



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS QUE PARTICIPAN EN EL CICLO DEL
AZUFRE EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE FLUJO
SUBSUPERFICIAL EN TETIPAC, EDO. DE
GUERRERO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

Bióloga

(Ciencias Ambientales)

P R E S E N T A

Alida Velazquez Guadalupe

Director de Tesis: M. en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro

Asesora interna: Biol. Maricela Arteaga Mejía



MÉXICO. D.F. a 27 Noviembre de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Laboratorio de Genómica Bacteriana de la Facultad de Medicina de la UNAM. A cargo de la Dra. María del Rosario Morales Espinosa, Dra. Gabriela Delgado Sapièn y a Biól. José Luis Mendez Sánchez, por su apoyo para la extracción de ADN y la obtención de las secuencias.

Al Laboratorio de Proyectos Ambientales FES Zaragoza UNAM. A cargo de la Biol. Maricela Arteaga Mejía por la obtención de las muestras, su apoyo y la constante enseñanza de sus conocimientos, durante mis años de laboratorio ahí.

Al M. en C. Jorge Antonio Valdivia por dirigir esta Tesis quien sin su apoyo, consejo, y ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Índice

Resumen	1
Introducción.....	2
Marco Teorico	4
Ciclo del azufre.....	5
Reduccion del azufre	7
Oxidacion del azufre.....	8
Agua residual	10
Humedales	11
Remoción biológica	13
Planteamiento del problema	15
Justificacion	16
Hipotesis	17
Objetivos.....	17
Metodo.....	18
Resultados.....	24
Discusion	36
Conclusiones.....	43
Perspectivas	44
Referencias	45

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo del azufre (S) asociado con la actividad microbiana	6
Figura 2. Humedal natural en Huatulco, Oaxaca. Fuente: www.ciudadania-express.com ..	11
Figura 3. Esquema de un humedal artificial de flujo subsuperficial (García & Corzo, 2011).	12
Figura 4. Fotografías del humedal artificial de flujo subsuperficial, vista frontal y vista lateral.	13
Figura 5. Esquema del humedal construido en el cual se señalan los 5 puntos de muestreo.	18
Figura 6. Muestreo de los componentes del humedal artificial en Tetipac, edo. Guerrero.	19
Figura 7. Valores de pH en cuatro meses de muestreo, en el afluente y efluente del humedal artificial.	24
Figura 8. Temperatura registrada en los cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.	24
Figura 9. Valores de oxígeno disuelto registrados en cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.	25
Figura 10. Demanda Biológica de Oxígeno (DBO ₅) en cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.	25
Figura 11. Colonias desarrolladas en medio de cultivo selectivo para aislar bacterias que participan en el ciclo del azufre.	26
Figura 12. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en abril.	27
Figura 13. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en mayo.	28

Figura 14. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en junio.....	29
Figura 15. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en septiembre.....	30
Figura 16. Productos de PCR carriles 1-12, CN= control negativo, CP= control positivo (Bacillus). Marcador 1Kb y Marcador “Low mass” (Invitrogen ®).	33
Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales del gen ARNr 16S mediante el algoritmo Neighbour-joining (NJ) en el que se muestra la posición de los aislados secuenciados y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de bootstrap superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas.	35

Resumen

La contaminación del agua se ha incrementado progresivamente impactando directamente a la población mundial. Los humedales construidos son una alternativa para el tratamiento de aguas residuales ya que albergan una diversidad microbiana responsable de la biotransformación de diferentes compuestos; entre los que se encuentran los compuestos sulfurados que producen impactos ecológicos adversos. El objetivo de este estudio fue aislar y explorar la diversidad microbiana asociada a los procesos de biotransformación de compuestos sulfurados en la rizósfera, el biofilm y agua residual en proceso de tratamiento en un humedal construido de flujo subsuperficial en Tetipac, Estado de Guerrero. Las bacterias se aislaron en un medio selectivo de sales minerales modificado, enriquecido con sales de azufre. Se obtuvieron 46 aislados, que corresponden a 17 de agua, 11 de biofilm y 14 de rizósfera, que fueron clasificados con base a su morfología colonial y se sometieron a diez pruebas bioquímicas para describir su potencial metabólico; lo que permitió identificar bacterias con capacidades metabólicas diferentes. Se obtuvieron 15 morfotipos, entre los cuales se encuentran aislados con capacidades metabólicas similares a los géneros *Thiobacillus*, *Beggiotoa* y *Thiothrix*, que participan en la oxidación quimiolitotrófica del azufre elemental transformándolo en ácido sulfhídrico. Para su identificación, se realizó la extracción de ADN cromosómico por medio de dos métodos, el método de buffer TE y el método del reactivo GES; posteriormente se realizó la amplificación del gen ARNr 16S con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual fue secuenciado para establecer la identidad de los aislados en la base de datos del GenBank. Se identificaron microorganismos relacionados con los géneros *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Dyella*, *Citrobacter*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* y *Sphingobacteria*. Los microorganismos identificados en el humedal representan a la fracción de bacterias cultivables que participan en el ciclo del azufre de este humedal. Por lo que se tiene una perspectiva básica de la diversidad microbiana que participa en los procesos de transformación de compuestos sulfurados presentes en el agua residual, sometida a tratamiento en el humedal artificial de flujo subsuperficial.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua y la destrucción de los ecosistemas se han incrementado gradualmente, lo que impacta directamente a la población mundial. El cambio climático, los desastres naturales, la pobreza, el crecimiento de la población y la urbanización, han incidido en la disponibilidad y saneamiento de los recursos hídricos (UNESCO, 2006).

El porcentaje de agua que se utiliza para usos consuntivos es un indicador del grado de presión que se ejerce sobre el recurso en un país, cuenca o región; si el porcentaje es mayor a 40 significa una fuerte presión sobre el recurso. A nivel nacional se ejerce una presión moderada con 17.4%; en las zonas centro y norte la presión es fuerte ya que alcanza el 88%. El estado de Guerrero, junto con toda la cuenca del Balsas, es considerada como una entidad federativa que ejerce fuerte presión sobre el recurso con 49.4% (CONAGUA, 2010).

Una alternativa para el tratamiento de aguas residuales son los “humedales construidos o artificiales”. El tratamiento y rendimiento de estos sistemas depende de los diferentes microorganismos que intervienen en la degradación de los compuestos contaminantes y que además realizan los procesos que forman parte de los diferentes ciclos biogeoquímicos, como el de nitrógeno (N), fósforo (P), carbono (C) y azufre (S). Estos microorganismos se encuentran, principalmente, en la raíz de las plantas, hábitat conocido como “*rizósfera*”. En dicho hábitat microbiano es donde se lleva a cabo la degradación de estos compuestos, siendo el proceso determinante para limpiar el agua sometida a tratamiento. Por lo que, la caracterización de la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en los humedales artificiales es importante para identificar la dinámica de los procesos involucrados en la transformación de los contaminantes presentes en las aguas residuales (Weber & Legge, 2011).

Dentro de los contaminantes de mayor importancia, los compuestos sulfurados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. Su emisión

al ambiente está asociada con la formación de lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud (Manion *et al.*, 1992; McEldowne *et al.*, 1993).

Los microorganismos tienen diversos mecanismos en los que utilizan al azufre como fuente de energía. Sus compuestos son usados como donadores de electrones para el crecimiento quimiolitotróficos y autotrófico aerobio de las bacterias. La mayoría de las reacciones propician la formación de sulfatos. Con relación a los sulfuros metálicos, como el bisulfuro de hierro (FeS_2) y bisulfuro de molibdeno (MoS_2), son químicamente atacados por los iones hexahidratados de hierro (II), generando tiosulfato y azufre elemental, el cual es oxidado hasta ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Lens & Kuenen, 2001).

Para los bioprocesos enfocados en la eliminación de compuestos reducidos de azufre en aguas residuales se consideran diferentes variables, como son: temperatura, pH y la concentración de sales. Variables determinadas por el origen del agua y pueden no ser fisiológicamente óptimas para que los microorganismos realicen los procesos de recirculación de este elemento. Por tales motivos, se considera necesario profundizar en el estudio de la estructura y función de las poblaciones y comunidades bacterianas, las cuales son la clave para entender los mecanismos de oxidación-reducción biológica de los compuestos de azufre, así como las condiciones que hacen más eficiente estos procesos (Pérez, 2007). La utilización de métodos moleculares aplicados al estudio de comunidades microbianas han cobrado relevancia rápidamente debido a la gran cantidad de información que proporcionan y a la relativa facilidad metodológica que implica, pues ponen en evidencia la gran diversidad genética bacteriana presente (Nogales, 2005).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ¡Error! Marcador no definido. Antecedentes

En la mayoría de los países, grandes cantidades de aguas residuales de origen doméstico e industrial son tratadas convencionalmente utilizando microorganismos que se desarrollan naturalmente dentro del sistema de tratamiento. A lo largo del siglo pasado, las mejoras en el tratamiento de aguas residuales se han llevado a cabo de forma empírica, pero cada vez más se están realizando estudios científicos sobre los procesos anaerobios y aerobios para dicho tratamiento, ya que la optimización conducirá a un mayor éxito en la mejora de estos procesos. Un enfoque que tiene potencial para aumentar la eficiencia del proceso de tratamiento de caudales contaminados es inocular el sistema con microorganismos que han sido seleccionados para el tratamiento de residuos particulares. En analogía con los cultivos para fermentación, tales organismos pueden ser llamados “cultivos iniciadores” (“*starters*”). Los cultivos iniciadores pueden ser utilizados en el tratamiento de aguas residuales de origen domésticos (Crueger *et al.*, 1993).

Los trabajos pioneros en el estudio de las poblaciones microbianas en humedales construidos se basaban en conteo por el “método de recuento en placa”. Estudios más recientes han tomado ventaja con la aplicación de las nuevas tecnologías moleculares y genéticas, tales como la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) seguido por la “electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización” (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993) o de la “fluorescencia por hibridación *in situ*” (FISH) (Manz *et al.*, 1992). Con lo anterior, se han podido obtener datos sobre la proporción relativa de especies y/o grupos funcionales existentes dentro de estos ecosistemas construidos. Generalmente, estos estudios pueden clasificarse en tres tipos: 1) aquellos relacionados con el recuento total de bacterias y con la eliminación de organismos infecciosos; 2) los relacionados con los procesos microbianos a escala global, con el acoplamiento de varias técnicas moleculares y bioquímicas que además de estimar su densidad microbiana, permiten identificar su actividad; y, 3) estudios con énfasis en una sola actividad o en un grupo microbiano con una función específica, como: bacterias nitrificantes, bacterias desnitrificantes, bacterias metanogénicas o reductoras de sulfato (Faulwetter *et al.*, 2009).

2.2 Ciclo del azufre

Los depósitos de azufre más abundantes se encuentran en sedimentos y rocas en forma de minerales sulfatados (principalmente yeso, CaSO_4) y la pirita de hierro (FeS_2). Sin embargo, es importante señalar que la fuente primaria de este elemento se encuentra en la biosfera y en los océanos en forma de sulfato inorgánico (Faulwetter *et al.*, 2009).

El ciclo global del azufre depende de la actividad metabólica de los microorganismos, que son filogenéticamente diversos y en su mayoría residen en el océano (Figura 1). A pesar de que rara vez el azufre se convierte en un nutriente limitante, los procesos de intercambio son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas. Los compuestos orgánicos de azufre funcionan como combustible para el metabolismo microbiano en la columna de agua superior y su recirculación tiene consecuencias importantes; por ejemplo, aquellas relacionadas con el sistema climático. Los microorganismos que metabolizan el azufre cumplen con funciones esenciales en su hábitat, ya sea por la formación de biomasa o por la degradación de la materia (carbono orgánico). Esto puede observarse en las actividades de degradación de sulfato en los sedimentos marinos realizada por las bacterias reductoras, y en las actividades de formación de azufre en aguas profundas y aberturas hidrotermales, realizadas por bacterias oxidantes. Algunas bacterias sulfuroxidantes aumentan la productividad del ecosistema mediante la retención de los compuestos de nitrógeno y fósforo. En el futuro será muy importante mejorar la cuantificación de estos procesos, para aprender más acerca de sus implicaciones ecológicas. Este conocimiento nos permitirá evaluar mejor su impacto ambiental y sus posibles respuestas a los cambios ambientales (Lens & Kuenen, 2001).

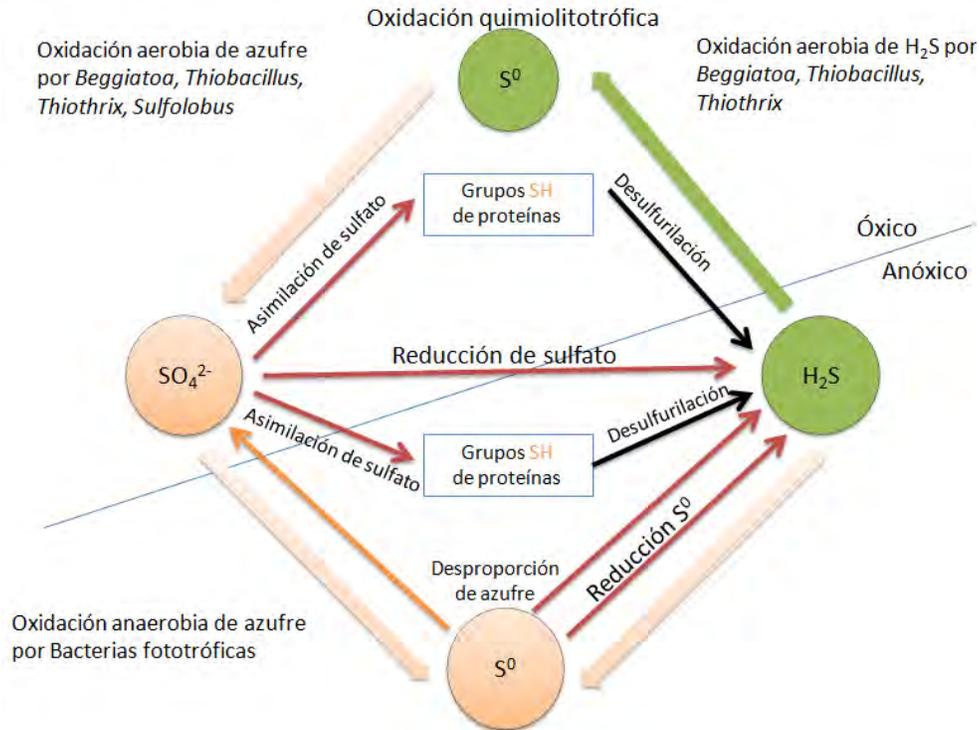


Figura 1. Ciclo del azufre (S) asociado con la actividad microbiana (Madigan et al., 2004)

Los compuesto de azufre que comúnmente son utilizados como fuente de energía son: sulfuro de hidrogeno (H_2S), azufre elemental (S^0) y tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Estos compuestos son transformados a través de las siguientes reacciones químicas:

- $\text{H}_2\text{S} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$
- $\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} + 1 \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$
- $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$

(Madigan et al., 2004)

El SH_2 en presencia de O_2 es usado como fuente de energía por microorganismos quimiolitotróficos como *Beggiatoa*, *Thiovulum*, *Thiothrix* y el termófilo *Thermothrix*. Algunos *Thiobacillus* (neutrófilos) también oxidan H_2S y otros compuestos de S reducidos. El S^0 resultante se acumula intracelularmente, pudiéndose oxidar posteriormente a SO_4^{2-} (Sievert et al., 2007).

Las bacterias rojas (Chromatiaceae) y verdes (Chlorobiaceae) del azufre, foto-reducen el CO_2 mientras oxidan el SH_2 a S_0 (y en caso necesario el S^0 a SO_4^{-2} , lentamente, sin acidificar el medio). Estas bacterias ejercen una actividad sulfoxidante en condiciones anóxicas (Sievert *et al.*, 2007).

El ciclo de azufre en los humedales es importante ya que se encuentra en cantidades considerables en las aguas residuales. En este ciclo se producen diferentes reacciones que tienen como resultado la formación de otros compuestos; por ejemplo, durante la fijación del CO_2 se forman compuestos orgánicos, la desnitrificación y la formación de sulfuros metálicos, que también pueden ser utilizados en algún otro ciclo biogeoquímico (Sorokin *et al.*, 2011). El ciclo puede variar según las condiciones que tenga las diferentes zonas del humedal. Sin embargo, aunque la actividad microbiana no es el único medio por el cual el azufre es transformado, la investigación indica que los procesos que llevan a cabo las bacterias son los más importantes (Faulwetter *et al.*, 2009).

Los diferentes procesos que llevan a cabo las bacterias pueden afectar el ciclo del azufre. Por ejemplo, la desnitrificación es energéticamente más favorable que la reducción del sulfato y la metanogénesis compite con los reductores de sulfato por el carbono disponible en condiciones similares de oxido-reducción (Faulwetter *et al.*, 2009).

2.3 Reducción de azufre

La reducción asimilativa del sulfato es el proceso mediante el cual una gran variedad de organismos vivos (incluyendo plantas superiores, algas, hongos y la mayoría de los procariotas) utilizan sulfato como fuente de azufre para la biosíntesis de compuestos organosulfurados (amino ácidos, metionina, cisteína, etc.), vitaminas (biotina), coenzimas (coenzimo-A) y compuestos osmoreguladores (dimetilsulfuro) (Sievert *et al.*, 2007).

La reducción disimilativa de sulfato representa un patrón de respiración anaerobia. Consiste en la habilidad de un selecto grupo de microorganismos para utilizar sulfato como aceptor final en cadenas de transporte de electrones que generan energía. Dicho grupo lo componen

“bacterias anaerobias estrictas” conocidas como “bacterias reductoras de sulfato”. Estas se han dividido en dos grupos fisiológicos: “bacterias oxidantes de acetato” y “bacterias no-oxidantes de acetato” (Arias-Triguero, 2004).

2.4 Oxidación del azufre

En condiciones aerobias el sulfuro se oxida espontáneamente a pH neutro. Si hay luz también puede llevarse a cabo la reacción oxidativa por bacterias fotosintéticas. En presencia de oxígeno, el azufre elemental es químicamente estable en la mayoría de los ecosistemas, pero es fácilmente oxidado por bacterias y su oxidación da por resultado la formación de iones sulfato e hidrógeno que disminuyen el pH (Madigan *et al.*, 2004).

Así como en la reducción, existen dos vías de oxidación:

a) Vía anaerobia, donde la mayoría de las bacterias fotosintéticas verdes y púrpuras son capaces de oxidar compuestos sulfurados reducidos a sulfato. Los donantes de electrones más comunes en las bacterias fototróficas son el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el tiosulfato (SO_3^{-2}).

El azufre elemental (S^0) se forma frecuentemente durante la oxidación del sulfuro de hidrógeno o el tiosulfato. Este puede acumularse en el interior de la célula (por ejemplo, en *Chromatium*) o puede ser depositado fuera de la célula, adherido a su superficie externa (por ejemplo, bacterias fotosintéticas verdes). El S^0 almacenado en forma de glóbulos intracelulares o depósitos extracelulares representa una fuente de electrones de rápido acceso para la célula fotosintética. No obstante, aparentemente el azufre elemental no es un intermediario obligado en la oxidación del sulfuro al sulfato, siendo más bien un producto colateral que se acumula cuando las concentraciones de sulfuro en el ambiente son altas. De hecho, cuando los niveles de sulfuro son limitantes, este se oxida directamente a sulfato sin formarse el azufre elemental (Lesley *et al.*, 1992).

b) Vía aerobia, donde existe un grupo de microorganismos quimiolitotróficos capaces de crecer a expensas de sulfuro de hidrógeno, azufre elemental o tiosulfato como donadores de

electrones. Dicho grupo se identifica como las “bacterias incoloras del azufre”. El producto final de la oxidación del azufre en la mayoría de los casos es SO_4^{-2} . En varias de las bacterias incoloras del azufre (con la excepción del género *Thiobacillus*) la oxidación del H_2S se produce por etapas, siendo la primera etapa la oxidación de sulfato a azufre elemental (Madigan *et al.*, 2004).

Algunas de estas bacterias almacenan el azufre elemental en forma de gránulos intracelulares (por ejemplo, *Beggiotoa*). Dichos depósitos representan una reserva de energía cuando el suministro de H_2S es limitado. Estas bacterias obtienen la energía de la oxidación del S^0 a SO_4^{-2} . En situaciones donde el azufre elemental está disponible mediante fuentes exógenas, el organismo crece adherido a partículas de azufre, dada la alta insolubilidad del azufre elemental (Madigan *et al.*, 2004).

En el caso de las bacterias del género *Thiobacillus* la oxidación de sulfuros, particularmente H_2S , no produce azufre elemental como producto intermediario. No obstante, estos microorganismos generan S^0 cuando oxidan tiosulfato. El azufre elemental que se produce de la oxidación de tiosulfato puede ser oxidado posteriormente cuando el suministro de tiosulfato sea escaso. Si la fuente de tiosulfato es escasa, la bacteria no acumula S^0 . Esto implica que bajo condiciones limitantes de tiosulfato, el azufre elemental se oxida tan pronto es producido (Pérez., 2007).

Por lo tanto, una de los resultados de la oxidación de compuestos de azufre, por bacterias incoloras del azufre es la acidificación del medio. El ácido que generan estas bacterias es ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los electrones provenientes de la oxidación de sulfuros, tiosulfato o azufre elemental entran en diferentes puntos de la cadena de transporte dependiendo de su potencial de reducción. Se genera ATP a través de la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena de transporte de electrones, siendo oxígeno el aceptor final de estos. La energía para la fosforilación de ADP a ATP proviene de la generación de un gradiente de protones (Madigan *et al.*, 2004).

Dentro de los compuestos que contiene el agua residual se encuentran los del azufre, los cuales son aprovechados y transformados por los microorganismos, que propician la disminución de los efectos adversos que pueden ocasionar al ambiente.

2.5 Agua residual

De acuerdo con la NOM-002-SEMARNAT-1996, las aguas residuales se definen como: *“las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas”* (SEMARNAT, 2003).

A través del drenaje se vierten aguas residuales que alcanzan las masas naturales de aguas superficiales, como ríos, lagos y océanos, las cuales son utilizadas como fuentes alternativas de agua potable, para uso doméstico, industrial y para riego; así como para cultivo de peces y actividades recreativas, por lo tanto es determinante mantener la calidad del agua potable lo más íntegra posible. El mantener la calidad de agua significa no sobrecargar con nutrientes orgánicos e inorgánicos, o con sustancias tóxicas, nocivas o inaceptables desde el punto de vista estético. No deben alterarse significativamente su oxigenación, temperatura, salinidad, turbidez o pH (Trinidad, 2006).

El tratamiento de las aguas residuales ha sido una actividad que se ha venido realizando para la recuperación del recurso y la protección del ambiente. Sin embargo, el elevado costo para la construcción y mantenimiento de las plantas de tratamiento convencionales ha hecho inoperable el uso de estas alternativas. Así también, análisis asociados con la remoción de los compuestos contaminantes han mostrado un bajo rendimiento en los procesos de transformación (EPA, 2000).

Por lo que, el uso de los “humedales artificiales” es una nueva alternativa para el tratamiento de las aguas residuales. Esta nueva tecnología requiere de una menor inversión económica durante su construcción y mantenimiento; aunado, a un elevado proceso de

remoción de los compuestos contaminantes que componen a las aguas residuales (García & Corzo, 2011).

2.7 Humedales

Las regulaciones federales definen a los humedales como: "*aquellas áreas que están inundadas o saturadas por agua superficial o suelo con una frecuencia y duración suficientes para apoyar una prevalencia de vegetación típicamente adaptada para la vida en condiciones de suelo saturado, generalmente incluyen pantanos, ciénagas, y áreas similares*" (Figura 2) (EPA, 2000).



Figura 2. Humedal natural en Huatulco, Oaxaca. Fuente: www.ciudadania-express.com

Desde hace unos treinta años los sistemas de humedales “construidos” o “artificiales” se han utilizado en el centro y norte de Europa y en los Estados Unidos de América., para tratar las aguas residuales de pequeños municipios. En la actualidad estos sistemas se están aplicando de forma creciente en todo el mundo (EPA, 2000). Los “humedales artificiales” son sistemas de depuración constituidos por lagunas o canales poco profundos (de menos de 1 m) plantados con vegetales propios de las zonas húmedas y en los que los procesos de descontaminación tienen lugar mediante las interacciones entre el agua, el sustrato sólido, los microorganismos, la vegetación e incluso la fauna (Figura 3). Los “humedales artificiales” son utilizados para sustituir las plantas de tratamiento convencionales. Algunos documentos de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) se refieren a estos humedales como una planta de tratamiento de aguas residuales, para evitar cualquier confusión (EPA, 2000).

Los “humedales artificiales” poseen propiedades que hacen más eficientes los procesos de remoción y transformación de los compuestos contaminantes, como: el “llenado y vaciado”, los patrones de flujo y sus propiedades físicas (EPA, 2000).

Los “humedales artificiales” proporcionan tratamiento avanzado a las aguas residuales que han sido tratadas previamente con los niveles secundarios, además de otros beneficios tales como hábitat de vida silvestre, laboratorios de investigación o usos recreativos (EPA, 2000).

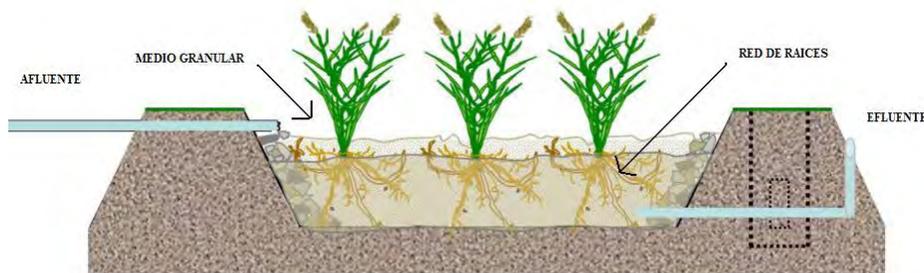


Figura 3. Esquema de un humedal artificial de flujo subsuperficial (García & Corzo, 2011).

De acuerdo con el tipo de circulación del agua, los “humedales artificiales” se clasifican en “flujo superficial” o “flujo subsuperficial”. En los sistemas de “flujo superficial” el agua está expuesta directamente a la atmósfera y circula a través de los tallos y hojas de las plantas. Estos tipos de humedales son una modificación del “lagunaje natural”, que tienen una profundidad de la lámina de agua entre 0.3 y 0.4 m, y con plantas y pueden ser utilizados para mejorar la calidad de efluentes que ya han sido previamente tratados en una depuradora (García & Corzo, 2011).

En los humedales de “flujo subsuperficial”, la circulación del agua es de tipo subterráneo a través de un medio granular y en contacto con las raíces y rizomas de las plantas. La profundidad de la lámina de agua suele ser de entre 0.3 y 0.9 m. La biopelícula que crece adherida al medio granular y a las raíces y rizomas de las plantas tiene un papel fundamental en los procesos de descontaminación del agua (García & Corzo, 2011).



Figura 4. Fotografías del humedal artificial de flujo subsuperficial, vista frontal y vista lateral.

2.8 Remoción biológica

La respiración y la fermentación son los principales mecanismos por los cuales los microorganismos transforman los compuestos orgánicos presentes en sustancias inocuas, como los contaminantes que forman parte de las aguas residuales. Los productos finales generados por dicha transformación, como el sulfuro, pueden habilitar otros mecanismos de eliminación; como la precipitación y el secuestro de metales pesados dentro de la matriz del humedal (Dvorak *et al.*, 1992; Machemer & Wildeman, 1992).

En la respiración, el microorganismo induce una transferencia de electrones de un compuesto donante de estado de energía más alto (típicamente de carbono orgánico, CO) a un aceptor de electrones de inferior estado energético; utilizando la energía para el crecimiento y reproducción. Por otro lado, un potencial “Redox” elevado está asociado con un entorno oxidado y promueve los procesos aeróbicos, tales como la nitrificación (Tabla 1). Por el contrario, la disminución de este potencial está relacionada con condiciones reducidas y por promover procesos anaeróbicos; tales como la reducción de sulfato y metanogénesis. Los procesos de respiración microbiana siguen una secuencia predecible dentro de rangos específicos del potencial “Redox”, asociado a la cantidad de energía disponible que puede ser aprovechada por el microorganismo (Faulwetter *et al.*, 2009).

En general, los procesos aeróbicos tienen un mayor rendimiento energético y propician un crecimiento rápido de las poblaciones microbianas. Así también, cuando el aceptor de electrones adecuado está disponible, las condiciones “Redox” se mantienen dentro de un intervalo adecuado que permite el consumo de carbono orgánico (Mitsch & Gosselink, 2000).

Tabla 1. Reacciones de oxidación-reducción (Faulwetter *et al.*, 2009).

Procesos	Electrón aceptor	Productos finales
Respiración aeróbica	O ₂	H ₂ O
Reducción de nitrato	NO ₃	- N ₂ , NO _x
Reducción de manganeso	Mn ⁴⁺	Mn ²⁺
Reducción de hierro	Fe ³⁺	Fe ²⁺
Sulfato reducción	SO ₄	2- S ₂
Metanogénesis	CO ₂	CH ₄

Por otro lado, las plantas y la biota asociada al suelo tienen un fuerte vínculo funcional como productores y descomponedores en los ecosistemas terrestres. Por ejemplo, las plantas proporcionan carbono orgánico a la biota del suelo a través de la producción de exudados provenientes de la raíz; mientras la biota del suelo descompone la materia orgánica y aprovecha el nitrógeno liberado. En retribución, la biota libera el fósforo que está mineralizado para que pueda ser utilizado en el crecimiento de las plantas. Por lo que, en estos ecosistemas la gran riqueza y diversidad funcional de las especies de plantas provocan una alta heterogeneidad de recursos y propician el desarrollo de los diversos grupos microbianos (Faulwetter *et al.*, 2009).

En el caso de los humedales artificiales, estos reciben una gran cantidad de materia orgánica procedente de las aguas residuales con las que son alimentados, generando una elevada Demanda Química y Biológica de Oxígeno (DQO y DBO, respectivamente) (Zhanga *et al.*, 2010). En este caso, las plantas colocadas en estos ecosistemas artificiales ayudan a la eliminación de los compuestos contaminantes a través de la diversidad microbiana asociada en sus raíces (*rizósfera*). Esta asociación permite el incremento de la densidad microbiana que aprovecha el oxígeno producido por las plantas; generándose las condiciones adecuadas de potencial “Redox” que promueven una gran variedad de procesos

microbianos que ayudan a la transformación de la materia orgánica recibida en las aguas residuales (Faulwetter *et al.*, 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la utilización de los recursos naturales está relacionado con el aumento de la población mundial, lo cual ha obligado a buscar alternativas que permitan aprovechar mejor los recursos y, principalmente, que sean reutilizados. La capacidad para controlar la contaminación causada por las actividades humanas será, a la larga, crucial para el desarrollo de la humanidad; siendo el manejo adecuado de los recursos hídricos uno de los mayores problemas a resolver (UNESCO, 2006).

En el 2008, México se encontraba en el lugar 89 en cobertura de agua potable; recibe del orden de 1489 millones de metros cúbicos (m^3) de agua en forma de precipitación; de esta cantidad el 73.2% regresa a la atmósfera, el 22.1% escurre por los ríos y arroyos, y el 4.7% restante se filtra al subsuelo y recarga los acuíferos. De tal forma, que el país cuenta con 459 mil millones de m^3 de agua dulce renovable. Sin embargo, el incremento de la población hizo que la disponibilidad natural *per cápita* de agua por habitante a nivel nacional disminuyera a 4288 m^3 /ha/año en el año 2008 y, se espera que en el año 2030 alcance los 3793 m^3 /ha/año (CONAGUA, 2012).

El impacto más dramático en los ecosistemas acuáticos continentales es el aumento de la concentración de sulfato, ocasionando el desarrollo de altos niveles de azufre reducido en los sedimentos (Baldwin & Mitchell, 2012). Los “sedimentos sulfídicos” (o “suelos ácidos sulfatados”) se forman cuando las “bacterias reductoras de sulfato” utilizan el ión sulfato como aceptor terminal de electrones para la respiración anaeróbica. El producto final de esta reacción respiratoria es el sulfuro de hidrógeno que reacciona con el hierro (y otros metales) para formar sulfuros minerales, tales como la pirita. La oxidación de los “sedimentos sulfurosos”, a través de reducción parcial del cuerpo de agua, puede tener

efectos ambientales adversos, como la acidificación, la desoxigenación y la movilización de metales pesados (Baldwin & Fraser, 2009).

El aumento de la concentración de sulfato en un cuerpo de agua también tiene el potencial de interrumpir los procesos biogeoquímicos que ocurren en los sedimentos, comprometiendo su condición ecológica. Por ejemplo, la reducción del sulfato se ha implicado en la metilación del mercurio en los sedimentos de humedales, las bacterias reductoras de sulfato por lo tanto pueden contener metil mercurio, ser consumidas por el peldaño trófico o excretarlo y pasar a procesos biomagnificadores dañando la salud humana (Gilmour *et al.*, 1992). La oxidación de los “sedimentos sulfídicos” consume oxígeno, que en casos extremos, puede consumir todo el oxígeno presente en la columna de agua favoreciendo la muerte de los organismos acuáticos. Esto es más probable que ocurra cuando formas altamente reactivas de azufre inorgánico en estado reducido son suspendidos a lo largo de una columna de agua (Baldwin & Fraser, 2009).

El aumento de las concentraciones de sulfatos también está implicado en la eutrofización de las aguas continentales mediante la movilización de fósforo. El sulfuro es un fuerte agente reductor que facilita la reducción de minerales sólidos férricos disueltos a iones ferrosos con propician la liberación del fósforo (P). Esta reacción se ve favorecida por la insolubilidad de uno de los productos de reacción, el sulfuro de hierro (Baldwin & Mitchell, 2012).

4. JUSTIFICACIÓN

Los humedales artificiales han demostrado tener muy buenos porcentajes de remoción de compuestos contaminantes. Su funcionamiento depende de los microorganismos que ahí residen y que participan en la biotransformación de los contaminantes. Por lo que, es importante identificar la diversidad microbiana que participa en la transformación de los compuestos contaminantes asociados al azufre y evaluar los factores que influyen en el rendimiento y la fiabilidad del uso de humedales artificiales en el tratamiento de las aguas residuales.

5. HIPÓTESIS

De acuerdo con el ciclo del azufre los géneros dominantes que participan en los procesos oxidativos son Beggiatoa, Thiobacillus y Thiothrix, por lo que se espera sean dominantes en el humedal de flujo subsuperficial.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Aislar e identificar las bacterias que participan en la degradación de compuestos asociados con el azufre en un humedal construido de flujo sub-superficial en Tetipac, estado de Guerrero.

6.2 Objetivos Particulares

- Aislar y purificar las colonias que crezcan en un medio selectivo para las bacterias que se encuentren participando en el ciclo del azufre en un “humedal artificial” ubicado en el municipio de Tetipac, estado de Guerrero.
- Realizar pruebas bioquímicas para determinar el potencial metabólico de compuestos asociados al azufre.
- Realizar la extracción de ADN cromosómico para amplificar el gen de ARNr 16S.
- Identificar la diversidad bacteriana que participa en el ciclo del azufre en los diferentes componentes del humedal.

7. METODO

- **Muestreo de agua, biofilm y rizósfera.**

En el año de 2012, se realizaron cuatro muestreos en los meses de abril, mayo, junio y septiembre, en cinco puntos diferentes dentro del humedal “artificial” (Figura 5). Se determinaron parámetros físicos, químicos y biológicos *in situ*, como: pH, temperatura, oxígeno disuelto a la entrada y salida del sistema; así también, en laboratorio se determinó la DBO₅ en los mismos puntos del sistema

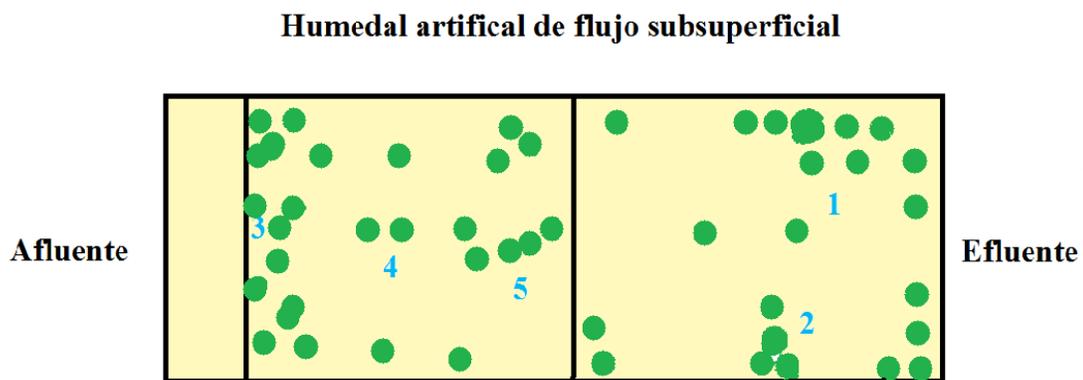


Figura 5. Esquema del humedal construido en el cual se señalan los 5 puntos de muestreo.

Se recolectaron muestras de agua por triplicado en tubos estériles con tapa, se abrieron y cerraron dentro del agua y se preservaron a 4°C hasta su procesamiento. Así también, se recolectaron muestras de raíz y de “biofilm” adyacentes al lugar en que se recolectaron las muestras de agua. Estas muestras se guardaron en bolsas de vinil con cierre hermético (*Ziplok*) y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento (Figura 6).



Figura 6. Muestreo de los componentes del humedal artificial en Tetipac, edo. Guerrero.

- **Procesamiento y condiciones de cultivo**

Las muestras se sembraron en un medio de cultivo con sales minerales que fue modificado en la concentración de los compuestos asociados con el azufre (Kumar *et al.*, 2011; Brombacher *et al.*, 2008; Okabe *et al.*, 2005; Williams & Unz, 1985; Velasco, 2001).

La proporción de sales por litro de medio, fueron: K_2HPO_4 7.05 mmol; KH_2PO_4 4.7 mmol; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.11 mmol; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.12 mmol; NaCl 1.72 mmol; $FeCl_3$ 0.625 mmol; $(NH_4)_2SO_4$ 14.28 mmol; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.12mmol; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.13 mmol; $Na_2MoO_4 \cdot 5H_2O$ 0.003 mmol; H_3BO_3 0.016 mmol; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.16 mmol; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.04 mmol; ciclohexamida 100 mg y agar bacteriológico 18 g.

Las condiciones para el crecimiento bacteriano fueron de 30°C con un tiempo de incubación de 3 a 5 días. De las muestras de agua, se sembraron 100 μ l directamente por el método de extensión en placa.

Las muestras de rizósfera se procesaron tomando 1g de raíz que se colocó en solución salina al 1% en un tubo de ensayo para suspender la microbiota asociada agitando por

medio de un Vortex. Las muestras de “biofilm” se procesaron tomando 1g de la materia adherida al sustrato y se colocó en solución salina al 1% en un tubo de ensayo para suspender la microbiota asociada agitando por medio de un Vortex. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} y se sembraron 100 μL de cada dilución.

Posteriormente, se realizó el conteo de colonias viables y se estimaron las unidades formadoras de colonias (UFC), los aislados fueron clasificados con base en su morfología colonial, considerando las siguientes características: coloración, forma, elevación y tipo de margen (Arellano *et al.*, 2005)

- **Pruebas bioquímicas**

Los aislados fueron sometidos a diversas pruebas bioquímicas para determinar su potencial metabólico de compuestos asociados al azufre. Los sustratos analizados fueron los siguientes: azufre elemental (S^0) 20 mmol, tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) 20 mmol, acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 20 mmol, piruvato ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$) 20 mmol, citrato ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 20 mmol, malato ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) 20 mmol, aspartate ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$) 20 mmol, metanol (CH_4O) 2.5% y etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) 2.5%. Cantidades utilizadas por cada litro de medio de cultivo.

- **Extracción de ADN y amplificación del gen de ARNr 16S por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Para la extracción de ADN total se utilizaron los siguientes métodos:

Método del buffer TE (descrito en Hassan *et al.*, 2006):

1. Tomar de 3 a 5 colonias y resuspenden en un tubo Eppendorf en 100 μL de buffer TE.
2. Colocar en una parrilla de calentamiento a 56°C por 2 horas y calentar un minuto adicional a 100°C .
3. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 segundos.
4. Tomar el sobrenadante y transferir a otro tubo *Eppendorf* y enseguida colocar en hielo.

5. Realizar electroforesis en gel en TBE al 1% para corroborar la presencia de ADN.

- Extracción por Reactivo Ges modificado (*Tiocianato de guanidina*):

1. Se inocula el aislado en 2 ml de “caldo Luria” a pH = 7.2, y se incuba a 37°C por 18 hrs en agitación.

2. Se transfiere a tubos *Eppendorf* y centrifuga 13 000 rpm por 15 minutos. Se elimina el sobrenadante.

3. La pastilla es re-suspendida en 100 µl de buffer TE.

4. Adicionar 500 µL de Ges, agitar suavemente 5 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente depositar en hielo.

5. Adicionar 250 µL de acetato de amonio 7.5 M dejar 5 minutos en hielo y agitar suavemente.

6. Agregar 750 µL de cloroformo-alcohol isoacrílico (24:1), dejar 15 minutos en hielo mezclar por inversión tres veces. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.

7. Renovar la fase acuosa y transferirla a otro tubo *Eppendorf* y repetir una vez más el paso seis.

8. El ADN se precipita con un volumen 0.54 µL de isopropanol mezclar 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos en hielo.

9. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos, se desecha el sobrenadante.

10. Se realizan dos lavados consecutivos con etanol al 70%, centrifugando a 13 000 rpm por 5 minutos en cada lavado. Dejar evaporar el alcohol.

11. Resuspender al ADN en 50 µl de agua para PCR.

12. Realizar electroforesis en gel TBE al 0.5% para corroborar la presencia de ADN.

- La amplificación del gen de ARNr 16S se realizó por medio de la técnica de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” o “PCR”. Cada tubo de reacción contiene la siguiente mezcla de reactivos (25 μ L por ensayo):

Agua	17.6 μ L
Buffer	2.5 μ L
MgCl ₂	1.5 μ L
dNTP's	1 μ L
Forward	1 μ L
Reverse	1 μ L
Taq-Polimesara	0.3 μ L
DNA	1 μ L

Las amplificaciones se llevaron a cabo durante 30 ciclos en el termociclador MJ Research PTC-200 con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min
- 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento por 49°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min
- Extensión final a 72°C por 3 min
- Conservación de los tubos a 4°C

Se realizó electroforesis en gel en TBE al 0.5% con una porción de 1 μ L de los productos de PCR. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se confirmó el producto en un transiluminador de luz UV.

- **Análisis de la secuencia del gen 16S ARNr**

Los productos de PCR fueron secuenciados en la “*High Throughput Genomics Center*”, de la Universidad de Washington, USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa “*Bioedit*” y se determinó su identidad a través de la comparación con la base de datos del “NCBI” (*National Center of Biotechnology Information*), se utilizó el programa “BLAST” (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Posteriormente, se utilizó el algoritmo “*ClustalW*” del programa MEGA5.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar et al., 2012) se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas junto con las secuencias tipo de los géneros *Beggiotoa*, *Thiobacillus* y *Thiothrix*. Se generó un árbol filogenético con el método de “*Neighbor-Joining*” (Saito y Nei, 1987) para establecer la relación entre los diferentes aislados, con un “*Boopstrap*” de 1000 repeticiones.

8. RESULTADOS

Muestreo

El pH en la entrada del sistema registró un valor entre 6.8 y 7.09 unidades, en junio se alcanzó el máximo valor. En la salida se registraron entre 6.4 y 7.09 unidades; en septiembre registró el valor de pH más bajo, 6.4 unidades (Figura 7).

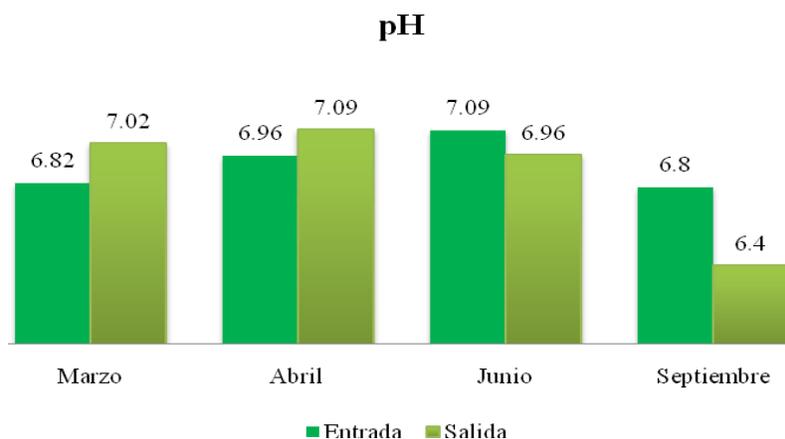


Figura 7. Valores de pH en cuatro meses de muestreo, en el afluente y efluente del humedal artificial.

La temperatura registrada en el afluente fue entre 21 y 24.3°C; en el efluente entre 20.5° a 24.5°C; junio registró el menor valor (Figura 8).

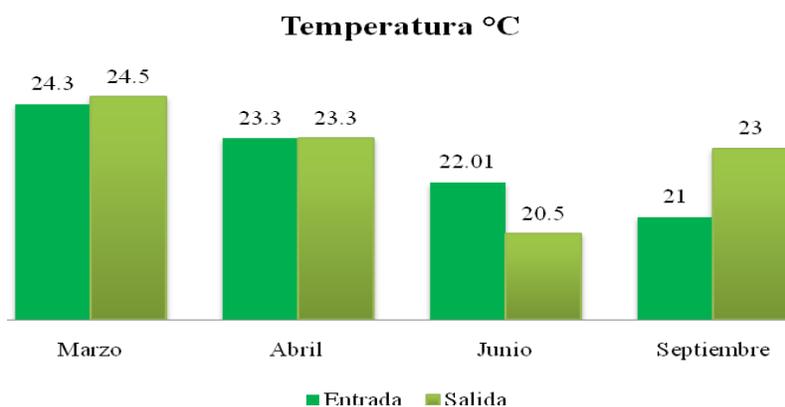


Figura 8. Temperatura registrada en los cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.

El oxígeno disuelto, en el afluente registró una concentración entre 0.5 y 2.02 mgL⁻¹. La concentración del efluente osciló entre 0.46 y 1.82 mgL⁻¹. Para ambos sitios junio registró las concentraciones más bajas (Figura 9). La concentración de oxígeno disuelto fue considerablemente baja debido al alto consumo por el proceso de oxidación de la materia orgánica y por la temperatura ambiente.

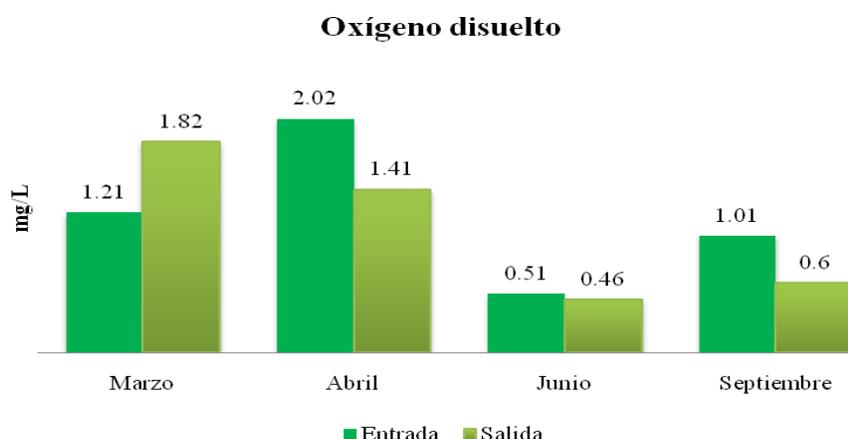


Figura 9. Valores de oxígeno disuelto registrados en cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.

Con relación a la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), el afluente del sistema registró una concentración de 63.95 a 765.69 mgL⁻¹. En el efluente las concentraciones alcanzadas estuvieron entre 63.71 a 239.8 mgL⁻¹. El mes de junio registró las concentraciones más bajas tanto en el afluente como en el efluente (Figura 10).

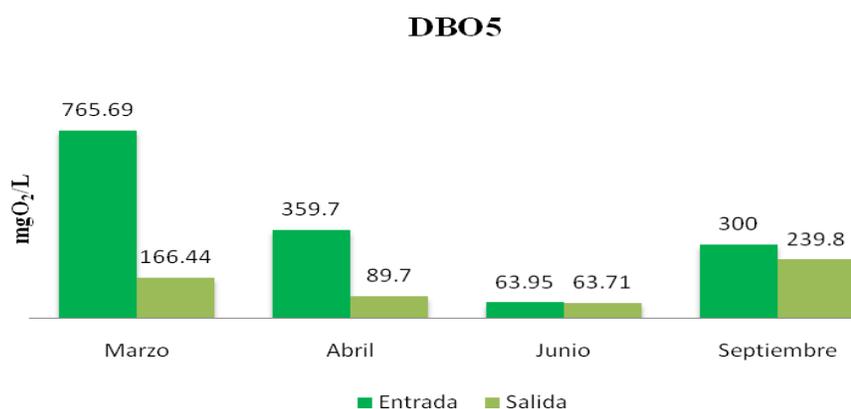


Figura 10. Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) en cuatro meses de muestreo, afluente y efluente del humeda artificial.

Cuantificación y aislamiento

A lo largo de los cuatro meses de muestreo en el “humedal artificial” de Tetipac, se recolectaron 63 muestras en los tres componentes analizados: agua, rizósfera y “biofilm”. Estas muestras fueron procesadas y sembradas en un medio selectivo para aislar bacterias que participan en el ciclo del azufre. A partir de estas muestras se aislaron 245 colonias, que se clasificaron en 15 morfotipos coloniales (Figura 11).

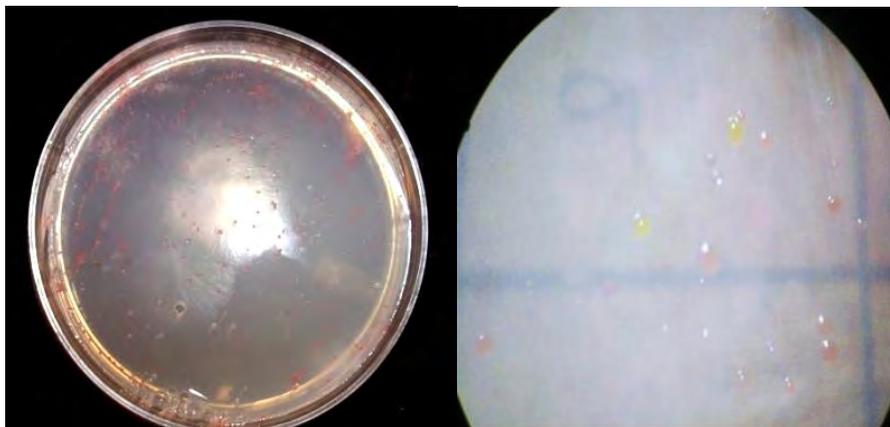


Figura 11. Colonias desarrolladas en medio de cultivo selectivo para aislar bacterias que participan en el ciclo del azufre.

En abril, se colectaron muestras en los sitios 3, 4 y 5; se aislaron nueve colonias que corresponden a los morfotipos 1, 2, 3, 4 y 6 (Tabla 2). En cuanto al conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), las menores UFC son de agua, mientras que son mayores en biofilm con 8,900 UFC mL⁻¹, y en rizósfera se alcanzaron 11,000 UFC mL⁻¹, sin embargo, para el punto 3 no hubo crecimiento de colonias de origen biofilm y para el punto 5 no hubo crecimiento de colonias de origen rizósfera (Figura 12)*.

Tabla 2. Morfología colonial de las cepas aisladas en muestreo de abril.

MORFOTIPO	CARACTERISTICAS	AISLADOS
1	Incoloras, puntiforme, convexa, entero.	A3a-9, A3a-11.
2	Incolora, circular, convexa, entero.	A3a-10, A3b-26.
3	Incolora, puntiforme, convexa, entero.	A5a-15.
4	Incolora, puntiforme, plana, entero.	A3r-18, A3b-27.
6	Rosa, circular, convexa, entero.	A3r-21, A3b-28.

*Clave de identificación de los aislados corresponde mes, sitio de muestreo, origen de muestra y número de aislado.

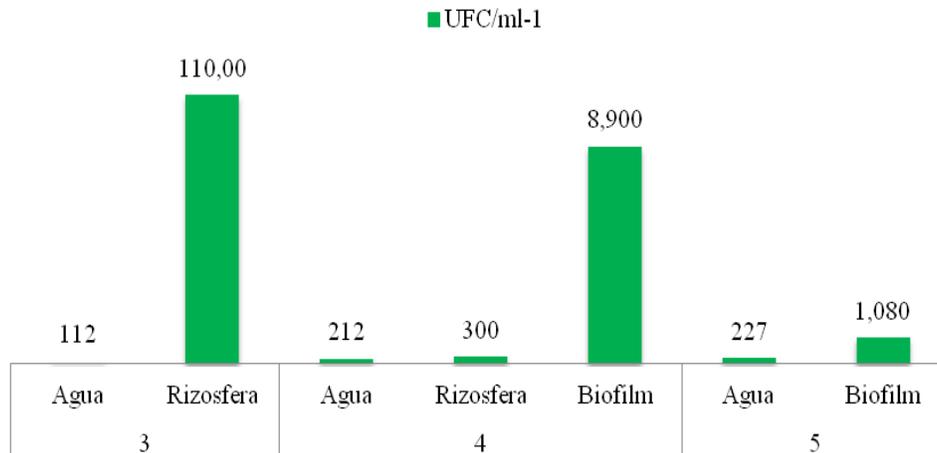


Figura 12. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en abril.

En mayo, se colectaron muestras de los cinco sitios de muestreo. Se aislaron 18 colonias que se clasificaron con los morfotipos 1, 2 y 6. Son los mismos que se presentaron en abril. Así también, se encontraron y describieron cinco nuevos morfotipos diferentes que son 5, 7, 8, 9 y 10 (Tabla 3). Estos morfotipos presentaron coloración rosa, amarilla y blanca, características que no presentaron los morfotipos 1, 2 y 6.

Con respecto al conteo de UFC DE las muestras de agua, fueron nuevamente menores en comparación con rizósfera, pero fue superado por las muestras de biofilm con 110,000 UFC mL⁻¹. Además, para los puntos de muestreo 3 y 5 no hubo crecimiento de colonias para las muestras de origen agua (Figura 13).

Tabla 3. Morfología colonial de las cepas aisladas en mayo.

MORFOTIPO	CARACTERISTICAS	AISLADOS
1	Incoloras, puntiforme, convexa, entero.	M1r-50.
2	Incolora, circular, convexa, entero.	M1a-33, M2a-35, M5a-47, M2r-53, M3r-57.
5	Incolora, irregular, plana, ondulado.	M3a-39.
6	Rosa, circular, convexa, entero.	M5r-67.
7	Rosa, puntiforme, convexa, entero.	M1r-52, M4r-63, M1b-70, M2b-74, M3b-75, Mab-83.
8	Amarilla, puntiforme, convexa, entero.	M5b-82.
9	Blanca, irregular, plana, entero.	M4a-44.
10	Blanca, irregular, plana, ondulado.	M3a-39, M2b-72.

*Clave de identificación de los aislados corresponde mes, sitio de muestreo, origen de muestra y número de aislado.

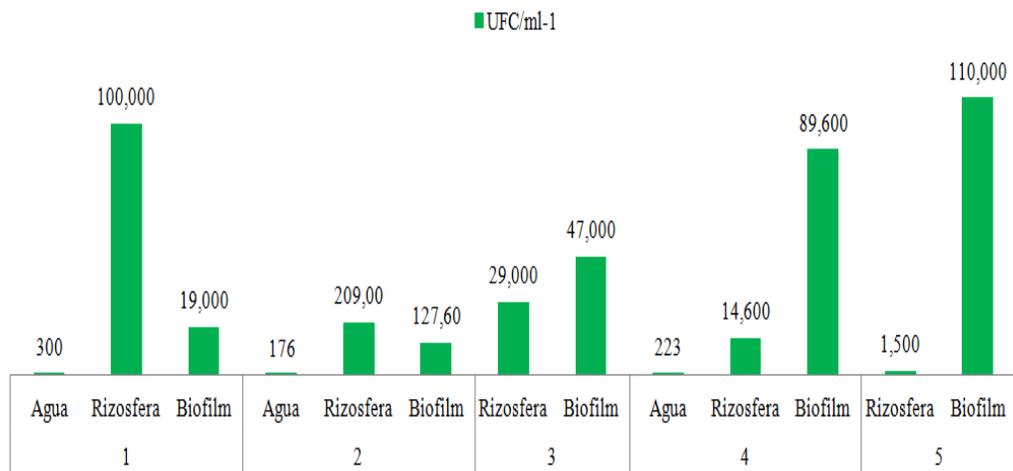


Figura 13. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en mayo.

En junio se colectaron muestras de los puntos 1, 2 y 4; y se observaron las mismas morfologías coloniales a las identificadas en el mes de abril, es decir, se presentaron nuevamente los morfotipos 1, 2 y 6 (Tabla 4). Se aislaron siete colonias y las UFC estimadas, fueron menores a $60,000 \text{ UFC mL}^{-1}$, cabe aclarar que las muestras colectadas de biofilm no tuvieron crecimiento por lo tanto no se cuantificaron (Figura 14)*.

Tabla 4. Morfología colonial de las cepas aisladas en junio.

MORFOTIPO	CARACTERISTICA	AISLADOS
1	Incoloras, puntiforme, convexa, entero.	J4a-88, J2r-94.
2	Incolora, circular, convexa, entero.	J1a-86, J2a 87.
6	Rosa, circular, convexa, entero.	J1r-89, J1r-90, J4r-97.

*Clave de identificación de los aislados corresponde mes, sitio de muestreo, origen de muestra y numero de aislado.

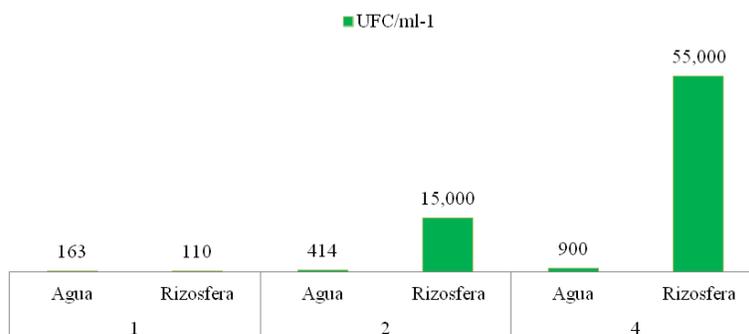


Figura 14. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en junio.

De las muestras colectadas en septiembre, se aislaron nueve colonias que presentaron seis morfotipos diferentes a los descritos en los meses anteriores (Tabla 5). En cuanto al conteo de UFC las muestras de agua de los puntos 3 y 5 hubo no pudieron ser cuantificadas por haber desarrollado demasiada población y no poder tener un conteo representativo, las muestras de biopelícula de los puntos 1, 2, 3, 4 y 5 presentaron la misma situación. Sin embargo, las muestras de rizósfera tuvieron hasta 201,000 UFC mL⁻¹, superaron las UFC de los meses de muestreo anteriores (Figura 15)*.

Tabla 5. Morfología colonial de las cepas aisladas en el mes de septiembre.

MORFOTIPO	CARACTERISTICAS	AISLADOS
10	Blanca, irregular, plana, ondulado.	S4r-117.
11	Blanca, circular, convexa, entero.	S1a-100, S3a-102.
12	Blanca, circular, planoconvexa, entero.	S2a-101, S4a-103.
13	Blanca, puntiforme, convexa, entero.	S5a-104, S5r-123.
14	Blanca, puntiforme, plano, entero.	S2b-131.
15	Blanca, puntiforme, plana, irregular	S5b-144.

*Clave de identificación de los aislados corresponde mes, sitio de muestreo, origen de muestra y numero de aislado.

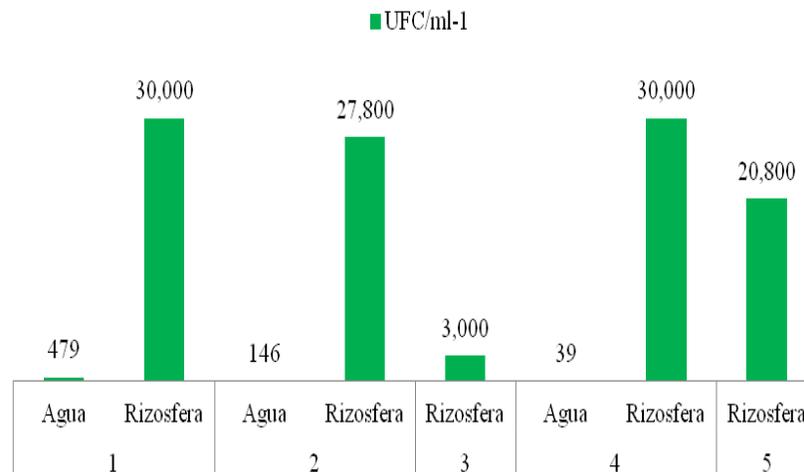


Figura 13.

Figura 15. Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por tipo de muestra, recolectadas en septiembre.

Pruebas bioquímicas

Para las pruebas bioquímicas, los sustratos fueron seleccionados con base en los perfiles metabólicos de microorganismos previamente caracterizados y que participan en los procesos de biotransformación del azufre en ambientes acuáticos naturales (Pérez, 2007; Brombacher *et al.*, 1988; Douglas & Castenholz, 1981). Los elementos azufrados seleccionados han sido considerados como importantes componentes durante la dinámica del ciclo del azufre (Schmidt *et al.*, 1987; Williams & Unz, 1985; Okabe *et al.*, 2005;

Katayama *et al.*, 1984). Se determinó el potencial metabólico de los diferentes aislados obtenidos en los cuatro meses de muestreo (Tabla 6). Las propiedades metabólicas fueron determinadas con base en las siguientes categorías:

A = Positivo al tercer día de incubación;

B = Positivo a la semana de incubación;

C = Positiva al mes de incubación;

D = Negativo.

Tabla 6. Perfiles metabólicos de los aislados más representativos en comparación con el perfil metabólico de los organismos *Beggiotoa*, *Thiobacillus* y *Thiothrix*.

SUSTRATO	<i>Beggiotoa</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiothrix</i>	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
Catalasa	D		AD	D	D	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Acetato	A		A	A	D	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A
Azufre	A			D	D	D	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Tiosulfato	A	A	A	D	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A
Piruvato	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Citrato		A		D	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Malato		A		D	D	A	A	A	A	A	A	D	A	A	A	A
Aspartate		A		D	D	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Metanol	A			D	D	B	B	B	D	B	A	A	A	A	A	A
Etanol	A			D	D	D	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A
Tinción Gram	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

*Identificación de los aislados estudiados: ^aA3r-21, ^bA3b-26, ^cA3b-27, ^dA3b-28, ^eM5a-47, ^fM1r-50, ^gM1r-50, ^hM4r-63, ⁱM1b-70, ^jM3b-75, ^kM4b-82, ^lJ1a-86, ^mJ1r-90, ⁿJ2r-94, ^oS4a-103, S4r-117 y ^pS5r-123, S2b-131, S5b-144.

Con estos análisis se identificaron perfiles similares a lo observado en bacterias pertenecientes a los géneros *Thiobacillus* (6 aislados), *Thiothrix* (5 aislados) y *Beggiotoa* (2 aislados). Así también, 17 aislados mostraron la capacidad de metabolizar todos los sustratos seleccionados; 4 aislados no metabolizaron ninguno de los sustratos, 5 aislados

fueron incapaces de utilizar un sustrato y 4 aislados metabolizaron solo un sustrato piruvato. Estos resultados son atípicos a lo observado en trabajos revisados para la selección de los compuestos utilizados (tiosulfato de sodio y azufre). En la mayoría de los casos, se identifican microorganismos conocidos como “bacterias oxidativas del azufre” (SOB), estrechamente relacionados con *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* y *Pseudomonas desnitrificas* (Okabe *et al.*, 2005); lo cual podría estar representando que diversas especies están metabolizando un compuesto del azufre en específico y ayudan a mantener el balance en los procesos de oxido-reducción.

Extracción de ADN y amplificación por el método de PCR

Para realizar los análisis moleculares, se seleccionaron 43 aislados que están distribuidos en los cuatro meses de muestreo, a partir de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas. A cada uno de los aislados se les realizó la extracción de ADN total; debido a cuestiones relacionadas con el crecimiento microbiano para la obtención de la biomasa necesaria de dicha extracción, se utilizaron dos métodos diferentes y así obtener una concentración adecuada de ADN para los análisis de amplificación. Por lo que, a 10 aislados se les realizó la extracción de ADN por el método del “Buffer TE” (Hassan *et al.*, 2010) y para el resto de los aislados se utilizó el “método con reactivo GES”.

Para la identificación de dichos aislados, se realizó la amplificación del gen de ARNr 16S por el método de PCR (1500 pb, aproximadamente). Se obtuvieron 37 productos de los 43 aislados seleccionados (Figura 16), ya que seis de los aislados seleccionados tuvieron dificultades para la amplificación de dicho gen, a pesar de haber obtenido la concentración de ADN total. Dichos productos de PCR fueron verificados a través de electroforesis en geles de agarosa, identificando el producto esperado se utilizó un marcador de peso molecular (1 Kb, Invitrogen ®). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciar a la “Unidad de Secuenciación” de la Universidad de Washington (USA), para determinar la identidad de las bacterias que participan en el ciclo del azufre en el humedal de flujo subsuperficial.

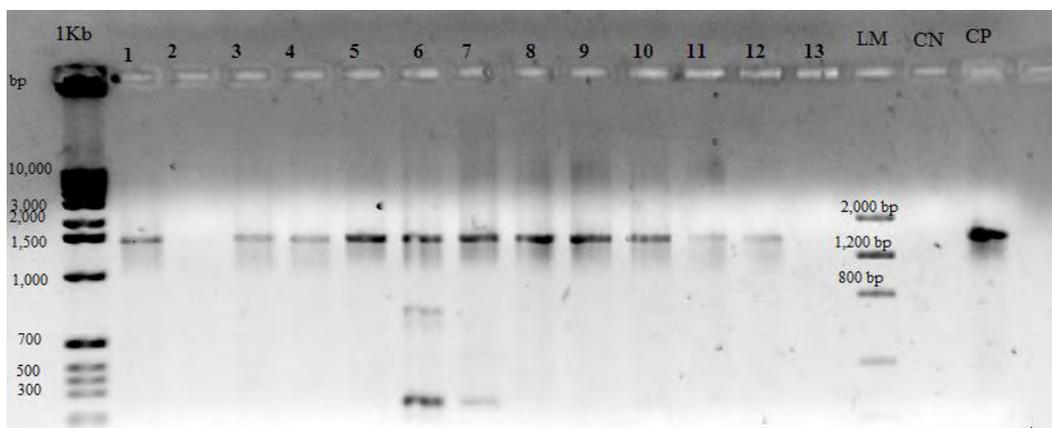


Figura 16. Productos de PCR carriles 1-12, CN= control negativo, CP= control positivo (*Bacillus*). Marcador 1Kb y Marcador “Low mass” (Invitrogen®).

Análisis filogenético

Se obtuvieron 17 secuencias parciales de una longitud de entre 400 y 500 nucleótidos. Dichas secuencias fueron comparadas con las secuencias disponibles en el “GenBank” de la base de datos del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Se seleccionaron las secuencias de las cepas tipo que mostraron mayor identidad con las secuencias obtenidas de los aislados del humedal (Tabla 7). Así también, se construyó un árbol filogenético por el método de “Neighbour-joining” (Saito y Nei, 1987), se utilizó el programa MEGA 5.1 (Kumar *et al.*, 2004) (Figura 17).

El análisis filogenético mostró que 12 aislados pertenecen a la Clase Gamma-proteobacteria; dos aislados a clase Beta-proteobacteria; un aislado perteneciente a un nueva orden de Bacteroidetes de la clase Sphingobacteria.

Tabla 7. Clasificación taxonómica preliminar de los aislados obtenidos del humedal artificial según comparación de las secuencias parciales del gen ARNr 16S.

Filo	Clase	Microorganismos filogenéticamente más relacionados	Similitud (%)	Aislado relacionado
<i>Proteobacteria</i>	<i>Beta Proteobacteria</i>	<i>Achromobacter xylooxidans</i> , raíz de la planta de caña de un humedal construido, Taiwán(JQ740156.1)	92	M5a-47
		<i>Ralstonia sp. str. CI</i> , piscina nuclear, Valencia España.(AY479983.1)	93	J4r-97
	<i>Gamma Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> , suelo contaminado con petróleo, Eslovaquia, (JX295987.1)	100	M1r-50

		<i>Stenotrophomonas sp. fl (2012)</i> , tratamiento tanque de aireación planta de aguas residuales, China(JQ717287.1)	92	M3r-57
		<i>Dyella soli</i> , suelo forestal Jeju Corea del sur, (NR_044539.1)	99	M4r-63 y Mab-82
		<i>Stenotrophomonas sp. JRL-2</i> , biofilm diclofop-metil ,Canadá(AF181569.1)	96	M3b-75
		<i>Uncultured Pseudomonas sp.</i> , comunidad atrazina degradante, Croacia(EU560961.1)	89	J1a-86
		<i>Uncultured bacterium</i> , humedal ,Francia (KC432152.1)	96	J1r-90
		<i>Citrobacter freundii</i> , fermentación leche, China (EU365679.1)	86	J2r-94
		Incultivable , el tratamiento de aguas residuales biorreactor, china, (FJ424270.1)	83	S4a-103
		<i>Pseudomonas sp. a186</i> , efluente de una producción de antibióticos planta de tratamiento de aguas residuales, (EU434377)	76	S4r-117
		<i>Raoultella sp. str. BM15-1-1</i> , suelo contaminado con DDT, China (FJ577962.1)	99	S5r-123
		<i>Bacteria 41-L049642-122-014-A06</i> , muestra impactador Anderson de la placa bac3, EE.UU.: Colorado(JX228258.1)	98	S2b-131
Bacteroidetes	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales bacteria PA21</i> , superficie de apatita bajo pino negral stand, Francia(JN819569.1)	99	S5b-144
ND				M1b-70

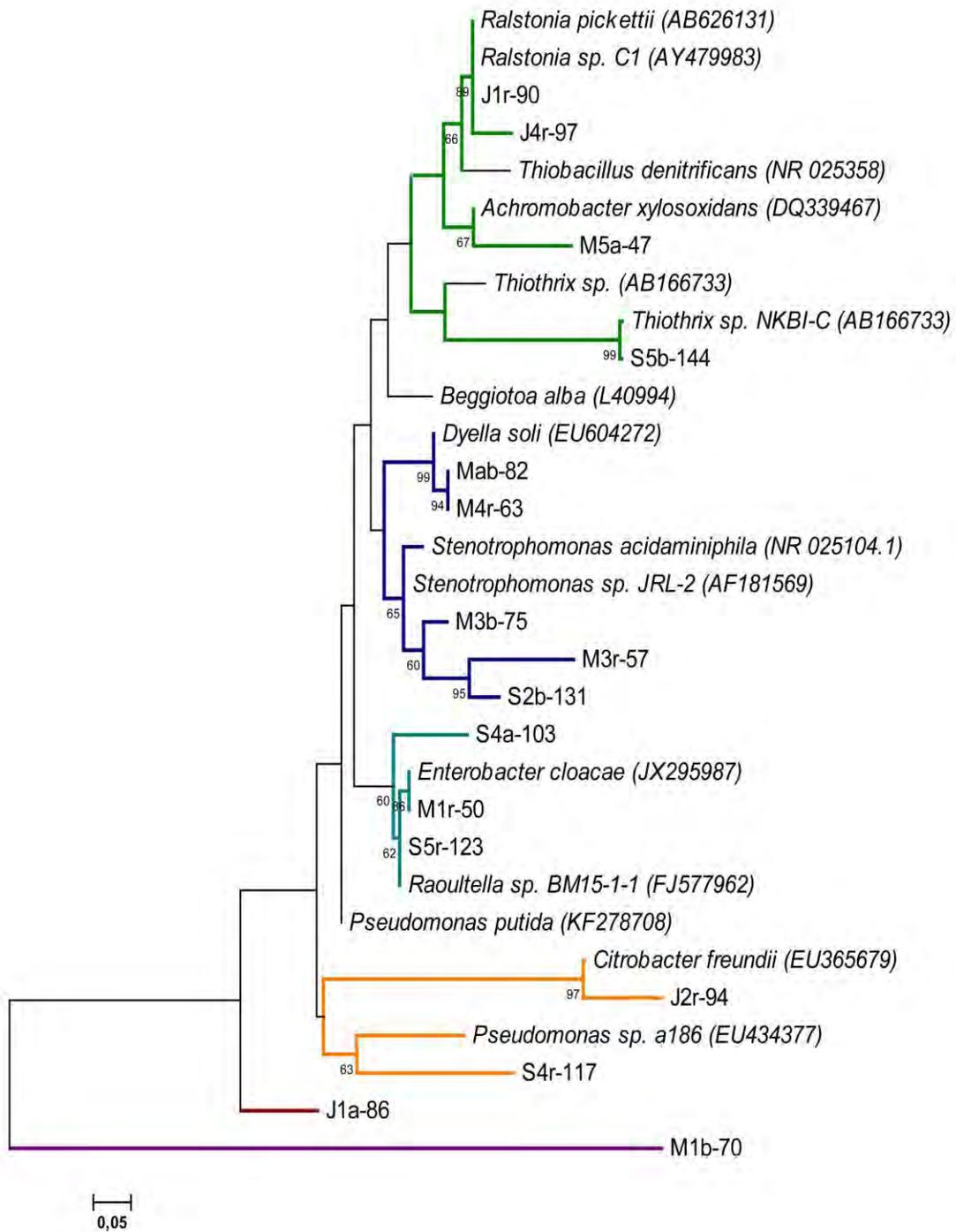


Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales del gen ARNr 16S mediante el algoritmo Neighbour-joining (NJ) en el que se muestra la posición de los aislados secuenciados y las especies más cercanas. El número de acceso de las secuencias se muestra entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de bootstrap superiores a 70% como porcentaje de 1000 réplicas.

9. Discusión

La contaminación del agua es un problema que año con año se ha incrementado, generando un efecto adverso en el mantenimiento y desarrollo de las poblaciones humanas (UNESCO, 2006). México es un país considerado en vías de desarrollo, que alberga una gran población en su territorio y ejerce una fuerte presión sobre los recursos hídricos. El estado de Guerrero es una región que tiene una alta demanda de estos recursos y tiene una capacidad limitada para el tratamiento de las descargas de origen antropogénico (CONAGUA, 2010).

El ciclo de azufre en los humedales es importante, ya que los compuestos que intervienen en él, se encuentran en cantidades considerables en las aguas residuales. Como resultado de las diferentes reacciones en el ciclo se propicia la formación de otros compuestos orgánicos adversos que permiten la fijación de CO₂, la desnitrificación y la formación de sulfuros metálicos (Sorokin *et al.*, 2011).

Diversos trabajos han sido desarrollados para comprender la ecología y fisiología de las bacterias que intervienen en el ciclo del azufre, éste depende de las actividades de una gran diversidad de microorganismos con diferentes capacidades metabólicas, en su mayoría estos microorganismos residen en el océano (Friedrich *et al.*, 2001; Lens & Kuenen, 2001; Stefen *et al.*, 2007). También hay estudios acerca del complejo ciclo interno del azufre que se produce en los “biofilm” de aguas residuales y, sobre la reducción del azufre en sedimentos de humedales naturales, en lagos ácidos o alcalinos (Baldwin & Fraser, 2009). La información relacionada con la diversidad filogenética y versatilidad metabólica de los microorganismos que participan en el ciclo del azufre no es abundante.

Los géneros *Thiobacillus*, *Beggiotoa*, *Thiothrix* y *Desulfovibrio* (Pérez, 2007; Brombacher *et al.*, 1988; Douglas & Castenholz, 1981; Schmidt *et al.*, 1987; Williams & Unz, 1985; Okabe *et al.*, 2005, y Mancini *et al.*, 2011) han sido los más estudiados, para su aislamiento e identificación se han empleado medios con sales minerales y suplementos vitamínicos que promueven el crecimiento de un solo género o especie. Por lo que se decidió tomar esta información y modificar el medio de cultivo para ampliar el espectro de aislamiento de estos microorganismos. La modificación consistió en incrementar la concentración de todas las sales.

La morfología colonial es un criterio fenotípico que ayuda a clasificar a los microorganismos, además de que permite su agrupamiento y selección para análisis posteriores. Las morfologías observadas en las colonias cultivadas de las muestras del humedal artificial en Tetipac, no coinciden con lo reportado anteriormente (Williams & Unz, 1985). El género *Thiobacillus* se caracteriza por la formación de colonias incoloras (Taylor & Hoar, 1969), y en las colonias obtenidas se observaron colonias con pigmentación rosa, amarilla y blanca. Es probable que debido a la alta plasticidad fenotípica que pueden presentar las bacterias no se puede adjudicar una sola morfología para la descripción de los géneros debido a las variaciones en su pigmentación, las cuales pueden representar una respuesta a la variación de las condiciones ambientales, pues los carotenoides además de servir de pigmentos accesorios fotosintéticos, actúan como fotoprotectores contra el efecto de la radiación ultravioleta (UV), además de ayudar en la eliminación de radicales libres y proteger a la célula de especies reactivas de oxígeno (Mueller *et al.*, 2005). Al determinar el potencial metabólico se obtuvo una caracterización más precisa y cercana a lo observado en trabajos anteriores.

Para analizar el potencial metabólico se usaron sustratos con características de ácidos orgánicos, alcoholes y compuestos reducidos de azufre, que han sido utilizados en la identificación de las bacterias que participan en el ciclo del azufre. A partir de los perfiles metabólicos observados en los géneros *Beggiatoa*, el acetato es el compuesto de carbono más ampliamente referenciado para su crecimiento (Brock & Schulz-Vogt, 2001; Schmidt *et al.*, 1987). Se ha reportado que los alcoholes son utilizados como fuente de energía para este género (Nelson & Castenholz, 1981; Douglas & Castenholz, 1981; Kelly *et al.*, 2000). Por este motivo, se utilizaron como sustrato el acetato, el metanol y el etanol; en los que la mayoría de los aislados tuvieron una buena producción de biomasa. El perfil metabólico de *Thiobacillus* ha sido bien caracterizado y se desarrolla en compuestos reducidos como sulfuro de hidrógeno, azufre, sulfito y tiosulfato (Moreira & Mils, 1997; Taylor & Hoar, 1969), además, se decidió tomar como sustratos a aspartato, citrato y malato (Katayama *et al.*, 1984), compuestos orgánicos importantes en el ciclo de los ácidos tricarbónicos; sustratos utilizados en este estudio. Para el caso de *Thiothrix* se ha sido descrito su crecimiento en compuestos como acetato, piruvato y, un crecimiento nulo en alcoholes (Rossetti *et al.*, 2003; Chernousova *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayor parte de los

aislados seleccionados de estos grupos microbianos mostraron propiedades metabólicas diferentes previamente descritas, ya que algunos aislados fueron capaces de crecer en todos los sustratos. Esto habla de una versatilidad metabólica, que refiere mixotrofia y heterotrofia por haber crecido sobre aspartato, citrato y malato, de los microorganismos aislados del humedal (Katayama *et al.*, 1984; Schmidt *et al.*, 1987). Así también hubo aislados que no crecieron en ningún tipo de sustrato, posiblemente por estar sometidos a condiciones de estrés natural, hambre, incubación fuera del rango de temperatura de crecimiento, concentraciones elevadas de osmóticos y de oxígeno, llevándolas a un posible estado de “viable pero no cultivable”; las condiciones señaladas además pueden ser letales si las células no entran en estado de inactividad durante su desarrollo (Oliver, 2005).

Se logró identificar perfiles metabólicos similares a los observados para *Thiobacillus* (6 aislados), *Beggiotoa* (1 aislado), y *Thiothrix* (5 aislados). Las características observadas en las pruebas bioquímicas indican la versatilidad y capacidad metabólica de los organismos presentes en “biofilm”, agua y raíces del humedal de flujo subsuperficial.

La amplificación del gen de ARNr 16S y su secuenciación ha sido utilizado para determinar la posición filogenética de las bacterias (Rodicio & Mendoza, 2004). El análisis de las secuencias obtenidas de los aislados seleccionados permitió identificar géneros distintos a los que generalmente han sido identificados en la recirculación del azufre (Friedrich *et al.*, 2001). La identificación de las secuencias del gen de ARNr 16S de las bacterias asociadas al agua residual tratada en el humedal, se relacionaron con microorganismos que habitan en ecosistemas similares a nuestro sitio de trabajo, las bacterias identificadas realizan funciones ecológicas parecidas a las que otros autores han identificado. Cabe destacar que el aislado de agua residual M5a-47 tuvo un 92% de identidad con la especie *Achromobacter xylosoxidans* (JQ740156.1), aislada de plantas de un humedal artificial con la capacidad de utilizar compuestos aromáticos como única fuente de carbono y que otorga un aumento en la capacidad de tolerancia a altas concentraciones de compuestos fitotóxicos (Ho *et al.*, 2012). El humedal de flujo subsuperficial de dónde se colectaron las muestras recibe aguas residuales de tipo doméstico mezcladas con aguas de origen industrial, producto de la elaboración de

muebles de madera que requieren en su manufactura, disolventes orgánicos y pigmentos cuya estructura química implica la presencia de compuestos aromáticos. El aislado M5a-47 de agua residual, mostró la capacidad de metabolizar todos los sustratos seleccionados excepto etanol. Para corroborar dicha identidad, se realizó la “prueba de la catalasa”, la cual resultó positiva para este aislado. La prueba mencionada permite evidenciar la actividad de la enzima catalasa (Iversen *et al.*, 2008), que es una de las pruebas bioquímicas utilizadas para describir bacterias pertenecientes a este género (Farajzadeh & Reza, 2012). Así también, el aislado J1a-86 del mismo origen tuvo un 89% de relación con la bacteria incultivable del género *Pseudomonas* (Uncultured *Pseudomonas* sp. EU560961.1), presente en una comunidad bacteriana asociada con suelos contaminados con “Atrazina”, un compuesto agroquímico que elimina plantas de hoja ancha que invaden el maíz el sorgo y la caña, y debido a su uso en exceso ha contaminado el suelo y agua (Udiković-Kolic *et al.*, 2010). Por otro lado, el aislado S4a-103 presentó un 83% de similitud con microorganismos incultivables (FJ424270.1), presentes en un biorreactor sulfidogénico para el tratamiento de aguas residuales con cambios en la alcalinidad del efluente. Este biorreactor tiene un 40% de remoción de sulfatos cuando la alcalinidad tuvo un valor de cero, momento en el que se observó la presencia de bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Dysgomonas*, *Sporobacter*, *Quinella* y *Citrobacter*; y con el aumento de la alcalinidad se presentó un incremento en la densidad y composición de la comunidad de bacterias asociadas a los géneros *Dysgomonas*, *Raoultella*, *Kluyvera* y *Phascolarctobacterium* (Zhao *et al.*, 2010).

Con respecto a las bacterias asociadas a la rizósfera de la vegetación del humedal, el aislado M1r-50 tuvo 100% de similitud con la especie *Enterobacter cloacae* (JX2959879) aislada de suelo contaminado con petróleo en Eslovaquia; la cual, fue seleccionada por su capacidad para degradar hidrocarburos y ha sido utilizada para descontaminar sitios con impacto ambiental (Bučková *et al.*, 2013). Por otro lado, el aislado M3r-57 tuvo 84% de similitud con una cepa ambiental del género *Stenotrophomonas* (*Stenotrophomonas* sp. ft1JQ717287.1) aislada de un tanque de aireación en una planta de tratamiento de agua residual en el que se estudia la capacidad de degradación de paracetamol (Zhang *et al.*, 2013). El aislado J1r-90 tiene 99% de similitud con una bacteria incultivable tomada de un humedal artificial de flujo horizontal en Francia (Uncultured bacterium KC432152.1). El

aislado J4r-97 tuvo 93% de similitud con una cepa ambiental del género *Ralstonia*, que fue aislada de una piscina nuclear en España (*Ralstonia* sp. str. C1, AY479983.1) en la que se observó la formación de “biopelículas” y se ha considerado el uso de estas bacterias en procesos de biorremediación de agua radiactiva (Sarro *et al.*, 2005). El aislado S4r-117 tuvo un porcentaje de similitud de 76% con la cepa *Pseudomonas* sp. a186 (EU434377) aislada de una planta de tratamiento de agua con descargas de antibióticos, donde se hizo una comparación entre el afluente y efluente de la planta, identificando una gran variedad de bacterias con una elevada resistencia a antibióticos (Li *et al.*, 2008). Cabe destacar que los aislados S4r-117 y M3r-57 indican la presencia de compuestos de origen farmacéutico y que no se han considerado en la evaluación de la calidad del agua del presente estudio, sin embargo, por el porcentaje de similitud alcanzado se recomienda su análisis. el aislado s5r-123 tuvo 99% de similitud con bacterias del genero *Raoultella* (*R.* sp. BM15-1-1; FJ577962.1), aislada de suelo contaminado por DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), permitiendo la identificación de diversos microorganismos con la capacidad de degradar dicho compuesto. La presencia de DDT en el agua residual que recibe el humedal, proviene principalmente de los procesos para el control de plagas en la madera almacenada en los patios de las casa de los artesanos. La presencia de éste compuesto modifica de las comunidades microbianas presentes en estos sistemas de tratamiento.

Por otro lado, dos aislados procedentes de diferentes componentes del humedal se relacionaron con una misma especie bacteriana. El aislado M4r-63 presente en la rizósfera y el aislado Mab-82 presente en el “biofilm” tuvieron 99% de similitud con *Dyella soli* (NR_044539.1) (Weon *et al.*, 2009). Esta bacteria fue aislada de una muestra de suelo forestal en Jeju (Corea del sur) identificada como nueva especie por un análisis polifásico con sus cualidades metabólicas y la secuenciación del gen de ARNr 16S (Jung *et al.*, 2009; Weon *et al.*, 2009). Tetipac Guerrero se caracteriza por su vocación en el aprovechamiento forestal debido a las comunidades presentes de Pino-Encino

De las muestras de “biofilm”, el aislado M3b-75 tuvo 96% de similitud con una cepa del género *Stenotrophomonas*. La cepa ambiental *Stenotrophomonas* sp. JRL-2 (AF181569.1) fue aislada de una biopelícula caracterizada por sus capacidades de degradación de

“diclofop-metil” (funciona como herbicida), generando diversos metabolitos que son intermediarios o sustratos para bacterias que degradan una variedad de compuestos aromáticos clorados (Laramée *et al.*, 2000). En Tetipac, se realizan diversas actividades como son producción de muebles, caña de azúcar, maíz y avena, así como la cría de ganado, por lo que usan productos como DDT y herbicidas “mata hierba, para controlar la maleza y plagas de insectos y roedores. Compuestos que se incorporan a las aguas residuales tratadas en el humedal.

El aislado S5b-144 registró 99% de similitud con la bacteria *Sphingobacteriales bacteria PA21* (JN819569.1), aislada de un suelo ácido de un bosque templado en Francia, y tiene la capacidad de intemperizar a la “apatita” para la obtención de nutrientes (Lepleux *et al.*, 2012), dicho aislado, mostró la capacidad de metabolizar todos los sustratos al que fue sometido. El aislado S2b-131 fue similar en un 98% a una cepa ambiental presente en aerosoles biológicos formados durante y después de la lluvia (*Bacteria 41-L049642-122-014-A06*) (Huffman *et al.*, 2013). El tipo de clima que presenta el municipio de Tetipac es cálido-subhúmedo, se caracteriza por ser el más húmedo, con tendencia al clima semicálido y con temperaturas anuales que oscilan entre los 18°C y 22°C, ambos factores promueven la formación recurrente de aerosoles biológicos, aunado al microclima que se forma producto de la densidad de la vegetación presente en el humedal. Las lluvias comienzan en mayo y terminan en septiembre arrojando un promedio de precipitación media anual de 1,200 milímetros.

Las mayores UFC se presentaron en la rizósfera, hubo más variedad fenotípica y metabólica y el mayor número de aislados identificados fueron de la rizosfera. Por lo que se puede decir, que la relación rizosfera-biota asociada es muy importante y promueve una riqueza y diversidad especies de microorganismos que hacen funcional el humedal artificial de flujo subsuperficial (Faulwetter *et al.*, 2009).

Las bacterias presentes en el humedal tienen diversas capacidades metabólicas, pudiendo intervenir no sólo en el ciclo del azufre, sino también en la degradación hidrocarburos, pesticidas, herbicidas, compuestos aromáticos y contaminantes emergentes persistentes.

Por lo que se presume que los géneros *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Dyella*, *Citrobacter*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* y *Sphingobacteria*, participan en la degradación de los compuestos de azufre. La elevada plasticidad que mostraron los géneros mencionados a través de las pruebas bioquímicas muestran que están involucrados en la oxidación de dichos compuestos, generando formas asimilables que les permite incorporarse en forma de aminoácidos, péptidos y enzimas o bien, participar como aceptores o donadores de electrones (Madigan *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 2001).

10. Conclusiones

El medio de cultivo de sales minerales al ser modificado a partir de la concentración de sales minerales, permitió el crecimiento de 43 colonias bacterianas con diversas morfologías y pigmentación.

La diversidad fenotípica se vio reflejada en los diferentes perfiles metabólicos, al observar que 17 aislados mostraron la capacidad de metabolizar todos los sustratos seleccionados; 4 aislados no metabolizaron ninguno de los sustratos, 5 aislados fueron incapaces de utilizar un sustrato (tiosulfato, metanol, malato y azufre) y 4 aislados metabolizaron solo un sustrato, piruvato.

El análisis de las bacterias que participan en el ciclo del azufre en los componentes del humedal artificial de flujo subsuperficial en Tetipac, estado de Guerrero, arrojó la identificación de los géneros *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomona* y *Dyella*, durante el mes de mayo, *Citrobacter*, *Ralstonia* y *Pseudomonas*, en junio y septiembre a los géneros *Pseudomonas*, *Raoultella* y *Sphingobacteria*; esta diversidad de géneros participa en la transformación de compuestos asociados con azufre y que por su gran versatilidad metabólica.

La variación fenotípica, metabólica y genética de las bacterias que participan en el ciclo del azufre es un reflejo de las condiciones espaciales y temporales (clima, calidad y origen del agua residual tratada) en el humedal de flujo subsuperficial en Tetpiac.

11.Perspectivas

El desarrollo de este trabajo permitirá ampliar el conocimiento acerca de la ecología de las poblaciones bacterianas que se pueden encontrar en un humedal artificial, con lo que se podría hacer más eficientes los procesos de biotransformación de los compuestos asociados con el azufre.

Al identificar los diferentes microorganismos que metabolizan compuestos sulfurados, sería importante determinar las vías metabólicas que utilizan para llevar a cabo los procesos de transformación, ya que se podrían identificar vías alternativas que harían más eficiente su eliminación de las aguas residuales o en otro tipo de componentes ecosistémicos contaminados.

Debido a que diversos microorganismos pueden estar realizando la misma función ecológica es importante hacer un estudio genético más detallado, asociado a genes funcionales involucrados en los procesos de transformación de los compuestos asociados al azufre, con lo que se podrá saber si esta versatilidad está asociada a procesos de flujo genético, como la transferencia horizontal genética, propiciando su adaptación a condiciones ambientales adversas (temperatura y compuestos presentes en agua residual).

Este tipo de análisis puede ser aplicado en el estudio de la diversidad microbiana involucrada en los demás ciclos biogeoquímicos de este sistema de tratamiento, como lo son el ciclo del carbono, nitrógeno y fósforo; con lo cual se puede tener una perspectiva global de los procesos de remoción y transformación de los compuestos contaminantes presentes en las aguas residuales de este Municipio.

12. REFERENCIAS

1. Arellano P.B.E., González M.J.O., Gutiérrez R.A.L, Martínez F.M.G., romero D.G. A. y Saucedo C.J., (2005), **Manual de prácticas para el laboratorio de microbiología general**, México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, 111.
2. Arias-Triguero O., (2004). **Estudio de la biodegradación de la materia orgánica en humedales construidos de flujo subsuperficial**. Tesina de licenciatura. España: Universidad Politécnica de Cataluña.
3. Baldwin D.S. and Fraser M., (2009). **Rehabilitation options for inland waterways impacted by sulfidic sediments e a synthesis**. Journal of Environmental Management, 91(2), 311-319.
4. Baldwin D.S. and Mitchell A., (2012), **Impact of sulfate pollution on anaerobic biogeochemical cycles in wetland sediment**, Water research, 46, 965 - 974.
5. Brock J. and Schulz-Vogt N.H., (2011), **Sulfide induces phosphate release from polyphosphate in cultures of a marine *Beggiatoa* strain**, International Society for Microbial, (5), 497–506.
6. Brombacher C., Bachofen R. and Brandl H., (1998), **Development of a laboratory-scale leaching plant for metal extraction from fly ash by *Thiobacillus* strains**, Applied and Environmental Microbiology., 64 (4), 1237–1241.
7. Bučková M, Puškarová A, Chovanová K.L., Kraková, Ferianc P,D Pangallo, (2013), **A simple strategy for investigating the diversity and hydrocarbon degradation abilities of cultivable bacteria from contaminated soil**, World Journal Microbiology Biotechnology., 29 (6),1085-1098.
8. Chernousova E. , Gridneva E M., Dubinina G., Akimov V., Rossetti S. and Kuever J., (2009),***Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., Gammaproteobacteria isolated from sulfide springs**, International Journal of Systematic Bacteriology, 59 (12),3128-3135.

9. CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. (2012). **Atlas del agua en México**. México.
10. Crueger W., Crueger A. and Liras P.A., (1993), **Biología: Manual de Microbiología Industrial**, Acribia, 415.
11. SEMARNAT, **NOM-002-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal**, DOF: 23 04 2003.
12. Douglas C. N. and Castenholz, R. W., (1981), **Organic Nutrition of *Beggiatoa sp.***, Journal of Bacteriology, 147 (1), 236-247.
13. Dvorak D.H., Hedin R.S., Edenborn H.M. and McIntire P.E., (1992), **Treatment of metal contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors**, Biotechnology, 40, 609-616.
14. EPA (Environmental Protection Agency), (2000), **Design manual constructed wetlands and aquatic plant systems for municipal wastewater treatment**, U.S. Environmental Protection. Florida.
15. Farajzadeh Z. and Reza K.H., (2012), **Isolation and characterization of a new *Achromobacter sp.* strain CAR1389 as a carbazole-degrading bacterium**, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(10), 3075-3080.
16. Faulwetter L.J., Gagnon V., Sundberg C., Florent B., Mark D. B., Jacques C. Anne K. and Steina O. R., (2009), **Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review**, Ecological Engineering, (35), 987–1004.
17. Friedrich G.C., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A. and Fischer J., 2001, **Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?**, Applied Environmental Microbiology, 67(7), 2873-2882.
18. García S.J. y Corzo H.A., **Guía práctica de diseño, construcción y explotación de sistemas de humedales de flujo subsuperficial**, (recuperado de:

http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/49025877.html), 22 de diciembre del 2011, 02:35 pm.

19. Gilmour C.C., Henry E.A. and Mitchell R., (1992), **Sulfate stimulation of mercury methylation in fresh-water sediments**, Environmental Science and Technology, 26 (11), 2281-2287.
20. Hassan A.A., Akineden Ö., Kress C., Estuningsih S., Schneider E. and Usleber E., (2006), **Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method**, International Journal of Food Microbiology, 10., 1016.
21. Ho Y.N., Mathew D.C., Hsiao S.C., Shih C.H., Chien M.F., Chiang H.M. and Huang C.C., (2012), **Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants**, Journal of Hazardous Materials, (219), 43–49.
22. Huffman J.A., Pöhlker C., Prenni A.J., DeMott P.J., Mason R.H., Robinson N.H., Fröhlich-Nowoisky J., Tobo Y., Després V.R., Garcia E., Gochis D.J., Harris E., Müller-Germann I., Ruzene C., Schmer B., Sinha B., Day D.A., Andreae M.O., Jimenez J.L., Gallagher M., Kreidenweis S.M., Bertram A.K. and Pöschl U., (2013), **High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain**, Atmospheric Chemistry and Physics, (13), 1767-1793.
23. Iversen C, Mullane N., McCardell B. , Tall D.T., Lehner A., Fanning S., Stephan R. and Joosten H., (2008), ***Cronobacter gen. nov.*, a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii gen. nov.*, comb. Nov., *Cronobacter malonaticus sp. Nov.*, *Cronobacter turicensis sp. Nov.*, *Cronobacter muytjensii sp. Nov.*, *Cronobacter dublinensis sp. Nov.*, *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis subsp. Nov.*, *Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis subsp. Nov.* and *Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi subsp. nov.***, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (58), 1442–1447.

24. Jung H.M., Leonid N.D. , Kyoung-Ho K., Shan D.A., Wan-Taek I. and Sung T.L. , (2009), ***Dyella ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea**, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (59), 460–465.
25. Katayama F. Y., Kawashima I., Tsuzaki N. and Kuraishi H., (1984), **Physiological characteristics of the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* species *Thiobacillus delicatus* nom. Rev., emend., *Thiobacillus perometabolis*, and *Thiobacillus intermedius***, International Journal of Systematic Bacteriology, 34(2), 139-144.
26. Kelly P.D., McDonaldan R. and Wood A.P., (2000), **Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the a-subclass of the Proteobacteria**, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 1797–1802.
27. Kojima H. and Fukui M., (2011), ***Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake**, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (61), 1651–1655.
28. Kumar R.S., Rajani B., Kumar C.R.U., Shaik M., Vanaja M. and Devi M.U., (2011) **Isolation of photosynthetic sulfur bacteria from the soil samples of elevated CO₂ chambers**, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3 (3), 86-88.
29. Kumar T., Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S., (2011), **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**, Molecular Biology and Evolution, (28), 2731-2739.
30. Laramée L, Lawrence J.R. and Greer C.W., (2000), **Molecular analysis and development of 16S rRNA oligonucleotide probes to characterize a diclofop-methyl-degrading biofilm consortium**, Canadian Journal of Microbiology, 46(2),133-42.

31. Lens P.N.L. and Kuenen J.G., (2001) **The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology**, Water Science and Technology, 44(8), 57–66.
32. Lepleux C., Turpault M. and Uroz S., (2012), **Correlation of the abundance of Betaproteobacteria on mineral surfaces with mineral weathering in forest soils**, Applied Environmental Microbiology, 197(78), 114-7119.
33. Lesley A., Robertson, L.A. and Kuenen J.G., (1992), **The colorless sulfur bacteria**. In: The Prokaryotes. 2nd Ed. Springer-Verlag, 6(1), 385-412.
34. Li D., Yang M., Hu J., Zhang J., Liu R., Gu X., Zhang Y. and Wang Z., (2008), **Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river**, Environmental Microbiology, 11(6), 1506-1517.
35. Machemer S.D. and Widelman T.R., (1992), **Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal process from acid mine drainage in a constructed wetland**, Journal of Contaminant Hydrology, 9, 115-131.
36. Madigan M.T. Martinko J. M and Parker J., (2007), **Brock Biología de los microorganismos**. Editorial Prentice Hall, Inc. Decima Edicion, España, 1008.
37. Mannion A.M., Bowley S.R. and Chichester, J.W., (1992), **Acidification and Eutrophication**, In: *Environmental*, 177-197.
38. Manz W, Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.H., (1992), **Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions**, Systematic Applied Microbiology, 1, 593-600.
39. McEldowney S., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.H. (1993), **Pollution: ecology and biotreatment**, Logman Science. & Technology, 193-230.
40. Mitsch J.W. and Gosselink G.J. (2000), **Wetlands**, 3rd edition, ISBN: 047129232 X.

41. Moreira D. And Mils R., (1997), **Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic Thiobacilli: proposal for *Thiomonas gen. nov.***, International Journal of Systematic Bacteriology, 47(2), 522-528.
42. Mueller D.R., Vincent W.F., Bonilla S. and Laurion I. (2005). **Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem**, FEMS Microbiology Ecology, 53, 73-87.
43. Muyzer G., De Waal E. and Uittierlinden A.G., (1993), **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA**, Applied Environmental Microbiology, 59, 695–700.
44. Nelson D C. and Castenholz R W, (1981), **Organic nutrition of *Beggiatoa sp.*** Journal of Bacteriology, 147(1): 236–247
45. Nogales B., (2005), **La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg**, Ecosistemas 14(2): 41-51.
46. Okabe S., Ito T. and Satoh H., (2005) **Succession of internal sulfur cycles and sulfur oxidizing bacterial communities in microaerophilic wastewater biofilms**, Applied Environmental Microbiology, 71(5), 2520-2529.
47. Oliver D.J., (2005), **The viable but nonculturable state in bacteria**, The Journal of Microbiology, 43(S), 93-100.
48. Pérez I.M.B., (2007), **Aislamiento y caracterización de microorganismos obtenidos de reactores sulfoxidantes**, (Tesis que para obtener el grado de doctor en Ciencias Biológicas, México D.D. Universidad Autónoma de México).
49. Rodicio M. del R. y Mendoza M. del C., (2004), **Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica**, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4):238-45.

50. Rossetti S., Blackall L., Levantesi C. , Uccelletti D. and Tandoi V., (2003), **Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge**, International Journal of Systematic Bacteriology, 53(5), 1271-1276.
51. Saitou N. and Nei M., (1987), **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**, Molecular Biology Evolution, 4(4):406-425.
52. Sarró M.I., García A.M., Moreno D.A., 2005, **Biofilm formation in spent nuclear fuel pools and bioremediation of radioactive water**, International Microbiology, 8(3), 223-30.
53. Schmidt M. T., Arieli T. B. , Cohen Y., Padan E. and Strohl R.W., (1987), **Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba***, Journal of Bacteriology, 169(12), 5466-5472.
54. Sorokin D.Y., Kuenen J.G. and Muyzer G., (2011), **The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes**, Frontiers in Microbiology, 2, 44-56.
55. Sievert M.S., Kiene R.P. and Schulz-Vogt H.N., (2007), **The Sulfur Cycle**, A quarterly Journal of The Oceanography Society, 20 (2), 117-123
56. Mancicni S., Abicht K.H and Solioz M., (2011), **Genome sequence of *Desulfovibrio sp. a2*, a highly copper resistant, sulfate-reducing bacterium isolated from effluents of a zinc smelter at the urals**, American Society for Microbiology, 193(23), 6793-6794..
57. Taylor F.B. and Hoare S.D., (1969), **New facultative *Thiobacillus* and a reevaluation of the heterotrophic potential of *Thiobacillus novellus***, Journal Of Bactriology, 100(1), 487-497.
58. Trinidad G.E., (2006), **Cuantificación de bacterias nitrificantes, denitrificantes, fijadoras de nitrógeno heterótrofas de humedales artificiales sub-superficiales para el tratamiento de agua residual**, Universidad de pamplona. Facultad de Ciencias Básicas, microbiología con énfasis en alimentos, Pamplona.

59. Udiković-Kolic N., Hršak D., Devers M., Klepac-Ceraj V., Petrić I. and Martin-Laurent F., (2010), **Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil**, , 109(1),355-367.
60. UNESCO (2006), **Water: a shared responsibility**, The United Nations World Water Development Report 2, ISBN UNESCO: 92-3-104006-5.
61. Velasco T.J.A., (2001), **Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación biológica de tiosulfato en azufre elemental**, Tesis que para obtener el grado de maestro en ingeniería química, México D.F., Universidad Autónoma Metropolitana.
62. Weber K.P. and Legge L.R., (2011), **Dynamics in the bacterial community-level physiological profiles and hydrological characteristics of constructed wetland mesocosms during start-up**, Ecological Engineering, 37, 666–677.
63. Weon H.Y., Anandham R., Kim B.Y., Hong S.B., Jeon Y.A. and Kwon S.W., (2009), ***Dyella soli* sp. nov. and *Dyella terrae* sp. nov., isolated from soil**, International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology., 59(7), 1685-1690.
64. Williams T.M. and Unz R., (1985), **Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa***, American Society for Microbiology, 49(4), 887-898.
65. Zhang L., Hu J., Zhu R., Zhou Q., Chen J., (2013), **Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium**. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(8), 3687-3698.
66. Zhanga C.B., Wang J., Liua W.L., Zhuh S.X., Geb H.L., Scott X.C., Chang J. and Ying G., (2010), **Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland**, Ecological Engineering, (36), 62–68.

67. Zhao Y.G., Li X.W., Wang J.C., Jie B., Tian W.J., (2010), **Performance of a sulfidogenic bioreactor and bacterial community shifts under different alkalinity levels**, *Bioresource Technology*, 101(23), 9190–9196.