



ARTÍCULO ORIGINAL

Monocultivos y consorcios bacterianos con aplicación en la asimilación de nutrientes de interés ambiental

Bacterial monoculture and consortia with application in assimilation of environmental concern nutrients

Lizandra Pérez-Bou , María E. Carballo-Valdés , Jasmany H. Sardiñas-del Río , Armando Martínez-Sardiñas , Mario Enrique Cruz-Arias, Irina Salgado-Bernal 

Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia:
irina@fbio.uh.cu

RESUMEN

El vertimiento de aguas residuales domésticas, con un elevado grado de contaminación, constituye uno de los principales problemas asociados al uso inadecuado de los recursos hídricos por el ser humano. Como tecnologías de tratamiento se aplican diferentes métodos físicos y químicos, sin embargo, el empleo de sistemas biológicos, especialmente de microorganismos, ha tomado auge en los últimos años por sus múltiples ventajas. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la remoción de materia orgánica, nitrógeno y fósforo por monocultivos y consorcios bacterianos, a través de su interacción en agua residual doméstica simulada. Se emplearon tres cepas bacterianas: *Bacillus subtilis* (AL-25), *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138). Se les determinó la capacidad para degradar diferentes fuentes de carbono, la actividad proteolítica y lipolítica, así como la remoción de amonio y fósforo. A partir de los resultados de la interacción de las cepas con los compuestos de interés se diseñaron cuatro consorcios. Los sistemas mixtos denominados CMB3 y CMB4 mostraron los resultados más integrales en cuanto a la remoción diversa de contaminantes, con valores de remoción superiores al 88 %. Los monocultivos de *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138) presentaron elevados porcentajes de remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) y fosfato, respectivamente. Estos valores fueron similares o superiores a los alcanzados por los consorcios; por ello pueden constituir una alternativa para el tratamiento de aguas con estos contaminantes. Los resultados demuestran las potencialidades de las biomasas bacterianas empleadas para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales con la presencia de estos compuestos.

Palabras clave: DQO, amonio, fosfato, biomasas bacterianas, tratamiento de aguas

Recibido: 2020-07-16

Aceptado: 2021-04-05

ABSTRACT

The dumping of large polluted domestic wastewater is one of the main problems associated to the inadequate use of hydric resources by humans. Different physical and chemical technologies have been applied for water treatment. Nevertheless the use of biological systems, in special the microorganisms, has been extensively developed in recent years due to its various advantages. In present research organic matter, nitrogen and phosphorus removal by bacterial monocultures and consortia was evaluated from simulated domestic sewage. Three bacteria strains were used: *Bacillus subtilis* (AL-25), *Bacillus cereus* (AL-30) and *Micrococcus sp.* (AL-138). Their capacities were determined for different carbon source assimilation, proteolytic and lipolytic activities, and phosphate and ammonium removal. Taking into account these previous results, four consortia were designed. The feasibility of using consortia CMB3 and CMB4 in the mixed removal of nutrients was determined in a simulated domestic wastewater with removal values higher than 88 %. The monocultures of *Bacillus cereus* (AL-30) and *Micrococcus sp.* (AL-138) presented high percentages of COD (Chemical Oxygen Demand) and phosphate removal, respectively. These values were similar or higher than those reached by the consortia; for this reason they can constitute an alternative for wastewater treatment with these pollutants. The potentialities showed by these bacterial biomasses make them attractive candidates for future application on wastewater treatment systems for the elimination of these pollutants.

Keywords: COD, ammonium, phosphate, bacterial biomasses, water treatment

INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado de los recursos hídricos ocasiona el deterioro de los ecosistemas acuáticos. Entre las causas de esta problemática se encuentra el vertimiento de aguas residuales provenientes de diversas actividades antrópicas (agropecuarias, industriales y domésticas). La presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos como consecuencia de esta acción, genera conflictos ambientales, sociales y culturales (Shon *et al.*, 2015). Esta situación presenta gran importancia actual, lo cual se refleja en su inclusión como uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda ONU 2030: lograr agua limpia y segura para todos. En el caso específico de las aguas residuales domésticas (ARD) se destaca como contaminante la materia orgánica, debido a su abundancia y composición compleja y heterogénea. Entre sus constituyentes principales están las proteínas (40 - 60 %), los carbohidratos (25 - 50 %) y los ácidos grasos (10 - 30 %) (Shon *et al.*, 2007; Varello, 2019). Otros compuestos de interés en este tipo de aguas son el amonio y el fosfato, los cuales influyen en la eutrofización y presentan un efecto desfavorable en la concentración de oxígeno en las aguas receptoras (Shon *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

Las bacterias tienen una nutrición y metabolismo muy versátiles, un ejemplo de ello es que presentan la

capacidad de utilizar diversas fuentes de nutrientes, por lo que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos en la naturaleza (Guo *et al.*, 2018). En este sentido, su aplicación potencial en la eliminación de carbono es uno de los tratamientos más importantes en la depuración biológica de Agua Residual Doméstica (ARD) (Arnáiz *et al.*, 2000). En un proceso de tratamiento biológico, la eliminación de la materia orgánica se entiende como la transformación de estos sustratos por los microorganismos a través de sus diferentes rutas metabólicas, por dos vías fundamentales: reacciones de producción de energía y reacciones de síntesis (Arnáiz *et al.*, 2000; Akpor y Muchie, 2010).

Por otro lado, la eliminación biológica de compuestos del nitrógeno y del fósforo, comprende reacciones complejas y heterogéneas. En el caso de los compuestos del nitrógeno, las formas químicas más estables en ambientes acuáticos como el amonio, el nitrato y el nitrito se remueven por dos mecanismos generales, la asimilación y la nitrificación - desnitrificación (Aggoun y Benmaamar, 2019). En el caso del fósforo se remueve por asimilación (Faulwetter *et al.*, 2009) o por acumulación del exceso de ortofosfatos, como gránulos de polifosfatos en bacterias acumuladoras de polifosfato (Lin-Lin *et al.*, 2007; Akpor y Muchie, 2010; Guo *et al.*, 2018).

Para el tratamiento de las ARD se aplican diferentes tecnologías físicas y químicas. Algunas de las limitaciones de su aplicación refieren los altos requerimientos de energía y reactivos, así como la generación de contaminaciones secundarias (Shon *et al.*, 2015). También se emplean sistemas de tratamiento biológicos, considerados métodos menos costosos y que utilizan generalmente, microorganismos autóctonos de la zona afectada (Salgado-Bernal *et al.*, 2012). Varias especies de algas, bacterias y hongos contribuyen a la eliminación de los contaminantes al ser fuentes de nutrientes esenciales para su metabolismo (Akpor y Muchie, 2010; Al-Ghouti *et al.*, 2019). El empleo de estos organismos resulta una opción atractiva por ser eficiente, económica y ecológica (Carballo *et al.*, 2011). Como valor añadido estos sistemas asumen y aplican el principio de que la eliminación de los contaminantes en la naturaleza es a menudo consecuencia de la interacción de varios microorganismos (Muratova *et al.*, 2003), lo cual puede ser explotado para el diseño de consorcios microbianos y la eliminación o transformación de varios tipos de contaminantes simultáneamente.

En Cuba la contaminación de las aguas constituye uno de los principales problemas ambientales, debido al manejo inadecuado, en ocasiones, de los residuales líquidos (Montalván *et al.*, 2014). Este hecho se refleja en la situación actual de algunos cuerpos de agua, como el río Almendares, ubicado en La Habana. Este cuerpo de agua presenta niveles elevados de compuestos orgánicos de diferente naturaleza, por ejemplo colorantes textiles, hidrocarburos y antibióticos; además compuestos inorgánicos como amonio, fosfato y metales pesados. Esto es consecuencia de las descargas que recibe de aguas residuales urbanas e industriales sin tratamiento o con tratamiento ineficiente (Carballo *et al.*, 2011). Por su condición de país en vías de desarrollo, hay un elevado déficit de mantenimiento y atención a la operación de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, lo cual ha originado su mal funcionamiento y la depuración inadecuada de los efluentes (Pérez *et al.*, 2009). Ante esta situación, se contemplan alternativas de solución que impliquen un método de tratamiento apropiado, entre los cuales el uso de microorganismos puede constituir una opción económicamente viable y amigable con el medio ambiente. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la remoción de materia orgánica, nitrógeno y fósforo por monocultivos y consorcios bacterianos, a través de su interacción en agua residual doméstica simulada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se utilizaron las cepas microbianas *Bacillus subtilis* (AL-25), *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138), pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología, de la Universidad de La Habana. Estos representantes se seleccionaron teniendo en cuenta el comportamiento de estas cepas frente a diferentes contaminantes inorgánicos y orgánicos, evaluados en un trabajo de Tesis previo realizado por Moreno (2019), en el Grupo de Investigación Biotecnología Microbiana de la propia institución.

Interacción de las bacterias con nutrientes de interés ambiental

Utilización de carbohidratos

La asimilación de diferentes fuentes de carbono se evaluó en medio sólido CAM (del inglés *Carbon Assimilation Medium*) (Atlas, 2010). Las cepas bacterianas se sembraron por estrías y por triplicado. Los carbohidratos utilizados fueron los monosacáridos: glucosa, manosa y xilosa; el disacárido lactosa y el polisacárido almidón. Para la selección de estos compuestos, se tuvo en cuenta que el porcentaje de monosacáridos en la materia orgánica de los residuos líquidos sigue el orden siguiente: glucosa > manosa > xilosa (Shon *et al.*, 2007), así como que la lactosa y el almidón son compuestos que se encuentran con frecuencia en los efluentes vertidos a los ecosistemas. Los cultivos se incubaron a 30°C por 48 h; posteriormente se observó el crecimiento de los microorganismos en presencia de cada carbohidrato.

Producción de proteasas

Se determinó la actividad proteolítica de las cepas al evaluar la capacidad de hidrólisis de proteínas en medios sólidos suplementados con caseína y gelatina, de acuerdo con la metodología descrita por Harrigan y McCance (1968). En ambos ensayos se sembró por estrías y se incubó a 30°C durante cinco días. Se comprobó la actividad mediante la aparición de un halo de hidrólisis alrededor del crecimiento bacteriano.

Producción de lipasas

La actividad lipolítica se comprobó en el medio Agar-Tween 80, según la metodología descrita por Harrigan y McCance (1968). Las bacterias se sembraron por punción y se incubaron a 30°C durante cinco días.

Cada 24 h se verificó la aparición de un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano, producto de la combinación del calcio y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. La selección de este medio se sustentó al tener en cuenta que las lipasas son generalmente producidas a partir de carbono lipídico como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tween (Carballo *et al.*, 2017).

Interacción con fuentes de nitrógeno

La reducción del nitrato se determinó según el método planteado por Harrigan y McCance (1968), la oxidación de amonio (Medio para Bacterias Oxidadoras de Amonio), la oxidación de nitrito (Medio para Bacterias Oxidadoras de Nitritos) y la amonificación (Medio para Bacterias Amonificantes), según las metodologías informadas por Atlas (2010). Los microorganismos inoculados en cada medio se incubaron a 30°C durante una semana.

Interacción con fuentes de fósforo

La acumulación de fosfato (se utilizó hidrógeno fosfato de potasio, KH_2PO_4) se evaluó en un medio base líquido (Atlas, 2010), se inocularon las bacterias y se mantuvieron en interacción con el medio a 30°C y 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 72 h. La capacidad de las cepas para la acumulación de este compuesto se constató mediante la evaluación cualitativa del caldo fermentado, por el método analítico del molibdato de amonio y el cloruro estañoso (APHA-AWWA-WPCF, 2001).

Interacción de las bacterias con un ARD simulada

Se preparó un agua residual sintética que simuló un efluente doméstico de contaminación promedio: 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de materia orgánica (cuantificada en forma de demanda química de oxígeno, DQO), 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrógeno total y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fósforo total (Salgado-Bernal *et al.*, 2012). La composición se presenta en la Tabla 1.

Evaluación de la remoción de los contaminantes por consorcios bacterianos

Para la interacción con el ARD simulada, se conformaron cuatro consorcios microbianos (CMB): CMB1: *B. subtilis* (AL-25), *B. cereus* (AL-30); CMB2: *B. subtilis* (AL-25), *Micrococcus* sp. (AL-138); CMB3: *B. cereus* (AL-30), *Micrococcus* sp. (AL-138) y CMB4: las tres cepas. La biomasa bacteriana se obtuvo individualmente en medio Caldo nutriente (BIOCEN, 13 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), a 30°C, en agitación a 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ por 24 horas. Posteriormente se filtró el cultivo obtenido con equipo Millipore (0,2 μm).

Tabla 1. Composición del agua residual doméstica sintética
Table 1: Composition of synthetic domestic wastewater

Composición química	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Peptona	250
Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	60
Almidón	140
Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	30
Fosfato de sodio tribásico ($\text{Na}_3\text{PO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	6
Lípidos (Aceite de soya)	50 ml

El filtro se lavó e inoculó al 1% (V/V) con aproximadamente 109 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el agua residual doméstica a un pH de 7, 30°C, con una agitación de 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ y 72 h de contacto, según se diseñó la formulación en consorcios. Como controles positivos se emplearon los respectivos monocultivos y como control negativo una variante sin tratamiento, en este caso ARD sintética sin inocular. El ensayo se realizó por triplicado y después de la incubación se separó la biomasa bacteriana de la solución, por centrifugación a 5000 g durante 15 min y se analizó la concentración de DQO, $\text{N}\text{-NH}_4^+$ y $\text{P}\text{-PO}_4^{3-}$ en el sobrenadante (APHA-AWWA-WPCF, 2001).

Cuantificación de los contaminantes orgánicos e inorgánicos

Para el cálculo de la concentración de todos los contaminantes se prepararon curvas de calibración, que permitieron calcular el coeficiente de correlación lineal (R2), la ecuación de la recta y la determinación de la concentración de los compuestos en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El porcentaje de remoción de los contaminantes del ARD sintética se calculó según la fórmula planteada por Romero-Aguilar (2009):

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

En la ecuación C_i y C_f corresponden a las concentraciones de los contaminantes al inicio y al final del experimento en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Análisis biométricos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. A los datos obtenidos se les comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov - Smirnov y Bartlett, respectivamente. La variable analizada fue el porcentaje de Remoción (%) correspondiente a cada compuesto analizado. Se aplicó el análisis estadístico paramétrico, Análisis de Varianza de Clasificación Simple para comparar más de dos muestras y cuando se obtuvieron resultados estadísticamente significativos se aplicó la prueba de Tukey a posteriori para la comparación de las medias a un nivel de significación de 0,05. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el programa de computación Microsoft Excel y el paquete estadístico Statistica versión 8,0 para Windows.

RESULTADOS

Asimilación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo por los monocultivos bacterianos

La asimilación de diferentes tipos de materia orgánica, nitrógeno y fósforo por cada una de las bacterias se muestra en la figura 1. De esta interacción fue notable que la mayoría de las cepas presentaron un patrón amplio para metabolizar diferentes compuestos carbonados.

En este sentido, se destacó *Bacillus subtilis* (AL-25) al mostrar más diversa capacidad metabólica frente a todos los nutrientes. Además, fue la única cepa que utilizó Tween 80 como fuente de carbono de origen lipídico.

A partir de los resultados de la interacción de las bacterias con los diferentes medios de cultivo suplementados con compuestos de nitrógeno y fósforo, se pudo constatar que las tres cepas mostraron reducción de nitrato hasta nitrito, utilización de nitrógeno orgánico (amonificación) y acumulación de fosfatos. No se observó la reducción total hasta dinitrógeno por la ausencia de gas dentro de la campana de Durham y ninguna bacteria realizó oxidación de amonio ni de nitrito (Fig. 1).

Según la premisa de que la eliminación de los contaminantes en la naturaleza es a menudo consecuencia de la interacción de varios microorganismos (Muratova *et al.*, 2003), se formaron cuatro consorcios bacterianos (CMB) a partir de las cepas de partida, CMB1: *B. subtilis* (AL-25), *B. cereus* (AL-30); CMB2: *B. subtilis* (AL-25), *Micrococcus sp.* (AL-138); CMB3: *B. cereus* (AL-30), *Micrococcus sp.* (AL-138) y CMB4: las tres cepas.

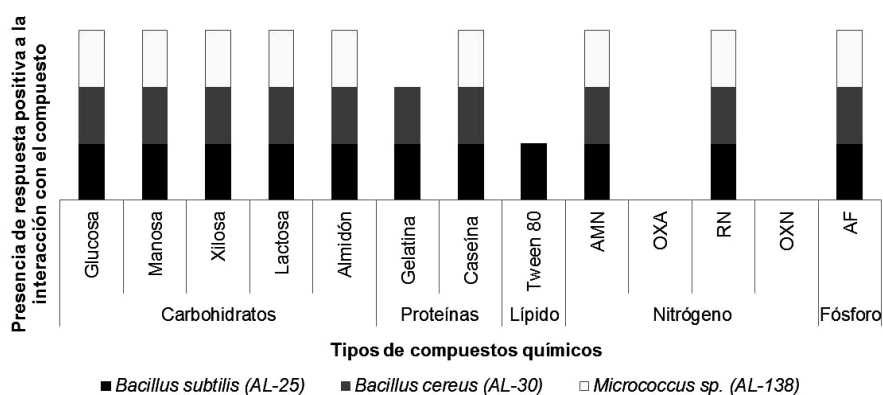


Figura 1. Interacción de los monocultivos bacterianos (presencia o ausencia de interacción) con diferentes tipos de materia orgánica (Carbohidratos, proteínas y lípido), nitrógeno (AMN-amonificación, OXA-oxidación de amonio, RN-reducción de nitrato y OXN-oxidación de nitrito) y fósforo (AF-acumulación de fosfato). Condiciones experimentales: empleo de medios de cultivos específicos con la presencia de cada compuesto. Incubación a 30°C, a diferentes tiempos (en dependencia del ensayo en particular); caso de interacción con el fósforo agitación a 100 r.min⁻¹

Figure 1. Bacterial monoculture interaction (interaction present or absent) with types of organic matter (Carbohydrates, proteins and lipid), nitrogen (AMN-ammonification, OXA-ammonium oxidation, RN-nitrate reduction and OXN-nitrite oxidation) and phosphorus compounds (AF-phosphate accumulation). Experimental conditions: using specifically culture media for the interaction with each compound. Incubation at 30°C, different incubation times (dependence on specific assay); phosphorus case, shaking 100 r.min⁻¹.

Remoción concomitante de los nutrientes en un ARD sintética

La efectividad en la remoción simultánea de materia orgánica, medida en forma de DQO, amonio y fosfato por los consorcios, en relación a los monocultivos que los conforman, se muestra en la Figura 2.

Se alcanzaron valores de remoción de DQO entre el 92 % y el 97 %, por los consorcios. Estos fueron estadísticamente significativos en relación a los logrados por los monocultivos, excepto el caso de *Bacillus cereus* (AL-30) (Fig. 2A). En la eliminación del amonio se observó que tres de los consorcios (CMB1, CMB3 y CMB4) mostraron altos porcentajes de remoción, superiores al 90% y estadísticamente significativos con respecto a los controles (Fig. 2B). Por otro lado en la acumulación de fosfatos se destacaron los consorcios CMB3 y CMB4, que demostraron ser los más efectivos, con similar respuesta a la mostrada por *Micrococcus* sp. (AL-138) (Fig. 2C). Estos dos consorcios presentaron los resultados más integrales. De manera general se constató la factibilidad de formar estas combinaciones con cepas bacterianas autóctonas para lograr la disminución de la carga contaminante mixta de un agua residual que simuló un efluente doméstico.

A partir de los resultados es posible proponer diferentes alternativas biotecnológicas, las que pueden resultar efectivas y económicas para la eliminación de los contaminantes evaluados, presentes en un agua residual. En la reducción de la DQO y del P-PO₄, si el objetivo es eliminar solo cada uno de estos contaminantes en particular, pudieran utilizarse los monocultivos *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138), respectivamente. Mientras que para la remoción solo de N-NH₄ podrían emplearse cualquiera de los tres consorcios (Fig. 2. A-B-C). Para la remoción de los tres tipos de contaminantes de manera conjunta pudiera ser factible el empleo de los consorcios CMB3 y CMB4.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo están en correspondencia con lo informado en la literatura. Los carbohidratos, proteínas y lípidos constituyen una fuente de carbono importante para el metabolismo de los microorganismos quimioheterótrofos (Salgado-Bernal *et al.*, 2012; Carballo *et al.*, 2017; Hernández-García *et al.*, 2019). El crecimiento de las bacterias evaluadas en presencia de las diferentes fuentes de carbono denota su versatilidad en la utilización de estos compuestos,

en particular monosacáridos como la D-glucosa. Este comportamiento se corresponde con la capacidad de las tres especies bacterianas de sintetizar enzimas hidrolasas, inducidas por la adición de cada compuesto en el medio de cultivo. De esta manera, a través de los procesos catabólicos las células reciben el aporte de energía en forma de ATP y poder reductor, necesario para desarrollar sus funciones vitales (Arnáiz *et al.*, 2000; Akpor y Muchie, 2010; Guo *et al.*, 2018). En relación al Tween 80 se observó que solamente *Bacillus subtilis* (AL-25) mostró la capacidad de asimilarlo. Esto pudiera explicarse porque para la mayoría de los microorganismos esta fuente de carbono lipídica tiene complejidad estructural y metabólica. Las diferencias observadas en cuanto a la síntesis y excreción de las enzimas lipasas es atribuida a causas como las características propias de cada especie microbiana, del cultivo y de su crecimiento (Perin *et al.*, 2012; Carballo *et al.*, 2017).

La eliminación de compuestos del nitrógeno y fósforo constituyen otros de los parámetros a tener en cuenta para un tratamiento exitoso de un ARD. De acuerdo a los resultados las tres cepas bacterianas pudieran tener utilidad en la eliminación de algunas fuentes de nitrógeno específicas, cuando se encuentran como contaminantes. El hecho de no detectarse actividad de oxidación de amonio y de nitrito es congruente con las características de las cepas bacterianas empleadas, clasificadas como microorganismos quimioheterótrofos. La actividad de nitrificación tiende a ser restrictiva a ambientes y especies bacterianas quimioheterótrofas particulares (Akpor y Muchie, 2010; Salgado-Bernal *et al.*, 2012; Shekhar y Medhi, 2019).

En la actual investigación la ausencia de burbujas de gas en la campana de Durham, denotó la no producción de dinitrógeno gaseoso y una reducción incompleta del nitrato, con la consecuente acumulación de nitrito en el medio. Este comportamiento se ha informado en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales e influye en la eficiencia de remoción del nitrógeno total en el efluente. Entre las condiciones que median en que pueda ocurrir una reducción parcial del nitrato está la concentración de la fuente de carbono (donante de electrones), considerada un parámetro esencial para lograr el proceso reductor completamente (Rijn *et al.*, 1996; Gan *et al.*, 2019). El comportamiento de las cepas bacterianas empleadas en la presente investigación frente a los compuestos nitrogenados y el fósforo es similar al informado por otros autores (Kallner *et al.* 2005; Lin-lin *et al.*, 2007).

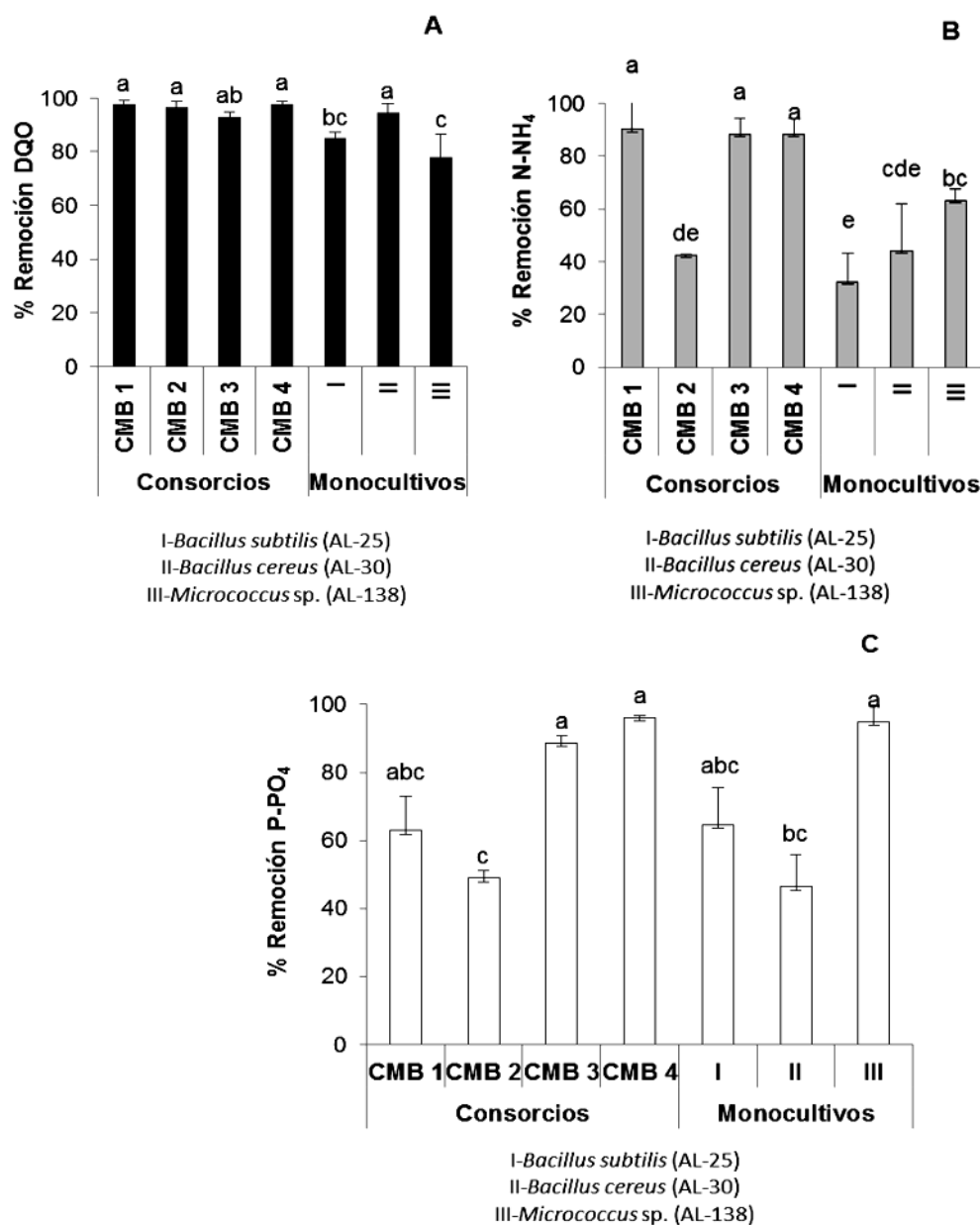


Figura 2. Remoción concomitante de DQO (A), amonio (B) y fosfato (C) de un agua residual doméstica simulada, por consorcios y monocultivos bacterianos. I- *Bacillus subtilis* (AL-25), II- *Bacillus cereus* (AL-30), III-*Micrococcus* sp. (AL-138). CMB1: *Bacillus subtilis* (AL-25), *Bacillus cereus* (AL-30); CMB2: *Bacillus subtilis* (AL-25), *Micrococcus* sp. (AL-138); CMB3: *B. cereus* (AL-30), *Micrococcus* sp. (AL-138) y CMB4: las tres cepas. Condiciones experimentales: pH 7,0, temperatura 30oC, agitación 100 r.min⁻¹ 48 h de contacto. Barras de error representan desviación estándar de tres repeticiones por cada ensayo. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de remoción entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba estadística Tukey a posteriori.

Figure 2. Concomitant removal of COD (A), ammonium (B) and phosphate (C) from synthetic domestic wastewater, by bacterial consortia and monocultures. I- *Bacillus subtilis* (AL-25), II- *Bacillus cereus* (AL-30), III- *Micrococcus* sp. (AL-138). CMB1: *B. subtilis* (AL-25), *B. cereus* (AL-30); CMB2: *B. subtilis* (AL-25), *Micrococcus* sp. (AL-138); CMB3: *B. cereus* (AL-30), *Micrococcus* sp. (AL-138) and CMB4: three strains. Experimental conditions: pH 7.0, temperature 30oC, shaking 100 r.min⁻¹ and 48 h of contact biomass - water. The values are averages from three measurements \pm 1 SD ($n = 3$). Different letters indicate significant differences among the Remotion % values ($p < 0.05$, by Tukey's test).

La caracterización de monocultivos bacterianos con buenas propiedades para la eliminación de los contaminantes de interés ha sido abordada ampliamente en la literatura. Entre los principales géneros involucrados en estos procesos se encuentran *Paracoccus*, *Agrobacterium* (Li *et al.*, 2015), *Nitrosomas*, *Nitrobacter* (Daims *et al.*, 2016), *Acinetobacter* (Chen *et al.*, 2019), *Serratia* (Fulazzaky *et al.*, 2017), *Actinobacteria*, *Rhodocyclus* y *Propionibacter* (Tang *et al.*, 2018), *Pseudomonas* (Yu *et al.*, 2019) y *Acinetobacter* (Chen *et al.*, 2019). Shao *et al.* (2013), informaron del efecto favorable de la bioaumentación de un humedal artificial con la bacteria *Paenibacillus* sp. XP1 para el tratamiento de aguas residuales domésticas municipales, en Shandong, China. Al emplear esta estrategia, se observó una remoción final de DQO del 73%, un 94% de amonio y un 78% de nitrógeno total. De manera similar investigaciones realizadas por Fulazzaky *et al.* (2017), al emplear la cepa *Serratia marcescens* SA30 para la degradación de materia orgánica oxidable, en un efluente industrial del proceso de obtención de aceite de palma en Indonesia, demostró este efecto positivo (remoción de DQO del 94%). Más recientemente, Yu *et al.* (2019) también informaron del uso exitoso de *Pseudomonas stutzeri* XL-2 para este fin, pues removió aproximadamente el 98,73% del amonio a escala de laboratorio.

La combinación de diferentes biomasas microbianas permite, en muchas ocasiones, complementar sus capacidades metabólicas. Este efecto sinérgico entre ellas favorece la degradación y asimilación de los contaminantes. Los consorcios CMB3 y CMB4 constituyen un ejemplo de este comportamiento, pues fueron los más integrales en cuanto a la remoción simultánea de todos los contaminantes. En este sentido, Gan *et al.* (2019) informaron la efectividad del consorcio conformado por 28 cepas bacterianas en la remoción de nitrógeno. Entre los géneros predominantes se encontraban *Pseudoxanthomonas*, *Caulobacter*, *Zoogloea* y *Dechloromonas*. La combinación de diferentes grupos microbianos también se ha señalado como una alternativa exitosa. Un ejemplo lo constituyó el empleo del consorcio entre una microalga (*Desmodesmus* sp.) y una bacteria (*Bacillus subtilis*) para el tratamiento de aguas residuales, con altos valores de remoción de N-NH_4^+ (82%) y de ortofosfatos (43%) (Hernández-García *et al.*, 2019).

En el caso de los consorcios CMB1 y CMB2, la combinación de las biomasas no favoreció la remoción de N-NH_4 ni de P-PO_4 . Este hecho pudiera deberse a múl-

tiples causas, entre las que se destacan la manifestación de competencia entre ellas y la afectación de sus capacidades fisiológicas y metabólicas. El nivel de remoción de un sistema microbiano depende de las características de cada especie bacteriana y de las potencialidades para realizar el proceso en cuestión, además, de las interacciones que sean capaces de establecer las cepas que conformen el consorcio entre sí y su interacción con los factores abióticos en el medio (Carballo *et al.*, 2003). Otro aspecto relevante es que con algunos de los monocultivos se logra la remoción concomitante de los contaminantes, aunque no se obtienen altos porcentajes de remoción para todos los compuestos a la vez. El futuro empleo de un monocultivo bacteriano con la capacidad por sí solo de remover varios tipos de contaminantes resultaría de gran interés, desde el punto de vista económico.

En este trabajo se evidenciaron las potencialidades de tres monocultivos, *Bacillus subtilis* (AL-25), *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138), en la remoción de materia orgánica, amonio y fosfato. Estos resultados contribuyeron al conocimiento de estos microorganismos como agentes biorremediadores y permitió su empleo en el diseño de consorcios bacterianos. A escala de laboratorio se constató la factibilidad del empleo de consorcios (CMB3 y CMB4) para la remoción concomitante de los compuestos de interés presentes en un ARD sintética, con valores de remoción superiores al 88%. Los monocultivos de *Bacillus cereus* (AL-30) y *Micrococcus* sp. (AL-138) se mostraron como una opción para el tratamiento de aguas con un solo tipo de contaminante, con valores de remoción de DQO y fosfato, respectivamente, comparables o superiores a los valores presentados por los consorcios. Los sistemas propuestos constituyen candidatos para su aplicación en tecnologías de tratamiento de efluentes. Con este fin se hacen necesarios estudios futuros que demuestren la efectividad de estas biomasas frente a efluentes reales y que determinen las mejores condiciones experimentales para el complejo proceso de interacción biomasa - contaminantes.

LITERATURA CITADA

- Aggoun, A. y Z. Benmaamar (2019). Effect of a mixture of cadmium and lead on nitrate and phosphate removal by the duckweed *Lemna gibba*. *Ann. Bot. (Roma)* 9: 53-62.
- Akpor, O. B. y M. Muchie (2010). Bioremediation of polluted wastewater influent: Phosphorus and nitrogen removal. *Sci. Res. Essays* 5(21): 3222-3230.

- Al-Ghouti, M.A., M. A. Al-Kaabi, M. Y. Ashfaq y D. Adel Da'na (2019). Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *J. Water Process. Eng.* 28: 222-239
- APHA, AWWA y WPCF (2001). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, 20th ed., Washington, DC
- Arnáiz, C., L. Isac y J. Lebrato (2000). Tratamiento biológico de aguas residuales. *Tecnol. agua* 20 (198): 22-26
- Atlas R.M. (2010) *Handbook of Microbiological Media*. 4th Edition. ASM Press and CRC Press. 2044 pp.
- Carballo, M. E., D. Nonjamba, A. Martínez, I. Salgado *et al.* (2017). Producción de lipasas por bacterias aisladas de efluente de productos lácteos. *Rev. Cub. Cien. Biol.* 5(3): 1-9
- Carballo, M.E, M. Heydrich, N. Rojas, I. Salgado *et al.*, (2011). Impact of microbial and chemical pollution in Cuban freshwater ecosystems: strategies for environmental recovery. *Biotechnol. Apl.* 28(4): 276-279
- Carballo, M.E., A. Piñón, A. Martínez, J. Martínez *et al.* (2003). Tamizaje de cepas bacterianas para la remoción de metales pesados (cobre y cadmio). *Revista Contribución a la Educación y la Protección Ambiental* 4:31
- Chen, S., S. He, C. Wu y D. Du (2019). Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp.T1 and its application for pig farm wastewater treatment. *J Biosci. Bioengg.* 127(2): 201-205
- Daims, H., S. Lütcher y M. Wagner (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trend. Microbiol.* 24(9): 699-712
- Faulwetter, J.L., V. Gagnon, C. Sundberg, F.Chazarenc *et al.* (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecol. Eng.* 35(6): 987-1004
- Fulazzaky, A. M., M. Nuid, A. Aris y K. Muda (2017). Kinetics and mass transfer studies on the biosorption of organic matter from palm oil mill effluent by aerobic granules before and after the addition of *Serratia marcescens* SA30 in a sequencing batch reactor. *Process Saf Environ.* 107: 259-268
- Gan, Y., Q. Zhao y Z. Ye (2019). Denitrification performance and microbial diversity of immobilized bacterial consortium treating nitrate micro-polluted water. *Bioresour. Technol.* 281:351-358
- Guo, Y., W. Zeng, N. Li y Y. Peng (2018). Effect of electron acceptor on community structures of denitrifying polyphosphate accumulating organisms in anaerobic-anoxic-oxic (A2O) process using DNA based stable-isotope probing (DNA-SIP). *Chem. Eng. Technol.* 334: 2039-2049
- Harrigan, W.F y M.E. Mc Cance (1968). *Métodos de laboratorio en Microbiología*. Editorial Académica. España. 426 pp.
- Hernández-García, A., S.B. Velásquez-Orta, E. Novelo, I. Yáñez-Nogueza *et al.* (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicol Environ Saf.* 174: 435-444
- Kallner, S.B., P.G. Eriksson, A. Premrov y K. Tonderski (2005). Potential denitrification in wetland sediments with different plant species detritus. *Ecological Engineering* 25 (2): 183-190
- Li, X., S. Wu, Y. Shen, Y. Ning *et al.* (2015). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by four novel isolated bacteria. *Pol. J Environ. Stud.* 24 (4): 1677-1682
- Lin-Lin, B., L. Dong, L. Xiang-kun, H. Rong-xin *et al.* (2007). Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *Int. J. Environ. Sci.* 19(4): 391-395
- Liu, X., K. Wang, J. Zhang, J. Wang *et al.* (2019). Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from waste water. *Bioresour. Technol.* 283: 184-190
- Montalván, A.Y., E. Aguilera y O. Brigido (2014). Sistema de indicadores para la gestión integrada de aguas residuales industriales. *Revista Avanzada científica* 17(3): 1-18
- Moreno, V. (2019). Remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos por biomasas bacterianas. Tesis de Grado, Universidad de La Habana, Cuba
- Muratova, A., Th. Hübner, S. Tischer, O. Turkovskaya *et al.* (2003). Plant-Rhizosphere-Microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 5 (2): 137-151
- Pérez, M., E. R. Domínguez, P. Martínez y M. E. López (2009). Eficiencia de diferentes sustratos de filtros de suelo plantados en la depuración de aguas residuales domésticas. *RCCB.* 40(3):181-185
- Perin, L.M., P. Mendoca, M.V. Almeida y N.L. Augusto (2012). Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Ciênc. Agrár.* 33(1): 333-342
- Rijn, J.V., Y. Tal y Y. Barak (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2615
- Romero-Aguilar, M., A. Colín-Cruz, E. Sánchez-Salinas y M.L. Ortiz-Hernández (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: evaluación de la remoción de la carga orgánica. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(3): 157-167
- Salgado-Bernal, I., A. Martínez-Sardiñas, M. E. Carballo-Valdés, M. Cruz-Arias *et al.* (2012) Diversidad de las bacterias rizosféricas asociadas a plantas de *Typha domingensis* en humedales del río Almendares. *RCCB.* 43(3): 1-7
- Shao, Y., H. Peiab y W. Huab (2013). Nitrogen removal by bioaugmentation in constructed wetlands for rural domestic wastewater in autumn. *Desalin Water Treat.* 51: 6624-6636
- Shekhar, I. y K. Medhi (2019). Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 282: 502-513
- Shon, H. K., S. Vigneswaran, J. Kandasamy y J. Cho (2015). Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36: 327-74
- Shon, H. K., S. Vigneswaran y S. A. Snyder (2007). Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 36(4): 327-374
- Tang, Y., M. Lia, Y. Zoua, M. Lv *et al.* (2018). Mechanism of aerobic denitrifiers and calcium nitrate on urban river sediment remediation. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 126: 119-130
- Varello, D. A. (2019). *Waste. A Handbook for Management*. Chapter 13 Wastewater. Second Edition: Academic Press. 259-290 pp.
- Yu, Y., Q. An, Y. Zhou y S. Deng (2019). Highly synergistic effects on ammonium removal by the co-system of *Pseudomonas stutzeri* XL-2 and modified walnut shell biochar. *Bioresour. Technol.* 280: 239-246

