

## Diversidad microbológica del lodo anaerobio durante el tratamiento de aguas de producción petroleras venezolanas

### *Microbiological Diversity of the Anaerobic Sludge During Treatment of Venezuelan Oilfield Produced Waters*

Cajacuri María Patricia

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)  
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: mariacajacuri@hotmail.com*

Behling Elisabeth

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)  
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: elisabeth.behling@gmail.com*

Rincón Nancy

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)  
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: nancycoromotorincon@hotmail.com*

Colina Gilberto

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)  
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: gjcolina@hotmail.com*

Araujo Ismenia

*Centro de Investigación del Agua (CIA)  
Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: ismenia\_araujo@hotmail.com*

Marín L. Julio César

*Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)  
Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería  
La Universidad del Zulia, Venezuela  
Correo: jmarin@fing.luz.edu.ve (correspondencia)*

Información del artículo: recibido: abril de 2011, aceptado: septiembre de 2012

#### Resumen

En esta investigación se compararon las abundancias microbianas presentes en el lodo granular de dos reactores anaerobios de manto de lodo con flujo ascendente (UASB): el primero alimentado con aguas de producción de petróleo liviano (31.1-39.0°API), provenientes de la región zuliana (Venezuela) (APP) y el segundo con glucosa. En tal sentido, se monitorearon las poblaciones de bacterias fermentadoras de glucosa (BFG), bacterias acetogénicas (BAC), metanógenos (MET), bacterias sulfato-reductoras (BSR), bacterias nitrato-reductoras (BNR) y heterótrofos, usando medios de cultivo selectivos. La densidad de los grupos microbianos estuvo correlacionada con los parámetros fisicoquímicos: pH, alcalinidad total, DQO,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ , así como con los porcentajes de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y de  $\text{N}_2$  en el biogás. Los resultados exhiben diferencias significativas entre la diversidad microbiana de ambos reactores, con una proporción de  $\text{BFG} > \text{BSR} > \text{MET} > \text{BAC} > \text{BNR}$  para el reactor con glucosa y de  $\text{MET} > \text{BNR} > \text{BAC} > \text{BSR} > \text{BFG}$  para las APP. La abundancia de bacterias en el reactor con glucosa estuvo en el orden de  $10^8$ , mientras que

#### Descriptores:

- aguas de producción petrolera
- aguas residuales industriales,
- bacterias anaerobias
- lodo anaerobio
- reactor UASB
- tratamiento biológico

en el reactor con APP fue de  $10^5$ , lo cual resulta de la composición orgánica y mineral de los afluentes. Los resultados presentados en este estudio aportan evidencias sobre la dinámica poblacional en lodos de reactores anaerobios UASB, durante el tratamiento de aguas de producción petrolera.

### Abstract

*In the present investigation the microbial abundances in the granular sludge of two upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) were compared: the first one fed with production waters of light oil (31.1-39.0° API), from the zuliana region (Venezuela) (APP) and the second one with glucose. To this respect, the populations of glucose fermenting bacteria (BFG), acetogenic bacteria (BAC), metanogens (MET), sulfate-reducing bacteria (BSR), nitrate-reducing bacteria (BNR) and heterotrophic bacteria were monitored, using selective culture media. The microbial density was correlated with physicochemical parameters: pH, total alkalinity, COD,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ , as well as with the percentages of  $CH_4$ ,  $CO_2$  and  $N_2$  in the biogas. The results exhibit significant differences between the microbial diversity of both reactors, with a proportion of  $BFG > BSR > MET > BAC > BNR$  for the glucose reactor and of  $MET > BNR > BAC > BSR > BFG$  for the APP. The abundance of bacteria in the glucose reactor was in the order of  $10^8$ , whereas in the APP reactor was of  $10^5$ , which ensues from the organic and mineral composition of effluents. The results presented in this study reach evidences on the population dynamics in sludge of UASB reactors, during the treatment of oil-field produced waters.*

### Keywords:

- anaerobic bacteria
- anaerobic sludge
- biological treatment
- oilfield produced waters
- UASB reactor
- industrial wastewater

## Introducción

Venezuela es uno de los países con las mayores reservas mundiales de petróleo. La explotación de este recurso trae como consecuencia una elevada generación de efluentes líquidos, entre los que se encuentran las aguas de producción petroleras (APP) (Peña y Colina, 2000). La preocupación de la industria petrolera venezolana por el tratamiento y reutilización de dichas aguas promueve la búsqueda constante de tecnologías que proporcionen alternativas viables para la degradación de los contaminantes contenidos en ellas, entre los que se encuentran metales, hidrocarburos (alifáticos y aromáticos), fenoles, etcétera (Gutiérrez *et al.*, 2009; Kemmer y McCallion, 1998), los cuales pueden impactar gravemente al ambiente.

La digestión anaerobia en reactores de manto de lodo con flujo ascendente (UASB), ha sido evaluada satisfactoriamente a escala de laboratorio, como alternativa real para el tratamiento de estas aguas de producción, mostrando la factibilidad técnica para su biodegradabilidad anaerobia (Díaz *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2003; Rincón *et al.*, 2002). Una gran variedad de microorganismos coexisten en el lodo de estos reactores anaerobios y la combinación apropiada de los mismos es necesaria para una eficiente transformación de la materia orgánica a gas metano (Hori *et al.*, 2005). Estos pro-

cesos metanogénicos sólo pueden ser realizados por grupos funcionales especializados de microorganismos (Roest, 2007). Tanto el conocimiento de la abundancia de las poblaciones como el entendimiento de los procesos bioquímicos asociados a la biodegradación anaerobia, podrían ayudar a predecir y vislumbrar las acciones a tomar durante la operación de estas unidades a escala real, con la finalidad de maximizar las remociones de los contaminantes presentes.

El objetivo de esta investigación consistió en comparar las abundancias de los grupos bacterianos presentes en el lodo granular de reactores UASB alimentados con APP y con glucosa (sustrato altamente biodegradable), con la finalidad de aportar herramientas en la predicción y optimización de la eficiencia de dichos sistemas de tratamiento.

## Desarrollo

### Descripción de los reactores UASB

Para los ensayos se utilizaron dos reactores UASB a escala de laboratorio, con volumen útil de 4000 mL, inoculados con 1200 mL (23.8% del volumen total) de lodo granular anaerobio proveniente de un reactor UASB de una industria cervecera de la localidad. Fueron alimentados a flujo continuo por 60 d (2.5 mL/

min), utilizando bombas peristálticas y aplicando un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 24 h, a una temperatura de operación de  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ . Durante los primeros 7 d se empleó un afluente sintético, preparado con glucosa (1 g/L) (HIMEDIA®) como fuente de carbono, de acuerdo a lo sugerido por Chacín (1993). Luego de este periodo de aclimatación, uno de los reactores se alimentó con APP provenientes de la extracción de petróleo liviano (31.1–39.0°API), las cuales contenían una demanda química de oxígeno (DQO) de  $712.83 \pm 146.87$  mg/L. Estas APP fueron recolectadas de forma aleatoria-simple a la salida de los tanques de deshidratación de crudo de patios de tanques del Estado Zulia, Venezuela, y transportadas al laboratorio en recipientes de 20 L de capacidad. El segundo reactor se continuó alimentando con el afluente sintético durante todo el periodo experimental.

### Parámetros fisicoquímicos

Diariamente se monitorearon los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, alcalinidad total y DQO, en el efluente de los dos reactores UASB, aplicando métodos estándares (APHA *et al.*, 1998). Tres veces por semana se analizaron las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , así como los porcentajes de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$  y de  $\text{CO}_2$  en el biogás. Se empleó la técnica de cromatografía iónica (cromatógrafo DIONEX CD20, columna analítica DIONEX AS4A y detector de conductividad) para cuantificar estos aniones (nutrientes) y la cromatografía gaseosa (cromatógrafo PERKIN ELMER Autosystem XL, columna de vidrio empacada con 20% TCEP PAWS 80/100 y detector FID) para los gases. De igual manera, los afluentes de los reactores (APP y sintético con glucosa), eran caracterizados desde el punto de vista fisicoquímico.

### Preparación de las muestras para análisis microbiológicos

Cuando se observó una estabilidad en los parámetros fisicoquímicos evaluados en los efluentes finales de los

reactores, se procedió a colectar muestras del lodo anaerobio para los análisis microbiológicos. Se realizaron muestreos simultáneos del lodo de ambos reactores cada semana, para un total de seis muestreos (12 muestras en total). En cada muestreo se colectaron 3 g de lodo anaerobio, de los cuales se pesó 1 g de muestra para los análisis microbiológicos. Este lodo fue homogenizado en un mortero e inoculado con jeringas estériles y agujas hipodérmicas en las soluciones amortiguadoras que contenían agentes reductores, de acuerdo con cada protocolo.

Todos los procedimientos aplicados durante la cuantificación de los grupos funcionales fueron realizados bajo condiciones anaeróbicas, empleando una cámara de atmósfera controlada marca PLAS LABS (Lansing, MI, USA), cuyo gas de alimentación estaba compuesto por  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (84.22, 10.79 y 4.99%, respectivamente), a una temperatura interna de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### Cuantificación de los grupos funcionales de anaerobios

El recuento de los grupos funcionales fue realizado por la técnica de tubos múltiples (APHA *et al.*, 1998), estimándose el número más probable de microorganismos por cada 100 g de muestra (NMP/100 g). Los grupos funcionales estudiados, así como los medios de cultivo empleados se especifican en la tabla 1.

Para la cuantificación se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-4}$  hasta  $10^{-8}$ . Estas diluciones fueron inoculadas en los medios selectivos estériles, cuyos tubos de cultivo estaban sellados con tapones de caucho de butilo y tapas de baquelita debidamente perforadas, lo cual permitió el uso de jeringas para agregar las muestras (Díaz *et al.*, 2002).

También se realizó el conteo de heterótrofos en el lodo por la técnica de vertido en placas, con la finalidad de cuantificar las unidades formadoras de colonias anaerobias por gramo de muestra ( $\text{UFC}_a/\text{g}$ ) (APHA *et al.*, 1998), empleando dos medios de cultivo comerciales: plate count agar (HIMEDIA®) y anaerobic agar (Brewer) (HIMEDIA®) (Brewer, 1942).

Grupo funcional	Siglas	Medio de cultivo	Referencia
Bacterias fermentadoras de glucosa	BFG	OF basal medium, HIMEDIA	MacFaddin, 2000 HIMEDIA M395
Bacterias acetogénicas	BAC	Reinforced clostridial broth, HIMEDIA	Schöbitz <i>et al.</i> , 2005 HIMEDIA 443
Metanógenos	MET	Medio para metanógenos	Boone <i>et al.</i> , 1989
Bacterias sulfato-reductoras	BSR	Sulphate API agar, HIMEDIA	Sand <i>et al.</i> , 1975 HIMEDIA 309
Bacterias nitrato-reductoras	BNR	Indole nitrate medium, HIMEDIA	Dowell, 1977 HIMEDIA 364

Tabla 1. Grupos funcionales y medios de cultivos selectivos empleados durante la cuantificación de la diversidad microbiológica del lodo anaerobio

Todos los medios de cultivo inoculados fueron incubados en condiciones anaerobias (jarras anaerobias de MERCK® con sobres de Anaerocult® A y con Anaerotest®) y mesofílicas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . El tiempo de incubación para el conteo de heterótrofos fue de 10 d y para los grupos funcionales de acuerdo al tiempo requerido por cada grupo.

#### Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la finalidad de determinar las diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos evaluados, considerando el tipo de sustrato (glucosa Vs. APP). Antes de realizar el ANOVA se comprobaron tanto la homogeneidad de las varianzas (Test de Bartlett) como la distribución normal de los residuos (Test de Kolmogorov-Smirnov). Adicionalmente, se estableció un estudio de correlación simple entre las diferentes variables de estudio en cada reactor, tomando  $n = 6$ ;  $p < 0.05$  y  $r_{\text{teórico}} = 0.754$ .

### Discusión y análisis de resultados

#### Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos

En la tabla 2 se muestran los valores de los parámetros fisicoquímicos evaluados durante la operación de los reactores UASB. Estos datos muestran que las APP (afluente) no cumplen con la normativa venezolana para la descarga a cuerpos de aguas naturales (Decreto 883, 1995), particularmente debido a la DQO (máx. 350 mg/L). El comportamiento del pH y de la alcalinidad total durante el tratamiento fue relativamente estable y dentro de los rangos adecuados para la biodegradación anaerobia de la materia orgánica contenida en las APP (Henze y Harremoës, 1983).

Los valores de pH en los efluentes finales de ambos reactores revelaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) (tabla 2). En la digestión anaeróbica el pH es, en general, amortiguado por el bicarbonato, dependiendo así

de la capacidad buffer expresada en alcalinidad total. Por tanto, es posible inferir que la diferencia en el pH de los efluentes tratados sea debida a la composición de las APP, las cuales tienen una gran capacidad amortiguadora resultante de la concentración de iones carbonatos y bicarbonatos (Rincón *et al.*, 2003). La alcalinidad total media en el efluente de los reactores UASB alimentados con glucosa y APP fue de  $632.3 \pm 68.2$  y  $1815.5 \pm 144.7$  mgCaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente.

En cuanto a la DQO, las concentraciones medias de entrada (afluente) se ubicaron en  $997.18 \pm 176.47$  y  $712.83 \pm 146.87$  mg/L para los reactores con glucosa y APP (tabla 2), respectivamente. Durante el tratamiento se obtuvieron porcentajes medios de remoción de materia orgánica, medida como DQO, de 83% para la glucosa y de 75% para las APP. Estos resultados sugieren una alta actividad metanogénica de la biomasa activa presente en el lodo granular de los reactores (Tabatabaei *et al.*, 2010), fenómeno particularmente relacionado con las APP, tomando en cuenta su compleja composición orgánica que incluye la presencia de hidrocarburos aromáticos tóxicos como el fenol (Rincón *et al.*, 2008). Así, las concentraciones medias finales de materia orgánica, medida como DQO, fueron de  $164.33 \pm 48.74$  y  $199.10 \pm 81.78$  mg/L para los reactores alimentados con glucosa y APP, respectivamente. Estos valores resultaron inferiores al máximo permisible de 350 mgDQO/L, establecido en la norma venezolana para la descarga a cuerpos de aguas naturales (Decreto 883, 1995).

La tabla 3 muestra los porcentajes medios de N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el biogás de los reactores UASB. En el reactor con APP se encontró una correlación significativa inversa entre CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> ( $r = -0.768$ ;  $p < 0.05$ ), la cual está asociada con la abundancia de los grupos bacterianos involucrados en la generación de estos gases, en función de las rutas metabólicas empleadas (Huang *et al.*, 2005). La proporción de CH<sub>4</sub> en el reactor con APP (86%) fue mayor que la del reactor que presentaba glucosa (76%), lo cual denota la eficiencia de la comunidad microbiana anaerobia en la transformación de las fuentes de carbono presentes en las APP (notablemente hidrocarburos) a CH<sub>4</sub>. Los resultados de APP también indican una correlación significativa ( $r = 0.814$ ;  $p < 0.05$ )

Parámetro	Reactor glucosa X <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup>		Reactor APP X <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup>	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
pH	7.52 ± 0.16	7.11 ± 0.18	8.11 ± 0.44	8.13 ± 0.18
Alcalinidad total (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	659.3 ± 59.6	632.3 ± 68.2	1828.4 ± 141.5	1815.5 ± 144.7
DQO (mg/L)	997.18 ± 176.47	164.33 ± 48.74	712.83 ± 146.87	199.10 ± 81.78
Temperatura (°C)	29.15 ± 2.18	29.44 ± 1.24	29.52 ± 1.68	29.09 ± 1.08

Tabla 2. Valores medios ( $n = 19$ ) de los parámetros fisicoquímicos evaluados en los reactores UASB alimentados con glucosa y aguas de producción petroleras (APP)

<sup>a</sup>X: media aritmética, <sup>b</sup>DE: desviación estándar

del porcentaje de  $\text{CH}_4$  con respecto a la DQO del afluente (entrada). La producción de  $\text{N}_2$  fue menor para la glucosa ( $8.75 \pm 2.68\%$ ) con respecto a las APP ( $13.54 \pm 3.91\%$ ), lo cual se relaciona con la abundancia de BNR en virtud de la reducción  $\text{NO}_3^-$  por la vía desasimilatoria (desnitrificación), produciendo  $\text{N}_2$  como producto final (Huang *et al.*, 2005; Karakashev *et al.*, 2005).

Las concentraciones medias de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{=}$  a la salida y entrada de los reactores, así como su porcentaje de remoción durante el tratamiento aplicado, se presentan en la tabla 4. Los porcentajes de remoción de estos nutrientes estuvieron en función de la abundancia de los grupos microbianos presentes en el lodo anaerobio (particularmente de las BNR y BSR), lo cual será discutido a continuación en el presente estudio. El reactor con APP mostró una alta remoción de  $\text{NO}_3^-$  ( $99.08 \pm 0.27\%$ ) con respecto al reactor con glucosa ( $7.06 \pm 1.85\%$ ), mientras que el  $\text{SO}_4^{=}$  fue removido más eficientemente en el afluente con glucosa ( $47.69 \pm 9.33\%$ ). Este comportamiento también fue dependiente de la disponibilidad de los nutrientes en el afluente, cuya concentraciones se ubicaron en  $19.31 \pm 3.30$  y  $23.33 \pm 12.17$  mg/L y en  $98.30 \pm 8.17$  y  $37.01 \pm 6.71$  mg/L, para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{=}$  en los reactores con glucosa y APP, respectivamente.

### Grupos funcionales de anaerobios en los reactores UASB

Las densidades de los diferentes grupos microbianos estudiados durante la etapa de estabilidad en los reactores UASB alimentados con glucosa y APP fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), exceptuando a las

BNR (figura 1). El orden de abundancia de los grupos funcionales fue mayor para la glucosa ( $10^8$ ) que para las APP ( $10^5$ ), lo cual pudiera ser un indicativo de la inhibición del crecimiento debido a la presencia de compuestos tóxicos en las APP, de acuerdo con lo reportado en otros estudios (Chen *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Rincón *et al.*, 2003).

La densidad de BFG fue significativamente diferente en los dos reactores ( $p = 0.028$ ), con valores de  $1.35 \pm 2.02 \times 10^9$  y de  $4.10 \pm 3.14 \times 10^4$  NMP/100 g de lodo para la glucosa y las APP, lo cual representa 61 y 1% de los grupos funcionales evaluados (figura 1), respectivamente. Esta desigualdad está directamente influenciada por la composición del afluente utilizado, siendo la glucosa poco disponible en las APP a diferencia del reactor glucosa que contenía este carbohidrato como única fuente de carbono. No obstante, las BFG transforman los productos de la hidrólisis en ácido acético y otros compuestos intermediarios como ácidos grasos volátiles (ácidos láctico, propiónico, fórmico y butírico), además de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , de manera que ciertos compuestos orgánicos presentes en las APP pudieran ser fermentados bajo las condiciones del presente estudio, contribuyendo con ese 1% encontrado para este grupo bacteriano. Según Rincón *et al.* (2003) y Díaz *et al.* (2005), las APP contienen gran variedad de hidrocarburos entre los que se encuentran los fenoles, los cuales pueden ser biodegradados empleando distintas rutas metabólicas. El fenol, por ejemplo, puede ser usado como fuente de carbono por un cierto número de microorganismos. En este sentido, algunos investigadores han demostrado que cultivos de *Pseudomonas* sp. y *Spirillum* sp. degradan fenol en ausencia de oxígeno libre, mediante su

Reactor UASB	% $\text{N}_2$ $\bar{X} \pm \text{DE}^b$	% $\text{CH}_4$ $\bar{X} \pm \text{DE}^b$	% $\text{CO}_2$ $\bar{X} \pm \text{DE}^b$
Glucosa	$8.75 \pm 2.68$	$75.64 \pm 3.75$	$15.31 \pm 2.51$
APP	$13.54 \pm 3.91$	$86.35 \pm 3.58$	$1.16 \pm 1.10$

Tabla 3. Valores medios ( $n = 10$ ) porcentuales de la producción de nitrógeno, metano y dióxido de carbono en los reactores UASB alimentados con glucosa y aguas de producción petroleras (APP)

<sup>a</sup>X: media aritmética, <sup>b</sup>DE: desviación estándar

Tabla 4. Concentraciones medias ( $n = 10$ ) de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{=}$  presentes en los reactores UASB alimentados con glucosa y aguas de producción petroleras (APP)

Nutriente	Reactor glucosa			Reactor APP		
	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Remoción (%)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Remoción (%)
$\text{NO}_3^-$	$19.31 \pm 3.30$	$16.10 \pm 2.25$	$7.06 \pm 1.85$	$23.33 \pm 12.17$	ND <sup>c</sup>	$99.08 \pm 0.27$
$\text{SO}_4^{=}$	$98.30 \pm 8.17$	$51.09 \pm 8.08$	$47.69 \pm 9.33$	$37.01 \pm 6.71$	$35.22 \pm 6.33$	$7.55 \pm 1.14$

<sup>a</sup>X: media aritmética, <sup>b</sup>DE: desviación estándar, <sup>c</sup>ND: no detectable (límite de detección 0.19 mg/L)



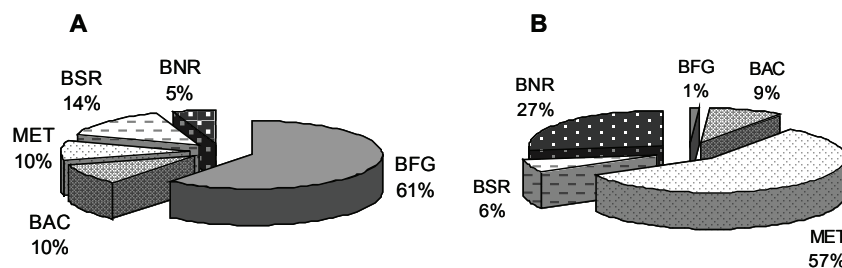


Figura 1. Distribución porcentual de los grupos funcionales presentes en el lodo anaerobio de los reactores UASB alimentados con glucosa (A) y aguas de producción petroleras (B). BFG: bacterias fermentadoras de glucosa, BAC: bacterias acetogénicas, MET: metanógenos, BSR: bacterias sulfato-reductoras, BNR: bacterias nitrato-reductoras

reducción a ciclohexanol, el cual posteriormente es deshidrogenado a ciclohexanona, para finalmente producir *n*-caproato por fisión hidrolítica del anillo alicíclico (Evans & Fuchs, 1988). También ha sido reportada la degradación anaerobia de fenol vía inicial carboxilación a ácido 4-hidroxibenzoico (Evans y Fuchs, 1988).

La abundancia de BAC fue de 10 y 9% para los afluentes de glucosa y APP (figura 1) ( $2.27 \pm 0.74 \times 10^8$  y  $3.20 \pm 3.02 \times 10^5$  NMP/100 g de lodo), respectivamente. Estas bacterias oxidan los productos de la fermentación a acetato,  $H_2$ ,  $CO_2$ , pero son inhibidas a ciertas presiones parciales de  $H_2$ , de manera que su proliferación depende de la eliminación de este gas por parte de otros grupos microbianos. De acuerdo con lo anterior, densidades significativas de BAC pueden ser observadas cuando se encuentran asociadas a un organismo consumidor de  $H_2$ , tales como MET o BSR (Mosey, 1983; Widdel, 1986; Wen-Tso *et al.*, 2002). En este sentido, el valor significativo de correlación negativa obtenido entre la abundancia de BAC y la DQO del efluente final en el reactor con glucosa ( $r = -0.883$ ;  $p < 0.05$ ), sugiere el establecimiento de esta relación sintrófica entre BAC y MET. Así, es posible inferir que la presencia del grupo funcional BAC asegura la materia prima (acetato,  $CO_2$  y  $H_2$ ) para los MET, degradándose eficientemente la materia orgánica para producir  $CH_4$  y, por tanto, disminuyendo la DQO de salida.

Los MET representaron 57% para las APP y 10% para la glucosa (figura 1), lo cual correspondió con las cantidades de  $CH_4$  encontradas en el biogás de los reactores ( $86.35 \pm 3.58$  y  $75.64 \pm 3.75\%$ , respectivamente) (tabla 3). Estos resultados demuestran la eficiencia de estos microorganismos en la utilización de los productos hidrocarbonados presentes en las APP como fuentes de carbono, para su bioconversión a  $CH_4$ . Dicho proceso es posiblemente gracias a que en ambientes con baja concentración de  $SO_4^{2-}$  (como los observados en las APP, tabla 4), los MET tienden a dominar por sobre otros grupos funcionales (Wen *et al.*, 2002; Stams *et al.*, 2005). La degradación de los constituyentes del petróleo mediada por MET ha sido reportada en diversos estudios (Watanabe *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2006).

Las BSR, por su parte, se presentaron en una proporción de 6% ( $2.21 \pm 2.08 \times 10^5$  NMP/100 g de lodo) en las APP, mientras que en el reactor alimentado con glucosa se ubicaron en 14% ( $3.17 \pm 3.51 \times 10^8$  NMP/100 g de lodo) (figura 1). Los resultados muestran correlaciones significativas entre las BSR y las concentraciones de  $SO_4^{2-}$  del afluente y del efluente para las APP ( $r = 0.824$  y  $0.772$ ;  $p < 0.05$ ; respectivamente), mostrando que el crecimiento de estas bacterias depende de la disponibilidad de dicho anión en el medio, el cual es utilizado como aceptor final de electrones durante las reacciones de degradación de la materia orgánica para formar  $H_2S$  (Millán *et al.*, 1996; Shabir *et al.*, 2008). La baja remoción de  $SO_4^{2-}$  en el reactor que presentaba APP ( $7.55 \pm 1.14\%$ , tabla 3), resulta de la menor densidad de BSR presentes en el lodo. En reactores anaerobios con baja concentración de  $SO_4^{2-}$ , se ha reportado que la población de BSR podría acoplarse a la de BAC, debido al metabolismo fermentativo de este grupo, por lo que la transferencia interespecífica de  $H_2$  se llevaría a cabo entre BSR, BAC y MET, donde las BAC producen  $H_2$  y los MET o las BSR lo consumen (Zhou y Fang, 1998; Valdez *et al.*, 2004).

Las densidades poblacionales de BNR fueron de 27 y 5% para los reactores con APP y glucosa, respectivamente. Es notorio que estos resultados están influenciados por la disponibilidad y utilización de  $NO_3^-$  como aceptor final de electrones, lo cual sugiere una remoción de este ión por parte del grupo funcional. En general, como parte fundamental de su metabolismo estas bacterias convierten el  $NO_3^-$  a formas más reducidas del nitrógeno, como  $N_2O$ ,  $NO$  y  $N_2$ . Considerando que estos productos gaseosos de la reducción del nitrato se pierden con facilidad del medio, dicho proceso es llamado desnitrificación (Zwolinski *et al.*, 2001). La producción de  $N_2$  fue de  $13.54 \pm 3.91$  y  $8.75 \pm 2.68\%$ , respectivamente, para APP y glucosa, indicando el desarrollo del proceso biológico de desnitrificación en ambos reactores, lo cual contribuye a la remoción de materia orgánica en presencia de  $NO_3^-$ . Tanto la desnitrificación como la metanogénesis ocurren dentro de los reactores UASB, contribuyendo a la degradación de

Medio de cultivo	Inicial <sup>a</sup> X ± <sup>b</sup> DE	Reactor glucosa <sup>a</sup> X ± <sup>b</sup> DE	Reactor APP <sup>a</sup> X ± <sup>b</sup> DE
ACP <sup>c</sup>	5.60x10 <sup>5</sup> ± 3.47 x10 <sup>5</sup>	4.88x10 <sup>7</sup> ± 3.47 x10 <sup>7</sup>	1.91x10 <sup>6</sup> ± 1.63 x10 <sup>6</sup>
Brewer <sup>d</sup>	9.30x10 <sup>4</sup> ± 7.42 x10 <sup>4</sup>	4.21x10 <sup>7</sup> ± 5.93 x10 <sup>7</sup>	2.43x10 <sup>4</sup> ± 1.58 x10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup>X: media aritmética, <sup>b</sup>DE: desviación estándar, <sup>c</sup>ACP: agar conteo en placa (HIMEDIA M091), <sup>d</sup>Brewer (HIMEDIA M491): agar para anaerobios

Tabla 5. Valores medios (n = 10) para el conteo de heterótrofos mesófilos anaerobios, expresados en UFC<sub>a</sub>/g, presentes en el lodo inicial y en los reactores UASB alimentados con glucosa y aguas de producción petroleras (APP)

materia orgánica acompañado de rápidas tasas de granulación (Huang *et al.*, 2005).

La tabla 5 presenta los resultados del conteo de heterótrofos anaerobios comparando su abundancia en: agar conteo en placa (ACP) y en el medio para anaerobios de Brewer. El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre la proporción de bacterias en los medios para ambos reactores. En ACP las abundancias fueron de 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFC<sub>a</sub>/g para APP y glucosa, respectivamente, mientras que en el medio de Brewer fueron de 10<sup>4</sup> (APP) y 10<sup>7</sup> UFC<sub>a</sub>/g (glucosa). A partir de estos resultados se puede inferir que los tipos de sustratos disponibles (glucosa y APP), influyen significativamente en el crecimiento poblacional (Ahiring *et al.*, 1993). Esta aseveración fue confirmada mediante la correlación significativa de la cantidad de heterótrofos del reactor con glucosa en el medio ACP con la concentración de DQO del afluente ( $r = 0.861$ ) ( $p < 0.05$ ). De igual manera, para las APP se obtuvo correlación inversa significativa entre el conteo de dichos microorganismos en medio ACP con la DQO del efluente ( $r = -0.887$ ) ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, la diferencia entre las magnitudes microbianas obtenidas en ambos medios de cultivo (mayor para ACP), también es debida a la composición de dichos medios, obteniéndose sólo bacterias anaerobias estrictas en el agar Brewer cuando es incubado en anaerobiosis (Brewer, 1942), mientras que en ACP pueden crecer incluso bacterias aerotolerantes (APHA *et al.*, 1998).

## Conclusiones

La elevada remoción de materia orgánica medida como DQO obtenida para APP (75.77 ± 7.40%) indica que la digestión anaerobia, mediante el uso de reactores UASB, es un tratamiento viable para la disminución de fracciones orgánicas de hidrocarburos presentes en este tipo de muestras. La eficiencia de remoción para la glucosa fue de 83.86 ± 4.41%.

Los resultados muestran diferencias significativas entre las densidades de los grupos microbianos evaluados en ambos reactores, con una proporción de BFG > BSR > MET > BAC > BNR para la glucosa y de MET > BNR > BAC > BSR > BFG para APP, obteniéndose ade-

más una producción de metano de 86.35 ± 3.58% para APP y de 75.64 ± 3.75% para la glucosa, lo cual evidencia el dominio de los MET en el reactor alimentado con APP. Las características fisicoquímicas de los efluentes de los reactores garantizaron el desarrollo de una comunidad microbiana mixta para degradar los sustratos orgánicos presentes.

La abundancia de los distintos grupos microbianos en el lodo de los reactores estuvo en función de las características nutricionales de los afluentes (glucosa Vs. APP). De igual manera, la composición de los medios de cultivo empleados (agar conteo y Brewer) determinó la magnitud de los heterótrofos mesófilos anaerobios cuantificados, siendo mayor para el agar conteo.

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) de Venezuela.

## Referencias

- Ahiring B., Schmidt J., Whinther-Nielsen M., Macario A., Conway E. Effect of Medium Composition and Sludge Removal on the Production, Composition and Architecture of Thermophilic (55°C) Acetate-Utilizing Granules from an Upflow Blanket Reactor. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 59 (número 8), 1993: 2538-2545.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environmental Federation (WEF). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>th</sup> ed., Washintong DC, American Public Health Association, 1998.
- Boone D., Johnson R., Liu Y. Diffusion of the Interspecies Electron Carriers H<sub>2</sub> and Formate Methanogenic Ecosystems and its Implications in the Measurement of  $k_m$  for H<sub>2</sub> or Formate Uptake. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 55 (número 7), 1989: 1735-1741.
- Brewer J. A New Petri Dish and Technique for Use in the Cultivation of on Anaerobes and Microaerophiles. *Science*, volumen 95, 1942: 587.

- Chacín E. *Treatment Characteristics of Two Phase Anaerobic System Using an UASB Reactor*, tesis (doctorado en ingeniería), Birmingham, University of Birmingham, 1993, 180 p.
- Chen Y., Cheng J., Creamer K. Inhibition of Anaerobic Digestion Process: a Review. *Bioresource Technology*, volumen 99 (número 10), 2008: 4044-4064.
- Decreto N°883. *Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos*, Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela, Núm. 5021. Venezuela, 1995.
- Díaz A., Rincón N., Marín J.C., Behling E., Chacín E., Fernández N. Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras. *Ciencia*, volumen 13 (número 3) 2005: 281-291.
- Díaz F., Espitia S., Maria C y Molina P. *Digestión anaerobia: una aproximación a la Tecnología*, 1a ed., Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2000, 168 p.
- Dowell V., Lombard F., Thompson F., Armifield A. *Media for Isolation Characterization and Identification of Obligately Anaerobic Bacteria*. *CDC Laboratory Manual*, Atlanta, Center for Disease Control, 1977, 46 p.
- Evans W., Fuchs G. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. *Annual Review of Microbiology*, volumen 42, 1988: 289-317.
- Gutiérrez E., Pérez F., Blanco E., Paz N., Caldera Y. Comportamiento de metales presentes en aguas de producción de petróleo durante el tratamiento anaerobio termofílico. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológica*, volumen 43 (número 1), 2009: 145-160.
- Henze M., Harremoës P. Treatment of Wastewater in Fixed Film Reactors-A Literature Review. *Water Science and Technology*, volumen 15, 1983: 1-101.
- HiMedia M309. Sulphate API agar. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [en línea] [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
- HiMedia M309. Sulphate API agar. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India [en línea] [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
- HiMedia M364. Indol nitrate medium. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India, [en línea] [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
- HiMedia M395. OF basal medium. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India, [en línea] [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
- HiMedia M443. Reinforced clostridial broth. HiMedia Laboratories. Technical data. Mumbai, India, [en línea] [Consulta 01 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/>
- Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ushii M., Igarashi Y. Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 72 (número 2), 2005: 1623-1630.
- Huang J., Wu C., Chen C. Microbial Activity in a Combined UASB-Activated Sludge Reactor System. *Chemosphere*, volumen 61, 2005: 1032-1041.
- Karakashev D., Batstone D., Angelidaki I. Influence of Environmental Conditions on Methanogenic Composition in Anaerobic Biogas Reactors. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 71 (número 19), 2005: 331-338.
- Kemmer F., McCallion J. *Manual del agua*, tomos I, II y III, México, Nalco Chemical Company, McGraw-Hill Interamericana, SA, 1998.
- Liu X., He R., Shen D. Studies on the Toxic Effects of Pentachlorophenol on the Biological Activity of Anaerobic Granular Sludge. *Journal of Environmental Management*, volumen 88 (número 4), 2008: 939-946.
- MacFaddin J. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3ª ed., Lippincott, Baltimore, Williams & Wilkins, 2000, 800 p.
- Millán R., Godoy G., Montiel M. Bacterias sulfato reductoras en muestras de sedimentos del Lago de Maracaibo, Venezuela. *Ciencia*, volumen 4, 1996: 4-16.
- Mosey F. Mathematical Modeling of the Anaerobic Digestion Process: Regulatory Mechanism for the Formation of Short Chain Volatile Acids from Glucose. *Water Science and Technology*, volumen 15 (números 8-9), 1983: 209-232.
- Peña Y., Colina J. Análisis de opciones para el manejo de aguas efluentes patio de tanques ULÉ. Tía Juana, Estado Zulia: Gerencia Técnica de Ingeniería de Procesos de Producción de PDVSA, Informe anual, 2000.
- Rincón N., Cepeda N., Díaz A., Marín J., Behling E., Bauza R. Comportamiento de las fracciones orgánicas en aguas de producción petroleras con digestión anaerobia. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*, volumen 31 (número 2), 2008: 106-117.
- Rincón N., Chacín E., Marín J., Moscoso J., Fernández L., Torrijos M., Moletta R., Fernández N. Tiempo de retención hidráulico óptimo para el tratamiento anaeróbico de las aguas de producción de petróleo liviano. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*, volumen 25 (número 2), 2002: 90-99.
- Rincón N., Chacín E., Marín J., Torrijos M., Moletta R., Fernández N. Anaerobic Biodegradability of Water Separated from Extracted Crude Oil. *Environmental Technology*, volumen 24 (número 8), 2003: 963-970.
- Roest K. *Microbial Community Analysis in Sludge of Anaerobic Wastewater Treatment Systems: Integrated Culture-Dependent and Culture-Independent Approaches*, tesis (doctorado), Wageningen, Wageningen University, 2007, 160 p.
- Sand M., La Rock P., Hodson R. Ratio-Isotope Assay for the Quantification of Sulfate-Reducing Bacteria in Sediments and Water. *Applied Microbiology*, volumen 29 (número 5), 1975: 626-634.



- Satoh H., Miura Y., Tsushima H y Okabe S. Layered Structure of Bacterial and *Archeal* Communities and their in Situ Activities an Anaerobic Granules. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 73 (número 22), 2006: 7300-7307.
- Schöbitz R., Uribe C., Molina H. Espina, F. Control del desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo gouda empleando diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. *Agro Sur*, volumen 33 (número 1), 2005: 48-57.
- Shabir A., Klerebezem R., Stams A., Kuenen J., Muyzer G. Competition and Coexistence of Sulfate-Reducing Bacteria, Acetogens and Methanogens in a Lab-Scale Anaerobic Bioreactor as Affected by Changing Substrate to Sulfate Ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volumen 78, 2008: 1045-1055.
- Stams A., Plugge C., Bok F., Houten B., Lens P., Dijkman H., Weijma J. Metabolic Interactions in Methanogenic and Sulfate-Reducing Bioreactors. *Water Science and Technology*, volumen 52 (números 1-2), 2005: 13-20.
- Tabatabaei M., Abdul-Rahim R., Abdullah N., Wright A., Shirai Y., Sakai K., Sulaiman A., Hassan M. Importante of the Methanogenic Archaea Populations in Anaerobic Wastewater Treatments. *Process Biochemistry*, volumen 45 (número 8), 2010: 1214-1225.
- Valdez-Vásquez I., Rios-Leal E., Esparza-García C.F., Pavan P y Poggi-Varaldo H. A Review on Hydrogen Production with Anaerobic Mixed Cultures, en: Proceeding of the H<sub>2</sub>-Age Conference: When, Where, Why. Editor S. Pierucci., AIDIC publ., Italia, 2004, pp. 16-19.
- Watanabe K., Kodama Y., Hamamura N y Kaku N. Diversity, Abundance and Activity of Archaeal Populations in Oil-Contaminated Groundwater Accumulated at the Bottom of an Underground Crude Oil Storage Cavity. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 68 (número 8), 2002: 3899-3907.
- Wen-Tso L., On-Chim C., Herbert H. Characterization of Microbial Community in Granular Sludge Treating Brewery Wastewater. *Water Research*, volumen 36, 2002: 1767-1775.
- Widdel F. Growth of Methanogenic Bacteria in Pure Culture with 2-Propanol and Other Alcohols as Hydrogen Donors. *Applied Environmental Microbiology*, volumen 51, 1986: 1056-1062.
- Zhou G y Fang H. Competition Between Methanogenesis and Sulfidogenesis in Anaerobic Waste Treatment. *Water Science and Technology*, volumen 38 (números 8-9), 1998: 317-324.
- Zwolinski M., Harris R y Hickey W. Microbial Consortia Involved in the Anaerobic Degradation of Hydrocarbons. *Biodegradation*, volumen 11, 2001: 141-158.

#### Este artículo se cita:

##### Citación estilo Chicago

Cajacuri, María Patricia, Nancy Rincón, Ismenia Araujo, Elisabeth Behling, Gilberto Colina, Julio César Marín-L. Diversidad microbológica del lodo anaerobio durante el tratamiento de aguas de producción petroleras venezolanas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XIV, 03 (2013): 325-334.

##### Citación estilo ISO 690

Cajacuri M.P., Rincón N., Araujo I., Behling E., Colina G., Marín-L. J.C. diversidad microbológica del lodo anaerobio durante el tratamiento de aguas de producción petroleras venezolanas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, volumen XIV (número 3), julio-septiembre 2013: 325-334.

## Semblanza de autores

*María Patricia Cajacuri.* Licenciada en biología (Universidad del Zulia, 2007), *Magister Scientiarum* en ciencias ambientales (Universidad del Zulia, 2010). Área de investigaci3n: ciencias ambientales.

*Nancy Rinc3n.* Ingeniera civil (Universidad del Zulia, 1991), *Magister Scientiarum* en ingeniería ambiental (Universidad del Zulia, 1996), doctora en ingeniería de procesos y del medio ambiente (INSA-Narbonne, Francia, 2002). Profesora titular a dedicaci3n exclusiva de La Universidad del Zulia (Venezuela). Miembro del *programa de estímulo a la innovaci3n e investigaci3n* (PEII) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Área de investigaci3n: ingeniería ambiental.

*Ismenia Araujo.* Licenciada en ciencias biológicas (Universidad del Zulia, 1968), *Magister Scientiarum* en microbiología (University of Georgia, USA, 1983). Profesora titular a dedicaci3n exclusiva de La Universidad del Zulia (Venezuela). Miembro del *programa de estímulo a la innovaci3n e investigaci3n* (PEII) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Área de investigaci3n: microbiología ambiental.

*Elisabeth Behling.* Ingeniera civil (Universidad del Zulia, 1991), *Magister Scientiarum* en ingeniería ambiental (Universidad del Zulia, 1996), Doctora en ingeniería ambiental (Universidad del Zulia, 2010). Profesora titular a dedicaci3n exclusiva de La Universidad del Zulia (Venezuela). Miembro del *programa de estímulo a la innovaci3n e investigaci3n* (PEII) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Área de investigaci3n: ingeniería ambiental.

*Gilberto Colina.* Licenciado en educaci3n mención química (Universidad del Zulia, 1989), *Magister Scientiarum* en ciencias ambientales (Universidad del Zulia, 1996), Doctor en ingeniería ambiental (Universidad del Zulia, 2011). Profesor asociado a dedicaci3n exclusiva de La Universidad del Zulia (Venezuela). Miembro del *programa de estímulo a la innovaci3n e investigaci3n* (PEII) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Área de investigaci3n: química ambiental, ciencias ambientales.

*Julio César Marín L.* Licenciado en biología (Universidad del Zulia, 1996), *Magister Scientiarum* en ciencias ambientales (Universidad del Zulia, 2000), Doctor en fisiología, biología de organismos, poblaciones e interacciones (Université de Caen-Basse Normandie, Francia, 2007). Profesor titular a dedicaci3n exclusiva de La Universidad del Zulia (Venezuela). Miembro del *programa de estímulo a la innovaci3n e investigaci3n* (PEII) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela. Área de investigaci3n: ecología acuática, ciencias ambientales.