTRACT

The industrial effluents containing heavy metals cause toxic effects on the natural ecosystems, as well as efficiency problems in biological treatment plants. In the present work, the biofilm characteristics of a three stage RBC reactor in presence and absence of heavy metals (Cd 5 mg/L and Cr 20 mg/L) were compared, under aerobic-mesophilic conditions and laboratory scale. The biofilm was formed from an aerobic sludge obtained of a local wastewater treatment plant. The reactor was fed at continuous flow with synthetic industrial effluent containing an organic load of 5.81 gCOD/d.m². In the final effluent of each stage the physicochemical parameters were monitored: pH, total alkalinity, dissolved oxygen, redox potential, chemical oxygen demand (COD), total suspended solids, suspended volatile solids, Cd and Cr concentration. The evolution of the biofilm was recorded photographically, also determining: thickness, biomass index, heterotrophic count and characterization of the main bacterial groups. The content of organic matter (COD) in the treated effluent was significantly lower (18.0 %) in the absence of metals, while the removals of Cd and Cr were 96.7±0.2 and 57.2±1.3 %, respectively. The final concentrations of Cr did not meet the discharge limit established in the national regulations (2.0 mg/L). The biofilm had a lower thickness and abundance of heterotrophs in the presence of metals, as a consequence of their toxic effect. The most abundant bacteria during the treatment of the effluent belonged to the genera: *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Lysinibacillus*.

KEYWORDS: adhering growth, biological treatment, heterotrophic bacteria, industrial effluent, toxicity.

Introducción

En la cuenca del Lago de Maracaibo se pueden encontrar asentadas distintas industrias dedicadas a la transformación o uso de metales pesados como parte de su proceso de manufactura, desde las relacionadas con la empresa petroquímica hasta las destinadas al tratamiento y curtido de pieles animales (tenerías) (Esclapés y Galindo, 2000;

Rodríguez, 2000; Marín-Leal et al., 2017). En detalle, se pueden hallar industrias de: producción de plaguicidas y otras sustancias químicas, producción y transporte de crudo, procesamiento de gas natural, extracción de carbón en minas a cielo abierto, entre otras; siendo fuentes importantes de residuos de metales pesados, particularmente de cadmio (Cd) y cromo (Cr) (ICLAM, 1988; Ávila et al., 2010; Ávila et al., 2014; Castro y Marín, 2018).

Los metales pesados son una fuente común de contaminación que incide directa e indirectamente sobre el bienestar del ser humano, afectando el funcionamiento de los ecosistemas, dado que no pueden ser degradados; ni química, ni biológicamente; y por lo general, tienden a bioacumularse y biomagnificarse, provocando efectos tóxicos de muy diverso carácter, que generan alteraciones desfavorables sobre los organismos vivos (Baral et al., 2006; Bjerregaard et al., 2015). Es por ello que, dicha situación amerita de gran preocupación al limitar el uso de las fuentes de aguas naturales, por el riesgo que representan para la salud pública, dado su efecto sobre los componentes de las redes tróficas (Páez-Osuna y Frías-Espericueta, 2001; Salazar-Lugo, 2009).

El Cr y Cd figuran entre los metales de mayor importancia toxicológica y ecotoxicológica en ambientes acuáticos, pues, para la mayoría de los organismos la exposición por encima de una concentración umbral puede ser extremadamente tóxica. Los iones de estos elementos suelen penetrar en la célula a través de los mismos sistemas de transporte que utilizan cationes fisiológicamente importantes como calcio, magnesio, cobre y zinc, generando alteraciones en los procesos enzimáticos de los organismos (Cañizares, 2000; Argota et al., 2012; Bjerregaard et al., 2015).

Una alternativa para el tratamiento de estas aguas residuales industriales cargadas de metales pesados, está constituida por los reactores biológicos rotativos de contacto, RBC según sus siglas en inglés, los cuales fungen como sistemas de tratamiento biológicos secundarios, que se han utilizado ampliamente en las últimas décadas para el tratamiento de diversos tipos de efluentes, ya que ofrecen multiplicidad de ventajas sobre otros sistemas

de tratamiento, destacándose su capacidad para mantenerse estable ante cambios bruscos de las condiciones operacionales, así como por su tolerancia a sustancias tóxicas en el afluente y su eficiencia en la remoción de materia orgánica, generando efluentes de buena calidad, con bajos costos de operación y mantenimiento (Najafpour et al., 2005; Tawfik et al., 2006; Cortez et al., 2008).

Una de las principales fortalezas de los reactores RBC la constituyen la amplia diversidad microbiana resistente y/o tolerantes a metales que puede estar presente en el sistema, tanto suspendida en el efluente, como creciendo adherida a los discos en forma de biopelícula. Esta resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos resulta de la acción de diferentes mecanismos, como son: bioabsorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción, mediados por las células vivas o muertas (Vullo, 2003; Naik y Dubey, 2013; Beyer et al., 2014; Limcharoensuk et al., 2015). No obstante, diferentes condiciones del efluente en tratamiento pueden afectar a biopelícula y por ende, al desempeño y eficiencia del sistema de tratamiento en general (Teitzel y Parsek, 2003; Cortez et al., 2008; Taseli et al., 2008).

Considerando los problemas de contaminación relacionados con la descarga de efluentes contaminados con metales pesados, la importancia de la microbiota relacionada con los mecanismos de depuración de aguas residuales y al auge que tienen los reactores RBC como alternativa menos costosa en comparación a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales pesados; el objetivo del presente estudio consistió en comparar las características de la biopelícula de un reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados (Cd y Cr).

1. Metodología

1.1. Sistema experimental

Se utilizó un reactor RBC construido en acrílico transparente, subdividido en tres compartimientos denominados cámaras, las cuales estaban separadas por una lámina del

mismo material con tres aberturas de 2 cm de diámetro cada una, para permitir la circulación del efluente en tratamiento (Figura 1). El caudal fue suministrado mediante una bomba peristáltica, conectada en la entrada de la cámara 1 (C1). En la salida de la cámara 3 (C3) también se conectó una bomba peristáltica, con el fin de retirar el efluente tratado. Los discos giraron 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. Las especificaciones del reactor utilizado se presentan en la Tabla 1.

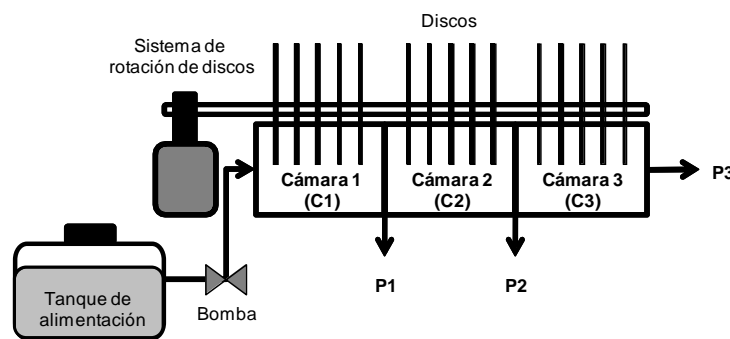


FIGURA 1. Esquema del reactor RBC de tres cámaras. P1, P2 y P3: puntos de muestreo de efluente tratado; C1, C2 y C3: efluentes de las cámaras 1, 2 y 3, respectivamente.

TABLA 1. Dimensiones y características del reactor RBC de tres cámaras empleado en esta investigación.

Característica	Valor
Diámetro del disco (cm)	18
Diámetro del tanque (cm)	23
Área total de contacto (m ²)	1,836
Porcentaje de sumergencia de discos (%)	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)	60
Volumen útil del reactor (L)	8
Velocidad de giro del disco (rpm)	10
Tiempo de retención hidráulico (h)	18

1.2. Efluente industrial sintético

Para esta investigación se preparó inicialmente un efluente sintético con glucosa como única fuente de carbono, proporcionando una demanda química de oxígeno (DQO) teórica de 1.000 mg/L, y los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en una proporción de C:N~5, cuyas características se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2. Composición del efluente industrial sintético usado en el presente trabajo, modificado de Chacín (1993).

Ítem	Compuesto	Efluente sin metales (g/L)	Efluente con metales (g/L)*
1	Glucosa	0,9375	0,9375
2	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0850	0,0850
3	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0040	0,0040
4	NiSO ₄ .6H ₂ O	0,5000	0,5000
5	CoO	0,0500	0,0500
6	FeCl ₂ .6H ₂ O	0,0006	0,0006
7	H ₃ BO ₃	0,1000	0,1000
8	NH ₄ Cl	0,1910	0,1910
9	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0540	0,0540
10	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5000	0,5000
11	KH ₂ PO ₄	0,0219	0,0219
12	K ₂ HPO ₄	0,0369	0,0369
13	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5000	0,5000
14	Na ₂ CO ₃	0,6390	0,6390
15	(NH ₄) ₂ .SO ₄	0,1300	0,1300
16	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0050	0,0050
17	CdCl ₂ .H ₂ O	-	8,1500
18	K ₂ Cr ₂ O ₇	-	56,540

* Cd 5 mg/L y Cr 20 mg/L.

Dicho efluente fue posteriormente contaminado con 5 mg/L de Cd y 20 mg/L de Cr, para observar su efecto sobre las características de la biopelícula del reactor RBC. La proporción de estos metales se estableció considerando la composición de efluentes industriales relacionados a procesos de curtido de pieles, pigmentos textiles, aleaciones, catalizadores, agentes anticorrosivos, baterías, recubrimientos metálicos,

electro galvanizados, aguas de producción de petróleo, entre otras (Katz y Salem, 1994), así como los límites permisibles de descarga a cuerpos de agua naturales de la normativa venezolana vigente (0,2 mg/L para Cd y 2,0 mg/L para Cr) (Decreto 883, 1995). En ocasiones se hizo necesario adicionar bicarbonato de sodio (1 g/L) a este fluente, con el fin de conferirle al sistema la capacidad para neutralizar la producción de ácidos.

1.3. Formación de la biopelícula

Para la formación de la biopelícula sobre los discos del reactor, se agregó a cada cámara 1 L de lodo aeróbico proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria de la localidad, y se agregó agua residual sintética sin metales hasta completar 3 L en cada una de las cámaras. Durante esta etapa el reactor se operó a flujo discontinuo, con un tiempo de retención de 24 h, durante 18 d. En este lapso se tomaron fotografías para monitorear la formación de la biopelícula, y se midió el pH diariamente para verificar que el sistema permaneciera dentro del rango óptimo para el crecimiento microbiano (6,5-8,5) (Atlas y Bartha, 2002). Una vez formada una capa de biopelícula de buen espesor sobre los discos, se procedió a retirar el lodo biológico y se cambió la condición a flujo continuo (7,3 mL/min), suministrando progresivamente agua residual sintética sin metales.

1.4. Condiciones de experimentación

Etapa I, ausencia de metales: el reactor se operó en ausencia de metales pesados durante un período de 30 d (Tabla 2), a flujo continuo con un caudal de 7,3 mL/min y un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 18 h, suministrando una carga orgánica de 5,81 gDQO/d.m².

Etapa II, presencia de metales: seguidamente, el reactor operó bajo las mismas condiciones de la etapa I, pero alimentando con el efluente industrial sintético conteniendo los metales pesados (Tabla 2). Esta etapa se extendió durante 25 d.

1.5. Recolección de muestras

1.5.1. Efluente tratado

Considerando el TRH establecido, se recolectaban muestras de 300 mL del efluente a la salida de cada una de las cámaras del reactor (Figura 1), a través de los puertos de muestreo P1, P2 y P3. Adicionalmente, se captaba el mismo volumen de efluente sintético fresco para las condiciones iniciales, obteniéndose un total de tres muestras del tratamiento y una de la entrada por día. En estas muestras se analizaron los siguientes parámetros: pH, alcalinidad total, oxígeno disuelto, potencial redox, DQO, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y metales (Cd y Cr), según los métodos estandarizados (APHA et al., 2005).

1.5.2. Biopelícula

Para el estudio de las características de la biopelícula, se efectuó un registro fotográfico y del color diariamente, con mediciones adicionales del grosor de la misma en cada etapa de tratamiento, utilizando un vernier. Además, se tomaron muestras de los discos, con la ayuda de un sacabocado de diámetro conocido (raspado de la superficie), a la entrada (primer disco) y salida (último disco) de cada cámara, para determinar el índice de biomasa (IDB), a partir de la razón de sólidos volátiles (SV) entre sólidos totales (ST) (APHA et al., 2005).

Con las muestras del raspado superficial, también se realizó el conteo de heterótrofos (agar conteo de Hi-Media *Laboratories*), expresando los valores en unidades formadoras de colonias por gramo de biopelícula seca (UFC/g peso seco), así como el aislamiento y caracterización de algunas especies bacterianas presentes, usando una batería de pruebas macromorfológicas, tintoriales, microscópicas y bioquímicas (Holt et al., 1994; Murray et al., 1999; Reynolds, 2002; MacFaddin, 2004), con la ayuda del programa ABIS *on line* (ABIS, 2018). El contenido de humedad de la biopelícula se estimó gravimétricamente, mediante secado a 60°C en una estufa.

1.6. Análisis estadísticos de datos

Se efectuaron cálculos de media aritmética y desviación estándar con los datos de parámetros fisicoquímicos y biológicos. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para determinar diferencias significativas entre los parámetros

fisicoquímicos y características de la biopelícula, con respecto a las condiciones experimentales establecidas (etapas) y a las cámaras del reactor (C1, C2 y C3).

2. Resultados y discusión

2.1. Características fisicoquímicas del efluente tratado

Todos los parámetros monitoreados en el efluente tratado presentaron diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto a las etapas experimentales, mostrando el efecto de la presencia de los metales pesados sobre el desempeño del reactor. Considerando la variable cámara, solo el potencial redox, DQO y contenido de metales, no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), mientras que para la interacción etapa*cámara, todos los parámetros mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), a excepción del Cr.

En la Tabla 3 se presentan los valores medios y las desviaciones estándares para los parámetros fisicoquímicos medidos durante las dos etapas de tratamiento, tanto en la entrada como a la salida de cada cámara del reactor RBC. En general, los niveles finales de pH (6,83 a 7,97), alcalinidad total (90,02 a 198,57 mgCaCO₃/L), oxígeno disuelto (2,02 a 7,65 mg/L) y potencial redox (-100,20 a -63,41 mV), se mantuvieron dentro de los rangos esperados para este tipo de tratamiento biológico aeróbico, garantizando la supervivencia de una comunidad de microorganismos capaz de degradar la materia orgánica presente (Nowak, 2000; Atlas y Bartha, 2002; Tawfik et al., 2006).

En la etapa II, el contenido de SST (100,0±20,0 mg/L) en el efluente tratado (cámara 3) no logró cumplir con el límite de descarga a cuerpos de aguas naturales, establecido en la legislación venezolana (80 mg/L; Decreto 883, 1995), posiblemente debido al efecto de la presencia de metales pesados, cuya toxicidad puede afectar las características biológicas y de adherencia de la biopelícula (Costley y Wallis, 2001; Taseli et al., 2008; Panigatti et al., 2012; Islam et al., 2017). Este hecho quedó reflejado por el aumento de la concentración de SSV en esta etapa II (Tabla 3).

TABLA 3. Valores medios y desviaciones estándares de los parámetros fisicoquímicos medidos durante el tratamiento del efluente sintético en el reactor RBC en ausencia y presencia de metales pesados.

Parámetro	Etapa I. Reactor RBC sin metales*				Límite de descarga** *
	Entrada	Cámara 1	Cámara 2	Cámara 3	
pH	7,48±0,34	7,14±0,31	7,66±0,21	7,79±0,18	6-9
AT (mgCaCO ₃ /L)	194,53±37,59	171,57±27,00	132,60±27,09	126,36±36,34	-
OD (mg/L)	5,03±1,73	3,93±1,91	6,26±1,23	6,84±0,81	-
PR (mV)	-88,21±10,93	-77,02±13,61	-90,45±7,68	94,95±5,25	-
SST (mg/L)	520,0±225,4	149,1±108,6	56,4±17,5	61,8±14,0	80
SSV (mg/L)	429,1±215,9	141,8±115,1	49,1±18,7	56,4±21,6	-
DQO (mg/L)	1.088,5±92,57	117,97±73,75	128,00±96,01	100,49±41,41	350
Cd (mg/L)	-	-	-	-	0,2
Cr (mg/L)	-	-	-	-	2,0
Parámetro	Etapa II. Reactor RBC con metales**				Límite de descarga** *
	Afluente	Cámara 1	Cámara 2	Cámara 3	
Ph	7,42±0,17	7,33±0,12	7,34±0,14	7,40±0,14	6-9
AT (mgCaCO ₃ /L)	215,99±40,36	160,51±21,16	158,96±22,12	157,80±22,76	-
OD (mg/L)	7,02±0,38	5,72±0,52	5,97±0,50	6,41±0,48	-
PR (mV)	-93,92±13,22	-91,02±4,50	-91,33±4,32	-93,83±3,76	-
SST (mg/L)	473,3±189,0	120,0±20,0	80,0±52,9	100,0±20,0	80
SSV (mg/L)	260,0±140,0	53,3±11,6	33,3±23,1	46,7±11,6	-
DQO (mg/L)	1.041,94±29,10	265,44±47,94	242,88±61,55	284,02±39,01	350
Cd (mg/L)	4,58±0,33	0,09±0,08	0,06±0,05	0,15±0,04	0,2
Cr (mg/L)	18,05±0,81	7,45±2,41	8,11±2,95	7,72±2,92	2,0

AT: alcalinidad total, OD: oxígeno disuelto, PR: potencial redox, SST: sólidos suspendidos totales, SSV: sólidos suspendidos volátiles, DQO: demanda química de oxígeno, -: no presenta, *n=30, **n=25, ***Decreto 883 (1995).

Las concentraciones finales de materia orgánica en ambas etapas experimentales (Tabla 3), medida como DQO ($100,49 \pm 41,41$ mg/L para la etapa I y $284,02 \pm 39,02$ mg/L para la etapa II), cumplieron con los valores máximos permisibles de la normativa nacional vigente para el vertido a cuerpos de aguas naturales (350 mg/L; Decreto 883, 1995), al igual que las concentraciones de Cd en la etapa II: $0,15 \pm 0,04$ mg/L (límite: 0,2 mg/L; Decreto 883, 1995). Sin embargo, los niveles finales de Cr de la etapa II no se ajustaron a las exigencias de esta norma, requiriéndose de un tratamiento adicional para su adecuación. Los mecanismos implicados en las transformaciones y desintoxicación de metales en microorganismos, dependen de la especie y de las propiedades fisicoquímicas del entorno celular. Estos involucran procesos de captación de metales (pasivos por bioabsorción y activos por bioacumulación intracelular), mantenimiento de la homeostasis y desintoxicación activa, metabolismo litotrófico que emplea iones metálicos como fuente de electrones, movilización activa o pasiva de metales a partir de minerales o formación de biominerales por precipitación inorgánica u orgánica de especies metálicas insolubles (Kotrba et al., 2011).

La eficiencia media de remoción de materia orgánica (DQO) en el reactor fue de $90,7 \pm 3,8$ % para la etapa I y de $72,7 \pm 4,3$ % para la etapa II, mostrando diferencias significativas entre ambas ($p < 0,01$), como respuesta a la presencia de metales; lo que representa un 18,0 % de pérdida de eficiencia del proceso de oxidación. Al respecto, Taseli et al. (2008) encontraron que concentraciones de Cr (VI) superiores a 20 mg/L afectan la oxidación de materia orgánica en reactores RBC, destacando que 5 mgCr(VI)/L fue el contenido óptimo en términos de remoción de materia orgánica (DQO), turbidez y sólidos suspendidos. En cuanto al Cd, Santos et al. (2005) detectaron una marcada disminución en la eficiencia de un reactor biológico secuencial cuando la concentración de Cd aumentó por encima de 14 mg/L, en cuyo caso la eliminación de materia orgánica (DQO) disminuyó de 98 a 41 %, mientras que la eliminación de amoníaco se redujo de 98 a 32 % y el índice biótico de lodo bajó a 0 en concentraciones de Cd superiores a 10 mg/L.

Las remociones medias de metales observadas durante el tratamiento del efluente industrial sintético fueron de $96,7 \pm 0,2$ y $57,2 \pm 1,3$ % para Cd y Cr, respectivamente (etapa II). En contraste, Costley y Wallis (2001), estudiando la habilidad del biofilm de un reactor RBC de tres etapas para depurar aguas residuales contaminadas con Cd, Cu y Zn, lograron remover un 33 % del contenido de Cd, señalando que la presencia de los metales inhibió el desarrollo microbiano, lo cual resultó en una baja tasa de eliminación de materia orgánica (DQO); mientras que Jacob et al. (2018), indican remociones de Cr (III) de hasta 94 % en agua sintéticas, usando estructuras cristalinas producidas por bacterias (magnetosomas) recubiertos con carbonato de calcio. La remoción biológica simultánea de metales pesados resulta un proceso complejo, ya que amerita de la participación de un conjunto de procesos fisiológicos que coadyuvan a la eliminación de dichos elementos del efluente en tratamiento, de acuerdo con lo planteado por Kotrba et al. (2011).

2.2. Características de la biopelícula

2.2.1. Registro fotográfico

Durante la etapa de formación de la biopelícula inicialmente ocurrió la adherencia y crecimiento de colonias microbianas en puntos aislados de la superficie de los discos del reactor (Figura 2A), con apariencia gelatinosa, principalmente en el área intermedia, la cual permanecía húmeda por estar mayor tiempo sumergida en el efluente en tratamiento, extendiéndose hacia los extremos hasta cubrir toda la superficie, dándole una apariencia afelpada (Figura 2B). Cortez et al. (2008), señaló que esta apariencia observada en las etapas iniciales de formación de la mayoría de las biopelículas en reactores RBC, es debida a la presencia de bacterias filamentosas del género *Beggiatoa*.

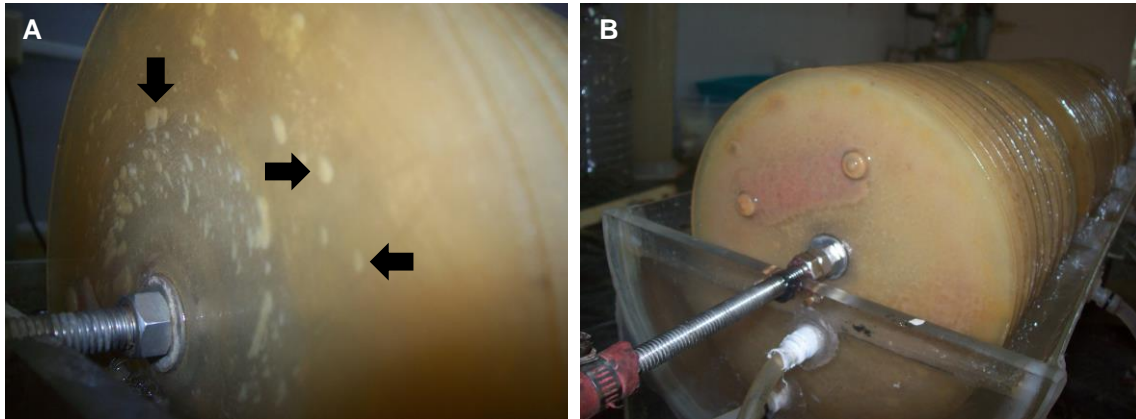


FIGURA 2. Formación de la biopelícula en el reactor RBC de tres cámaras. A) Etapas iniciales de la biopelícula (flechas negras), B) Biopelícula madura.

Posteriormente, la biopelícula fue aumentando su espesor siendo de mayor dimensión en la cámara 1 y disminuyendo gradualmente hasta la cámara 3 (Figura 3). Este comportamiento es debido a la entrada del efluente fresco (afluente) en la cámara 1, el cual proporciona una mayor cantidad de elementos nutritivos a los microorganismos, magnificando su crecimiento y adherencia a la superficie, en concordancia con lo descrito por varios autores (Martín-Cereceda et al., 2001; Welter et al., 2004; Pérez, 2010); quienes afirman que por lo general el espesor de la biopelícula varía dependiendo de la carga y no es uniforme en toda la superficie del disco. El tiempo de formación de la biopelícula fue de 20 d, resultando similar al reportado por Okabe et al. (1996) para un reactor RBC inoculado con cultivos procedentes de un tanque de sedimentación primaria.

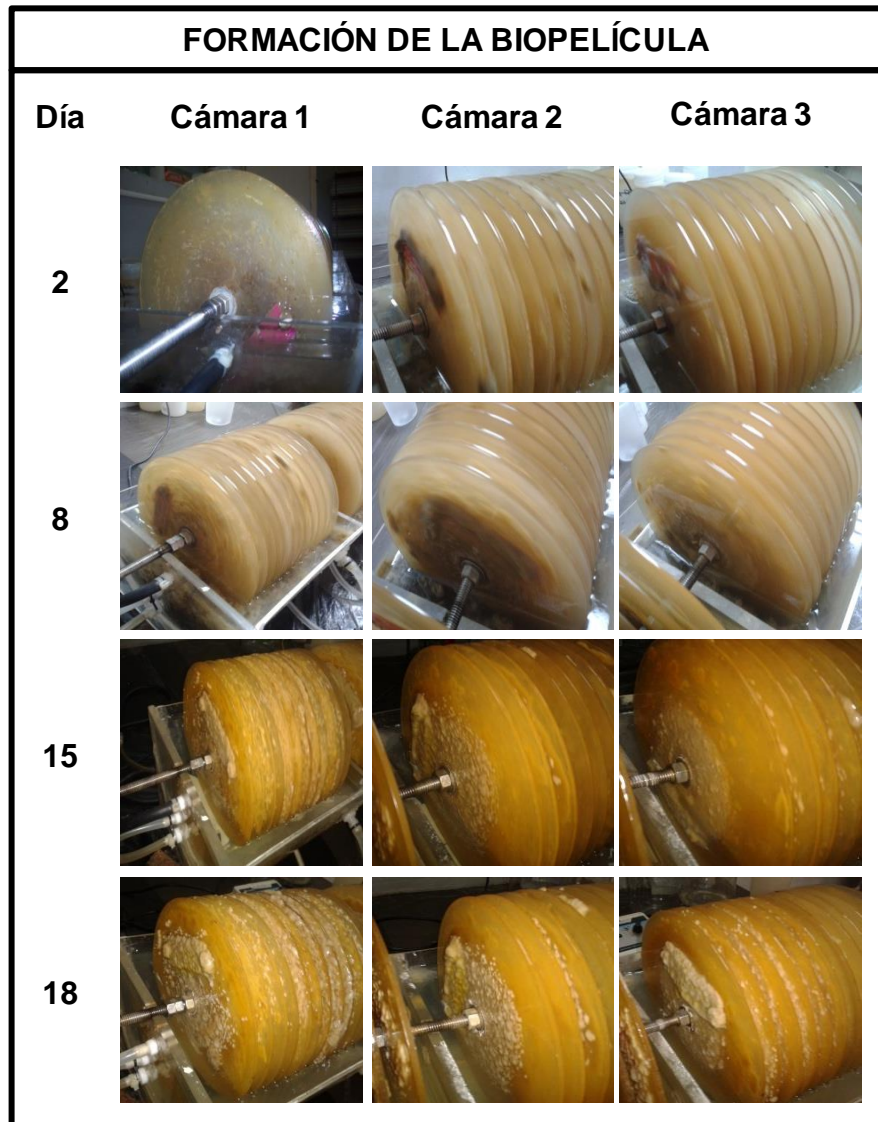


FIGURA 3. Evolución de la formación de la biopelícula en el reactor RBC de tres cámaras.

Durante la etapa I (Figura 4), la biopelícula fue aumentando su grosor (día 7), exhibiendo una apariencia heterogénea tanto en color, como grosor y textura, formando en ocasiones puentes entre los discos. Eventualmente se presentó desprendimiento en secciones de la biopelícula (día 20), probablemente debido a la dificultad en la transferencia de sustrato hacia las capas más internas, como lo señalaron Lobo et al. (2013)

en su trabajo acerca del desarrollo de biopelículas en el tratamiento de aguas residuales de una industria láctea.

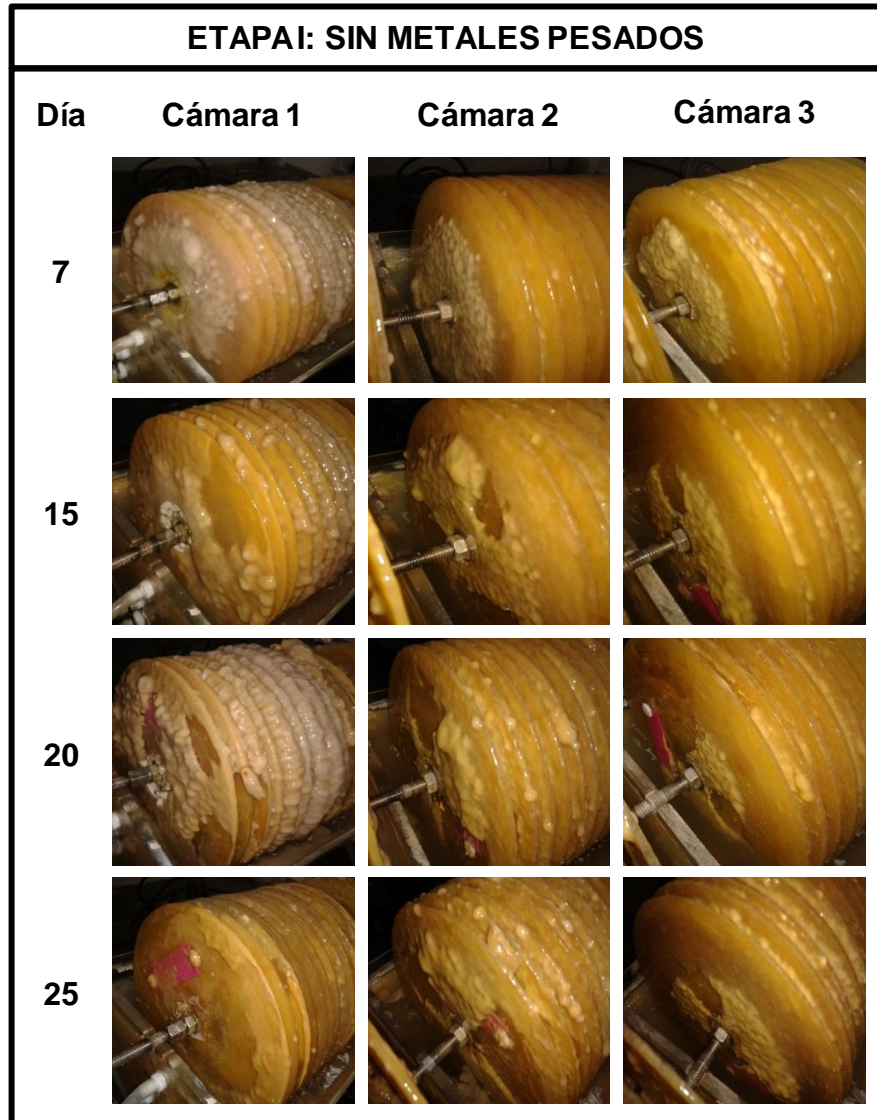


FIGURA 4. Evolución de la biopelícula en el reactor RBC de tres cámaras.
Etapa I: ausencia de metales pesados.

Durante la etapa II (Figura 5), se observó la disminución progresiva del grosor de la biopelícula, presentándose áreas de desprendimiento de la misma en los días iniciales de la exposición a los metales (día 10), debido probablemente a su efecto tóxico sobre la integridad de la misma. No obstante, también se pudo observar crecimiento de nueva

biopelícula en las áreas afectadas (día 19), lo que destaca el potencial de los microorganismos presentes para adaptarse a los contaminantes añadidos. Dicho fenómeno fue mencionado por Costley y Wallis (2001) al constatar que la biopelícula seguía creciendo a pesar de ser sometida a la influencia de Cd, Cu y Zn, durante la remoción de metales pesados en agua residual sintética, utilizando un reactor biológico rotativo de contacto.

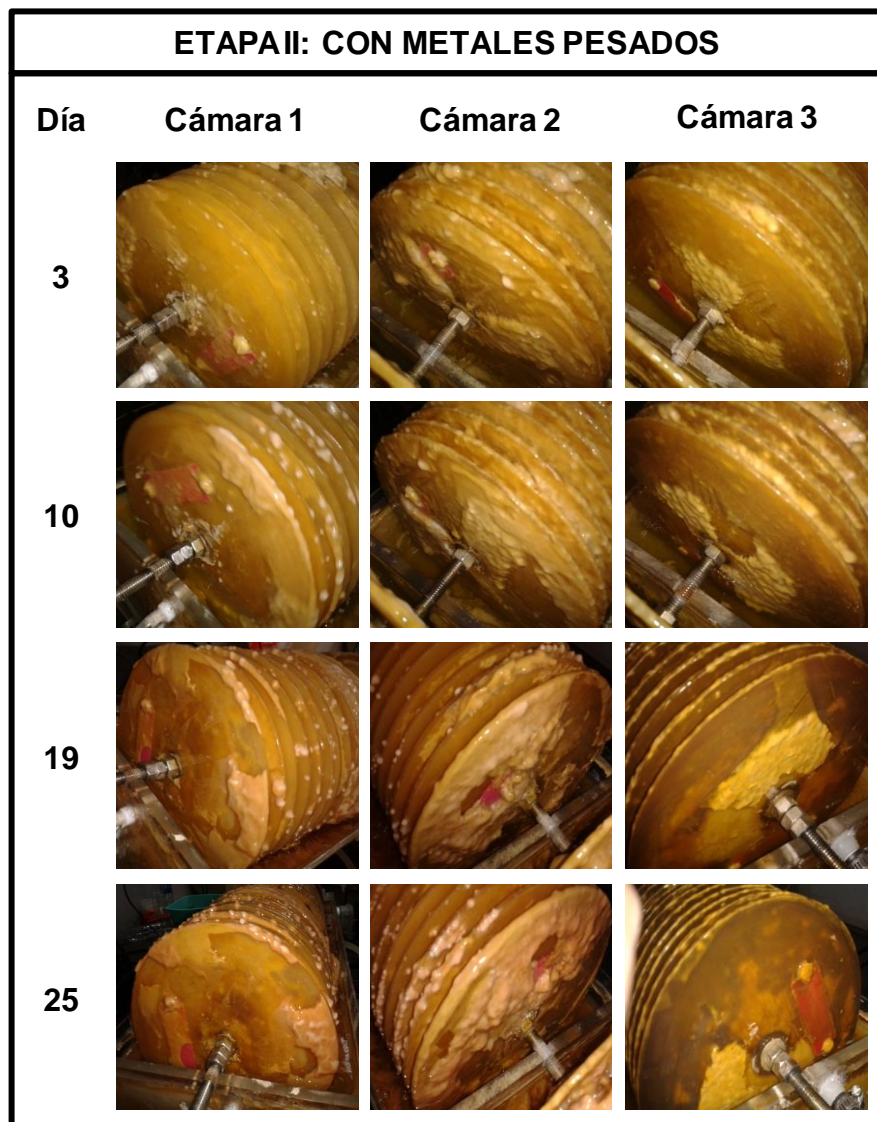


FIGURA 5. Evolución de la biopelícula en el reactor RBC de tres cámaras.
Etapa II: presencia de metales pesados.

2.2.2. Color

Durante la etapa I del tratamiento, de manera general la biopelícula presentó una coloración marrón-dorada (Figura 4), presentándose áreas localizadas de color blanco y rosa, siendo más abundantes en la cámara 1 (mayor crecimiento microbiano). En la etapa II (Figura 5), el color marrón fue tornándose cada vez más oscuro, en concordancia con lo reportado por Welter et al. (2004); en las primeras etapas por lo general se presenta una biopelícula de color gris o gris amarronado, lo cual es indicativo de una biomasa removedora de materia orgánica carbonosa, mientras que en las etapas posteriores, la misma presenta coloración amarronada o rojiza-amarronada, propia de microorganismos nitrificantes. Sin embargo, el color de la biopelícula varía dependiendo de la naturaleza del afluente en cuestión (Welter et al. 2004).

2.2.3. Grosor

En la Figura 6 se presenta el grosor de la biopelícula para las dos etapas experimentales, en cada una de las cámaras del reactor (C1 hasta C3), con valores desde 3,0 (C3, entrada y salida) hasta 6,1 mm (C2 entrada) para la etapa I y desde 0,4 (C3 entrada) hasta 1,8 mm (C1 y C2 salida) para la etapa II, los cuales fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). En ausencia de metales (etapa I), el grosor se mantuvo bastante estable en las cámaras, con muy ligeras variaciones temporales entre la entrada (primer disco) y la salida (último disco), como muestra de la estabilidad del sistema. El crecimiento abundante de la biopelícula en ocasiones originó la formación de puentes entre los diferentes discos, particularmente en la cámara 1, lo cual ha sido reportado como respuesta a la abundancia de sustrato (Martín-Cereceda et al., 2001; Welter et al., 2004; Pérez 2010).

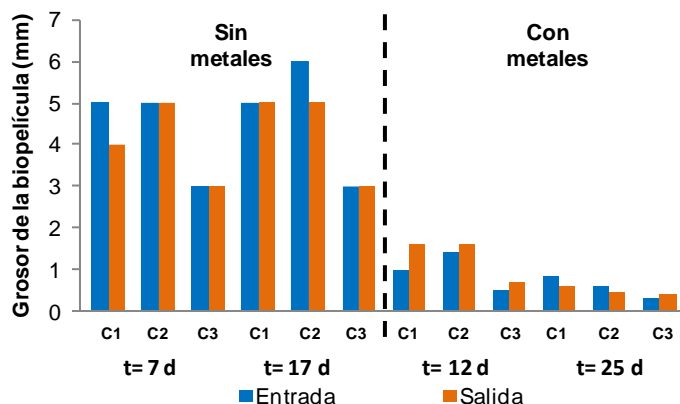


FIGURA 6. Grosor de la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados. C1-C3: cámaras del reactor, t: tiempo de muestreo, entrada: primer disco, salida: último disco.

Una vez que se inició la alimentación con el efluente contaminado con metales (etapa II), el grosor de la biopelícula disminuyó progresivamente, para llegar a los valores mínimos en el día 25 de experimentación (cámara 3). Se observaron grandes resquebrajamiento y desprendimientos de biomasa a lo largo del desarrollo de esta etapa, por efecto del contenido de Cd y Cr (Costley y Wallis, 2001; Taseli et al., 2008), lo cual incidió sobre las concentraciones de SST y SSV en el efluente tratado (Tabla 3), como ya fue mencionado.

2.2.4. Sólidos totales, sólidos volátiles, índice de biomasa y contenido de humedad

Los contenidos de sólidos en la biopelícula fueron ligeramente variables en cada etapa de tratamiento, así como de una cámara respecto a otra (Figura 7), sin exhibir diferencias significativas ($p > 0,05$). En la etapa I fue notorio el aumento de los ST desde C1 hasta C3 en ambos muestreos, con concentraciones medias de $27,05 \pm 2,85 \text{ mg/cm}^2$ a los 7 d de ensayo y de $18,13 \pm 1,32 \text{ mg/cm}^2$ a los 17 d. En la etapa II, los ST también se incrementaron entre las cámaras, con tenores medios de $22,55 \pm 1,08 \text{ mg/cm}^2$ a los 12 d y de $35,12 \pm 2,31 \text{ mg/cm}^2$ a los 25 d de tratamiento. El comportamiento de los SV fue similar al de los ST en ausencia de metales, con valores medios de $15,01 \pm 2,34 \text{ mg/cm}^2$ para el día 7 y de $11,64 \pm 0,93 \text{ mg/cm}^2$ para el día 17, mientras que en presencia de metales, se observó una disminución

progresiva de las concentraciones de SV entre las cámaras (excepto C3), con medias de $14,45 \pm 1,44 \text{ mg/cm}^2$ en el día 12 y de $13,66 \pm 5,42 \text{ mg/cm}^2$ en el día 25.

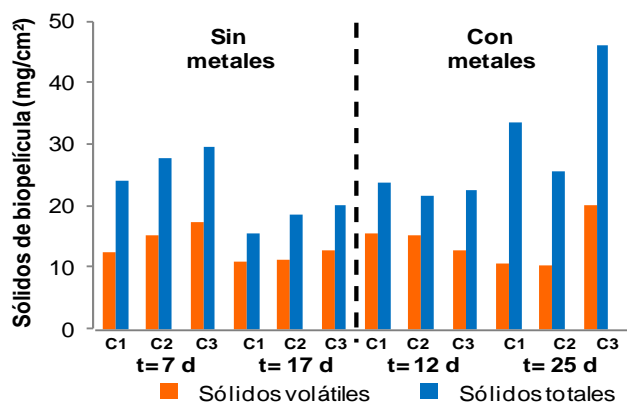


FIGURA 7. Sólidos en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados. C1-C3: cámaras del reactor, t: tiempo de muestreo.

Al respecto del contenido de sólidos en la biopelícula, Tyagi et al. (1993) durante el tratamiento de efluentes petroleros, también observaron un incremento de ST en las cámaras finales del reactor RBC, señalando que dicho comportamiento se debe a la intensidad del proceso de degradación de materia orgánica en la primera cámara, lo cual tiene como consecuencia la disminución del impacto de sus altas concentraciones (DQO) y de la de nutrientes, sobre la generación de biomasa (SSV), principalmente de microorganismos heterótrofos, en las cámaras subsiguientes. Adicionalmente, la acumulación de material suspendido y de metales en la biopelícula, posiblemente contribuyó al aumento en la concentración de ST, mediado por procesos fisiológicos o no, los cuales son factibles tanto con biomasa viva o muerta, así como con productos derivados del metabolismo, tal es el caso de la matriz polimérica extracelular (exopolisacárido, EPS), donde se encuentran embebidos los microorganismos de la biopelícula (Curt-Flemming y Wingender, 2003; Welter et al., 2004).

En la Figura 8 se incluyen los resultados de IDB obtenidos durante el tratamiento del efluente sintético, bajo las dos condiciones experimentales establecidas. En ausencia de

metales los valores estuvieron entre 0,53 (C1) y 0,70 (C1), mientras que en presencia de Cd y Cr el rango fue de 0,32 (C1) a 0,71 (C2). En general, este índice exhibió una tendencia a incrementarse en la etapa I y a decrecer en la etapa II, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Según Tyagi et al. (1993) el IDB representa la cantidad de biomasa activa presente en los discos, estableciendo que valores altos son indicativos de la presencia de un tipo común de bacterias oxidantes de materia orgánica carbonosa, cuyas variaciones son debidas a la presencia de bacterias nitrificantes y otros tipos de microorganismos asociados a la biopelícula. Los valores constantes de IDB podrían deberse a un tipo común de bacterias en todas las cámaras del reactor. Así, el descenso en el IDB registrado al final de la etapa II de ensayo, pudo deberse al efecto tóxico ejercido por los metales sobre los microorganismos presentes, cuyos valores hacen referencia a una biomasa activa pero afectada.

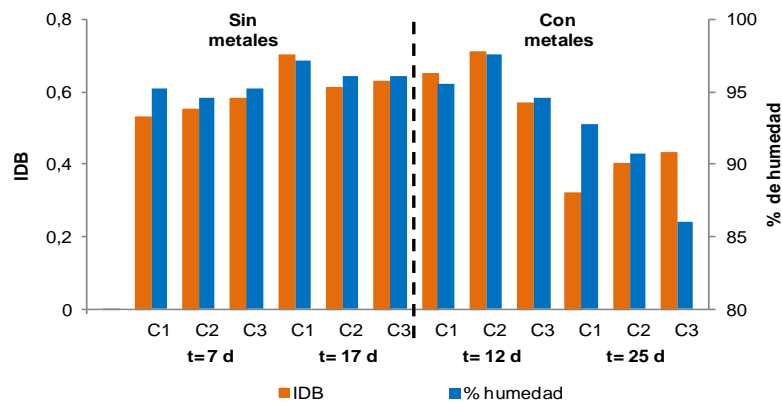


FIGURA 8. Índice de biomasa (IDB) y contenido de humedad en la biopelícula durante el tratamiento de un efluente sintético en un reactor RBC en presencia y ausencia de metales pesados.

El contenido de humedad de la biopelícula mostró alta presencia de agua, con valores entre 86,06 y 97,62 % (Figura 8), sin diferencias significativas entre las etapas ($p > 0,05$). Según Curt-Flemming y Wingender (2003), los EPS son un prerrequisito para la formación de una biopelícula, y son los responsables de la acumulación de agua en la misma, logrando que con 1 a 2 % de la materia orgánica presente se acumule hasta 99 % de humedad. Dicho planteamiento respalda los datos obtenidos, ya que la humedad fue alta aun en presencia de metales (etapa II), lo cual podría ser indicativo, en conjunto con el IDB,

de biomasa biológicamente activa, a pesar de la acción tóxica ejercida por los contaminantes.

2.2.5. Abundancia y diversidad de heterótrofos

La abundancia de microorganismos heterótrofos en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras fue alta, con densidades de $6,71 \times 10^9$ a $2,32 \times 10^{10}$ UFC/g peso seco en la etapa I y de $4,71 \times 10^8$ a $3,01 \times 10^9$ UFC/g peso seco en la etapa II, representando diferencias significativas ($p < 0,05$). Fue característica una mayor abundancia en ausencia de metales pesados que en presencia de los mismos, tanto a la entrada de las cámaras como a la salida (Figura 9). Sin embargo, la cantidad de heterótrofos presentes en la etapa II fueron suficientemente eficientes como para remover un cierto porcentaje de la materia orgánica (DQO) presente, al igual que los elementos Cd y Cr (Tabla 3), según lo comentado con anterioridad. La mayor abundancia observada en los días 7 y 12, para las etapas I y II respectivamente, pudiendo estar relacionada con la madurez y estabilidad del cultivo adherido (biopelícula), mientras que la menor densidad en C3 fue resultante del bajo influjo de materia orgánica y nutrientes, en comparación con C1.

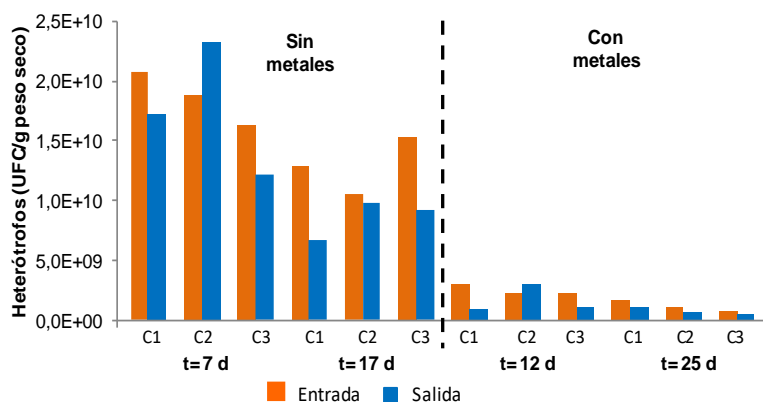


FIGURA 9. Conteo de heterótrofos en la biopelícula del reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados. C1-C3: cámaras del reactor, t: tiempo de muestreo, entrada: primer disco, salida: último disco.

Durante el proceso de aislamiento e identificación de las cepas bacterianas de la biopelícula, fueron descartadas las colonias cuyo crecimiento exhibía características macromorfológicas similares, obteniéndose finalmente siete cepas bacterianas distintivas para ambas etapas de tratamiento, notándose predominios de colonias redondas, de color blanco, opacas y planas, así como una diversidad en la forma de los bordes de la colonia (agar conteo).

En la Tabla 4 se detallan las características tintoriales y micromorfológicas de las cepas bacterianas aisladas, así como la especie en cuestión y probabilidad de dicha identificación, según el programa ABIS *on line*. Todas las cepas resultaron ser Gram negativas y con forma de cocobacilos, de las cuales tres exhibieron crecimiento a manera de cadenas cortas. En diversos trabajos realizados en zonas impactadas por hidrocarburos, se han reportado resultados similares, tal es el caso de León et al. (2009), quienes aislaron una amplia gama de bacterias que presentaron gran diversidad en forma, color, borde, tamaño, textura y elevación, a partir de desechos petrolizados, resultando en su totalidad del tipo Gram negativas. Por su parte, Ramírez et al. (2016) lograron aislar cinco cepas bacterianas de un manglar impactado por hidrocarburos, cuya morfología celular correspondió a formas bacilares y cocobacilares, mientras que las colonias presentaron formas redondas, concéntricas e irregulares, con pigmentación blanca y fluorescente.

TABLA 4. Especies bacterianas identificadas durante el tratamiento del efluente sintético en el reactor RBC de tres cámaras, en presencia y ausencia de metales pesados.

Cepa	Tinción	Forma	Especie	*Probabilidad (%)
B1	Gram -	Cocobacilo	<i>Paenibacillus apiarius</i>	84
B2	Gram -	Cocobacilo	<i>Paenibacillus elgii/Bacillus funiculus</i>	75
B3	Gram-	Cocobacilo	<i>Paenibacillus nematophilus</i>	79
B4	Gram -	Cocobacilo-cadena	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	89
B5	Gram -	Cocobacilo-cadena	<i>Bacillus farraganis/B. fordii/B. fortis/Paenibacillus borealis</i>	89
B6	Gram -	Cocobacilo	<i>Lysinibacillus massiliensis</i>	88

B7	Gram -	Cocobacilo- cadena	<i>B. funiculus/Bacillus oleronius</i>	83
----	--------	-----------------------	--	----

*Programa ABIS *on line*.

Con base en estas características macromorfológica, tintoriales y microscópicas de las cepas aisladas, así como del perfil bioquímico exhibido, las mismas fueron identificadas como pertenecientes al orden Bacillales y a los géneros: *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*. Para la cepa B1 el programa asignó la especie *Paenibacillus apiarius* con un 84 % de probabilidad, seguida por *Lysinibacillus fusiformis* (79 %) y *Paenibacillus wynnii* (79 %). La B2 fue identificada *a priori* como *Paenibacillus lautus* con una probabilidad de 79 %, sin embargo esta especie fue descartada por ser Gran positiva, siendo entonces nombrada como *Paenibacillus elgii* (75 %) o *Bacillus funiculus* (75 %). La B3 se identificó como *Paenibacillus nematophilus* con 79 % de probabilidad, seguido de *Paenibacillus alvei* (71 %). La B4 fue nombrada *Lysinibacillus fusiformis* con 89 % de probabilidad, seguido de *Paenibacillus borealis* (89 %). La B5 fue identificada como *Bacillus farraganis/B. fordii/B. fortis* o *Paenibacillus borealis*, todas con un 89 % de probabilidad. La B6, por su parte, obtuvo 88 % de probabilidad para la especie *Lysinibacillus massilensis*. Finalmente, la B7 se trató de la especie *Bacillus funiculus* o *B. oleronius*, ambas con 83 % de probabilidad.

La identificación taxonómica de las cepas aisladas en ambas condiciones experimentales es congruente con lo reportado por diversos autores, lo cual aportan información tanto de las capacidades metabólicas como de la ecología de los microorganismos que cohabitan en la biopelícula de reactor RBC. Tal es el caso de Gallegos-Monterrosa et al. (2017), quienes identificaron mediante técnicas moleculares, cepas de *L. fusiformis* a partir de muestras de suelos, indicando además la ocurrencia de esta especie asociada a biopelículas en las micorrizas de algunas plantas, formando consorcio con *Bacillus subtilis*, mediante la segregación de ciertas sustancias extracelulares por parte de *L. fusiformis*, que inducen la asociación de *B. subtilis* a la biopelícula.

Srinath et al. (2002) aislaron cepas bacterianas bioacumuladoras de Cr en un efluente de tenería, las cuales fueron identificadas como: *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus megaherium*, mientras que Guerrero et al. (2017), demostraron la capacidad de la bacteria *Paenibacillus* sp. para la remoción de Cr, utilizando como sustrato agua residual municipal, obteniendo un 79,27 % de eficiencia. Así mismo, Azzam y Tawfik (2015) señalaron el potencial biorremediador de los biofloculantes producidos por especies de *Bacillus* en aguas residuales de una industria textil, reportando 74,5 % de remoción del contenido inicial de Cd ($321 \pm 6 \mu\text{g/L}$), por parte de la cepa *Bacillus* sp.

Conclusiones

La presencia de Cd y Cr repercutió sobre el desempeño del reactor RBC de tres cámaras, durante el tratamiento del efluente industrial sintético. Los parámetros pH, alcalinidad total, oxígeno disuelto, potencial redox, SST, así como el contenido de materia orgánica (DQO), Cd y Cr del efluente final, exhibieron diferencias significativas ($p < 0,01$), con respecto a las condiciones experimentales evaluadas (presencia y ausencia de Cr y Cd). Se observó un 18,0 % de pérdida en la eficiencia del proceso de oxidación de materia orgánica.

Los parámetros fisicoquímicos monitoreados cumplieron con los límites permisibles para la descarga a cuerpos de agua naturales, establecidos en la legislación venezolana, a excepción del contenido de Cr; por lo que se requiere de un postratamiento para su adecuación a las exigencias de la normativa ambiental.

De las características evaluadas en la biopelícula del reactor, el grosor y la abundancia de heterótrofos mostraron una menor proporción bajo la presencia de los metales, como consecuencia de su efecto sobre la actividad microbiana. Las bacterias más abundantes durante el tratamiento del efluente pertenecieron a los géneros: *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*.

Referencias

- ABIS. (2018). Advanced bacterial identification. Ver. 12.8. Regnum Prokaryotae. Fecha de consulta: 10-04-2018. Disponible en: <https://abis-online.es.aptoide.com>
- APHA, AWWA, WCF. (2005). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21 ed. American Public Health Association. Washington D. C., USA. 1054 p.
- Argota, G., González, Y., Argota, H., Fimia, R., Iannacone, J. (2012). Desarrollo y bioacumulación de metales pesados en *Gambusia punctata* (Poeciliidae) ante los efectos de la contaminación acuática. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 13(5): 1-12.
- Atlas, R., Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4 ed. Pearson Educación S. A. Madrid. 677 p.
- Ávila, H., Gutiérrez, E., Ledo, H., Araujo, M., Sánquiz, M. (2010). Heavy metals distribution in superficial sediments of Maracaibo Lake (Venezuela). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de LUZ*. 33(2): 122-129.
- Ávila, H., Quintero, E., Angulo, N., Cárdenas, C., Araujo, M., Morales, N., Prieto, M. (2014). Determinación de metales pesados en sedimentos superficiales costeros del sistema Lago de Maracaibo, Venezuela. *Multiciencias*. 14(1): 16-21.
- Azzam, A. M., Tawfik, A. (2015). Removal of heavy metals using bacterial bio-flocculants of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*. 23(4): 288-294.
- Baral, A., Engelken, R., Stephens, W., Farris, J., Hannigan, R. (2006). Evaluation of aquatic toxicities of chromium and chromium containing effluents in reference to chromium electroplating. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 496-502.
- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K. E. (2014). Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Marine Environmental Research*. 96: 81-91.
- Bjerregaard, P., Andersen, C. B., Andersen, O. (2015). Ecotoxicology of metals: sources, transport, and effects on the ecosystem. Chapter 21. En: *Handbook on the toxicology of metals*. G., Nordberg, B., Fowler, M., Nordberg (Eds.). 4 ed. Academic Press. p.p. 425-459.

- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 131-143.
- Castro, F., Marín, J. C. (2018). Comparación de la ecotoxicidad por metales pesados sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del Lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 14(1): 1-10.
- Chacín, E. (1993). Treatment characteristics of two phase anaerobic system using an UASB reactor. Tesis de doctorado. University of Birmingham. Birmingham, England. 180 p.
- Cortez, S., Texeira, P., Oliveira, R., Mota, M. (2008). Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7: 155-172.
- Costley, S., Wallis, F. (2001). Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor. *Water Research*. 35(15): 3715-3723.
- Curt-Flemming, H., Wingender, J. (2003). The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms. En: S., Wuertz, P., Bishop, P., Wilderer (Eds.): *Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach*. IWA Publishing. Londres. 401 p.
- Decreto 883. (1995). Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de aguas y vertidos de efluentes líquidos. Gaceta oficial de la República de Venezuela No. 5021, extraordinaria. Caracas, Venezuela.
- Esclapés, M., Galindo, I. (2000). Calidad de las aguas del Lago de Maracaibo. En: G., Rodríguez (Ed.): *El sistema de Maracaibo*. Capítulo 9. 2 ed. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. p.p. 125-146.
- Gallegos-Monterrosa, R., Kankel, S., Gotze, S., Barnett, R., Stallforth, P., Kovacs, A. (2017). *Lysinibacillus fusiformis* M5 induces increased complexity in *Bacillus subtilis* 168 colony biofilms via hypoxanthine. *Journal of Bacteriology*. 199(22): 204-217.
- Guerrero, D., Pinta, J., Fernández, P., Ibarguen, E., Hudalgo, S., Burbano, E. (2017). Eficiencia en la reducción de cromo por una bacteria silvestre en un tratamiento tipo Bach utilizando como sustrato agua residual del municipio de Pasto, Colombia. *Revista Universidad y Salud*. 19(1): 102-115.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. M. D., Williams, C., Wilkins. Baltimore, USA. 606 p.

- ICLAM (1988). Determinación de la concentración de hidrocarburos y metales pesados en agua, sedimento y biota del Lago de Maracaibo. Informe Técnico. Instituto para el Control y la Conservación del Lago de Maracaibo. 47 p.
- Islam, S., Ahmed, K., Raknuzzaman, M., Al-Mamun, H., Kundu, G. (2017). Heavy metals in the industrial sludge and their ecological risk: A case study for a developing country. *Journal of Geochemical Exploration*. 172: 41-49.
- Jacob, J. J., Varalakshmi, R., Gargi, S., Jayasri, M. A., Suthindhiran, K. (2018). Removal of Cr (III) and Ni (II) from tannery effluent using calcium carbonate coated bacterial magnetosomes. *NPJ Clean Water*. 1: 1-10.
- Katz, S., Salem, H. (1994). *The biological and environmental chemistry of chromium*. 1 ed. Wiley-VCH. New York, USA. 214 p.
- Kotrba, P., Mackova, M., Fišer, J. y Macek, T. (2011). Biosorption and metal removal through living cells. En: P. Kotrba, M. Mackova, J. Fišer y T. Macek (Eds.): *Microbial biosorption of metals*. Springer Science + Business Media B. V. Dordrecht. p.p. 197-233.
- León, Y., De Sisto, A., Inojosa, Y., Malaver, N., Naranjo, L. (2009) Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la faja petrolífera del Orinoco. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*. 1(2): 11-24.
- Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. (2015). Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122: 322-330.
- Lobo, C., Arturi, T., Bertola, N., Contreras, E. (2013). Evaluación del desarrollo de biopelícula para el tratamiento de agua residual de industria láctea. AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos-CPSQ. 1-11.
- MacFaddin, J. 2004. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3 ed. Editorial Panamericana, Madrid, España. 850 p.
- Marín-Leal, J. C., Carrasquero-Ferrer, S. J., Pire-Sierra, M. C., Behling de Calmón, E. H. (2017). Dynamic of priority pollutants and wastewater adequacy in the Lake Maracaibo basin (Venezuela). Chapter 29. En: C. V. M. Araújo, Cándida Shinn (Eds.): *Ecotoxicology in Latin America*. Nova Science Publishers, Inc. USA. pp. 457-479.
- Martín-Cereceda, M., Álvarez, A., Serrano, S., Guinea, A. (2001). Confocal and light microscope examination of protozoa and other microorganisms in the biofilms from

a rotating biological contactor wastewater treatment plant. *Acta Protozoologica*. 40: 263-272.

Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F. Yolken, R. (1999). *Manual of clinical microbiology*. 6 ed. ASM Press, Washington D. C., USA. 1773 p.

Naik, M. M., Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98: 1-7.

Najafpour, G., Yieng, H., Younesi, H., Zinatizadeh A. (2005). Effect of organic loading on performance of rotating biological contactors using palm oil mill effluents. *Process Biochemistry*. 40(8): 2879-2884.

Nowak, O. (2000). Upgrading of wastewater treatment plants equipped with rotating biological contactors to nitrification and P removal. *Water Science and Technology*. 41: 145-153.

Okabe, S., Hiratia, K., Ozawa, Y., Watanabe, Y. (1996). Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. 50(1): 24-35.

Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M. (2001). Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos. En: F., Páez (Ed.): *Camaronicultura y medio ambiente*. Universidad de Texas. Austin, USA. p.p. 244-270.

Panigatti, M., Griffa, C., Boglione, R., Gentinetta, F., Cassina, D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Av. Cien. Ing.* 3(2): 11-24.

Pérez, J. (2010). Aplicación y evaluación de un reactor de contactores biológicos rotativos (RBC o biodiscos) a escala laboratorio como tratamiento de los lixiviados generados en el relleno sanitario de la pradera. Tesis de Maestría. Universidad de Medellín. Colombia. 185 p.

Ramírez, B., Hidalgo, A., Ordinola, A., Vieyra, E., Palacios, P., Ordinola, J. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Revista Química Viva*. 15(1): 20-30.

Reynolds, J. (2002). *Laboratory procedures manual*. Richland College. Dallas, USA. 87 p.

- Rodríguez, G. (2000). *El sistema de Maracaibo, biología y ambiente*. 2 ed. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas. 241 p.
- Salazar-Lugo, R. (2009). Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 10(11). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111109/110909.pdf>
- Santos, A., Alonso, E., Riesco, P. (2005). Influence of cadmium on the performance of an activated SBR sludge treatment. *Environmental Technology*. 26(2): 127-134.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P., Garg, S. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*. 48: 427-435.
- Taseli, B., Gökçay, C., Gürol, A. (2008). Influence of nickel (II) and chromium (VI) on the laboratory scale rotating biological contactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35: 1033-1039.
- Tawfik, A., Temmink, H., Zeeman, G., Klapwijk, B. (2006). Sewage treatment in a rotating biological contactor (RBC) system. *Water, Air, and Soil Pollution*. 175: 275-289.
- Teitzel, G., Parsek, M. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 2313-2320.
- Tyagi, R., Tran, F., Chowdhury, A. (1993). Biodegradation of petroleum refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with polyurethane foam attached to the disks. *Water Research*. 27(1): 91-99.
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3): 93-104.
- Welter, A., Romero, J., Grumelli, Y., Sánchez, J., Ascar, G. (2004). La biopelícula en los procesos RBC. AIDIS. Fecha de consulta: 10-04-2018. Disponible en: <http://www.bvsaidis/argentina14/welter.pdf>.