



Revista de CIENCIAS AMBIENTALES

Tropical Journal of Environmental Sciences



Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Isolating soil bacteria and their potential use in systems for wastewater treatment

Silvia Mau^a, Karen Vega^b y Mónica Sánchez^c

^a La autora, microbióloga, es investigadora y docente en la Universidad Nacional, Costa Rica. ^{b y c} Las autoras son estudiantes de Biología en la Universidad Nacional, Costa Rica.

Director y Editor:

Dr. Eduardo Mora-Castellanos

Consejo Editorial:

Enrique Lahmann, UICN, Suiza
Enrique Leff, UNAM, México
Marielos Alfaro, Universidad Nacional, Costa Rica
Olman Segura, Universidad Nacional, Costa Rica
Rodrigo Zeledón, Universidad de Costa Rica
Gerardo Budowski, Universidad para la Paz, Costa Rica

Asistente:

Rebeca Bolaños-Cerdas



Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Silvia Mau, Karen Vega y Mónica Sánchez

S. Mau, microbióloga, es investigadora y docente en la Universidad Nacional. M. Sánchez y K. Vega son estudiantes de biología en la misma institución.

Resumen

El estudio de microorganismos provenientes de ambientes naturales puede ser útil para la formulación de un compuesto microbiano aplicable para el bioaumentación a un sistema de tratamiento de aguas. Se estudió microorganismos provenientes de muestras de suelo tomadas en Estación Biológica Tropical y Acuicultura "Río Macho", Cartago, Costa Rica, y se seleccionaron cepas de los morfotipos más representativos. Se realizó cuatro tratamientos inoculando en el agua residual una suspensión de cada morfotipo seleccionado y posterior al tratamiento se cuantificó la DBO (demanda bioquímica de oxígeno). Los morfotipos de bacterias aisladas fueron bacilos Gram negativos (52,9%), bacilos Gram positivos esporulados (29,4%), bacterias filamentosas (11,8%) y bacilos Gram positivos no esporulados (5,9%). Tras los tratamientos se obtuvo una disminución entre un 94,7%

Abstract

The study of microorganisms from natural environments may be useful for developing a microbial consortium used for the bioaugmentation to a water treatment system. We studied microorganisms from soil samples taken in Tropical Biological Station and Aquaculture "Río Macho", Cartago, Costa Rica and from these strains were selected most representative morphotypes. We performed four treatments in the wastewater by inoculating a suspension of each selected morphotype and the BOD (Biochemical Oxygen Demand) was quantified after these treatments. The morphotypes of the isolates were Gram negative bacilli (52,9%), Gram positive sporulated bacilli (29,4%), filamentous bacteria (11,8%) and Gram positive non-sporulated bacilli (5,9%). After the treatments there was a reduction from 94,7% to 95,85% on the initial BOD

Introducción

La contaminación del agua con el vertido directo de materia fecal y otros contaminantes pone en peligro su calidad higiénica, convirtiéndose así en un potencial vehículo transmisor de enfermedades y la causa de un gran impacto a nivel ambiental. Por esta razón, el tratamiento óptimo de los desechos es imprescindible para evitar riesgos sanitarios, debido a que las capas superficiales de agua se utilizan como fuentes de captación para agua potable, por lo tanto es crucial mantener su calidad. Ante esta problemática, los sistemas diseñados para la depuración de aguas residuales son una excelente alternativa para minimizar este impacto (Reynolds, 2002). El propósito principal del tratamiento de aguas residuales es eliminar el efluente tratado sin provocar un impacto negativo sobre el ecosistema de los cuerpos de agua receptores. Por esta razón, el tratamiento de aguas residuales se enfoca en reducir la concentración de: sólidos suspendidos, materia orgánica, nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) y de los microorganismos patógenos (Kuai *et al.*, 1999; Habit *et al.*, 2005).

En este sentido, es importante resaltar que aunque existen muchos métodos

hasta más de un 95,85% en la DBO inicial del agua residual, en contraste con el agua que no fue inoculada donde se obtuvo una disminución de un 91%. Este estudio preliminar evidencia un buen potencial de estas cepas para su utilización en sistemas de depuración de aguas residuales como inóculos para bioaumentación.

Palabras clave: aguas residuales, planta de tratamiento, contaminación ambiental, microbiología ambiental, bioaumentación, microorganismos del suelo.

of wastewater, in contrast with the water that was not inoculated which yielded a decrease of 91%. This preliminary study demonstrates a good potential of these strains for use in systems of wastewater treatment as inocula for bioaugmentation.

Key words: wastewater treatment, pollution, environmental microbiology, bioaugmentation, soil microorganisms.

de tratamiento, se requiere la selección de un método de eliminación eficiente, centrado en la producción final de agua ambientalmente segura. Varios métodos utilizan procedimientos de tipo físico, químico o biológico para disminuir el grado de contaminación previa al vertido, en el caso de los tratamientos biológicos, se utilizan microorganismos. Aunque popularmente sean identificados como causantes de enfermedades infecciosas, los microorganismos son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas y se encargan de la purificación del agua, el suelo y el aire, además de mineralizar una gran fracción de materia orgánica y de degradar algunos contaminantes orgánicos (Reynolds, 2002). Esto debido a su gran diversidad metabólica, pues son capaces de vivir en diferentes hábitats bajo diferentes condiciones ambientales, y al vivir en un entorno competitivo deben explotar todos los recursos disponibles y ser capaces de metabolizar desde los nutrientes más comunes hasta los más complejos (Iranzo *et al.*, 2001). Es por esta razón que han sido utilizados en procesos para la descontaminación de ambientes naturales.

En el caso específico de aguas residuales comunes, las bacterias se han utilizado en diversos sistemas de depuración, en donde se da el proceso de formación de flóculos de biomasa (agregados de bacterias con materia orgánica), debido a las interacciones célula-célula, que actúan como una forma de autoinmovilización. Estos densos consorcios microbianos inmobilizados en flóculos son los que realizan la degradación. En este proceso, se intenta mimetizar las condiciones naturales, bajo un entorno controlado y optimizado, utilizando sistemas llamados lodos activados o de biopelícula inmobilizada (Kavanagh y Keller, 2007).

Los sistemas de tratamiento basados en consorcios microbianos son complejos, pues además de los microorganismos residentes incluyen un conjunto diverso de consumidores:

protozoos, rotíferos y, en algunos casos, nematodos y microcrustáceos. Todos estos constituyen una cadena alimentaria muy dinámica que realiza la sucesión ecológica durante el tratamiento (Graham y Smith, 2004). Los microorganismos utilizados para tales procesos pueden encontrarse dentro de la misma materia orgánica contenida en el agua residual (Szymanski y Patterson, 2003). Sin embargo, en algunas ocasiones la biomasa microbiana indígena está presente en cantidades muy pequeñas y puede no tener la capacidad de degradar los contaminantes. Como solución se puede inocular microorganismos seleccionados de otras áreas (concepto conocido como bioaumentación), o periódicamente suplementar con nutrientes (o bioestimulación), si los microorganismos indígenas son capaces de metabolizar tales contaminantes, pero requieren de suplementos especiales (Kuai *et al.*, 1999).

En los casos en los que se tiene problemas en la optimización de las condiciones de tratamiento debido a que la biomasa microbiana indígena no es capaz de realizar el proceso degradativo, se ha demostrado que la bioaumentación mejora el rendimiento del sistema, mediante la adición de microorganismos externos con alta capacidad de degradación de determinados compuestos contaminantes (Loperena *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008). La mayoría de los inóculos producidos comercialmente se componen de poblaciones microbianas mixtas y son generalmente costosos y diseñados para condiciones que no corresponden exactamente con las que se encuentran a nivel local (Loperena *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008). Por lo que se requiere una selección de microorganismos óptimos para la degradación de desechos que no sean patógenos y se desarrollen bajo las condiciones establecidas en los sistemas de tratamiento. Bajo este concepto, el estudio de microorganismos provenientes de ambientes naturales puede ser útil para la formulación de un compuesto microbiano aplicable a un sistema de tratamiento.

Uno de los ambientes naturales que se caracteriza por poseer una amplia diversidad de

biomasa microbiana es el suelo. El suelo alberga probablemente la comunidad biológica más compleja. Los organismos del suelo son muy diversos y contribuyen a una amplia gama de funciones que son esenciales para el funcionamiento sostenible de los ecosistemas naturales (Barrios, 2007). Entre estos, las bacterias poseen importantes potencialidades biodegradadoras (Kuai *et al.*, 1999; Iranzo *et al.*, 2001).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio –preliminar– es determinar el potencial de cepas bacterianas provenientes del suelo para ser utilizadas como inóculos que puedan mejorar el proceso en un sistema de tratamiento de aguas residuales.

Métodos

Área de estudio

El muestreo se realizó en la Estación Biológica Tropical y Acuicultura “Río Macho”, Cartago, Costa Rica, que se encuentra ubicada en la cuenca del Guarco, dentro de la zona protectora Río Macho, Cartago, Costa Rica, entre los 9° 45' – 9° 47' N y 83° 51' – 83° 53' O.

Muestreo

Se realizó durante la estación seca (abril 2008) en una parcela de 10 x 50 m. Se tomó muestras de la parte superficial del suelo, a unos 10 centímetros de profundidad, en la capa de crecimiento aerobio, en diferentes puntos para formar una muestra compuesta.

Una porción de la muestra fue utilizada para la determinación de las características físico-químicas del suelo (Laboratorio de Suelos y Foliare, Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Inisefor) donde se determinó la acidez, pH, concentración de calcio, magnesio, hierro, potasio, fósforo, cobre, zinc, manganeso, porcentaje de materia orgánica, carbono y nitrógeno. Por otro lado, el aislamiento de bacterias aerobias

se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional.

Aislamiento de las cepas bacterianas

Para el procesamiento de las muestras de suelo en el laboratorio se tomó 10 g y se realizó diluciones seriadas en agua peptonada estéril. Se cultivó por vaciado 1 ml de cada dilución por duplicado en agar extracto de suelo (Alef, 1995). Se incubó a temperatura ambiente por 1 semana y luego de este período de tiempo se seleccionó las placas con crecimiento de colonias bacterianas aisladas.

Cada una de las colonias se separó en agar extracto de suelo para obtener cultivos puros. A partir de cada cultivo puro se realizó una descripción de las características macroscópicas y microscópicas para cada aislamiento. A cada aislamiento puro se le asignó un código para su almacenamiento en el laboratorio.

Selección de las cepas bacterianas

Con las cepas aisladas y purificadas se realizó una selección de los morfotipos más abundantes para realizar la inoculación de las aguas residuales.

Inoculación de bacterias en aguas residuales

El efecto de la inoculación de las aguas residuales con los aislamientos seleccionados se evaluó a escala de laboratorio, para lo cual se preparó en medio líquido cultivos puros de las cepas seleccionadas. Se elaboró un sistema de erlenmeyers, pre-

viamente esterilizados, con aireación a los cuales se agregó agua residual tomada a partir del tubo de captación de una planta de tratamiento, la cual se recolectó utilizando botellas estériles.

La inoculación con los aislamientos seleccionados se realizó por separado, se utilizó un total cuatro tratamientos y un control sin inocular. Se realizó cada tratamiento inoculando una suspensión de cada cepa para obtener una concentración final de 1.0×10^6 bacterias/ml. Los erlenmeyers se colocaron a temperatura ambiente y con un sistema de aireación en un agitador orbital con agitación constante por 20 horas. Luego de este período de tiempo, se realizó un proceso de sedimentación del agua residual tratada en los erlenmeyers, y se cuantificó la DBO.

Análisis de resultados

Se realizó una comparación del porcentaje de disminución de la DBO de cada tratamiento con respecto a la DBO inicial (agua de entrada a la planta de tratamiento) y con la DBO del control sin inocular.

Resultados

Aislamiento de las cepas bacterianas

Se analizó las características físico-químicas del suelo muestreado para el diseño del medio de cultivo para el crecimiento microbiano. Se observó que se trata de un suelo con pH bajo y con un exceso de hierro (cuadro 1).

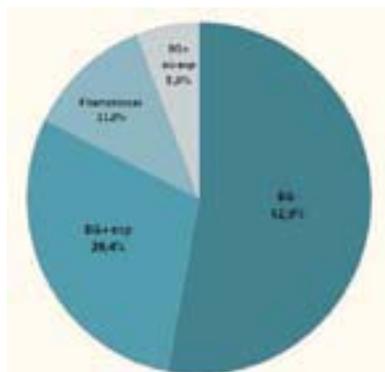
Cuadro 1. Características físico-químicas de la muestra de suelo tomada en la Estación Biológica Tropical y Acuicultura "Río Macho", Cartago, Costa Rica.

Muestra	pH H ₂ O	Acidez	Ca	Mg	K	P	Cu	Zn	Mn	Fe	% M	% C	% N
			cmol (+) / L	cmol (+) / L	cmol (+) / L	µg / ml	Org	Org					
Suelo	4,54	4,5	2,19	0,64	0,22	9	2	2	15	349	13,2	7,7	0,87
Nivel medio	5,6-6,5	0,5-1,5	4,0-20	1,0-5	0,2-0,6	1,0-20	3,0-20	2,0-10	6,0-50	11-100			

Fuente: Laboratorio de Suelos y Foliare, Inisefor, Universidad Nacional.

Se aisló una biomasa microbiana muy diversa en cepas bacterianas; los diferentes morfotipos coloniales y su respectiva tinción de Gram muestran que existen grupos de bacilos Gram negativos (BG-), bacilos Gram positivos esporulados (BG+ esp), bacilos Gram positivos no esporulados (BG+ no esp) y bacterias filamentosas entre las cepas bacterianas purificadas (figura 1).

Figura 1. Distribución porcentual de los morfotipos bacterianos aislados en la muestra de suelo tomada en la Estación Biológica Tropical y Acuicultura “Río Macho”, Cartago, Costa Rica.



Selección de las cepas bacterianas

Tomando en cuenta la distribución porcentual de los morfotipos bacterianos, se seleccionó un aislamiento de cada morfotipo. En este caso se seleccionaron las cepas: P13-2, P2, P4 y P8.

Inoculación de bacterias en aguas residuales

Luego de la inoculación de las aguas residuales con cada uno de los tratamientos se evidencia un aumento de la floculación con respecto al agua residual sin inocular (figura 2).

Figura 2. Flóculos de biomasa producidos en el agua tratada con uno de los aislamientos (4P).



Para recrear el proceso que se lleva a cabo en la planta de tratamiento de la que se obtuvo el agua residual, se realizó un proceso de sedimentación de los flóculos en cada uno de los erlenmeyers, para luego separar el agua tratada. En este caso, las muestras inoculadas con los diferentes tratamientos a simple vista presentan una menor turbidez que el agua sin inocular (figura3).

Figura 3. Diferencia en la turbidez del agua tratada con el aislamiento P4 en comparación con el agua de salida de la Planta de Tratamiento (sin inocular).



Con respecto a la determinación de la DBO, se obtuvieron los siguientes resultados:

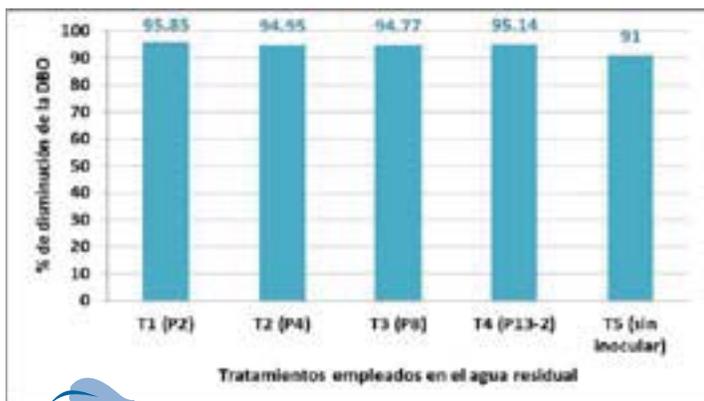
Cuadro 2. Resultados de la medición de la DBO para el agua residual y los diferentes tratamientos empleados.

Muestra	DBO (mg/L)
Entrada a la planta de tratamiento	555 ± 84
Tratamiento 1 cepa P2 (T1)	23 ± 4
Tratamiento 2 cepa P4 (T2)	28 ± 5
Tratamiento 3 cepa P8 (T3)	29 ± 5
Tratamiento 4 cepa P13-2 (T4)	27 ± 5
Tratamiento 5 sin inocular (T5)	50 ± 4

Fuente: Laboratorio de Servicios Químicos, Escuela de Química, Universidad Nacional.

Con estos resultados, se comparó el porcentaje de disminución de la DBO de cada tratamiento con respecto al agua de entrada a la planta de tratamiento, la cual mostró una DBO de 555 ± 84 mg/L; además, se tomó un tratamiento como control sin inocular. En este caso se obtuvo que el porcentaje de disminución de la DBO del agua residual con cada uno de los tratamientos es mayor que el obtenido en el control sin inocular (figura 4).

Figura 4. Porcentaje de disminución de la DBO del agua residual con los diferentes tratamientos empleados.



Como fue posible constatar, se obtuvieron disminuciones desde un 94,77% hasta un 95,85% en los tratamientos empleados, en contraste con el agua sin inocular (con los microorganismos autóctonos del agua) que disminuye un 91% la DBO de entrada.

Discusión

El suelo en el sitio de muestreo mostró parámetros físico-químicos que podrían condicionar el crecimiento de microorganismos dada su alta acidez, bajo pH y el exceso de hierro, ya que se ha descrito que la estructura de las comunidades microbianas está influenciada por el pH y las condiciones nutricionales (Reyes y Valery, 2007). Por lo que se realizó el aislamiento de las cepas bacterianas utilizando como medio de cultivo agar extracto de suelo, para así tener un medio similar a las condiciones ambientales y lograr maximizar el número de organismos que podrían ser aislados (Hamaki *et al.*, 2005). Se aisló una biomasa microbiana muy diversa en cepas bacterianas, a pesar de las condiciones extremas de este microambiente. Lo cual evidencia que estos microorganismos deben de tener una naturaleza acidofílica o sistemas metabólicos eficientes que les ayude a disminuir el impacto de la acidez (Vásquez *et al.*, 2002). Los morfotipos microbianos encontrados, fueron mayoritariamente bacilos Gram negativos (52,9%), seguidos de bacilos Gram positivos esporulados (29,4%), además se hallaron bacterias filamentosas (11,8%) y bacilos Gram positivos no esporulados (5,9%).

A partir de estas cepas se seleccionó una de cada morfotipo para realizar los tratamientos y así evaluar la capacidad de las bacterias ambientales de interactuar con la biomasa indígena proveniente del agua residual. Esto se realizó con la finalidad de estudiar un posible potencial de estas cepas para ser utilizadas en técnicas de bioaugmentación y así mejorar el proceso en un sistema de trata-

miento de aguas residuales. En el tratamiento biológico de aguas residuales por medio de sistemas de lodos activados la remoción de la DBO es posible por la acción de una variedad de microorganismos. En este, bacterias constituyen la población mayoritaria y más importante, debido a que sus distintas actividades bioquímicas les permiten metabolizar la mayor parte de los compuestos orgánicos que se encuentran en las aguas residuales. Ya que al tener un metabolismo heterotrófico utilizan la materia orgánica como fuente de carbono y con la formación de flóculos, los lodos sedimentarán mejor y producirán un efluente final más transparente y de mejor calidad (Vilaseca, 2001; Nodal, 2001).

En el presente trabajo se nota que el proceso de floculación es mayor en las aguas inoculadas con las bacterias aisladas del suelo (figura 2), lo que sugiere que se forma una mayor interacción célula-célula entre las bacterias y la materia orgánica. Esto puede ser importante para el aumento de la densidad de la población bacteriana durante el tratamiento y, con ello, para el proceso de degradación. El objetivo de las técnicas de bioaumentación utilizando cepas microbianas aisladas del medio ambiente es el de mejorar algunos de los procesos que intervienen en el tratamiento de efluentes o en la biorremediación. Los microorganismos seleccionados se inoculan para aumentar el potencial biodegradador, por lo que una de las aplicaciones de esta técnica se aboca a lograr un aumento en la disminución de la DBO en plantas de tratamiento de aguas residuales (Bitton, 2005). En este estudio, además de observar esta mayor floculación, se nota que se forman flóculos más grandes y compactos, por lo que tienen una mayor sedimentabilidad observándose una turbidez menor en el agua tratada con respecto a la del agua sin inocular (figura 3).

La mayor disminución de la DBO del agua residual se logró con el tratamiento 1, con la cepa P2, la cual muestra una disminución de un 95,85% con respecto a la DBO de entrada del agua residual, en contraste con un 91% de dis-

minución presentado por el control sin inocular. Además, con los demás tratamientos se nota disminuciones de 94,77 % (tratamiento 3), 94,95% (tratamiento 2) y 95,14% (tratamiento 4).

En Costa Rica, la DBO permitida para eliminar aguas residuales a un cuerpo de agua natural superficial se establece en el Decreto ejecutivo No. 26042-S-Minae Reglamento de reuso y vertido de aguas residuales, y es de 50 mg/L. Con respecto a este valor, se nota que el agua tratada con los aislamientos de origen ambiental tiene un DBO menor a la norma (cuadro 2). Es importante resaltar que este parámetro no representa todos los evaluados para determinar si el agua es segura y se requiere un mayor número de tratamientos para establecer la significancia de este porcentaje de disminución. Por lo que es necesario realizar la determinación de más parámetros físico-químicos del agua y una caracterización de las bacterias para complementar los resultados. Sin embargo, este estudio sirve para evidenciar que las cepas aisladas tienen un buen potencial para ser utilizadas en este tipo de sistemas de depuración.

La importancia de realizar este tipo de estudios va acorde con lo estipulado por el Decreto Ejecutivo N° 32133-S, donde se declara de interés y necesidad social el diseño, financiamiento, ejecución, operación y mantenimiento de las obras requeridas para la recolección, el tratamiento y disposición final de las aguas residuales. Por lo que estudios dirigidos al mejoramiento de los sistemas de tratamiento utilizando tecnologías limpias es de vital importancia para disminuir el impacto del vertido de aguas residuales en los ecosistemas.

Conclusiones

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales utilizan microorganismos que se encargan de la degradación de la materia orgánica y otros contaminantes. En algunos casos se utiliza la población microbiana autóctona de las mismas

aguas, sin embargo se ha visto que en algunas ocasiones no son tan eficientes. Es por esto que el aislamiento de bacterias ambientales con una alta capacidad de biodegradación de contaminantes es importante para aumentar la eficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En el caso del presente estudio, se determinó el potencial de varias cepas aisladas del suelo para lograr una disminución importante de la DBO de aguas residuales.

Referencias bibliográficas

- Alef, K. (1995). Nutrients, sterilization, aerobic and anaerobic culture techniques. En Alef, K, y Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (pp. 124-125). Londres: Acad. Press.
- Asamblea Legislativa de Costa Rica. (1997, junio 19). Decreto ejecutivo No. 26042-S-MINAE. *La Gaceta*, N° 117.
- Asamblea Legislativa de Costa Rica. (2004, diciembre 7). Decreto ejecutivo N° 32133-S. *La Gaceta*, N° 239.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economic*, 64, 269-285.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater microbiology*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Graham, D, y Smith, V. H. (2004). Designed Ecosystem Services: Application of Ecological Principles in Wastewater Treatment Engineering. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(4), 199-206.
- Habit, E, Parra, O, y Valdovinos, C. (2005). Ictiofauna de un sistema fluvial receptor de aguas servidas: Respuestas a una nueva planta de tratamiento (Río Quilque, Chile central). *Gayana*, 69(1), 94-103.
- Hakami, T, Suzuki, M, Fudou, R, Jojima, Y, Kajiura, T, Tabuchi, A, Sen, K, y Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(5), 485-492.
- Iranzo, M, Sainz-Pardo, I, Boluda, R, Sánchez, J, y Mormene, S. (2001). The use of microorganisms in environmental remediation. *Annals of Microbiology*, 51, 135-143.
- Kavanagh, L, y Keller, J. (2007). Engineered ecosystem for sustainable on-site wastewater treatment. *Water Research*, 41, 1823 – 1831.
- Kuai, L, Kerstens, W, PhuCuong, N, y Verstraete, W. (1999). Treatment of domestic wastewater by enhanced primary decantation and subsequent naturally ventilated trickling filtration. *Water, Air, and Soil Pollution*, 113, 43–62.
- Loperena, L, Ferrari, M. D., Díaz, A. L., Ingold, G, Pérez, L. V, Carvallo, F, Travers, D, Menes, R. J, y Lareo, C. (2008). Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 100, 1762–1766.
- Ma, F, Guo, J, Zhao, L, Chang, C, y Cui, D. (2008). Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresource Technology*, 100, 597–602.
- Nodal, E. (2001). Procesos biológicos aplicados al tratamiento de agua residual. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 22(4), 52-56.
- Reyes, I, y Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Biagro*, 19(3), 117-126.
- Reynolds, K. (2002). Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica: Identificación del Problema. Agua Latinoamérica. Disponible en <http://www.agualatinooamerica.com/docs/pdf/DeLaLaveSepOct02.pdf>.
- Szymanski, N, y Patterson, R. (2003). *Effective Microorganisms (EM) and Wastewater Systems*. En Patterson, R.A., y Jones, M.J. (Eds). *Future Directions for On-site Systems: Best Management Practice. Proceedings of On-site '03 Conference* (pp. 348-355). Disponible en <http://www.lanfaxlabs.com.au/papers/P53-03-Szymanski-Patterson.PDF>.
- Vásquez, A, Santiago, G, y Estrada, A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, 73(1), 1-15.
- Vilaseca, M. M. (2001). Observación microscópica de fangos activados en los tratamientos de depuración biológica. *Boletín INTEXTER (U.P.C.)*, 119, 67-72.