



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN UN HUMEDAL
ARTIFICIAL LOCALIZADO EN EL VALLE DEL
MEZQUITAL, ESTADO DE HIDALGO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
FERNANDO GABRIEL SANTANA VERGARA



**FES
ZARAGOZA**

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2014



**UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
*ZARAGOZA***

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN UN HUMEDAL
ARTIFICIAL LOCALIZADO EN EL VALLE DEL
MEZQUITAL, ESTADO DE HIDALGO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
FERNANDO GABRIEL SANTANA VERGARA

M. en C. Eliseo Cantellano de Rosas

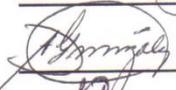
Director de tesis

Mtra. Dora Alicia Pérez González

Asesor de tesis

PRESIDENTE I.B.Q. SUSANA MÉNDEZ VÁZQUEZ
VOCAL M. en C. ELISEO CANTELLANO DE ROSAS
SECRETARIO MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ
SUPLENTE Q.F.B. LILIA TEQUIANES BRAVO
SUPLENTE Q.F.B. SANDRA ORTEGA MUNGUÍA







El título de la tesis que se presenta es: **Aislamiento y caracterización de microorganismos en un humedal artificial localizado en el Valle del Mezquital, Estado de Hidalgo.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a ~~19 de Mayo~~ 19 de Mayo de 2014.


DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.


DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

DEDICATORIA

Este escrito esta dedicado con mucho amor y agradecimiento a mis padres, por ser las personas que me han guiado y apoyado siempre. Gracias:

Prof. María C. Vergara Herrera

C.D. Fernando B. Santana Campos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a **Dios** por darme la fuerza para seguir adelante y no caer en los momentos de dificultad.

A mis hermanas: **Liliana Angélica Santana Vergara**

Ana Lilia Santana Vergara

Por que de alguna u otra manera contribuyeron con mi formación profesional.

A mis **amigos** por estar en los buenos y malos momentos.

A la profesora **Dora A. Pérez González** por estos años de experiencia y conocimientos que me ha compartido, de igual manera al profesor **Eliseo Cantellano de Rosas**, por haber confiado en mí para desarrollar este proyecto, sus aportaciones y la paciencia para adentrarme en este nuevo tema.

Y por último pero no menos importante a las profesoras **Sandra Ortega Munguía**, **Susana Méndez Vázquez**, **Lilia Tequianes Bravo** y **Fabiola Martínez Rodríguez**, ya que gracias a su conocimiento, experiencia y tiempo este trabajo fue grandemente enriquecido. Y por su puesto a mi segundo hogar la **U.N.A.M**, en la cual me formé profesionalmente.

A todas y cada una de las personas que han estado con migo:

GRACIAS

Si de todos los organismos creados por Dios, los más pequeños y aparentemente menos útiles fueran suprimidos, la vida se tornaría imposible, ya que el regreso a la atmósfera y al reino mineral de todo lo que dejó de vivir sería bruscamente suprimido.

Louis Pasteur

Contenido

RESUMEN	
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Aguas residuales	3
1.2 Componentes contaminantes de aguas residuales	7
1.3 Agentes patógenos que habitan aguas residuales	13
1.4 Humedales	22
1.5 Ecología del suelo	28
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
III. OBJETIVOS.....	36
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	36
V. MATERIALES Y MÉTODO	37
V.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
V.2 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	37
V.3 MATERIAL Y EQUIPO	38
V.4 MÉTODO	39
V.5. DIAGRAMA DE FLUJO	41
VI. RESULTADOS	42
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	64
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
ANEXOS.....	70
REFERENCIAS	75

RESUMEN

El agua es un recurso vital para el desarrollo de las actividades humanas y para mantener los procesos ecológicos de la biodiversidad. Para los humanos que son los generadores de la contaminación, existen graves riesgos a la salud, pues la gran mayoría de las enfermedades tiene su origen en el agua contaminada asociada a la proliferación de microorganismos patógenos, sin embargo también muchos esos microorganismos pueden servir para degradar compuestos tóxicos o bien biorremediar algún daño ecológico. Un humedal es una zona inundada y saturada, bien sea por aguas subterráneas o superficiales y con una frecuencia, duración y profundidad suficientes para mantener especies de plantas predominantemente adaptadas a crecer en suelos saturados.

En el presente estudio se investigaron los géneros y especies de microorganismos que colonizan un humedal artificial ubicado en el Valle del Mezquital del Estado de Hidalgo. Las muestras recolectadas fueron tomadas a largo de 4 meses de muestreo y sometidas a procesos de enriquecimiento, aislamiento y conservación de las cepas que de ellas se obtuvieron.

El diagrama de caja y bigote muestra una dispersión muy alta en la composición microbiana lo cual puede atribuirse a la heterogeneidad en el sustrato del humedal. El número total de microorganismos aislados e caracterizados en el humedal durante todos los meses de muestreo fueron: 10 cepas en alcatraz, 10 cepas en papiro estrella y 8 cepas en el sustrato, a este respecto se puede decir que en el sustrato inerte las condiciones para que se desarrollen de manera favorable los microorganismos no son las adecuadas como ocurre con el alcatraz y el papiro, sin embargo como la cantidad de cepas aisladas en cada punto de muestreo no distan mucho, al parecer no existen cambios importantes a nivel de rizosfera y sustrato que nos indiquen que los microorganismos colonicen de manera mayoritaria alguno de los sitios muestreados y analizados

INTRODUCCIÓN

Con el crecimiento de la población mundial la demanda de agua para consumo humano y la contaminación de los recursos hídricos, hace necesaria la aplicación de métodos de tratamiento a las aguas residuales. En México apenas se da tratamiento al 35% de las aguas residuales que se generan, lo que propicia que buena parte del agua contaminada llegue a ríos, lagos, lagunas y zonas costeras. Las alternativas convencionales de tratamiento basadas en lodos activados o procesos de elevada complejidad tecnológica tienen costos muy elevados de diseño, construcción y mantenimiento, en cambio, las comunidades rurales requieren alternativas adecuadas a condiciones económicas, culturales y ecológicas acordes a su contexto, es decir, tiene que ser sustentables en cuanto a factibilidad y rentabilidad económica, aceptación y participación comunitaria⁽¹⁾.

Los contaminantes presentes en el agua residual son una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos y los organismos patógenos que se encuentran comúnmente en las aguas residuales, se clasifican entre bacterias, protozoarios, helmintos y virus. En México se ha adoptado como indicador de contaminación al grupo coliforme, por lo que su presencia está relacionada con descargas de aguas residuales no tratadas, de tipo doméstico y pecuario⁽¹⁾.

Los humedales construidos o artificiales fijan y transforman contaminantes de aguas residuales por medio de procesos como la transformación, asimilación o eliminación de contaminantes; son estables, productivos y resistentes, además de que su construcción, diseño y operación es de bajo costo. El comportamiento de los humedales artificiales y su eficiencia son el resultado de un entramado complejo de procesos físicos, químicos y biológicos, siendo de importancia la actuación e interacciones de las bacterias, hongos, algas, vegetación y fauna⁽²⁾. Destacan las bacterias porque participan en la transformación y eliminación de los contaminantes. Muchos de ellos participan en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, azufre y fósforo, realizando las transformaciones que permiten asimilar los contaminantes por las plantas o bien liberarlos a la atmósfera⁽³⁾.

Por ello para mejorar el funcionamiento de los humedales artificiales, es necesario conocer la cantidad y abundancia de la comunidad microbiana.

En este trabajo se realizó una evaluación para conocer la cantidad y abundancia de la comunidad microbiana de un humedal artificial establecido en el Valle de Mezquital, Estado de Hidalgo. Con ello se obtuvieron más elementos para conocer y mejorar su funcionamiento.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Aguas residuales

Las aguas residuales pueden definirse como aquellas que provienen del sistema de abastecimiento de una población, después de haber sido modificadas por diversos usos en actividades domésticas, industriales o comunitarias. El agua residual es aquella que se ha usado en casas, establos, escuelas, mercados y en otras actividades industriales y comerciales. Las aguas residuales urbanas son aguas que se han canalizado a los núcleos urbanos para uso doméstico (inodoros, fregaderos, lavadoras, lavabos, lavavajillas y baños) y que pueden contener algunos residuos de los arrastres de las aguas de lluvia por una parte y de pequeñas actividades urbanas por otra. Su origen son líquidos procedentes de la actividad humana y se constituye a base de excretas, residuos domésticos, infiltraciones y residuos industriales. Las excretas son las que contienen los residuos sólidos y líquidos que constituyen las heces humanas. Los residuos domésticos son los que proceden de la evacuación de los residuos de cocina (vegetales, detergentes de trastes y partículas), de los lavabos (jabón, detergentes sintéticos y espumantes), y de las actividades en las viviendas (insecticidas, almidones, etc.)⁽¹⁾.

Los arrastres de lluvia son las partículas y fluidos presentes en las superficies expuestas (polvo orgánico o inorgánico, partículas sólidas, restos de animales, tierra de los parques y zonas verdes) y las infiltraciones se llevan a cabo cuando los acuíferos están expuestos a las superficies por las lluvias u otras causas, existe la infiltración y fugas a través de tuberías en mal estado y con conexiones defectuosas⁽¹⁾.

La cantidad de contaminantes adicionados a un cuerpo de agua depende del uso que se le dio, es decir, urbana, agrícola o industrial, siendo las de tipo urbano e industrial las que producen aguas residuales con mayor cantidad de contaminantes ya que más de 60% de la población habita en zonas urbanas. Sin embargo, aún dentro de estos dos grupos existen marcadas diferencias en contenido de compuestos que sus aguas residuales poseen, siendo las más importantes las que se muestran en el Cuadro 1, en la que se pone de manifiesto que el contenido de materia orgánica es alto en ambos casos y también en la cantidad de agua residual producida⁽⁴⁾.

La diferencia más importante entre los dos tipos de agua, radica en la gran cantidad de compuestos de origen industrial que se adiciona al agua de este tipo, lo cual hace más difícil su tratamiento⁽⁴⁾.

TIPO DE AGUA RESIDUAL	CARACTERÍSTICAS
Urbanas	Grandes volúmenes Alto contenido de materia orgánica Patógenos Poca variación en la composición Variación horaria
Industriales	Grandes volúmenes Gran variación en la composición Continuas o periódicas
Agrícolas	Volúmenes dependientes de la precipitación y permeabilidad del suelo Componentes de suelo, fertilizantes y plaguicidas

Cuadro 1. Composición de diversos tipos de agua residual⁽⁵⁾.

Un sistema hidrosanitario urbano inicia en la fuente de abastecimiento de agua donde es captada, si el agua no reúne las condiciones de potabilidad se le da un tratamiento para que cumpla con los parámetros establecidos, posteriormente es utilizada por los usuarios, quienes a su vez le adicionan contaminantes que proceden del uso doméstico, comercios, industrias, establecimientos de servicio y usos municipales⁽⁶⁾.

Agua residual agrícola y de acuicultura

En 1989 la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicó una obra que se refiere al uso directo o indirecto de aguas. Entre otras cosas, las directrices se apoyan en pruebas epidemiológicas disponibles al establecer que si el tratamiento de las aguas residuales es suficiente para que el número probable de los coliformes fecales por cada 100 mL sea menor a 1 000 y los huevos de nemátodo menor a uno por cada litro, dichas aguas se consideran adecuadas para irrigar cosechas de productos comestibles⁽⁴⁾.

Los contaminantes son aquellos compuestos que, en determinadas concentraciones, pueden producir efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente, dañar la infraestructura hidráulica o inhibir los procesos de tratamiento de las aguas residuales⁽⁷⁾.

Los contaminantes básicos son aquellos compuestos y parámetros que se presentan en las descargas de aguas residuales y que pueden ser removidos o estabilizados mediante tratamientos convencionales. En cuanto a los contaminantes patógenos y parásitos se puede decir que son microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, flora y fauna⁽⁸⁾.

Como regla general considerarse un agua contaminada cuando presenta elevadas concentraciones de^(4,7,8):

- a) Desechos orgánicos, ya sean domésticos, industriales, agrícolas o animales los cuales remueven el oxígeno del agua por descomposición.
- b) Agentes infecciosos que pueden transmitir enfermedades.
- c) Nutrientes de plantas como abono orgánico que promueven el crecimiento de masas de algas.
- d) Compuestos orgánicos sintéticos, tales como detergentes y pesticidas, los cuales son tóxicos para la vida acuática.
- e) Sustancias químicas inorgánicas, resultado del agua de lavado de minas, procesos de manufactura industriales, los cuales destruyen la vida acuática, causan excesiva dureza, producen efectos corrosivos y en general aumentan el costo en el tratamiento de aguas.
- f) Sustancias radioactivas, resultado del uso de compuestos para plantas de energía nuclear.
- g) Incremento en la temperatura, como resultado del enfriamiento de reactores en plantas eléctricas o nucleares, que evitan el desarrollo de la vida acuática.

Los contaminantes interactúan física, química y biológicamente en los ecosistemas acuáticos produciendo modificaciones en ambos sentidos y casi siempre con efectos adversos para las comunidades al alterarse la composición específica y los procesos de autodepuración naturales. En el caso particular de algunos contaminantes, como iones metálicos y sales que en determinados niveles son usados como macro y

micronutrientes para el crecimiento de fotoautótrofos, se consideran que su problema es de concentración, ya que en cantidades reducidas tiene efectos bioestimuladores que se traducen en incrementos en la productividad de los ecosistemas. Sin embargo, la gran mayoría de los contaminantes tienen con frecuencia efectos nocivos aún en pequeñas concentraciones, como es el caso de los plaguicidas, hidrocarburos, y compuestos radioactivos⁽⁹⁾.

El problema de contaminación acuática se agudiza cada vez más, ante la demanda creciente de agua para consumo humano. Esta situación, genera un impacto negativo en actividades productivas como son la pesca y la acuicultura. La presencia de los contaminantes vertidos en los efluentes, se pone de manifiesto por la toxicidad hacia comunidades de los organismos, la cual puede ser modificada por las interacciones complejas de los contaminantes del medio. Los vertidos industriales afectan el medio ambiente, ciudades, e incluso las zonas rurales. Dentro del grupo de residuos industriales, los vertidos líquidos juegan un papel fundamental. En la mayoría de las ocasiones los residuos industriales líquidos representan riesgo potencial para el medio ambiente debido a la carga contaminante que llevan. Esta situación se ve agudizada en determinadas industrias, como pueden ser: química, metalúrgica y papeleras. Puesto que las sustancias tóxicas presentes en sus vertidos son difícilmente biodegradables y precisan un tratamiento intenso⁽¹⁾.

Para facilitar la gestión de los distintos vertidos, es conveniente realizar una clasificación de éstos en función de sus propiedades y según su naturaleza y de estas va a depender el sistema de tratamiento que se aplique⁽¹⁾.

1.2 Componentes contaminantes de aguas residuales

El agua residual doméstica está constituida por 99.9% de agua y 0.1 % de sólidos. A su vez estos sólidos pueden clasificarse en orgánicos (70%) e inorgánicos (30%). Los sólidos están constituidos por proteínas, carbohidratos, grasas y aceites. Mientras tanto, los sólidos inorgánicos están compuestos de metales, sales y arenas. La Figura 1 muestra como está compuesta la materia sólida que acompaña al agua residual doméstica⁽¹⁰⁾.

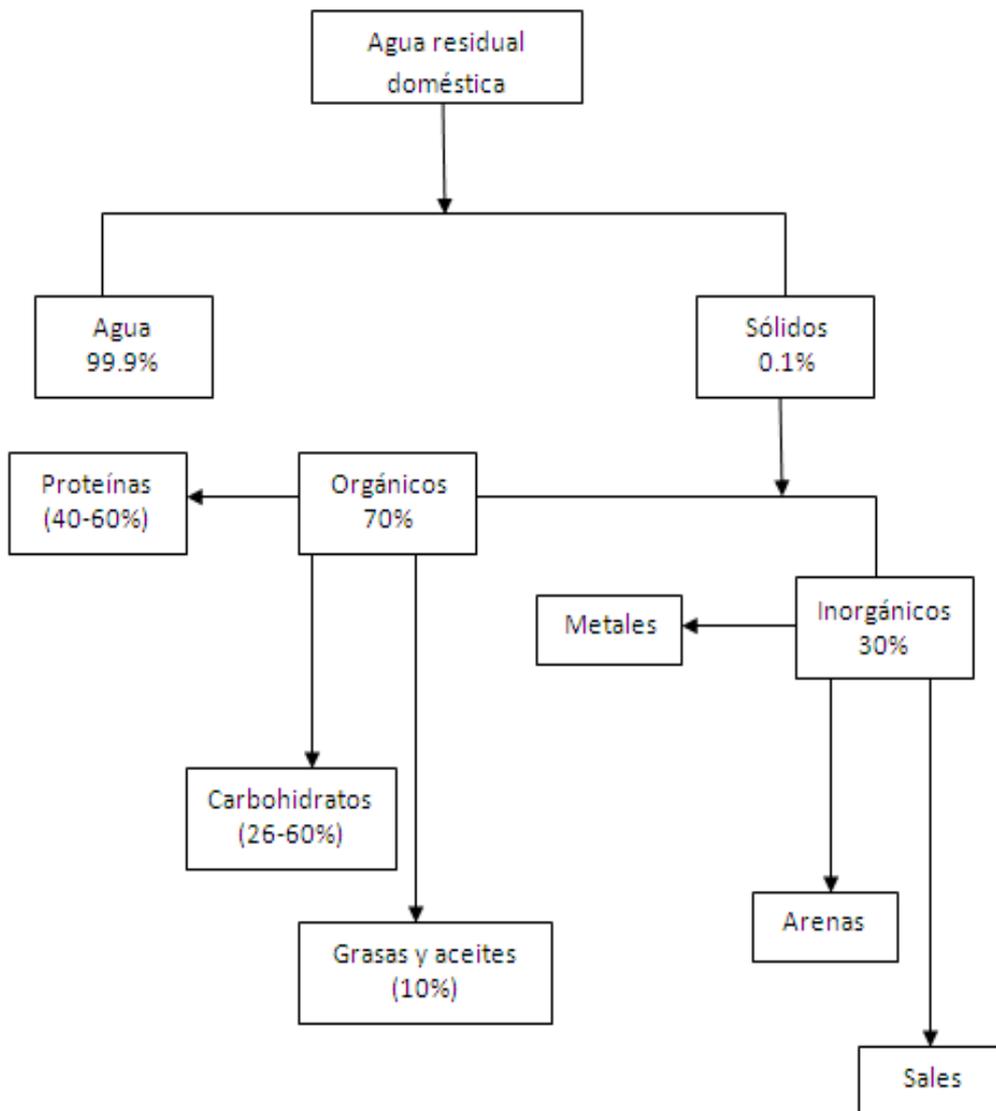


Figura 1. Componentes del agua residual doméstica⁽¹⁰⁾.

Por otro lado, las aguas residuales requieren de tratamiento antes de ser descargadas en el sistema de alcantarillado municipal; las características de esta agua, así como de los procesos de tratamiento varían de una industria a otra, los procesos de tratamiento también son muy variables⁽¹⁰⁾.

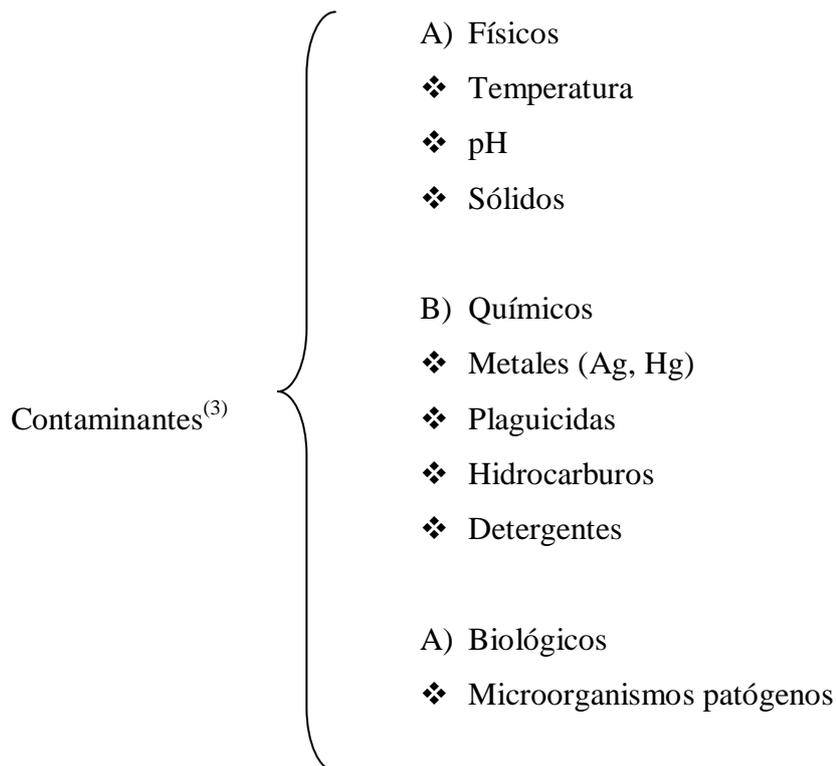
En primer lugar se encuentra una gran cantidad de compuestos orgánicos solubles que pueden disolverse en el agua. La importancia de controlar la presencia de estas sustancias radica en que debido a su naturaleza, son oxidadas por procesos biológicos en presencia de microorganismos. Esta oxidación se traduce en una disminución del oxígeno libre disuelto que puede destruir la fauna acuática si llega a unos límites mínimos. Este tipo de contaminación se determina mediante la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), en función de la cual será necesario adoptar un determinado sistema de tratamiento. Casi todos los vertidos industriales tienen contaminación orgánica, aunque ésta se hace especialmente importante en determinadas industrias que producen grandes cantidades de carbohidratos. Entre estas industrias se pueden destacar las refinerías de azúcar, las conserveras, las lácteas, las papeleras, las destilerías, y las cerveceras⁽⁴⁾.

Otro segundo grupo importante está formado por compuestos inorgánicos tóxicos como arsénico, cianuro, flúor, y particularmente los metales pesados. Todos ellos son altamente tóxicos, tanto para la fauna acuática como para el hombre, y tiene las características de irse acumulando en el organismo hasta alcanzar las concentraciones necesarias para ser letales. Debido a estos es muy importante su control y la aplicación de tratamientos que aseguren su eliminación. Las industrias que producen este tipo de contaminantes, son entre otras aquellas que incluyen procesos de limpieza de metales, niquelado, etc., o las refinerías de bauxita, la industria del cloro, o las industrias de curtidos y encurtidos⁽⁴⁾.

En tercer lugar encontramos la contaminación producida por los nutrientes vegetales, de los que son básicos los compuestos de nitrógeno y fósforo. Estos compuestos son necesarios para el desarrollo de la flora acuática, y por tanto la conveniencia o no de su presencia en el vertido va a depender de cuales sean las aplicaciones o los tratamientos que se vayan hacer. Si su concentración es elevada, tendrá lugar un proceso de eutrofización provocado por el crecimiento de algas, que resulta indeseable⁽⁴⁾.

La calidad física, química y biológica del agua puede modificar la toxicidad de los compuestos. Una forma de lograr esto es afectando el estado fisiológico de los organismos, lo que aumenta o disminuye la sensibilidad a los tóxicos; ejemplo de estos son la temperatura la cual como tal no es una forma de contaminación pero si está relacionada como se explicará más adelante, también la concentración de oxígeno disuelto (OD), aunque otras características del medio son también importantes. La otra forma en que se producen modificaciones es a través de los balances iónicos, siendo ejemplos de tal efecto la acción del pH en el equilibrio del amonio libre y disociado; de estos compuestos el primero es altamente tóxico para los organismos acuáticos en tanto que el segundo es de escasa o nula toxicidad⁽¹¹⁾.

A continuación se presenta de forma sintetizada un diagrama que muestra los contaminantes más usuales en aguas residuales:



A) FÍSICOS

Temperatura

Se ha observado en la trucha café (*Salmo trutta*) que un incremento de 10 °C en la temperatura, produce un aumento del 100% en la captación de contaminantes tales como DDT, PCB, y metil mercurio, tanto a través del agua como de los alimentos⁽¹²⁾.

Existe una relación compleja entre la temperatura y los compuestos tóxicos ya que la temperatura por si misma puede ser un factor letal y sus límites de tolerancia para los organismos se puede alterar por la influencia de los tóxicos, presentándose interacciones entre ambos. Se debe considerar además que la climatización a la temperatura puede afectar las respuestas de los organismos tanto en este factor como en otros actuando de manera conjunta⁽¹³⁾.

pH

Otro grupo de agentes contaminantes de gran importancia es el formado por las sustancias ácidas o alcalinas. Su presencia tiene como consecuencia directa la alteración de pH del medio. Esto es especialmente importante por su incidencia sobre los microorganismos del agua, pues éstos solo pueden desarrollarse y llevar a cabo sus funciones de biodegradación dentro de un intervalo de pH determinado⁽¹⁾.

B) QUÍMICOS

Metales

Muchos tipos de desechos industriales contienen metales pesados en solución, de los cuales se sabe ejercen un efecto adverso para los procesos biológicos en general.

Los metales pesados considerados altamente tóxicos son mercurio, plata y cobre, ya que muestran un efecto muchas veces letal en una semana a concentraciones de 0.0004, 0.02 y 1 mg/L respectivamente, los moderadamente tóxicos son: potasio, manganeso, plomo y cobalto, ya que se requieren concentraciones de 15 a 70 mg/L, para tener un efecto en una semana y finalmente, los no tóxicos son: bario, magnesio, estroncio, calcio y sodio, ya que se requieren concentraciones muy altas para ejercer algún efecto. Por ejemplo la plata es uno de los compuestos más tóxicos para la vida acuática, una concentración de 400 mg/L puede matar al 90% de adultos *Balanus balanoides* en 48 horas.

Concentraciones de AgNO_3 de 10 a 100 g/L causan el desarrollo anormal de huevos de *Paracentrotus* pero ensayos de laboratorio han demostrado que aún concentraciones de 0.25 g/L pueden tener efecto sobre este organismo por otra parte el mercurio puede pasar a cuerpos de agua a partir de afluentes industriales, originándose en fábricas las cuales producen compuestos que contiene mercurio o utiliza el mercurio en el proceso.

Uno de los casos más dramáticos que se han presentado de intoxicación por mercurio en humanos, fue el envenenamiento a gran escala en la Bahía de Minamata en Japón, debido a consumo de peces con alto contenido de mercurio; los efectos que se presentan es la destrucción del cerebro y alteración de la información genética, dando como resultado una generación de personas con retardo mental. Este metal puede ser transformado por actividad bacteriana, generando metil-mercurio, un compuesto muy tóxico y de baja polaridad. Otros metales pesados captados por los organismos en forma iónica, tiene alta afinidad por los grupos sulfhídrico de las proteínas, cambiando la estructura y actividad de las enzimas con subsecuentes efectos tóxicos sobre los individuos⁽¹⁴⁾.

Plaguicidas

El problema de contaminación con plaguicidas se inicia a partir de la segunda guerra mundial, incrementándose en tal forma su producción que a la fecha existen cerca de 90 mil productos, formulaciones y mezclas en el mundo. Con tal volumen de productos en el mercado ha sido extremadamente difícil conocer su impacto biológico sobre cuerpos de aguas. Otro problema que se enfrenta para poder evaluar el impacto biológico, es que la persistencia de los pesticidas en el medio ambiente es variable. Algunos pueden permanecer varios años, en cambio otros sólo tiene una vida media de unas semanas⁽¹²⁾.

Hidrocarburos

La contaminación ambiental por estos compuestos es debida a los esfuerzos del hombre para la obtención del petróleo, lo que ha traído como consecuencia grandes derrames de hidrocarburos sobre la superficie de la tierra y principalmente en el agua. Los efectos de la contaminación por petróleo son variables y poco predecibles ya que dependen de la composición del yacimiento por el cual se han obtenido. Aunque en forma general se puede decir que cuando se presenta un gran derrame de petróleo, los organismos que son primeramente afectados son las aves marinas, las cuales se cubren de petróleo lo que impide que vuelen, al tratar de limpiar su plumaje, el ave ingiere cierta cantidad de petróleo, afectando severamente intestino, tracto respiratorio y riñones, lo que trae como consecuencia la muerte de las aves por debilitamiento⁽¹⁴⁾.

Detergentes

El incremento de estos compuestos en la vida diaria del hombre, ha traído como consecuencia su acumulación en los cuerpos de agua. Los efectos de estos compuestos son principalmente sobre peces a los cuales les separa el epitelio de las branquias, impidiendo el libre intercambio de oxígeno⁽¹⁴⁾.

C) BIOLÓGICOS

Microorganismos patógenos

Para los humanos, existen graves riesgos de salud, casi 80% de las enfermedades se ligan con el agua contaminada, la insalubridad y la falta de higiene pues existe una relación entre la infraestructura de saneamiento disponible al acceso del agua potable y la mortalidad infantil⁽¹⁵⁾.

La gran diversidad de contaminantes que hay en el agua causa serias enfermedades que pueden provocar endemias y epidemias. El agua contaminada por microorganismos produce cólera, ceguera por tracoma, elefantiasis, amibiasis, diarreas y disenterías, fiebre tifoidea, etc. Numerosos microorganismos infecciosos pueden causar enfermedades en los seres humanos, estos agentes incluyen bacterias, hongos, protozoarios, metazoarios (helmintos), rickettsias y virus, siendo los más comunes los que se representan en la Figura 2⁽¹⁵⁾.

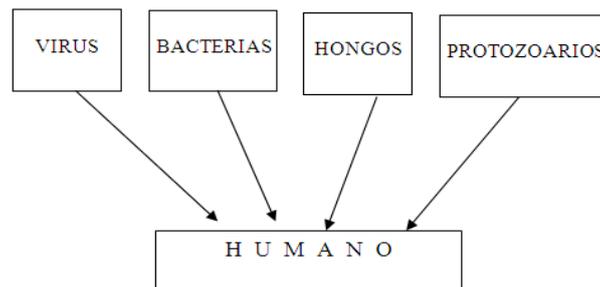


Figura 2. Microorganismos que causan enfermedades al ser humano⁽¹⁵⁾.

La evaluación de los agentes infecciosos se basa en su virulencia o su potencia para causar enfermedades en humanos. La virulencia está relacionada con la dosis de agente infeccioso necesario para infectar al huésped y causar enfermedad, y la potencia para causar la enfermedad y depende de la estabilidad del agente infeccioso en el ambiente. La dosis infecciosa mínima (DIM) varía ampliamente con el tipo de agente infeccioso.

En el Cuadro 2 se muestra las DIM para algunos microorganismos⁽¹⁵⁾.

Microorganismos presentes en agua contaminada para consumo humano	Dosis infecciosa mínima (microorganismos, quistes, huevos o UFC)
<i>Salmonella</i> sp	10 ⁴ -10 ⁷ microorganismos
<i>Shigella</i> sp	10 ¹ -10 ² microorganismos
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁶ -10 ⁸ microorganismos
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<100 microorganismos
<i>Vibrio cholerae</i>	10 ³ microorganismos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cerca de 500 microorganismos
<i>Giardia lamblia</i>	10 ¹ -10 ² quistes
<i>Cryptosporidium</i> sp	10 ¹ quistes
<i>Entamoeba coli</i>	10 ¹ quistes
<i>Ascaris</i> sp.	1-10 huevos
Virus hepatitis A	1-10 UFC

Cuadro 2. Dosis infecciosa mínima para algunos microorganismos causantes de enfermedades en el ser humano⁽¹⁵⁾.

1.3 Agentes patógenos que habitan aguas residuales

Una variedad de microorganismos patógenos se encuentran comúnmente en las aguas residuales domésticas así como en los efluentes en plantas de tratamiento en aguas residuales. Las tres categorías de agentes patógenos que se encuentran en el medio ambiente son⁽¹⁵⁾:

Bacterias patógenas	Virus patógenos	Protozoarios
<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Legionella</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Aeromonas</i>	Estos también son liberados en los ambientes acuáticos, pero son incapaces de multiplicarse fuera de las células anfitrionas. Su dosis infecciosa es generalmente menor que para patógenos bacterianos.	Estos se liberan en los ambientes acuáticos como quistes y ooquistes, que son muy resistentes al estrés ambiental y a la desinfección, a sí mismo no se multiplican fuera de sus hábitats.

Cuadro 3. Agentes patógenos más comunes en el ambiente⁽¹⁵⁾.

Bacterias patógenas

La materia fecal puede contener hasta 10^2 bacterias por gramo, el contenido de bacterias en las heces representa aproximadamente el 9% en peso húmedo⁽¹⁵⁾. Las bacterias en aguas residuales que se han aislado y caracterizado pertenecen a los siguientes grupos⁽¹⁵⁾.

- a. Bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas (Por ejemplo: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Shigella*).
- b. Bacterias Gram negativas, aerobias (Por ejemplo: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*).
- c. Bacterias Gram positivas formadoras de esporas (Por ejemplo: *Bacillus spp.*)
- d. Bacterias Gram positivas no formadoras de esporas (Por ejemplo: *Artrhobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*)

Una recopilación de las bacterias más importantes que pueden ser patógenas para los seres humanos y que pueden ser transmitidas directa o indirectamente por vía fluvial, se presenta en la Cuadro 4. Estos patógenos causan infecciones entéricas como⁽¹⁵⁾:

- ❖ Tifoidea
- ❖ Cólera
- ❖ Shigelosis

Agente bacteriano	Enfermedad principal	Principal reservorio	Principal sitio afectado
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Salmonella paratyphi</i>	Fiebre paratifoidea	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>Shigella sp</i>	Disentería bacilar	Heces humanas	Parte inferior del intestino
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
<i>E. coli</i> patogénica	Gastroenteritis	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
	Síndrome urémico hemolítico		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis	Heces humanas/animales	Tracto gastrointestinal
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	Heces humanas/animales	Tracto gastrointestinal
<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedad respiratoria aguda (legionelosis)	Térmicamente enriquecido con las aguas	Pulmones
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	Exudado respiratorio humano	Pulmones
<i>Leptospira sp</i>	Leptospirosis (enfermedad de Weil's)	Heces y orina de animales	Generalizada
Bacterias oportunistas	Variable	Aguas naturales	Principalmente tracto gastrointestinal

Cuadro 4. Principales enfermedades transmitidas por el agua⁽¹⁵⁾

Virus patógenos

Las aguas residuales pueden ser contaminadas por aproximadamente 140 tipos de virus entéricos. Estos virus entran al cuerpo humano por vía oral, se multiplican en el tracto gastrointestinal y se excretan en grandes cantidades en las heces de personas infectadas (Cuadro 5), los virus entéricos se encuentran en ambientes acuáticos en cantidades relativamente pequeñas en aguas residuales y son patógenos para los seres humanos, causan infecciones no aparentes que son difíciles de detectar y son los responsables de una amplia gama de enfermedades que van desde erupciones en la piel, hasta fiebre, infecciones respiratorias, conjuntivitis, gastroenteritis y parálisis⁽¹⁵⁾.

Grupo de virus	Serotipos	Algunas enfermedades causadas
A. Enterovirus	3	Parálisis Meningitis aséptica
Poliovirus		
Coxsackievirus		
A	23	Herpangia Meningitis aséptica Enfermedades respiratorias Parálisis Fiebre
B	6	Pleurodinia Meningitis aséptica Pericarditis Miocarditis Cardiopatías congénitas Anomalías Nefritis Fiebre
Echovirus	34	Infección respiratoria Meningitis aséptica Diarrea Pericarditis Miocarditis Fiebre, erupción cutánea
Enterovirus (68-71)	4	Meningitis Enfermedades respiratorias
Virus de hepatitis A		Hepatitis infecciosa
Virus de hepatitis E		Hepatitis
B. Reovirus	3	Enfermedades respiratorias
C. Rotavirus	4	Gastroenteritis
D. Adenovirus	41	Enfermedades respiratorias Conjuntivitis aguda Gastroenteritis
E. Calcivirus	1	Gastroenteritis
F. Astrovirus	51	Gastroenteritis

Cuadro 5. Algunos virus entéricos humanos⁽¹⁵⁾.

La Figura 3 muestra de forma general los destinos finales de las excretas humanas.

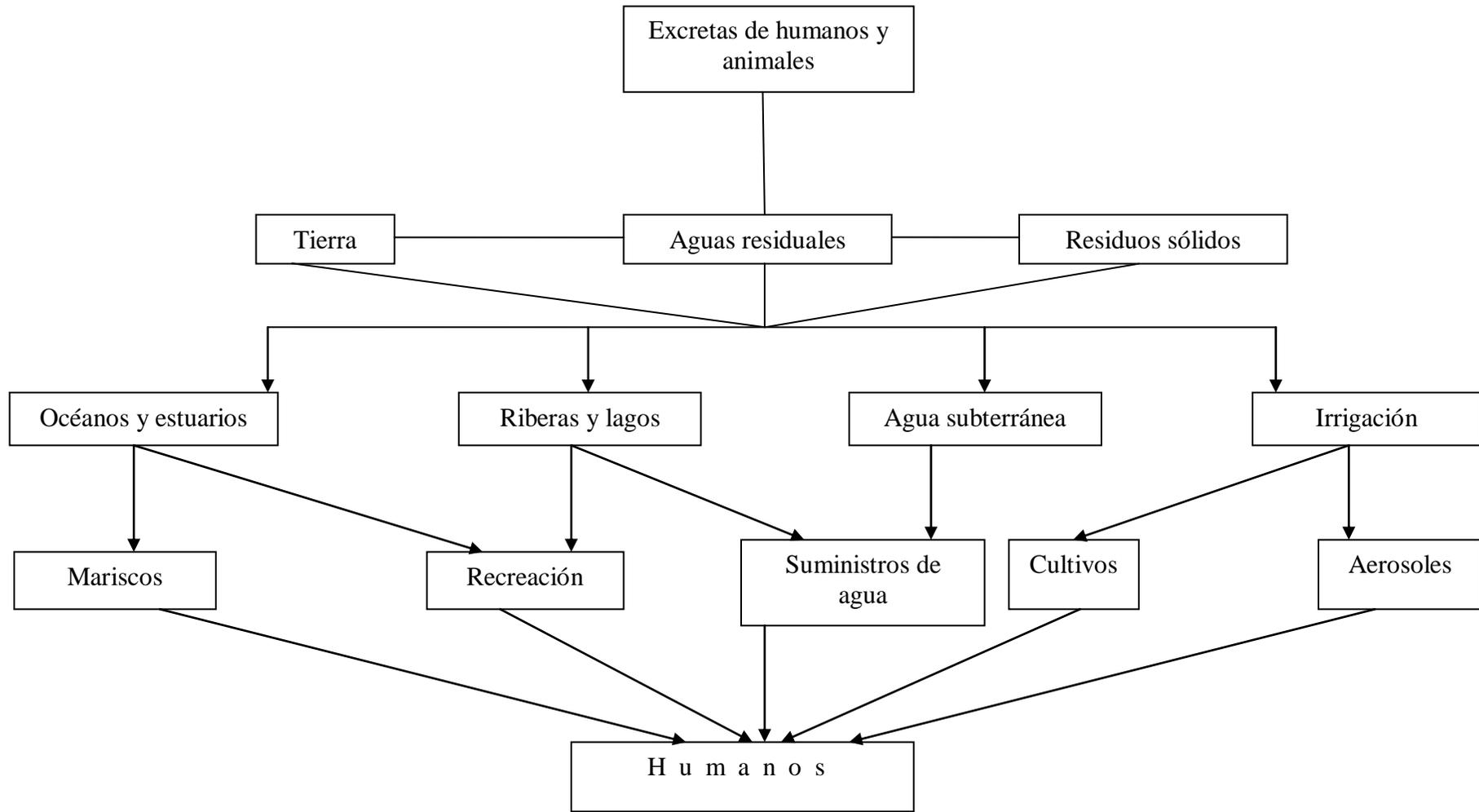


Figura 3. Transmisión de virus entéricos por el agua ⁽¹⁵⁾.

Protozoarios Parásitos

La mayoría de los parásitos protozoarios producen quistes, que son capaces de sobrevivir fuera de su hospedero bajo condiciones ambientales adversas. El enquistamiento se desencadena por factores tales como la falta de nutrientes, la respuesta a la acumulación de metabolitos tóxicos, o respuesta inmune del huésped⁽¹⁵⁾. El Cuadro 6 presenta a los protozoarios de mayor frecuencia encontrados en agua.

Organismo	Enfermedad (sitio afectado)	Principal reservorio
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (tracto gastrointestinal)	Heces humanas y animales
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana (tracto gastrointestinal)	Heces humanas
<i>Acantamoeba castellani</i>	Meninjoencefalitis amebiana (sistema nervioso central)	Suelo y agua
<i>Naegleria gruberi</i>	Meninjoencefalitis amebiana (sistema nervioso central)	Suelo y agua
<i>Balantidium coli</i>	Disentería/ ulcera intestinal (tracto gastrointestinal)	Heces humanas
<i>Cryptosporidium sp</i>	Diarrea profusa y acuosa, pérdida de peso, náuseas, fiebre de bajo grado (tracto gastrointestinal)	Heces humanas y animales
<i>Cyclospora sp</i>	Diarrea acuosa alternada con estreñimiento	Contaminación fecal de vegetales y frutas
<i>Mycrosporidia sp</i>	Diarrea crónica, deshidratación, pérdida de peso	Heces

Cuadro 6. Principales enfermedades de origen hídrico causadas por protozoarios⁽¹⁵⁾.

Helmintos parásitos

Aunque los helmintos parásitos no se detectan, su presencia por estudios microbiológicos en aguas residuales es sin embargo motivo de gran preocupación en materia de salud humana⁽¹⁵⁾. Los helmintos comúnmente detectados en análisis de aguas se enlistan en el Cuadro 7.

Organismo	Principal sitio afectado
Nematodos (lombrices)	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascaris- obstrucción intestinal en niños (intestino delgado)
<i>Trichuris trichiura</i>	<i>T. trichiura</i> –trichuriasis, intestino
Anquilostomas	
<i>Necator americanus</i>	Anquilostomiasis- tracto gastrointestinal
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anquilostomiasis- tracto gastrointestinal
Cestodo (tenias)	
<i>Taenia saginata</i>	Tenia de res- malestar abdominal (tracto gastrointestinal)
<i>Taenia solium</i>	Tenia del cerdo- tracto gastrointestinal
Trematodos	
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosomiasis – complicaciones en el hígado (cirrosis), vejiga e intestino grueso.

Cuadro 7. Principales parásitos helmintos⁽¹⁵⁾.

Hongos

En suelos cultivados aireados, los hongos constituyen una gran parte de la masa microbiana total, ellos son abundantes en los horizontes orgánicos de suelos boscosos o selváticos y son los que llevan a cabo la descomposición en ambientes ácidos.

Los hongos filamentosos poseen un micelio con hifas independientes, pueden ser septadas o no septadas; con un diámetro considerablemente mayor que los actinomices comunes, poseen hifas vegetativas y fértiles, que producen esporas sexuales o asexuales.

La patogenicidad por hongos es una característica que se origina en el suelo, ya que algunas especies que normalmente son saprofitas pueden invadir tejido vivo y comportarse como agente patógeno. Pueden ser parásitos facultativos o parásitos verdaderos y permanecer en el suelo inactivos^(16,17,18,19).

Microorganismos indicadores de contaminación fecal

La detección directa de bacterias, virus patógenos, y los quistes de los parásitos protozoarios exige procedimientos costosos y requiere mucho tiempo y mano de obra bien formada. Estos requisitos llevaron al concepto de organismos indicadores de contaminación fecal, que ya en 1914 el servicio de salud pública de Estados Unidos de Norteamérica adoptó al grupo coliforme como un indicador de contaminación fecal del agua potable⁽¹⁵⁾.

Los criterios para que un microorganismo sea indicador ideal de contaminación fecal son: provenir de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente, debe estar presente cuando los patógenos están presentes, y ausentes en las muestras no contaminadas, debe estar presente en mayor cantidad que los microorganismos patógenos, ser al menos igual de resistente como los patógenos a agresiones ambientales y en desinfección de plantas de tratamiento de agua potable y aguas residuales, no debe multiplicarse en el medio ambiente, debe ser detectable por métodos sencillos, rápidos y de bajo costo, el organismo indicador no debe ser patógeno⁽¹⁵⁾.

Coliformes totales

Los coliformes totales pertenecen a la familia Enterobacteriaceae e incluye a los aerobios y anaerobios facultativos, gran negativos, no formadores de esporas y fermentación de lactosa con producción de gas a 35 °C en 48 horas^(15,16). Este grupo incluye a: *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Estos coliformes se presentan en altas cantidades (2×10^9 coliformes/día/habitante) en las heces de humanos y animales, pero no todos ellos son de origen fecal. Estos indicadores son útiles para determinar la calidad del agua potable, las aguas para cría de mariscos, y las aguas de recreo, algunos miembros (*Klebsiella*) de este grupo en ciertas ocasiones pueden crecer bajo las condiciones ambientales de los desechos industriales y agrícolas⁽¹⁵⁾.

La Figura 4 resume de manera general los distintos tipos de indicadores que se emplean para el análisis de aguas.

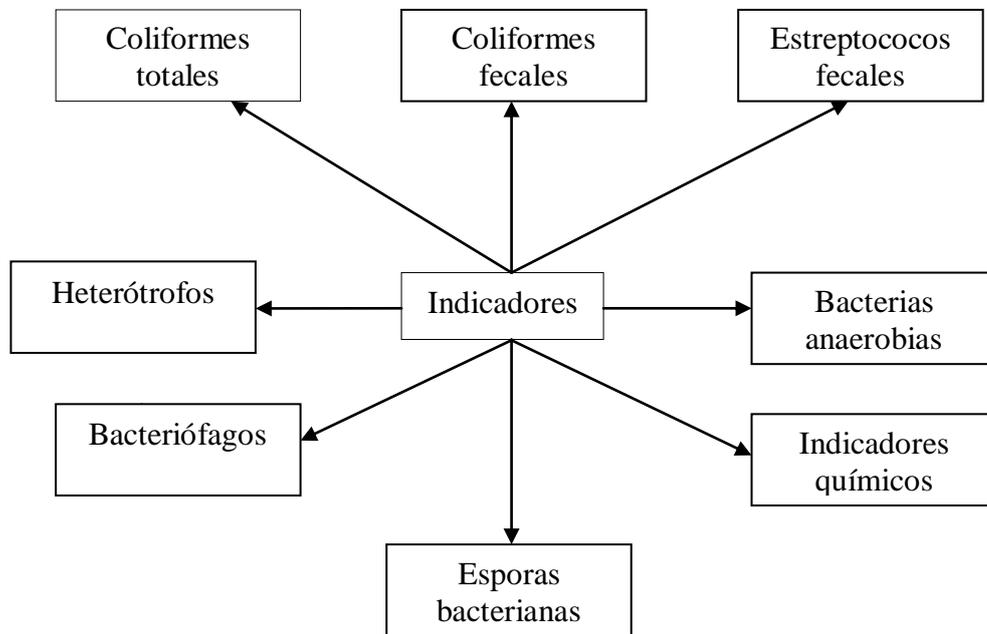


Figura 4. Indicadores químicos y microbiológicos^(15,16).

Coliformes fecales y organismos termotolerantes

Los coliformes fecales o coliformes termotolerantes incluye a los coliformes que fermentan la lactosa a 44.5 °C y comprende bacterias tales como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, y *Enterobacter aerogenes*. La presencia de coliformes fecales indica que existe materia fecal de animales de sangre caliente. Sin embargo la contaminación por fuentes humanas o animales no se puede diferenciar^(15,16).

1.4 Humedales

Los humedales, también llamados zonas húmedas o zonas encharcadas (encharcables), son las zonas pantanosas, pantanos, marismas, charcas, turberas, aguas rasas, riveras, areneros, o canales abandonados, naturales o artificiales, temporales o permanentes, con aguas fijas o corrientes, de carácter dulce, salino o salobre⁽¹⁾.

Los humedales son sistemas ricos en biodiversidad debido a particularidades como: disponibilidad de agua y flujo lento de las aguas. El término humedal, agrupa una gran gama de hábitats interiores, costeros y marinos que comparten ciertas características y tiene gran importancia por los recursos que se obtienen de ellos como: pesca, plantas medicinales y los servicios ambientales que proporcionan, ya que son la base de las actividades pesqueras, ayudan en el control de inundaciones, en la filtración y limpieza del agua y en la protección de las zonas costeras, en el aporte de nutrientes a los cuerpos de agua, proporcionan refugio a los juveniles de especies acuáticas, entre los más importantes. Los humedales conjuntan una gran variedad de comunidades vegetales con distinta composición, estructura y formas de vida⁽¹⁾.

Frecuentemente se les considera como un solo tipo de ecosistema, comparable a los bosques o pastizales, sin embargo, los humedales forman una enorme comunidad de variedades arbóreas y herbáceas. Los principales factores físicos involucrados en mantener la diversidad vegetal en humedales son: microtopografía, el nivel y tiempo de inundación, la salinidad del suelo y agua⁽¹⁾.

Un humedal también se puede definir como una zona inundada y saturada, bien sea por aguas superficiales o por aguas subterráneas y con una frecuencia, duración y profundidad suficientes para mantener especies de plantas predominantemente adaptadas a crecer en suelos saturados. Estas zonas húmedas se han aprovechado para el control de la contaminación, generada por las aguas residuales de manera espontánea e indiscriminada. El aprovechamiento de estas zonas húmedas era práctica usual en las civilizaciones antiguas, que vertían sus aguas en zonas adyacentes a lagos y ríos (humedales naturales). Evidentemente, la razón primordial era deshacerse de las aguas residuales más que el depurarlas, pero gracias a la capacidad de estas zonas húmedas, el

potencial de contaminación de las aguas negras se reducían antes de que se incorporaran a los cauces. Como beneficio agregado, las aguas estabilizadas del humedal aportaban nutrientes aprovechables para el sostenimiento de la fauna y flora^(20,21). Los humedales son las zonas de transición entre los sistemas acuáticos y terrestres, constituyen áreas de inundación temporal o permanente. La duración de la inundación debe ser mayor al 5% de la temporada de crecimiento para permitir el desarrollo de suelos hídricos y al menos periódicamente mantener una vegetación predominantemente de hidrófitas, esto es plantas adaptadas a vivir en condiciones de inundación^(22,23).

Componentes del humedal

Las partes fundamentales que integran a un humedal artificial serán el sustrato inerte, una columna de agua, plantas adaptadas a la inundación y los microorganismos. Las plantas son una parte esencial de un humedal artificial, el aspecto más importante es su capacidad de mantener o restablecer la conductividad hidráulica del lecho filtrante a través de una fase de recuperación. Las plantas a su vez también son necesarias en el proceso de tratamiento ya que proporcionan un ambiente apropiado para el crecimiento microbiano y mejoran significativamente la transferencia de oxígeno a la zona de raíces⁽²⁴⁾.

El sistema debe estar impermeabilizado para evitar pérdidas. El agua pasa a través de un filtro para estar en estrecho contacto con la zona de raíces y poder convertir a los contaminantes en nutrimentos, los cuales son asimilados por las plantas⁽²⁴⁾.

El uso de humedales para depurar aguas se ha incrementado durante los últimos veinte años y, hoy por hoy, son una opción de tratamiento de aguas residuales reconocida y recomendada. Se ha demostrado que son efectivos en la reducción de materia orgánica, para transformar y asimilar nutrientes y retienen y/o eliminan sustancias tóxicas que de otra manera serían vertidas sin tratamiento alguno al medio ambiente⁽³⁾.

La investigación científica y sistemática amplió el horizonte de aplicación de los humedales como sistemas de control de contaminación. Esta investigación en particular se inició en los años cincuenta con el trabajo de Seidel y posteriormente Kickuth que crearon el concepto de rizosfera. Sin embargo, los resultados obtenidos por estos

sistemas no fueron del todo satisfactorios pero marcaron el inicio en el desarrollo y en la investigación de esta tecnología⁽²⁵⁾.

El primer humedal construido específicamente para tratar aguas residuales entró en operación en 1974 en Othofresen⁽²⁶⁾. A partir de esta fecha, el desarrollo ha sido acelerado y efectivo y ha llevado a la construcción de estos sistemas, tanto en Norte América como en Europa. Hay más de 200 de estos sistemas en operación en Norte América⁽²⁶⁾, mientras se afirma que hay más de 500 de estos sistemas en operación en Europa⁽²⁵⁾.

Además de la depuración de aguas residuales, los humedales ofrecen beneficios ambientales agregados cómo: mejora de la calidad ambiental, crean y restauran nichos ecológicos, generan mejoramientos paisajísticos, contribuyen a la generación de zonas de amortiguamiento de crecida de ríos y avenidas, son fuente de agua en procesos de reutilización de aguas residuales para riego y aportan ventajas en otras actividades de carácter lúdico y económico⁽²⁵⁾.

Tipos de humedales

Son muy diversas las clasificaciones que existen en la identificación de los humedales artificiales. Una clasificación de acuerdo con las características del material vegetal predominante en los lechos⁽²⁶⁾:

- a) Humedales contruidos, basados en macrófitas flotantes.- Ej.: *Eichhornia crassipes* y *Lemna minor*.
- b) Humedales contruidos, basados en macrófitas de hojas flotantes.- Ej.: *Nymphaea alba*, *Potamogeton gramineus*.
- c) Humedales contruidos, con macrófitas sumergidas.- Ej.: *Littorella uniflora*, *Potamogeton crispus*.
- d) Humedales contruidos, con macrófitas emergentes.- Ej.: *Thypha latifolia*, *Phragmites australis*.

La Figura 5 ilustra cada uno de los sistemas enunciados anteriormente con sus plantas características.

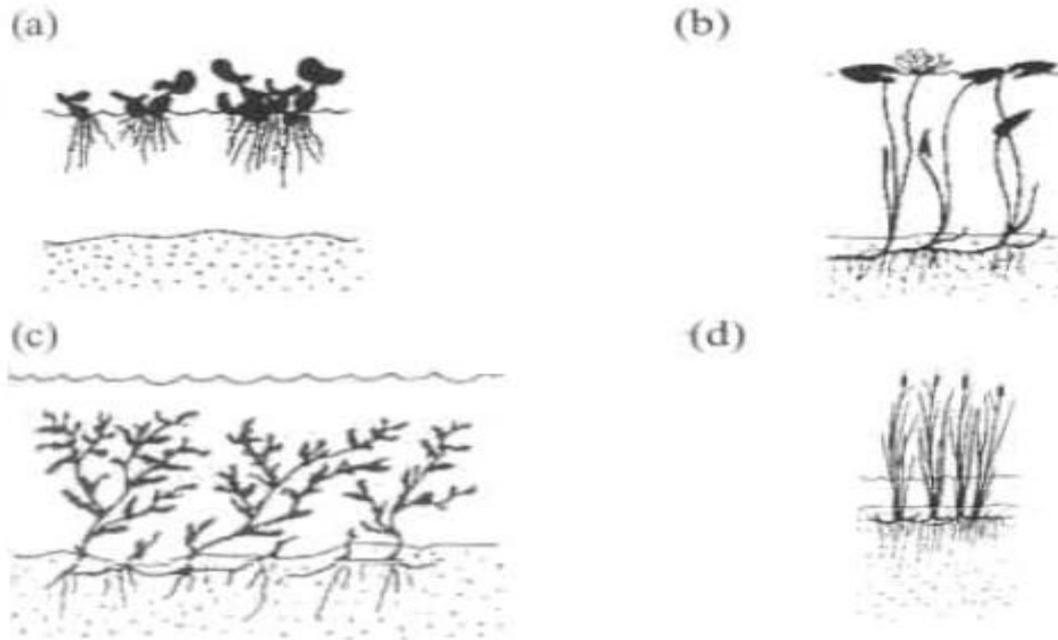


Figura 5. Tipos de humedales según las plantas predominantes. (a) Libre flotantes. (b) Flotante enraizadas. (c) Sumergidas enraizadas. (d) Enraizadas emergentes⁽²⁷⁾.

Para el tratamiento de aguas residuales existe la posibilidad de usar las diferentes alternativas siempre y cuando las plantas se puedan adaptar a las condiciones ambientales. Sin embargo, las plantas correspondientes al grupo de macrófitas emergentes han demostrado buena capacidad de adaptación y en especial son resistentes a las condiciones ambientales adversas predominantes, cuando se trata de aguas residuales. Una posible subdivisión de estos humedales artificiales plantados con macrófitas emergentes, es⁽²⁷⁾:

- a) Sistema de flujo libre (humedales de flujo superficial).
- b) Sistemas de flujo horizontal subsuperficial.
- c) Sistema de flujo vertical.
- d) Sistemas híbridos.

La Figura 6, muestra cada uno de los sistemas enunciados.

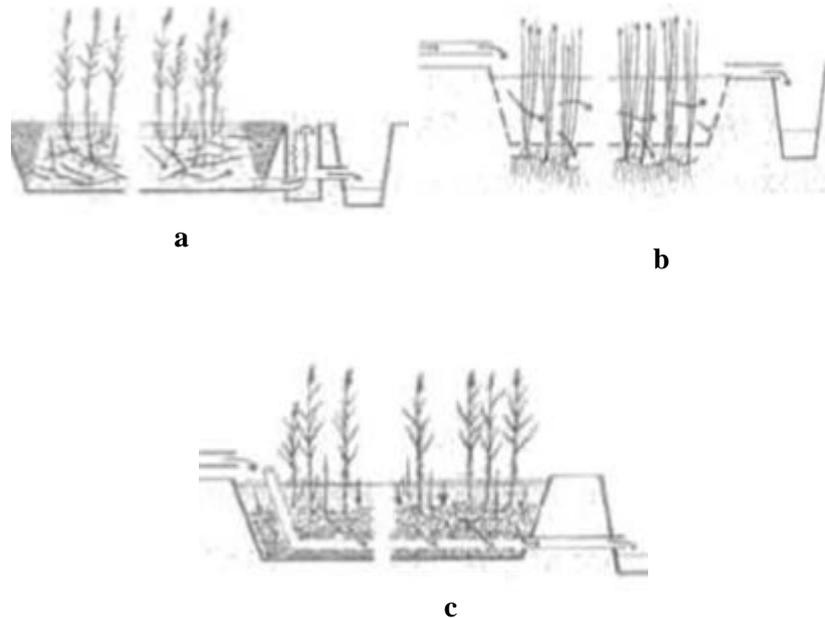


Figura 6. Tipos de humedales construidos según el tipo de flujo predominante en los lechos. (a) Flujo superficial horizontal. (b) Flujo subsuperficial horizontal. (c) Flujo vertical⁽²⁷⁾.

La anterior clasificación obedece al sentido preferente del movimiento del agua en los lechos. En los humedales de flujo horizontal superficial (a), el agua se vierte en superficie en un extremo del lecho, circula expuesta a la atmósfera, lenta y horizontalmente, para finalmente ser evacuada en el extremo opuesto del lecho, por medio de un vertedero. En los humedales de flujo horizontal subsuperficial (b), el agua se distribuye en un extremo del lecho, se infiltra, moviéndose en sentido horizontal a través de un medio granular de relleno entre las raíces de las plantas. Al final y en el fondo del lecho se recoge y se evacua por medio de tuberías y/o vertederos. Las profundidades de estos humedales descritos no suelen exceder los 0.60 m y para facilitar el trasiego del agua deben ser construidos con una leve pendiente en el fondo, pero manteniendo en lo posible condiciones hidráulicas de flujo laminar. Los lechos deben ser aislados del suelo subyacente para evitar la contaminación de suelos y de las aguas subterráneas⁽²⁷⁾.

En los humedales de flujo vertical (c) el agua fluye de manera descendente y percola (movimiento y filtración de fluidos a través de materiales porosos) en el humedal. El agua se vierte y se distribuye en toda la superficie del lecho y percola en el lecho, entre las diferentes capas de material filtrante de relleno. El material de relleno puede ser de distinta naturaleza y además sirve para facilitar el arraigo de las plantas. El lecho debe de tener una profundidad no menor a 1 m. El sistema de distribución de agua afluente está en la superficie y reparte el agua por tratar uniformemente, para asegurar buenos resultados en la depuración. Una vez que el agua pasa a través del lecho, se recoge en el fondo y se evacua por medio de tubería⁽²⁷⁾.

El agua en los humedales de flujo vertical se puede dosificar de manera continua o intermitentemente hasta inundar totalmente el lecho, siempre dependiendo del modo de operación previsto en el diseño. Los humedales de flujo vertical presentan cierta ventaja con respecto a los humedales de flujo horizontal en tanto que además de eliminar la (DBO) tiene mayor capacidad para nitrificar totalmente el agua tratada, inclusive a niveles que sólo se obtienen en sistemas de tratamiento terciario o secundario⁽²⁷⁾.

Los humedales híbridos, son combinaciones de los humedales anteriormente descritos y pueden estar compuestos de diferentes lechos y/o de zonas en donde el agua circula expuesta a la atmósfera, zonas donde el flujo es subsuperficial e incluso con sectores de flujo vertical. Su disposición dependerá de los objetivos del tratamiento, de las características del agua por tratar de las condiciones de operación y de la disponibilidad económica. Para mejorar aun más la calidad del agua, o cuando se quieren obtener resultados de calidad específicos y hacer los sistemas más efectivos, también es posible implementar procesos de recirculación del agua tratada en diferentes puntos de los sistemas⁽²⁸⁾.

1.5 Ecología del suelo

El cumplimiento de las funciones de autodepuración de los humedales artificiales depende de la presencia y la interacción en el suelo. Esta es la región en la que se sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico y muchos de sus nutrientes. Químicamente, el suelo contiene una gran cantidad de sustancias orgánicas que se encuentran en los estratos más profundos. El medio ambiente edáfico es único en diferentes aspectos: contiene gran variedad de bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; es uno de los sitios más dinámicos en interacciones biológicas en la naturaleza, en el cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de materia orgánica, la intemperización de las rocas y la nutrición de cultivos agrícolas⁽²⁹⁾.

Descripción general del suelo

El suelo está formado por cinco componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos constituyentes no es la misma en todos los suelos sino que varía con la localidad. La cantidad de materia orgánica y mineral, que forma parte de la porción inanimada, es relativamente fija en un determinado lugar; sin embargo, la proporción de aire y agua varía. El aire y el agua juntos representan aproximadamente la mitad del volumen del suelo; dicho volumen se denomina espacio poroso. Por lo general la materia orgánica constituye del 3 al 6% del total. La porción viviente del suelo (incluyendo varios animales pequeños y microorganismo) constituyen menos del 1% del volumen total; aun así, esta porción es indudablemente esencial para la producción de cultivos y la fertilidad del suelo⁽²⁹⁾.

La porción inorgánica del suelo tiene un notable efecto sobre los habitantes microbianos, debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. Un suelo bien aireado, desde el punto de vista microbiológico, es aquél en el que los procesos microbianos que requieren O₂ se llevan a cabo rápidamente. Sin embargo, es poco probable que el suelo siempre esté suficientemente bien aireado como para satisfacer a todos sus habitantes debido al problema de transporte de gas en los poros pequeños y en los microambientes en que se encuentran los organismos⁽²⁹⁾.

Cuando el suministro de O₂ es inadecuado se reduce la velocidad de muchas transformaciones microbianas e incluso se eliminan algunos procesos. En hábitats deficientes de O₂ se inician nuevos procesos microbiológicos, algunos de los cuales pueden ser nocivos para el desarrollo de las plantas. Por ejemplo, durante las épocas deficientes en O₂ se liberan N₂ o CH₄, aparecen inhibidores orgánicos y se acumulan iones sulfuro, ferroso y manganoso⁽²⁹⁾.

Microbiología de la rizosfera

La rizosfera constituye toda la zona de influencia de la raíz, es decir, la raíz y su ambiente del suelo con todos los microorganismos que en ella se desarrollan. Los microorganismos que ahí se desarrollan dependen de los compuestos químicos que allí se contienen por incorporación de los constituyentes orgánicos de las plantas⁽³⁰⁾:

1. Celulosa 15-60%
2. Hemicelulosa 10-30%
3. Lignina 5-30%
5. Azúcares-aminoácidos y ácidos alifáticos 5-30%
6. Grasas-aceites-resinas-pigmentos-proteínas-minerales 1-13%

La región de la rizosfera es un hábitat favorable para la proliferación de numerosos géneros y especies microbianas, y puede ser investigada con técnicas de microscopía de luz y electrónica, de biología molecular, de genética y bioquímica^(31,32). Muestran una asociación física de los microorganismos en la superficie de las raíces exteriores, lo que representa elevada diversidad microbiana, en contraste con la cantidad relativamente pequeña que se detecta en medios de cultivo artificial de laboratorio, dada la incapacidad técnica para cultivar y aislar la verdadera diversidad en esa área^(33,34).

El examen microscópico revela la existencia de una amplia comunidad microbiana cosmopolita, en la superficie de las raíces e incluso en su interior^(35,36), con formación de microcolonias y cadenas de células individuales de actinomicetos, bacterias, hongos y protozoarios⁽³³⁾.

Ciertos géneros bacterianos son estimulados por los exudados de las raíces de tal manera que se clasifican en grupos taxonómicos, genéticos y fisiológicamente

diferentes. Los que más responden son los bacilos cortos Gram-negativos que ocupan el mayor porcentaje de la rizosfera en comparación con el total de la microbiota autóctona del suelo^(37,38), mientras que el porcentaje menor corresponde a bacilos Gram-positivos que forman esporas como los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*.

En contraste disminuye el efecto sobre los géneros *Arthrobacter*, *Micrococcus* y *Sarcina*; otros bacilos Gram-negativos no forman esporas pero que son comunes en esa zona son: *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, y *Xanthomonas*, y los menos son bacilos Gram-positivos no esporulados del tipo: *Corynebacterium* y *Mycobacterium*^(34,37,38).

Los anaerobios como *Clostridium* son afectados por la reducida tensión de oxígeno derivada de la respiración de las raíces y la actividad microbiana^(39,40). Los microorganismos interactúan entre sí, modificando constantemente la ecología de la rizosfera, todo lo cual repercute en el reciclaje de nutrientes, entre los que se pueden mencionar:

1. Ataque de un sustrato aprovechable por otro

Por ejemplo los hongos celulolíticos liberan ácidos orgánicos, el carbono sirve como fuente de energía a bacterias y hongos.

2. Síntesis de factores de crecimiento que benefician a otros organismos

Por ejemplo los aminoácidos, vitamina B, purinas y pirimidinas.

3. Descomposición de inhibidores biológicos

Por ejemplo las bacterias aerobias que consumen O₂ al consumirlo permiten el desarrollo de anaerobios.

4. Cambios de pH

Por ejemplo la acidificación favorece el desarrollo de los hongos.

El pH del suelo, el carbono y nitrógeno total así como el cociente entre ellos son de gran importancia para la estructura y abundancia de las comunidades del suelo⁽⁴¹⁾. Los patrones especialmente de biodiversidad que se alojan bajo la tierra son independientes en la escala espacio y tiempo, y por lo tanto son influenciados tanto por factores bióticos como por abióticos^(42,43) la biota del suelo posee una alta diversidad y

distribución muy heterogénea en la rizosfera en plantas y restos de materia orgánica^(42,44).

Interacciones entre microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo no existen de manera aislada, ellos están en asociación con otros microorganismos. Esto visualiza los diferentes tipos de relaciones con otros tipos de microorganismos. Este tipo de asociaciones en las que un tipo de especies viven en asociaciones cercanas con individuos de otras especies, es llamada simbiosis y esta asociación puede ser positiva (benéfica), negativa (perjudicial) o neutra⁽⁴⁵⁾.

Asociación neutra

Cuando microorganismos de dos diferentes especies viven en el mismo medio ambiente sin afectarse el uno al otro, esto es llamado neutralismo, aunque los dos tipos diferentes de especies ocupen el mismo medio ambiente ambos tienen diferentes requerimientos⁽⁴⁵⁾.

Asociación positiva

Mutualismo

Esta es una relación obligatoria entre dos organismos de diferente especie en el que los dos organismos se benefician de esta asociación⁽⁴⁵⁾.

Comensalismo

Es la relación entre dos organismos en que uno de los miembros se beneficia de el otro y este no es afectado⁽⁴⁵⁾.

Asociación negativa

En la asociación negativa uno o ambos miembros son negativamente afectados por la presencia de otro miembro. Estos son los siguientes tipos⁽⁴⁵⁾:

Amensalismo

Esta es una asociación en que miembros de una especie es negativamente afectada por el miembro de una diferente especie, esto es también llamado antagonismo. Por ejemplo algunos microorganismos producen antibióticos que tienen efectos inhibitorios en otros microorganismos susceptibles presentes en el suelo⁽⁴⁵⁾.

Competencia

Cuando organismos de dos diferentes especies compiten por el mismo nutrimento, la relación entre ellos es llamada competición⁽⁴⁵⁾.

Parasitismo

Esta es la relación en que un organismo vive en o en otro organismo, el parásito se alimenta de las células tejidos o fluidos o de otros organismos llamados hospederos⁽⁴⁵⁾.

Ciclos biogeoquímicos

Los organismos vivos toman varios elementos en forma de nutrientes a partir del medio ambiente. Los elementos necesarios son reciclados continuamente para que estén a disposición de los organismos vivos. Los microorganismos juegan un papel muy significativo en el reciclaje de estos elementos. Los microorganismos del suelo, especialmente las bacterias y hongos, tienen un papel crucial en el ciclo de muchos elementos. Los microorganismos convierten moléculas orgánicas complejas en compuestos inorgánicos simples o en el constituyente de elementos, estos procesos, llamados mineralización, es muy esencial para la continuidad de los elementos en la atmósfera⁽⁴⁵⁾.

Los ciclos biogeoquímicos son un camino por el cual los elementos químicos que tiene tanto comportamiento biótico y abiótico en el ecosistema.

El ciclo del carbono

El carbono está presente en los organismos en forma de compuestos orgánicos, en la atmósfera está presente en estado gaseoso como CO₂ y metano. Este es reciclado a través del ecosistema por la vía de la fotosíntesis. El ciclo del carbono comienza con la acumulación de CO₂ atmosférico por autótrofos fotosintéticos tal como plantas, algas y cianobacterias, en las formas de compuestos orgánicos tal como glucosa, mediante el uso de energía de la luz del sol. Una pequeña cantidad de CO₂ es también fijada por autótrofos quimiosintéticos tal como las metanobacterias. Algunas de las moléculas orgánicas son usadas por los quimioheterótrofos para sus requerimientos energéticos, ellos liberan CO₂ en la atmósfera por la respiración. La mayor parte del carbono permanece con los organismos. Cuando estas plantas o animales mueren, ellos son descompuestos por microorganismos tal como bacterias y hongos y el CO₂ es liberado en el medio ambiente⁽⁴⁵⁾.

El carbón es también almacenado como carbón y petróleo, también en rocas y océanos en la forma de caliza pero su reciclaje en forma de carbón de estos depósitos es muy lento⁽⁴⁵⁾.

El ciclo del fósforo

En los organismos el fósforo está presente en forma de ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP y otros compuestos fosfóricos. Esto juega un papel importante en procesos biológicos tal como división celular, respiración y otros. El principal depósito de fósforo está en las rocas⁽⁴⁵⁾.

El ácido, liberado de la bacteria *Thiobacillus*, disuelve el fosfato de las rocas y el fósforo es liberado, en el suelo y el agua en forma de compuesto inorgánico soluble. Esta es la principal fuente de fosfato para la atmósfera⁽⁴⁵⁾.

El ciclo del nitrógeno

EL nitrógeno es componente de proteínas, ácidos nucleicos y algunos otros compuestos que son estructuras esenciales y componentes funcionales de organismos. Este es el componente más abundante de la atmósfera más de cerca del 79% del volumen del aire⁽⁴⁵⁾.

En la atmósfera está presente en la forma de gas N_2 . Pero este no puede ser utilizado en esta forma. Este es primero fijado y combinado con otros elementos, para usarse por los organismos. Esto es llamado fijación del nitrógeno. Esto puede solo ser utilizado cuando está combinado con otros elementos en diferentes formas tales como nitratos (NO_3), nitritos (NO_2) o amonio (HN_3)⁽⁴⁵⁾.

Microorganismo	Función
Fijación de nitrógeno	
Bacterias de vida libre	
<i>Azotobacter</i>	Fijación de nitrógeno
<i>Azospirillum</i>	Fijación de nitrógeno
<i>Beijerinckia</i>	Fijación de nitrógeno
Bacterias simbióticas en plantas leguminosas	
<i>Rhizobium</i>	Fijación de nitrógeno
<i>Bradyrhizobium</i>	Fijación de nitrógeno
<i>Azorhizobium</i>	Fijación de nitrógeno
Amonificación	
<i>Clostridium</i>	Amonificación
<i>Proteus</i>	Amonificación
Nitrificación	
<i>Nitrosomonas</i>	Oxida amonio a nitritos
<i>Nitrococcus</i>	Oxida amonio a nitritos
<i>Nitrosomonas</i>	Oxida nitritos a nitratos
<i>Nitrocystis</i>	Oxida nitritos a nitratos
Denitrificación	
<i>Bacillus</i>	Nitritos y nitratos en nitrógeno molecular
<i>Pseudomonas</i>	Nitritos y nitratos en nitrógeno molecular
<i>Spirillum</i>	Nitritos y nitratos en nitrógeno molecular
<i>Thiobacillus</i>	Nitritos y nitratos en nitrógeno molecular

Cuadro 7. Microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno⁽⁴⁵⁾.

Ciclo del azufre

El azufre es el componente mayor de compuestos orgánicos que contiene los aminoácidos cisteína y metionina. El azufre es originado de depósitos de sedimento naturales en rocas, océanos, lagos y pantanos. En el suelo este está presente en varias formas tales como SO_3^- (sulfito), SO_4^- (sulfato), S_2O_3 (tiosulfato), H_2S (ácido sulfhídrico) o S (azufre elemental)⁽⁴⁵⁾.

Las plantas pueden asimilar azufre solo en forma de SO_4^- . En animales el azufre ocurre en forma orgánica en aminoácidos cisteína y metionina con contenido de grupos sulfhidrilo (SH) y formas de enlace disulfuro (S-S)⁽⁴⁵⁾.

Una variedad de bacterias, presente en el suelo tal como *Thiobacillus* convierten el azufre de los aminoácidos en H_2S . El H_2S es oxidado en SO_2^{4+} por dos grandes grupos de bacterias no fotosintéticas: *Beggiatoe* y *Thiobacillus* el que convierte H_2S en sulfuro elemental y que después es oxidado a SO_4^{2-} ⁽⁴⁵⁾.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua es un recurso escaso y fundamental, de ella depende la vida en el planeta, sin embargo, ya no son solamente desperdicios los que se arrojan a los ríos y mares; si no que actualmente se agregan productos químicos nocivos que destruyen la vida animal y vegetal, y que además exceden la acción de bacterias y algas en el proceso de biodegradación de los contaminantes orgánicos y químicos de las aguas. Ante esta situación, es de gran importancia usar el agua de manera racional, así como tratar y reutilizar las aguas residuales. Los contaminantes que tiene el agua residual depende del uso que se le dio (doméstico, industrial o agrícola), pero se puede señalar a los coliformes fecales, los fosfatos, los nitratos, los metales y lo compuestos orgánicos principalmente. En general, provocan daños a la salud humana, como enfermedades gastrointestinales (diarreas), daños en la piel o malformaciones en recién nacidos. Para evitar los problemas antes mencionados el agua desechada debe recibir un tratamiento físico, químico y biológico. Sin embargo, los sistemas convencionales son muy caros y las autoridades no cuentan con recursos suficientes para construirlos y darles mantenimiento. Una forma alternativa consiste en aprender la manera en que la naturaleza procesa los contaminantes y aplicarlo de acuerdo a las necesidades de la sociedad. Esta forma de tratamiento consiste en el uso de humedales artificiales o construidos. Sin embargo es necesario conocer el funcionamiento de este tipo de sistemas de tratamiento ya que son altamente susceptibles a la colonización microbiana tales como bacterias, parásitos, hongos y virus que en un determinado momento si no se pone de manifiesto su presencia y se estima la cantidad presente podría convertirse en un foco de infección.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar los microorganismos que colonizan un humedal artificial ubicado en el Valle del Mezquital en el municipio de Ixmiquilpan, Estado de Hidalgo, en un periodo de 4 meses con un total de 12 muestreos.

3.2 Objetivos específicos

1. Aislar a los microorganismos presentes en muestras de alcatraz, papiro egipcio y sustrato provenientes del humedal artificial localizado en Ixmiquilpan Hidalgo.
2. Caracterizar a los microorganismos aislados por medio de tinciones y pruebas bioquímicas para determinar su clasificación morfológica y metabólica.
3. Determinar la cantidad de microorganismos presentes en diferentes sitios del humedal.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Puesto que en el humedal artificial se presentan diferentes tipos de condiciones en el sustrato, se espera que la mayor riqueza y diversidad de microorganismos se encuentre en la zona de la rizósfera mientras que sea menor en el sustrato inerte.

V. MATERIALES Y MÉTODO

V.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio fue prospectivo, descriptivo, longitudinal, experimental.

5.1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Diversas muestras de raíz y sustrato pertenecientes al humedal artificial ubicado en Ixmiquilpan Hidalgo. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Microbiología (L-313) ubicado en F.E.S Zaragoza Campus II.

5.1.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de raíz y sustrato obtenidas en forma aséptica en frascos de vidrio estériles con tapa hermética, las cuales deberán ser analizadas en máximo 2 horas después de su recolección.

5.1.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron todas aquellas muestras de raíz y sustrato que no estén etiquetadas debidamente, o bien que no se analicen en el tiempo límite establecido.

5.1.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras que no fueron de raíz y sustrato, o que las muestras no hayan sido tomadas de ese humedal.

5.1.6 VARIABLES

- a) Variable dependiente. Tipo de microorganismos encontrados y caracterizados.
- b) Variables independientes. Muestras de alcatraz, papiro egipcio y sustrato inerte.

V.2 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se calcularon las frecuencias y porcentajes de microorganismos encontrados en los diferentes sitios del humedal. Se elaboró un diagrama de caja y bigote para observar la dispersión y simetría de los resultados.

V.3 MATERIAL Y EQUIPO

Material de vidrio

Matraces Erlenmeyer de 1000 mL Kimax
Matraces Erlenmeyer de 500 mL Kimax
Cajas de Petri estériles Kimax
Tubos de ensaye de 18 x150 mm Kimax con tapón de algodón.
Probeta graduada de 100 mL Pyrex
Vasos de precipitados de 250 mL Pyrex
Vaso de precipitados de 50 mL Pyrex
Pipetas graduadas de 10 mL Pyrex
Pipetas graduadas de 1 mL Pyrex

Material general

Asas bacteriológicas y micológicas
Aplicadores de madera estériles
Mecheros Fisher
Tripiés
Algodón
Gasas
Papel indicador de pH escala 1 a 12
Gradillas

Equipo

Balanza granataria de 2600 g OHAUS
Olla a presión de 21 litros Presto Steele
Incubadora a 37 °C RIOSSA
Incubadora a 28 °C RIOSSA
Refrigerador Philips
Microscopio de contraste de fases Zeizz
Contador de colonias SOLBAT

Medios de cultivo

Agua peptonada a pH 7.2	Agar FLO
Agar soya tripticaseína, AST (en tubo y caja)	Agar cetrimida
Agar Sabourud o PDA (en caja)	Agar EMB

Pruebas bioquímicas (caldo rojo de fenol con carbohidratos, caldo nitrato, rojo de metilo-Voges Proskauer, SIM, LIA, KIA, citrato de Simmons, catalasa, oxidasa)

Muestras

Alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*)
Papiro egipcio (*Cyperus papyrus*)
Sustrato inerte (grava)

V.4 MÉTODO

1. TOMA DE MUESTRA

- 1.1 Las muestras fueron tomadas de Septiembre de 2012 a Abril de 2013 en la comunidad de Ixmiquilpan Hidalgo, sumando un total de 12 muestreos tanto de raíz de alcatraz y papiro como también de sustrato (grava), provenientes de un humedal artificial.
- 1.2 Se utilizaron palas de jardinería para remover la grava con el propósito de liberar la zona de la raíz y con la espátula se quitó la película formada alrededor de las raíces.
- 1.3 Se tomaron aproximadamente 20 g aproximadamente de las muestras de raíz a analizar (alcatraz, papiro y sustrato), y se colocaron cada una en un matraz que contenía aproximadamente 180 mL de agua peptonada esterilizada (dilución 10^{-1}). Los matraces fueron rotulados anotando los datos de la fecha de muestreo, lugar del muestreo, zona del muestreo, y el nombre del analista.
- 1.4 Las muestras se trasladaron inmediatamente bajo condiciones de 5 a 15 °C al Laboratorio L-313 de Microbiología en Campus II de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la U.N.A.M.

2. PREPARACIÓN DE DILUCIONES

- 2.1 De la dilución 10^{-1} se tomó 1 mL transfiriéndola a 9 mL de agua peptonada obteniendo así la dilución 10^{-2} (1:100), se agitó lentamente.
- 2.2 Se tomó una alícuota de 1 mL de la dilución 10^{-2} y se mezcló con 9 mL de agua peptonada, y esta fue una dilución 10^{-3} (1:1000), se agitó lentamente.

3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE DILUCIONES

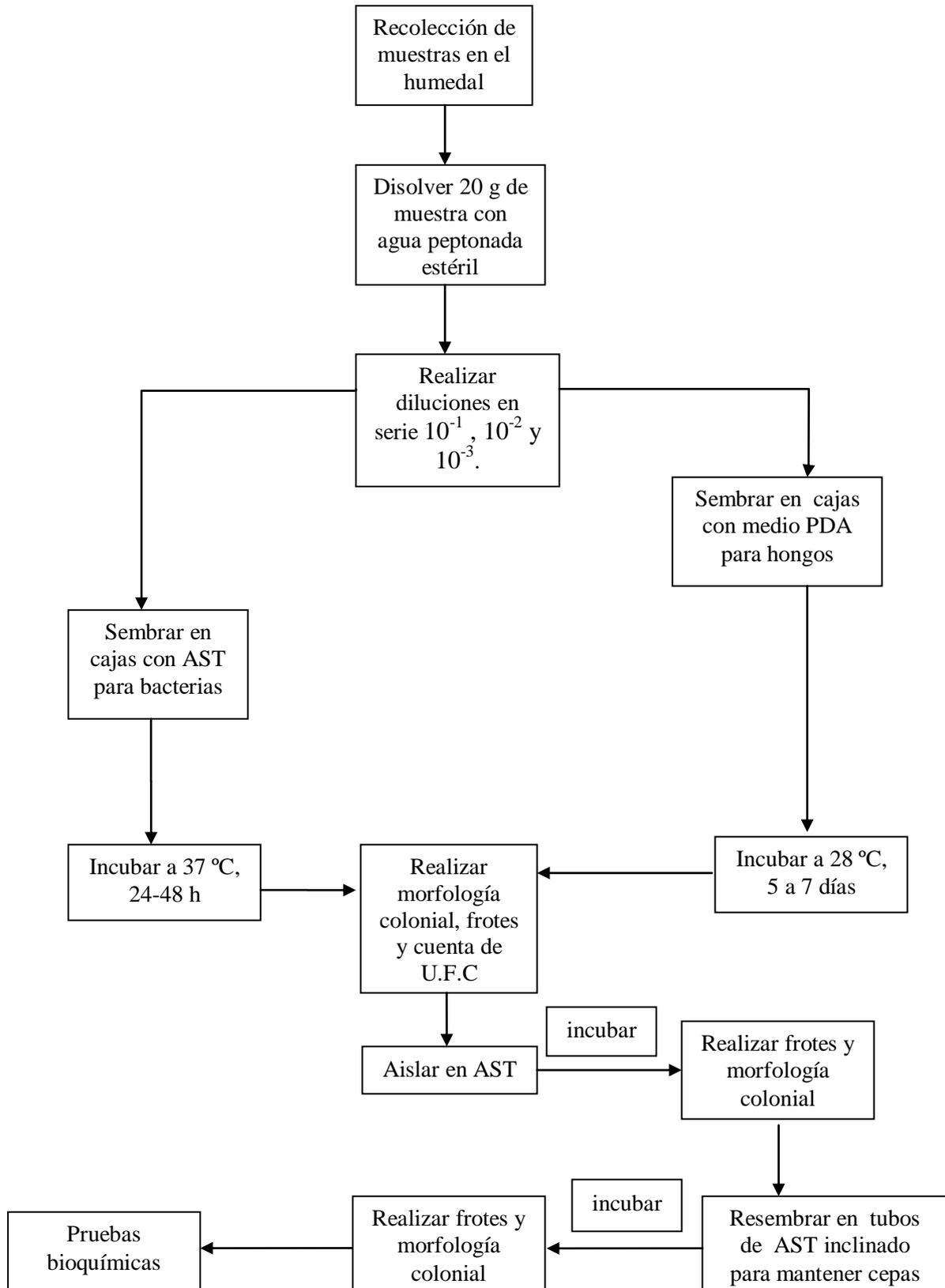
- 3.1 Se tomó una alícuota de 1 mL de las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} , mismas que fueron inoculadas en cajas con agar AST, se distribuyó de manera uniforme el inóculo con movimientos giratorios en forma de “ocho” hasta que se logró la completa incorporación al medio de cultivo, incubándose a 36 °C de 24 a 48 horas en posición invertida para evitar de esta manera la formación de agua de condensación.
- 3.2 De las colonias aisladas se describió la morfología colonial, seleccionando las colonias que mostraron diferencias entre sí.

- 3.3 Las colonias seleccionadas se resembraron en cajas de agar EMB por estría cruzada y de ahí se hicieron frotos de dichas colonias que se tiñeron por la tinción de Gram.
- 3.4 Se resembraron nuevamente las colonias en tubos de AST inclinado para mantenimiento de las cepas y se efectuaron pruebas bioquímicas para su total identificación.

4. AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE DILUCIONES

- 4.1 En condiciones de esterilidad se tomo 1 mL de cada dilución (10^{-1} y 10^{-3}) y se inoculó por extensión, en cajas con agar PDA.
- 4.2 Se incubó en posición invertida con la tapa hacia a bajo a 28°C durante 5 a 7 días.

V.5. DIAGRAMA DE FLUJO



VI. RESULTADOS

A continuación se indican los resultados de microorganismos encontrados en los diferentes sitios muestreados del humedal a lo largo de los meses correspondientes.

Fecha de muestreo	Sitio de muestreo	No. de cepas aisladas
Septiembre de 2012	Alcatraz	2
	Papiro	2
	Sustrato	2
Octubre de 2012	Alcatraz	2
	Papiro	2
	Sustrato	2
Enero de 2013	Alcatraz	4
	Papiro	4
	Sustrato	3
Abril de 2013	Alcatraz	2
	Papiro	2
	Sustrato	1
Total de cepas aisladas		28

Cuadro 8. Cantidad de cepas aisladas con respecto a la fecha y sitio de muestreo.

Los siguientes cuadros muestran las diluciones hechas a las muestras, con los microorganismos aislados y caracterizados por tipo de planta.

Septiembre de 2012					
Alcatraz		Papiro		Sustrato	
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus bovis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Cuadro 9. Bacterias identificadas en distintos puntos del humedal, para el mes de Septiembre de 2012.

Octubre de 2012					
Alcatraz		Papiro		Sustrato	
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Kurthia zopfii</i>	<i>Bacillus mycoides</i>

Cuadro 10. Bacterias identificadas en distintos puntos del humedal, para el mes de Octubre de 2012.

Enero de 2013					
Alcatraz		Papiro		Sustrato	
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Bacillus alvei</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Micrococcus varians</i>		<i>Bacillus alvei</i>			<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>					

Cuadro 11. Bacterias identificadas en distintos puntos del humedal, para el mes de Enero de 2013.

Abril de 2013					
Alcatraz		Papiro		Sustrato	
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻³
<i>Listeria murayi</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria murrayi</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Brucella canis</i>

Cuadro 12. Bacterias identificadas en distintos puntos del humedal, para el mes de Abril de 2013.

Las gráficas siguientes representan el número de bacterias totales que se aislaron del humedal.

Bacterias Gram positivas y negativas

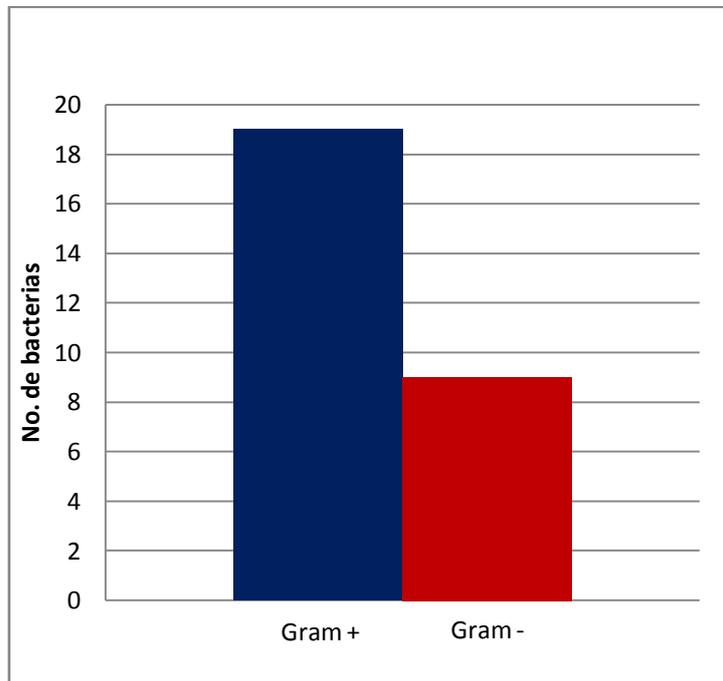


Figura 7. Gráfica de barras que muestra el total de bacterias Gram (+) y Gram (-) aisladas en todos los puntos del humedal muestreado.

Bacterias con respecto a su forma microscópica

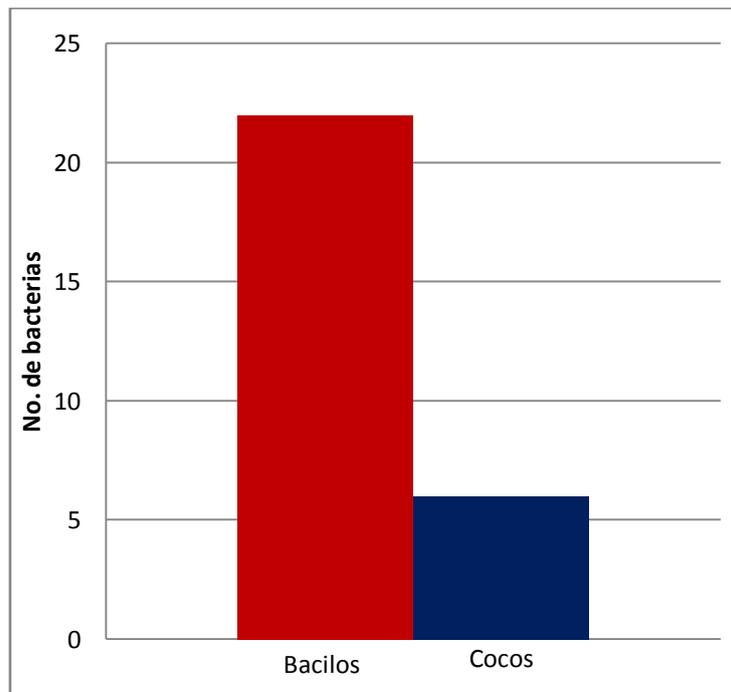


Figura 8. Gráfica de barras que muestra el número total de bacilos Gram (+) , (-) y número total de cocos Gram (+) aislados en todos los puntos del humedal muestreado.

Bacterias con respecto a su morfología microscópica

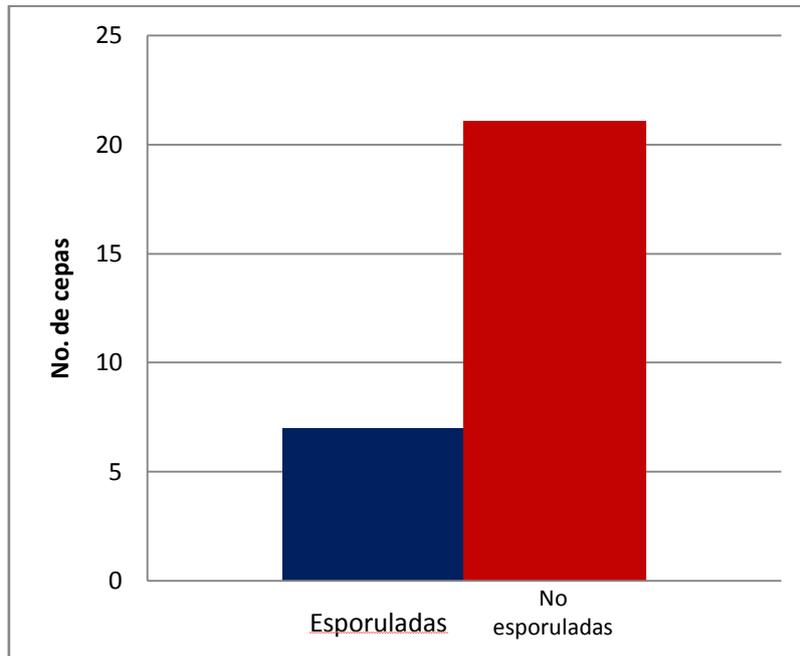


Figura 9. Gráfica de barras que representa el número de bacterias esporuladas y no esporuladas aisladas del humedal.

Las gráficas siguientes representan el porcentaje de bacterias totales que se aislaron en los sitios del humedal.

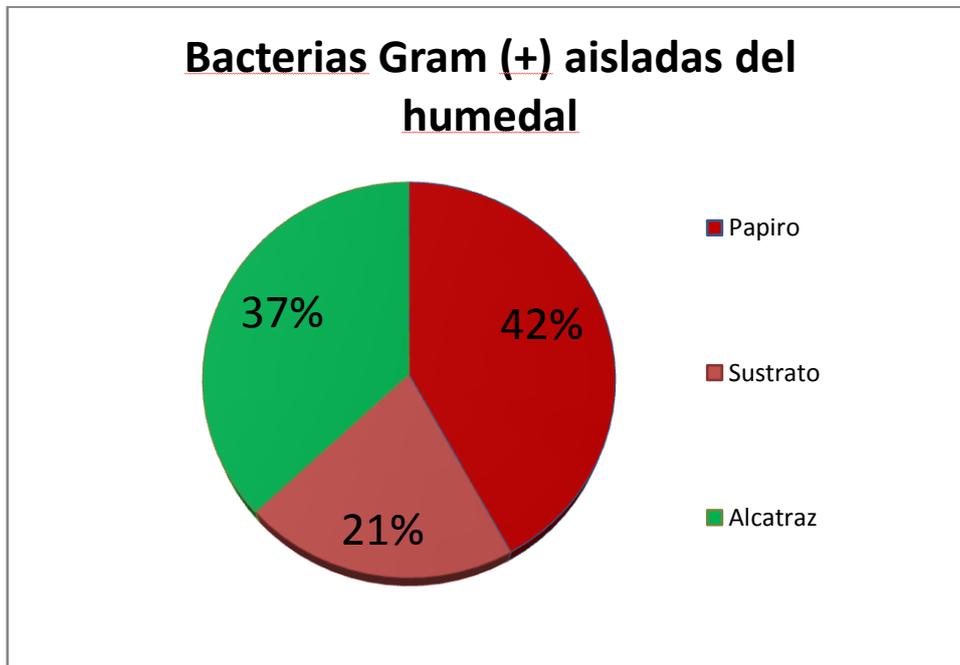


Figura 10. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram (+) aislados en los distintos puntos del humedal muestreados.

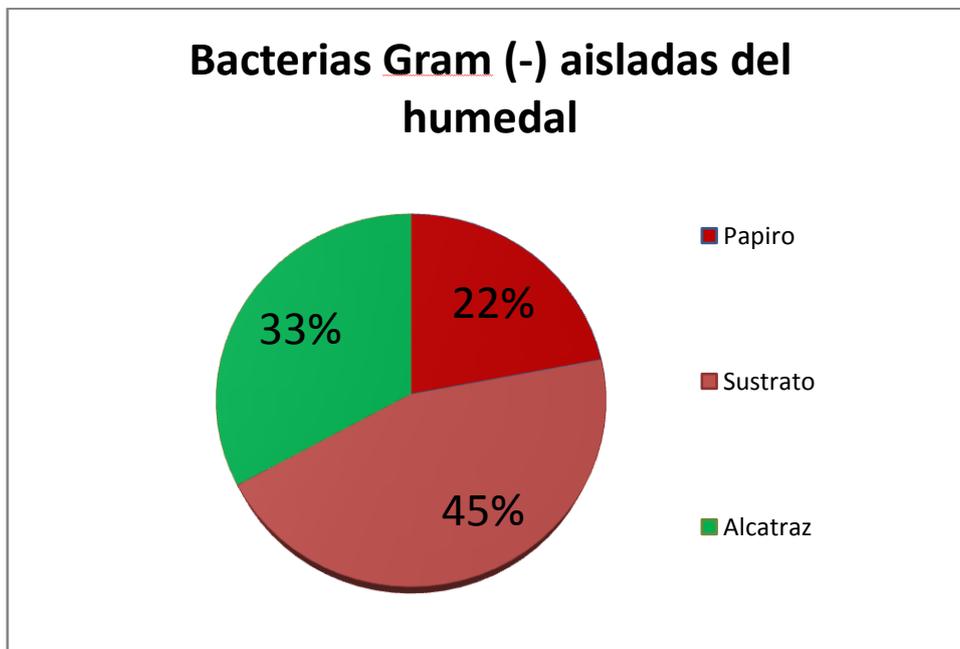


Figura 11. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram (-) aislados en los distintos puntos del humedal muestreados.

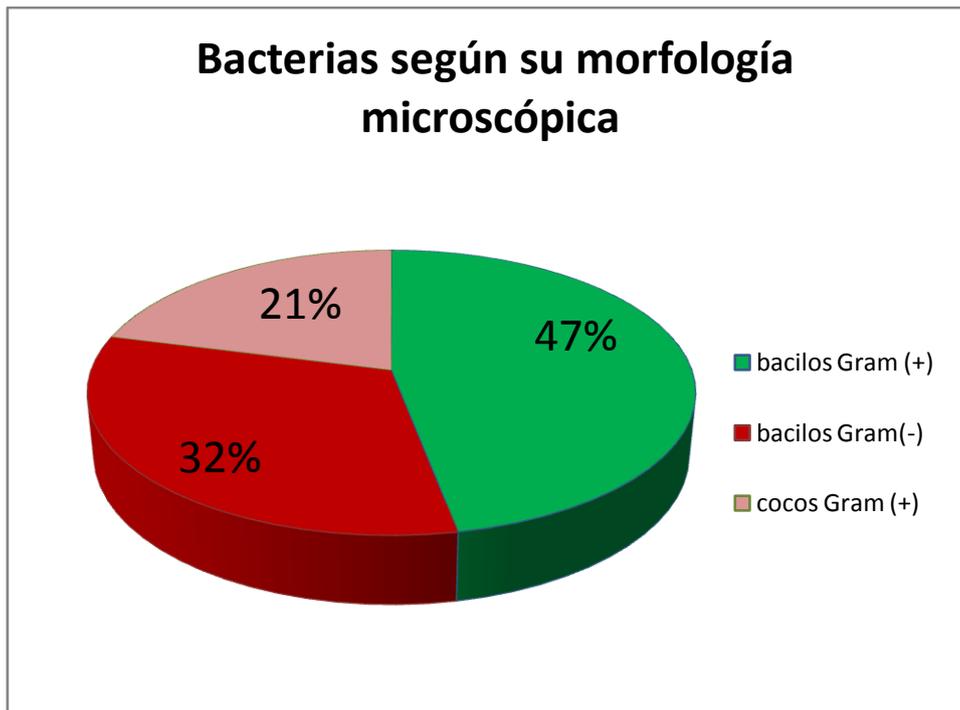


Figura 12. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram (+), Gram (-) y cocos Gram (+) según su forma microscópica aislados en el humedal.

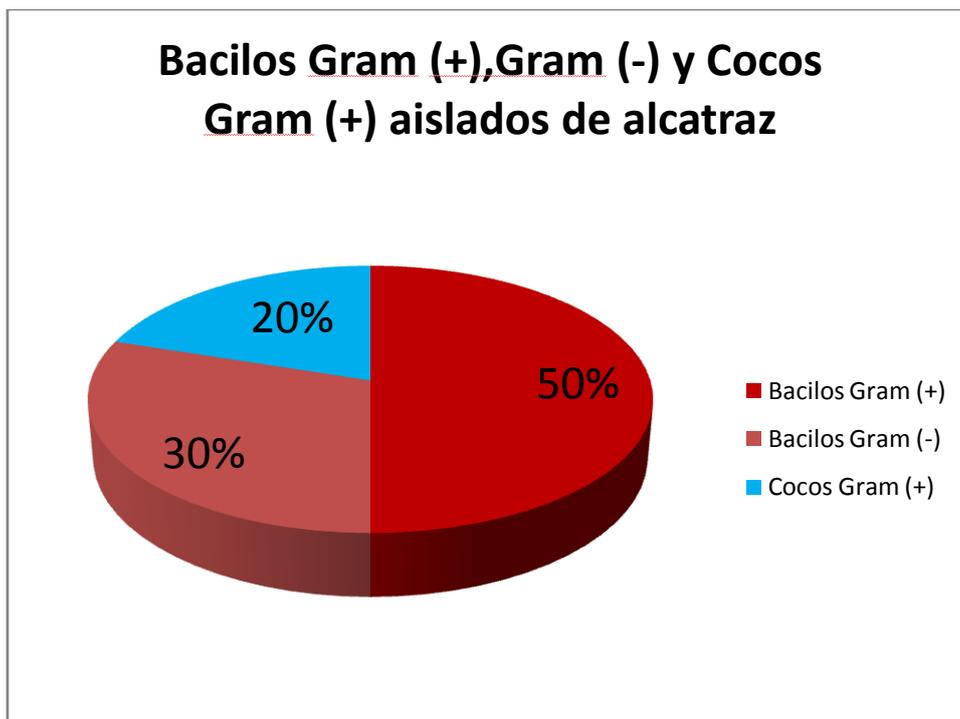


Figura 13. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram (+), Gram (-) y cocos Gram (+) aislados en el alcatraz.

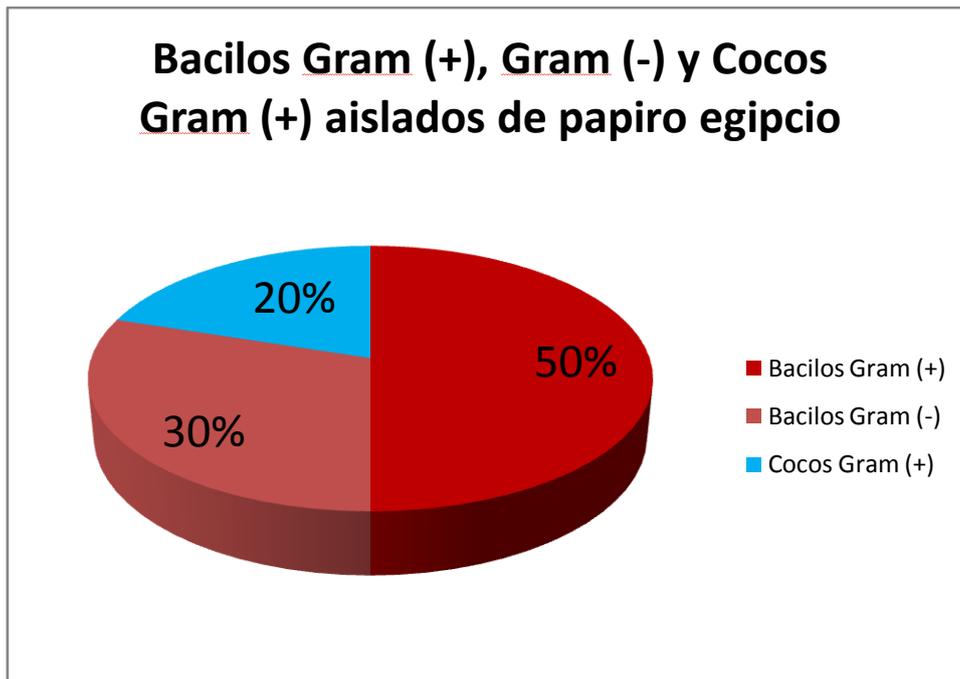


Figura 14. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram(+), Gram (-) y cocos Gram (+) aislados en el papiro.

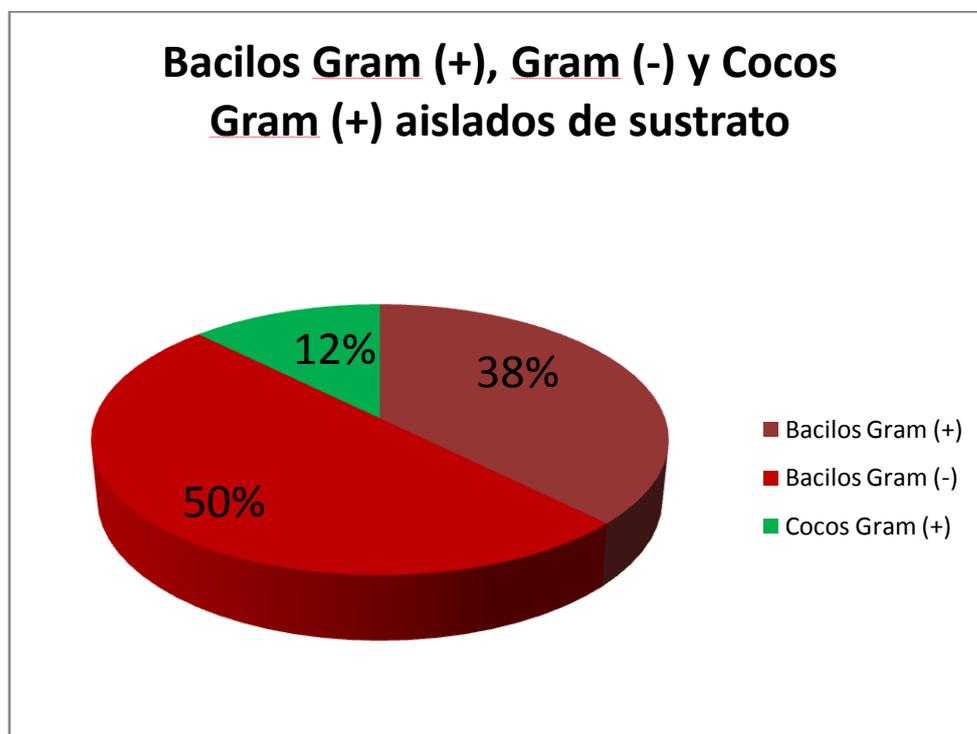


Figura 15. Gráfica de pastel que representa el porcentaje de bacterias Gram (+), Gram (-) y cocos Gram (+) aislados en el sustrato.

En este cuadro se agrupa de manera general los microorganismos, mencionando características generales de cada uno de ellos así como la frecuencia con la que fueron identificados en el humedal.

	Bacteria	Forma	Gram	Espora	Frecuencia	%
1	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo	+	✓	2	7.14
2	<i>Bacillus bovis</i>	Bacilo	+	✓	1	3.5
3	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Bacilo	-	x	3	11
4	<i>Micrococcus varians</i>	Coco	+	x	3	11
5	<i>Aeromonas caviae</i>	Bacilo	-	x	1	3.5
6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coco	+	x	1	3.5
7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Bacilo	-	x	2	7.14
8	<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilo	-	x	1	3.5
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	Coco	+	x	1	3.5
10	<i>Kurthia zopfii</i>	Bacilo	+	x	1	3.5
11	<i>Bacillus mycoides</i>	Bacilo	+	✓	1	3.5
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacilo	-	x	1	3.5
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco	+	x	1	3.5
14	<i>Paenibacillus alvei</i> (anteriormente llamado <i>Bacillus alvei</i>)	Bacilo	+	✓	3	11
15	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilo	+	x	1	3.5
16	<i>Listeria innocua</i>	Bacilo	+	x	1	3.5
17	<i>Listeria murrayi</i>	Bacilo	+	x	2	7.14
18	<i>Listeria grayi</i>	Bacilo	+	x	1	3.5
19	<i>Brucella canis</i>	Bacilo	-	x	1	3.5

Cuadro 13. Presentación general de las bacterias aisladas en el humedal.

Gram positivo : (+)

Gram negativo : (-)

Presenta espora : (✓)

Sin espora : (x)

Diagrama de caja y bigote

Este diagrama de caja y bigote muestra la distribución de los datos obtenidos en cuanto a la frecuencia del número de microorganismos identificados.

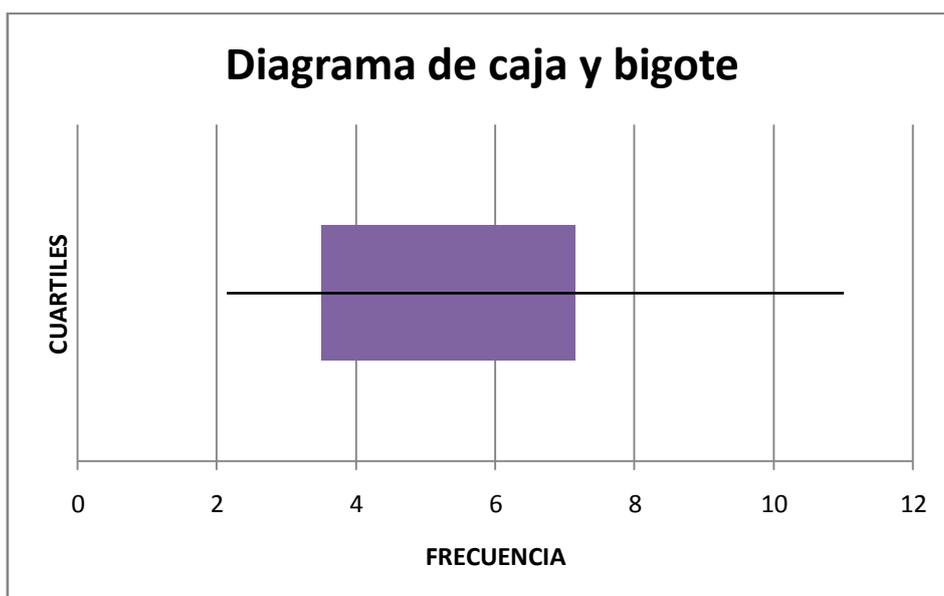
Microorganismo	Frecuencia %
1	7.14
2	3.5
3	11
4	11
5	3.5
6	3.5
7	7.14
8	3.5
9	3.5
10	3.5
11	3.5
12	3.5
13	3.5
14	11
15	3.5
16	3.5
17	7.14
18	3.5
19	3.5

Mínimo	3.5
Q1	3.5
Q2	3.5
Q3	7.14
Máximo	11

Mínimo	3.5
Q1	0
Q2	0
Q3	3.64
Máximo	3.86

Mínimo	-5.46
Máximo	12.6
Rango	
Intercuartílico	3.64*

*Valores atípicos



Analizando la gráfica se observa un sesgo hacia la izquierda, lo cual indica que los valores se concentran más hacia un punto de la escala.

Imágenes obtenidas de la morfología microscópica de las bacterias aisladas y caracterizadas encontradas en muestras de alcatraz, papiro y sustrato pertenecientes al humedal y teñidas con la tinción de Gram y Sheaffer-Fulton (para esporas).

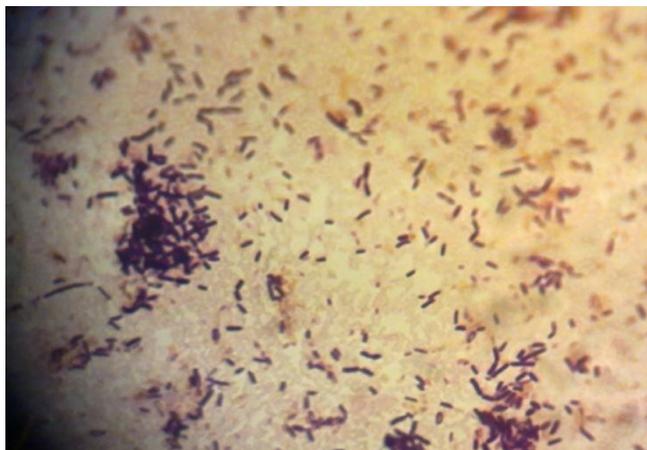


Imagen No. 1 *Bacillus subtilis* teñido por técnica de Gram.

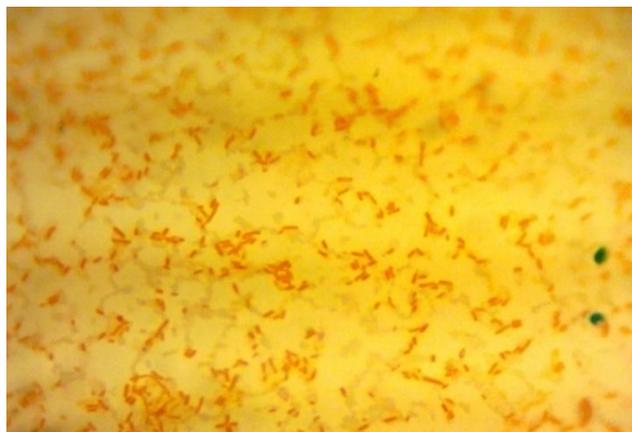


Imagen No. 2 Esporas de *Bacillus subtilis* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.

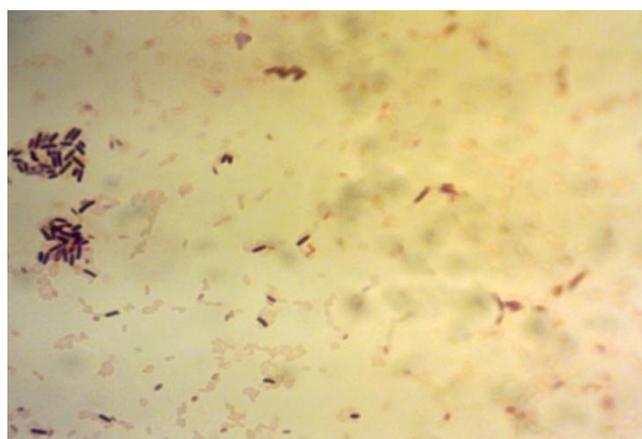


Imagen No. 3 *Bacillus bovis* teñido por técnica de Gram.

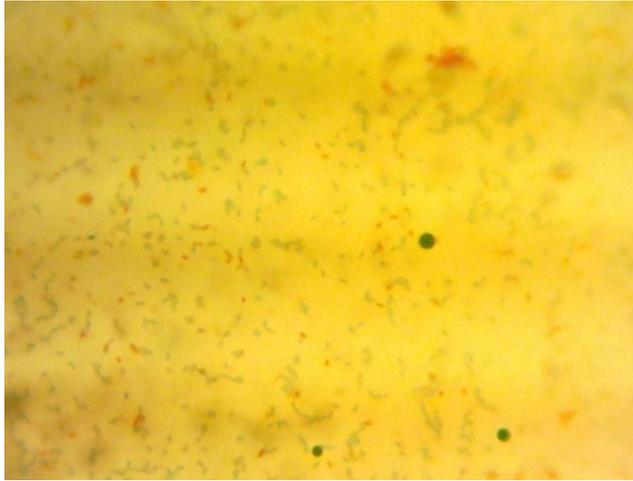


Imagen No. 4 Esporas de *Bacillus bobis* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.

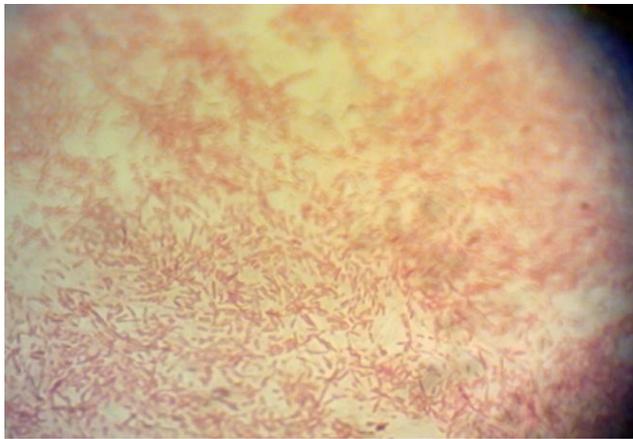


Imagen No. 5 *Aeromonas salmonicida* teñida por técnica de Gram.

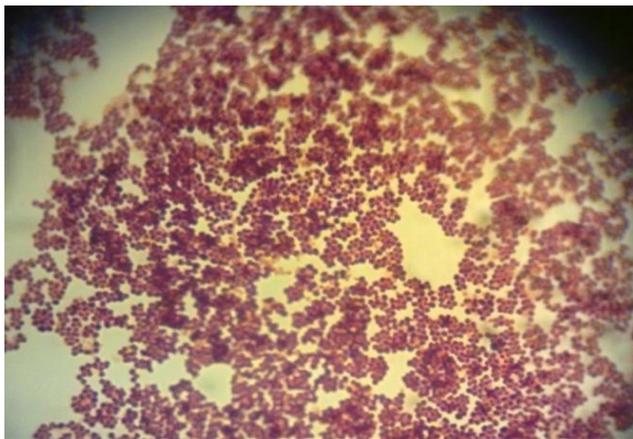


Imagen No. 6 *Micrococcus varians* teñido por técnica de Gram.

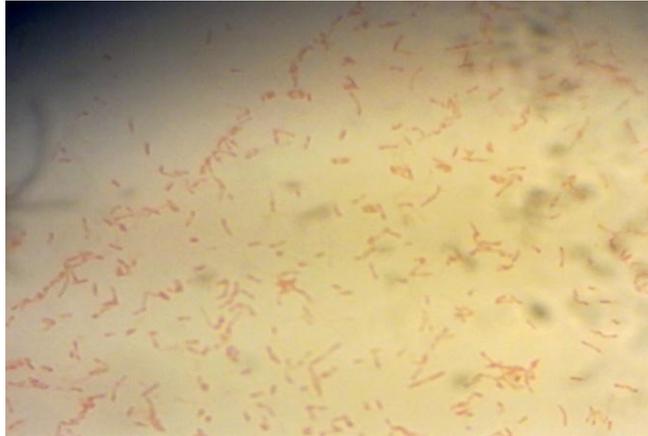


Imagen No. 7 *Aeromonas caviae* teñida por técnica de Gram.

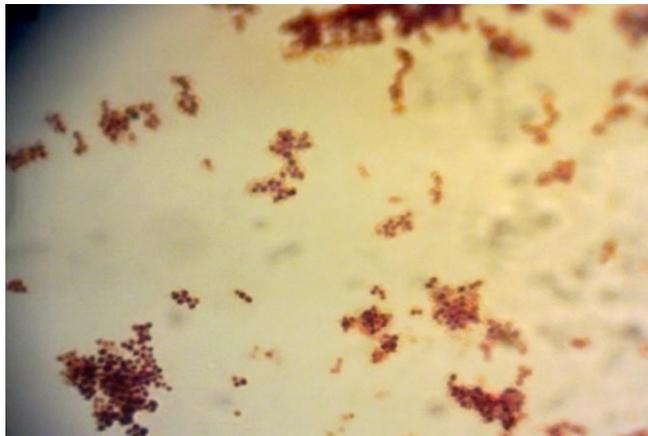


Imagen No. 8 *Staphylococcus saprophyticus* teñido por técnica de Gram.

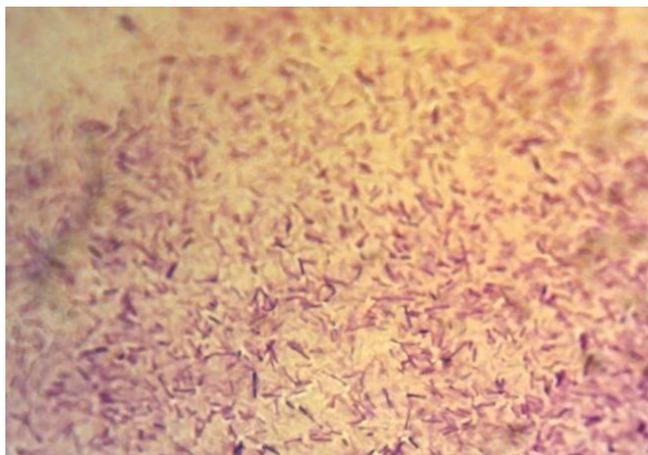


Imagen No. 9 *Acinetobacter calcoaceticus* teñido por técnica de Gram.

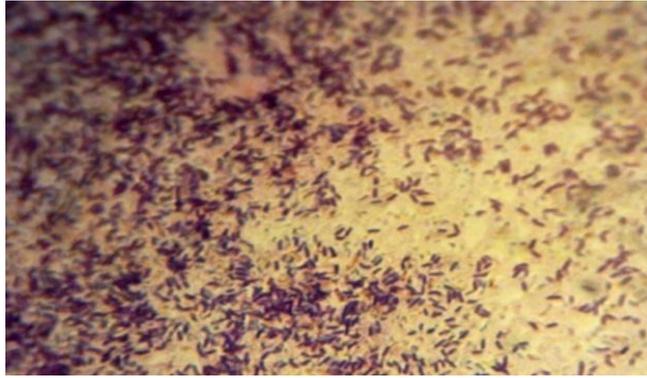


Imagen No. 10 *Acinetobacter calcoaceticus* teñido por técnica de Gram.

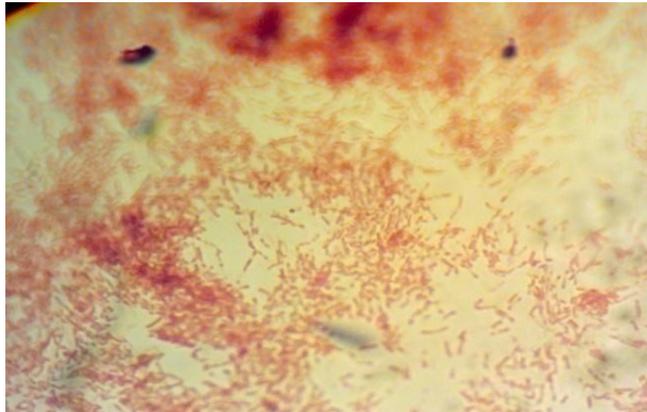


Imagen No. 11 *Citrobacter freundii* teñido por técnica de Gram.

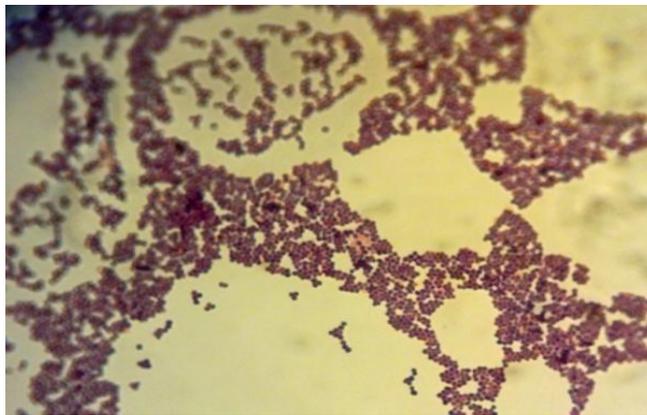


Imagen No. 12 *Enterococcus faecalis* teñido por técnica de Gram.

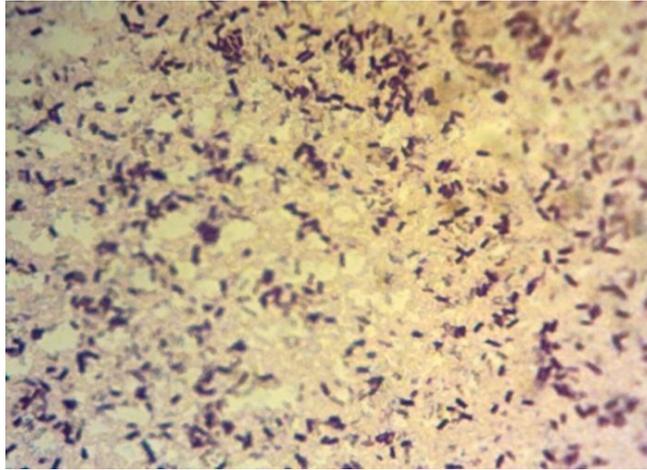


Imagen No. 13 *Kurthia zopfii* teñida por técnica de Gram.

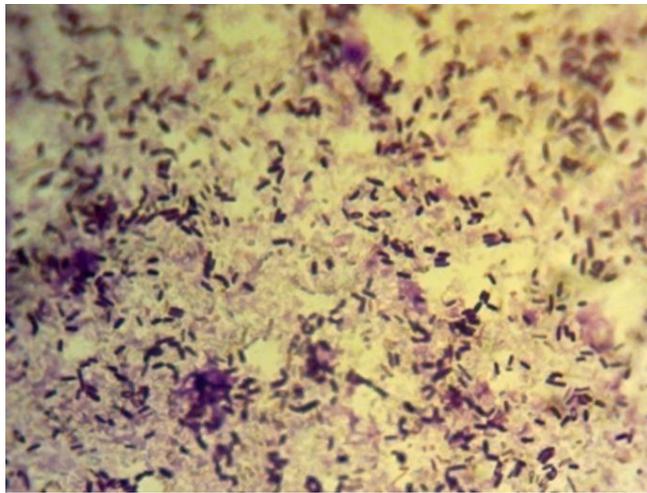


Imagen No. 14 *Bacillus mycoides* teñido por técnica de Gram.

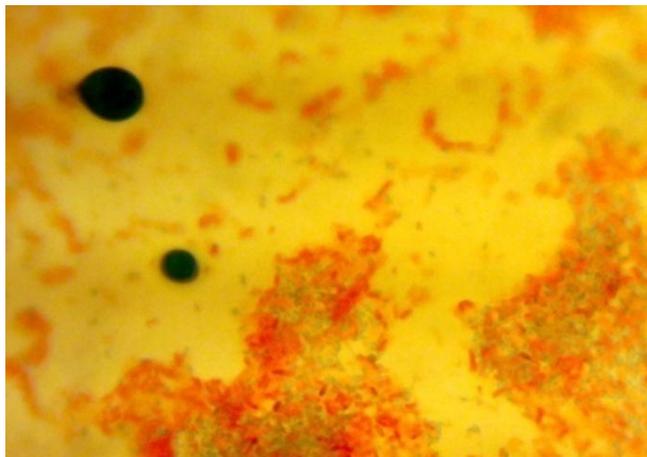


Imagen No. 15 Esporas de *Bacillus mycoides bobis* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.

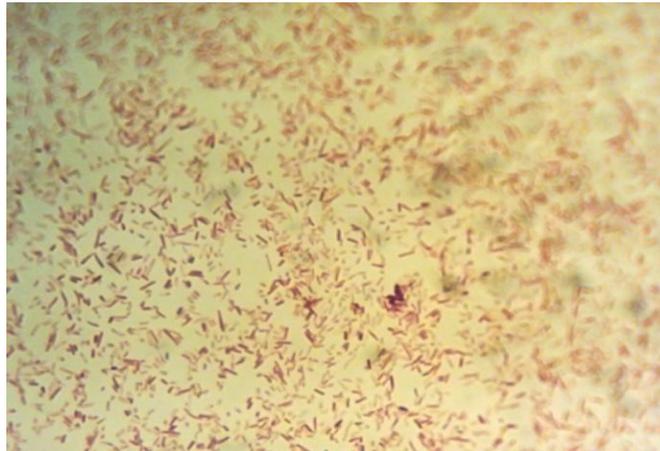


Imagen No. 16 *Pseudomonas fluorescens* teñida por técnica de Gram.

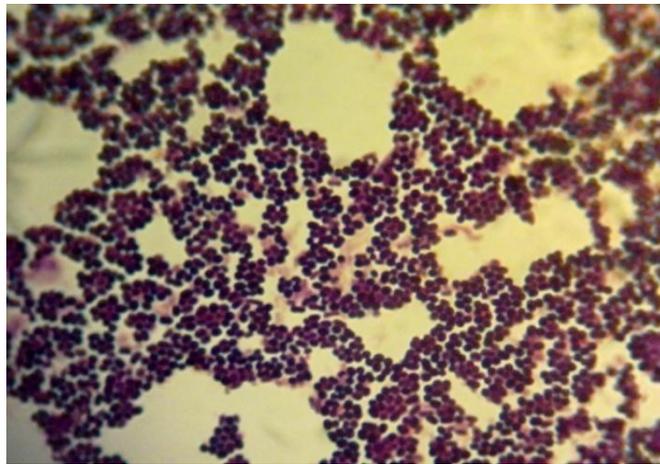


Imagen No. 17 *Micrococcus varians* teñido por técnica de Gram.

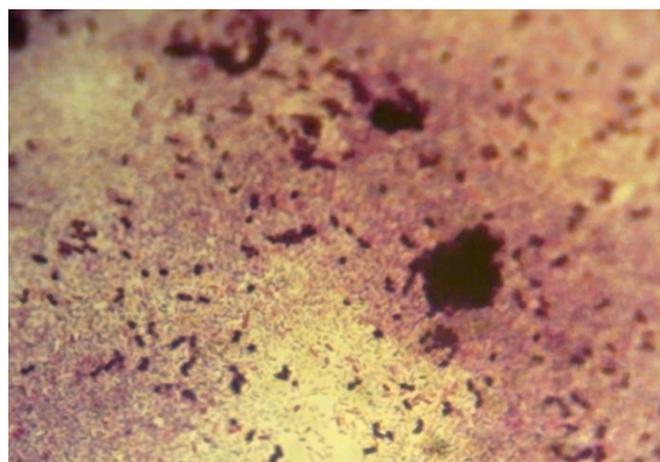


Imagen No. 18 *Staphylococcus aureus* teñido por técnica de Gram.

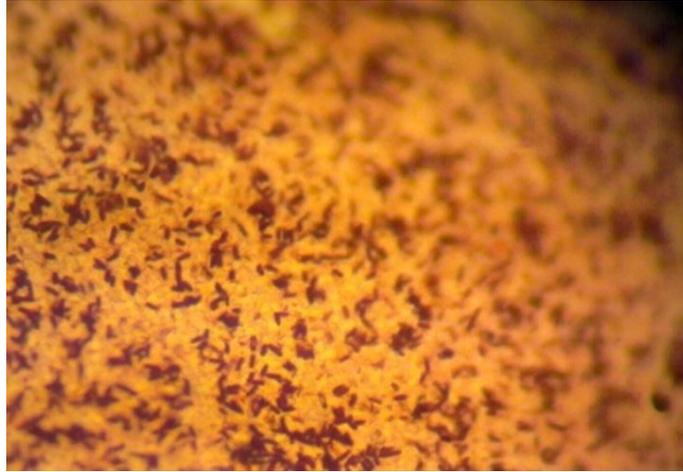


Imagen No. 19 *Paeniacyllus alvei* teñido por técnica de Gram.



Imagen No. 20 Esporas de *Bacillus alvei* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.



Imagen No. 21 *Micrococcus varians* teñido por técnica de Gram.



Imagen No. 22 *Bacillus alvei* teñido por técnica de Gram.

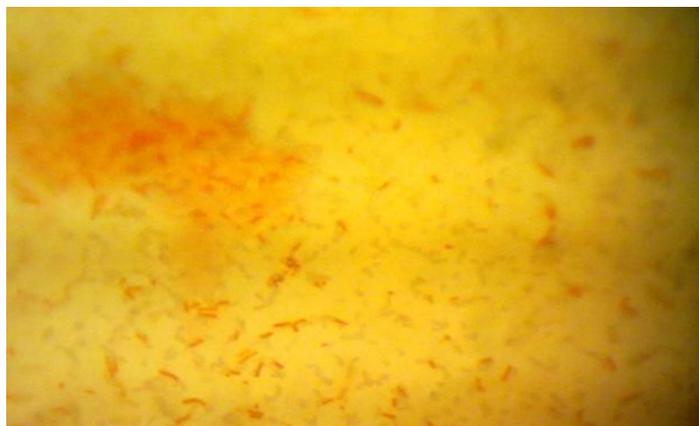


Imagen No. 23 Esporas de *Bacillus alvei* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.

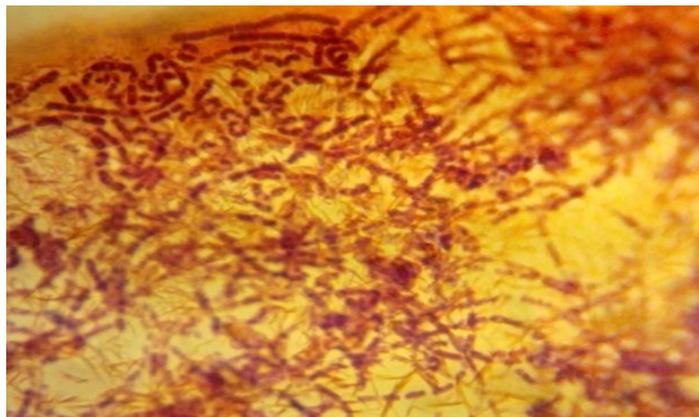


Imagen No. 24 *Listeria monocytogenes* teñida por técnica de Gram.

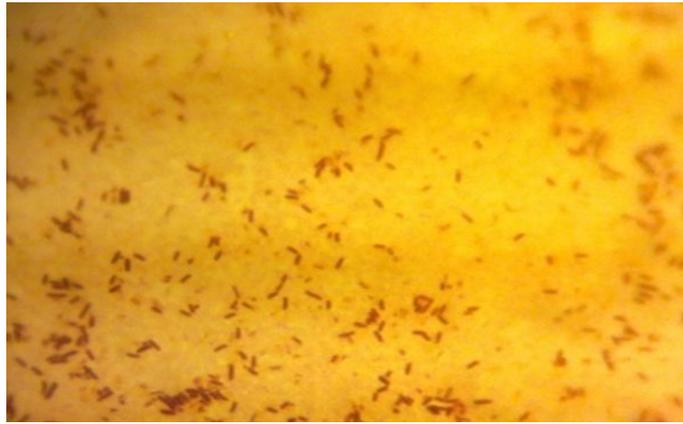


Imagen No. 25 *Bacillus alvei* teñido por técnica de Gram.

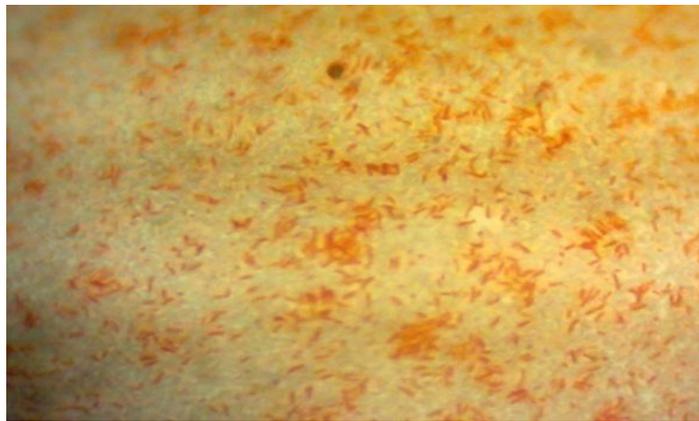


Imagen No. 26 Esporas de *Bacillus alvei alvei* teñidas por técnica de Sheaffer-Fulton.



Imagen No. 27 *Listeria innocua* teñida por técnica de Gram.

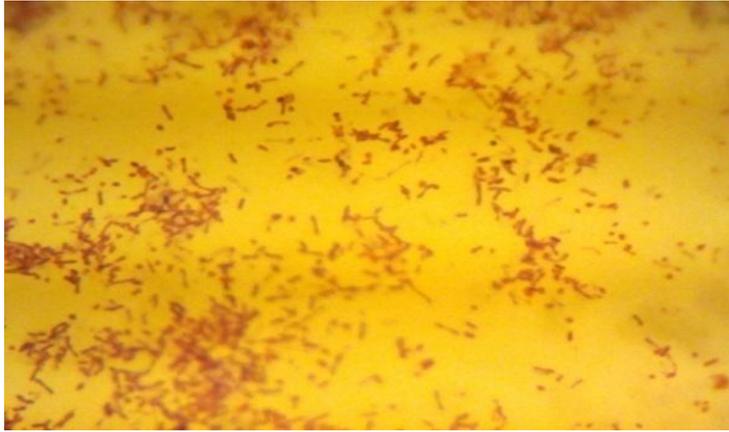


Imagen No. 28 *Aeromonas salmonicida* teñida por técnica de Gram.



Imagen No. 29 *Aeromonas salmonicida* teñida por técnica de Gram.



Imagen No. 30 *Listeria murrayi* teñida por técnica de Gram.

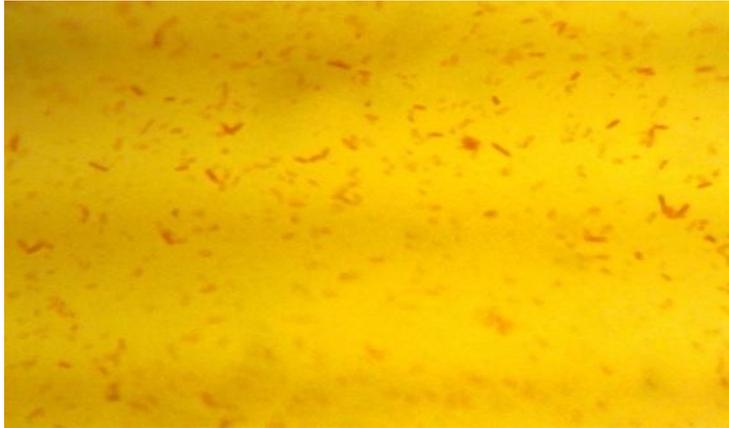


Imagen No. 31 *Listeria grayi* teñida por técnica de Gram.



Imagen No. 32 *Bacillus subtilis* teñido por técnica de Gram.

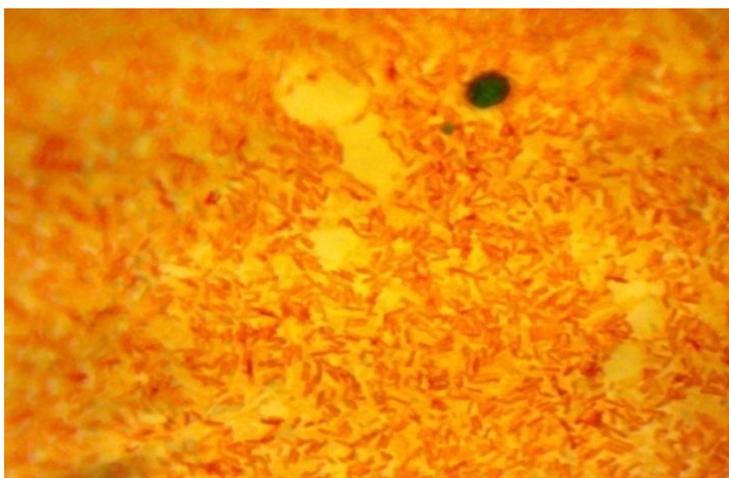


Imagen No. 33 Esporas de *Bacillus subtilis* teñido por técnica de Sheaffer-Fulton.

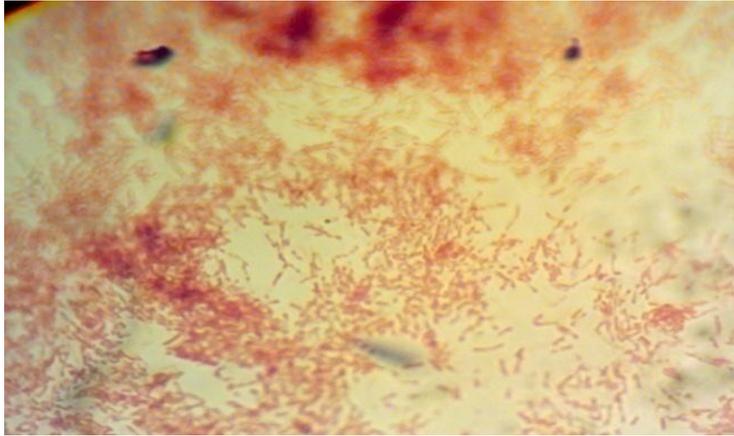


Imagen No. 34 *Brucella canis* teñida por técnica de Gram.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo con la NOM-022-SEMARNAT-2003 los componentes de un humedal comprende a las comunidades vegetales y zonas de inundación con procesos geomicrobianos cuya integridad está íntimamente ligada a la dinámica hidrológica. El humedal se caracteriza por presentar un flujo hídrico con remoción de materia orgánica, nitratos, parásitos y bacterias. A partir de trabajos previos las plantas que se emplean en el filtro corresponden a papiro egipcio (*Cyperus papyrus*) y alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*)⁽⁴⁶⁾.

Es en este punto donde se hace mención acerca de los microorganismos que habitan en un humedal, de manera general los microorganismos del suelo median muchos procesos como la nitrificación, desnitrificación, y metanogénesis que a su vez regulan el funcionamiento de los ecosistemas y también influyen en la química atmosférica. Estos procesos son de especial interés en los ecosistemas de los humedales en el ciclo de nutrientes, además que las bacterias son indicadores potencialmente útiles de la calidad del agua debido a su diversidad de especies y capacidad rápida responder a las cambiantes condiciones ambientales. La investigación biogeoquímica en humedales se ha centrado más a menudo en procesos como la metanogénesis y el control sobre la tasa de desnitrificación, y con menos frecuencia en las comunidades microbianas o en poblaciones de microorganismos específicos de interés ecológico. A sí mismo la investigación sobre las comunidades microbianas en los suelos de los humedales incluye las bacterias responsables de la reducción de sulfato. En general puede plantearse que los trabajos sobre la composición general de la comunidad microbiana en humedales es particularmente escasa⁽⁴⁷⁾.

Los descrito aquí fue lo encontrado en el humedal de Ixmiquilpan donde destaca la presencia del grupo funcional asociado a la remoción de nitrógeno mediante desnitrificación en suelos, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*^(48,49) mientras que los géneros señalados para ambientes acuáticos son *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Vibro*⁽⁵⁰⁾.

Los tres primeros fueron encontrados en el humedal de Ixmiquilpan, por lo que puede plantearse que existen las condiciones microbiológicas para que se realice la remoción de nitrógeno mediante desnitrificación. Específicamente *B.subtilis*, se ha encontrado en diversos cuerpos acuáticos con propiedades para descomponer significativamente

materia orgánica y promover la remoción de sulfuro, amonio, nitrato y metales pesados. Incluso, agregándolo en polvo para que el proceso sea más eficiente⁽⁵¹⁾.

En cuanto al género *Aeromonas* que en este trabajo se encontró se le considera frecuente de las aguas dulces ambientales en asociación con la fauna acuática y sedimento. Algunas especies son patógenas para el ser humano y otras para los peces, anguilas y batracios así como para vertebrados y algunos invertebrados^(52,53). Estos microorganismos son habitantes normales de fuentes de agua y pueden estar presentes en un alto número en agua fresca en presencia o ausencia de contaminación fecal. Las *Aeromonas* crecen en un medio ambiente con baja cantidad de nutrientes, algunos estudios han encontrado una significativa correlación entre la presencia de *Aeromonas* y el estado trófico de las aguas dulces⁽⁵³⁾. Con referencia en investigaciones recientes *Aeromonas* se relaciona estrechamente con casos de infección en peces los cuales mueren por necrosis de tejido parenquimatoso, hígado, bazo y riñones, igualmente por lesiones necróticas encontradas en branquias e intestino, encontrándose mayor número de microorganismos vivos en hígado y riñón. En consecuencia se encontró a sí mismo que el agua contaminada con este microorganismo ocurrieron cambios ambientales en el agua como el pH, temperatura y contenido de oxígeno^(54,55), en este sentido se comprende que el deterioro del estado fisiológico del pescado estimula la reproducción y propagación de *Aeromonas salmonicida* y que la infección se disemine a través de los cuerpos de agua de manera que esto resulte muy peligroso para la naturaleza, las especies de peces y el hombre.

Micrococcus varians, *Acinetobacter alcoeticus* y *Pseudomonas* son microorganismos con actividad de reducción de nitrato a gas de nitrógeno⁽⁵⁶⁾ y son frecuentes en ambientes tales como estaciones depuradoras de aguas residuales, en los montones de abono compuesto y en el suelo fértil donde el gas de nitrógeno liberado llega a formar parte de la atmósfera. Dichos microorganismos participan activamente en la biorremediación la cual se considera como un eficiente y de bajo costo proceso biotecnológico para limpiar el medio ambiente contaminado⁽⁵⁷⁾.

Micrococcus varians ha manifestado capacidad para degradar petróleo crudo cuando existe un derrame, esto refleja que la microbiota heterótrofa presente en el suelo es utilizadora de petróleo crudo y capaz de degradar compuestos orgánicos clorados de igual manera mineralizar estos productos químicos y utilizarlos como fuentes de energía

de carbono, llama la atención que para que pueda efectuarse una exitosa degradación de compuestos orgánicos deben existir factores ambientales que no afecten la biodegradación y en estos se incluyen la temperatura, nutrientes, oxígeno, pH, y la salinidad⁽⁵⁸⁾.

Paenibacillus alvei (anteriormente llamado *Bacillus alvei*) es una bacteria aerobia que produce esporas y se desarrolla favorablemente en campos agrícolas y puede contribuir de manera directa o indirecta a la productividad de los cultivos. Algunas poblaciones de estos microorganismos eliminan agentes patógenos de plantas y plagas mediante la producción de metabolitos (antibióticos), mientras que otros pueden estimular directamente las defensas del huésped de la planta antes de la infección, algunas cepas pueden también estimular la absorción de nutrientes por las plantas, ya sea mediante la promoción de rizobios y simbiosis de micorrizas o mediante la fijación de nitrógeno atmosférico directamente. Un número considerable de estas cepas ya se ha comercializado como fungicidas biológicos, insecticidas y nematicidas o promotores del crecimiento vegetal⁽⁵⁹⁾.

Bacillus subtilis ejerce un efecto positivo en el crecimiento de cultivos agrícolas, plantas silvestres, árboles y microalgas a través de diferentes mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, es capaz de fijar el nitrógeno y originar una acumulación de amonio en el medio donde se desarrolla además de que tiene potencial para mejorar el tratamiento de aguas residuales⁽⁶⁰⁾.

Acinetobacter calcoaceticus se puede encontrar en diferentes hábitats que incluyen el suelo, la rizosfera, las plantas y el aguasuelo y una amplia variedad de sustratos, aunque generalmente se considera no patógena se han encontrado cepas de *Acinetobacter* como agente causante infección nosocomial. Dentro del humedal *Acinetobacter* juega un papel en la sulfoxidación en la cual se reoxida el sulfuro formado, La degradación de compuestos organosulfurados como los bencensulfonatos. *A. calcoaceticus* es capaz de gradar insecticidas (por ejemplo clorpirifós) en el medio y de es amañera biorremediar suelos agrícolas contaminados con insecticida. El microorganismo posee un gran potencial de biorremediación para la eliminación eficaz de la contaminación de plaguicidas químicos y residuos en el medio ambiente⁽⁵⁷⁾.

Además, informes recientes han descrito propiedades que poseen *A. calcoaceticus* tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, la producción de sideróforo (compuesto quelante de hierro secretado por algunos microorganismos), amoniaco, giberelina (son fitohormonas que inducen la floración en algunas plantas), y ácidos orgánicos, todas estas propiedades son importantes en los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, también se ha mostrado múltiples rasgos de solubilización de fosfato, -3-indol-acético ácido y producción de sideróforos lo cual implica que el microorganismo tiene aplicaciones potenciales en la promoción del crecimiento de las plantas y puede ser eficaz para controlar regiones con problemas ambientales y agronómicos⁽⁵⁸⁾.

El género *Listeria sp* puede ser aislado de varios ambientes diferentes incluyendo el suelo, la vegetación, el agua, alimentos para animales, entornos agrícolas y ambientes de procesamiento de alimentos. Se ha reportado la presencia de *Listeria sp* en muestras de suelo que va desde un 8.7 % a 51.4 % para los sitios agrícolas mientras que en sitios no agrícolas se ha encontrado un intervalo de 15.2 % a 43.2 %. Estudios acerca de aguas superficiales muestran que una de las especies más comúnmente encontradas de este género es *Listeria monocytogenes* y *L. innocua* como las más prevalentes⁽⁶¹⁾.

El género *Pseudomonas* presenta una distribución mundial, con una localización preferencial en ambientes húmedos, fuentes de agua, suelos, plantas, incluyendo frutas y vegetales para el consumo humano. Es una bacteria que no se considera autóctona del suelo y el agua, puede derivar de heces humanas y animales, su detección en agua se asocia con polución por descarga de aguas residuales, por lo tanto hay una estrecha correlación de su presencia en ambientes acuáticos con fenómenos de contaminación. Estos microorganismos crecen en muy baja concentración de nutrientes en medio ambiente acuoso y puede sobrevivir durante muchos meses en agua y suelo a temperatura ambiente⁽⁶²⁾. *Pseudomonas* ha sido aislada de suelos, de reactores empleados en tratamiento de efluentes y hasta de respiraderos marinos. Su metabolismo incluye la oxidación de S_2^- a SO y de $S_2O_{32}^-$ a $S_4O_{62}^-$, además del uso de dimetil sulfuro (DMS) como fuente de S al igual que *Acinetobacter*⁽⁶³⁾.

Evaluando la dispersión de los resultados por el diagrama de caja y bigote, nos damos cuenta que la dispersión es muy alta, esto es aceptable y correcto ya que considerando que la variabilidad de la biota que coloniza el suelo es muy grande esto se corrobora por medio de esta gráfica, la línea representa la simetría, si esta relativamente en el centro de la caja, indica que la distribución es simétrica.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El número total de microorganismos aislados e identificados en el humedal durante todos los meses de muestreo son de 10 cepas en alcatraz, 10 cepas en papiro egipcio y 8 cepas en el sustrato, a este respecto se puede decir que en el sustrato inerte las condiciones para que se desarrollen de manera favorable los microorganismos no son las adecuadas como ocurre con el alcatraz y el papiro, sin embargo como la cantidad de cepas aisladas en cada punto de muestreo no distan mucho, al parecer no existen cambios importantes a nivel de rizosfera y sustrato que nos indiquen que los microorganismos colonicen de manera mayoritaria alguno de los sitios muestreados y analizados. Referente al tipo de bacterias identificadas, se estimó que 67.85% (19 cepas) son Gram (+) y 32.14% (9 cepas) son Gram (-) como se representa en la figura 7 lo cual se evidenció por medio de una tinción por la técnica de Gram, mientras que 78.57% (22 cepas) se identificaron como bacilos y 21.42% (6 cepas) como cocos (figura 8 respectivamente). Por otra parte en cuanto a su capacidad para esporular se cuantificaron 25% (7 cepas) de bacterias esporuladas y 75% (21 cepas) no esporuladas (figura 9), la mayor cantidad de bacterias no esporuladas puede atribuirse al predominio del medio acuático en el humedal, por lo que las bacterias esporuladas tienen desventaja en la colonización.

Los géneros que representan importancia médica por sus mecanismos de patogenicidad para con el hombre se encuentran *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Listeria* y *Brucella*. Cabe mencionar que para la identificación de hongos esto no fue posible debido a que no hubo un desarrollo de estos en el medio de cultivo destinado para tal fin (PDA), posiblemente por que fueron suprimidos o destruidos por el desarrollo de las bacterias presentes. Razón por la cual son necesarios mayores muestreos en periodos de tiempo más frecuentes para determinar la frecuencia de una diversidad más clara del tipo de microorganismos que colonizan el humedal.

ANEXOS



Alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*)



Papiro egipcio (*Cyperus papyrus*)



Sustrato inerte (grava)

MEDIOS DE CULTIVO

Agar de Soya Trypticaseína

Fórmula aproximada en g/L

Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15

Pesar según las indicaciones del fabricante y disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave entre 118 °C y 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos.

Caldo nitrato

Fórmula aproximada en g/L

Extracto de carne	3.0
Peptona de carne	5.0
Nitrato de potasio	1.0

Pesar según las indicaciones del fabricante y disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos.

Caldo rojo de fenol base para carbohidratos

Fórmula aproximada en g/L

Peptona de carne	10
Extracto de carne	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.018
Carbohidrato a fermentar	7.0

Pesar según las indicaciones del fabricante y disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 110 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 10 minutos.

Caldo rojo de metilo-Vogues Proskauer

Fórmula aproximada en g/L

Glucosa	5.0
Peptona de carne	5.0
Fosfato dipotásico	5.0

Pesar según las indicaciones del fabricante y disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7 ±0.2.

Agar Citrato de Simmons

Fórmula aproximada en g/L

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
Citrato de sodio	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15 a 20
Azul de bromotimol	8.0

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7 ±0.2.

Agar Kliger Hierro

Fórmula aproximada en g/L

Extracto de carne	3.0
Extracto de levadura	3.0
Peptona de carne	15
Proteosa peptona	5.0
Lactosa	10
Glucosa	1.0
Sulfato ferroso	0.2
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	0.3
Agar	12
Rojo de fenol	0.024

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7 ±0.2.

Agar EMB

Fórmula aproximada en g/L

Peptona de carne	10
K ₂ HPO ₄	2.0
Lactosa	10
Eosina Y, amarillenta	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar	13.5

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7 ±0.2.

Agar SIM

Fórmula aproximada en g/L

Extracto de carne	3.0
Peptona de carne	30
Hierro peptonizado	0.2
Tosulfato de sodio	0.025
Agar	3.0

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7 ±0.2.

Agar PDA

Fórmula aproximada en g/L

Infusión de papa	200
Dextrosa	20
Agar	15

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 5.5 ±0.2.

Agar de hierro y lisina

Fórmula aproximada en g/L

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
Dextrosa	1.0
L-lisina	10
Citrato de amonio férrico	0.50
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	13.50

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 6.7 ±0.2.

Agar FLO

Fórmula aproximada en g/L

Mezcla de peptonas	20
Fosfato dipotásico	1.5
Sulfato de magnesio	1.5
Agar	14

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, agregar 10 mL de glicerol, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7.0 ±0.2.

Base caldo KCN

Fórmula aproximada en g/L

Mezcla de peptonas	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de potasio	0.225
Fosfato de sodio	5.640

Pesar según las indicaciones del fabricante, disolver en 1 L de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C a una presión no mayor de 15 lb/plg² durante 15 minutos. Ajustar el pH a 7.6 ±0.2. Añadir 15 ml de una solución de KCN al 0.5 %.

REFERENCIAS

1. Seoáñez CM. Aguas residuales: Tratamiento por humedales artificiales. Fundamentos científicos. Tecnologías. Diseño. Madrid: Mundi-Prensa; 1999.
2. Brix H. Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales. Ciencia e ingeniería Neogranadina. 2003; 13: 17-24.
3. Gutierrez CT. Apuntes de ecología microbiana. Ed. IPN. México; 1996.
4. Cuellar CR, Martínez P. Alternativas para el control de aguas residuales en México. Memoria del primer Congreso nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 1978; 1:57.
5. Mireles MRJJ. Modelos de evaluación tecnológica para los procesos y operaciones unitarias con aplicación al tratamiento y purificación de aguas en el entorno de la ley nacional de aguas. [tesis].Facultad de Química:UNAM;2004.
6. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca.NOM-003-ECOL-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicio al público.
7. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca .NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
8. Laws EA. Aquatic pollution. Jhon Wiley & Sons, New York, U.S.A; 1981.
9. Okun FG. Abastecimiento de agua y remoción de aguas residuales. Ingeniería sanitaria y de aguas residuales. Tomo 1. Ed. Limusa, Madrid, España; 1990.
10. Thurston RV, Russo RC, Vinogradov GA. Ammonia toxicity to fish. Effect of pH on the toxic of the unionized ammonia species. Environ. Sci. Technol. 1981; 15(7): 837-840.
11. Spigarelli SA, Thomes MM, Prepejchal W. Thermal and metabolic factors affecting PCB uptake by adult brown trout. Environ. Sci. Technol.1983; 15(7):837-840.
12. Cairns J, Healt AG, Paker BC. The effects of temperature upon the toxicity of chemical to aquatic organism. Hydrobiology. 1975;47(1):135-171.
13. Heitmuller PT, Hodson PT. Acute toxicity of 54 industrial chemicals to sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). Bull. Environn. Contan. Toxicol.1988; 27:596-604.
14. Bryan FL. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. J. Food Protect.1977; 40:45–56.

15. Bitton G. Wastwater microbiology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. USA; 2005.
16. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington, D.C; 2012.
17. Moreno ME. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. México. 1988.
18. Mitchell R. Enviromental microbiology. Ed John Willey-Liss Inc. New York, USA. 1992.
19. Edwards CA, Steiner BR, Steiner D, and Rabatin S. Biological interactions in soil. Elsevier Science Publishin & company Inc. New York, USA; 1995.
20. Rao NS. Soil Microorganism & Plant Growth. Science Publishers. New York, USA; 1995.
21. IWA. Constructed wetlands for pollution control. Processes, performance, design an operation IWA Specialist group on use on macrophytes in water pollution control. IWA publishing, London, England; 2000.
22. Environmental Laboratory Corps of Engineers. Wetlands delineation manual. Technical report Y-87-1. U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station. Vicksburg, MS, USA; 1998.
23. Mitsch WJ, Gosselink JG. Wetlands. 3rd ed. John Wiley and Sons. New York, NY, USA, 2000.
24. Hoffman H, Platzer C, Von Muench E, Winker M. Technology review of constructed wetlands. Deutsche Gesellschaft für International Zusammenarbeit (GIZ) GmbH; 2011.
25. Börner T, Felde K, Gschössl E, Kunst S, Wising F. Germany, en Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe. The Netherlands. 1998. 169-190.
26. Vymazal J, Brix, H, Cooper PF, Green MB, Haberl R. Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe. Backhuys Publisher, Leiden. The Netherlands; 1998.
27. Brix H. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? Wat. Sci. Tech. 1997; 35: 11-17
28. Cooper P. A review of the design and performance of vertical flow and hybrid reed bed treatment system. En procedings of 6th International Conference on Wetlands System for Water Pollution Control, Aguas de Sao Pedro, Brazil. September 27 a October 2. 1998 (ed. Tauk-Tornisielo).

29. Martín A. Introducción a la microbiología del suelo. 2ed. México. AGT editores. 1980.
30. Ríos GF. Microbiología agrícola. Apoyos académicos No. 18. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección de difusión cultural. 1992.
31. Miranda CHB, Boddey RM. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grow in nitrogen soil. *Agronomy J.* 1987; 79: 558-562.
32. Box JE, Hammond LC. Rhizosphere dynamics . Selected symposium 113. Ed. Westview Press. Boulder, Colorado, EUA. 1990.
33. Curl EA, Truelove B. The rhizosphere. Ed. Springer –Verlag. Nueva York, EUA. 1986.
34. Garcia GMM, Sánchez YMJ, Peña CCJ, Moreno Z PE. Respuesta del maíz (*Zea mays L.*) a la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno. *Terra.* 1995; 13: 71-79.
35. Hebbar KP, Atkinson D, Tucker W, Dart PJ. Supresion of *Fusarium moniliforme* by maize rot-associated *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 1992; 24: 1009-1020.
36. Heulin T, Rahman M, Omar AMN, Rafidison Z, Pierrat JC, Balandreau J. Experimental and mathematical procedures for comparing N₂-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *J. Microbiol. Methods.* 1989; 9:163-173.
37. Klopper J.W, Scher FM, Laliberté M, Zaleska I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. *Can. J. Microbiol.* 1985;31:926-929.
38. Klopper JW, Kábana RR, MaInroy JA, Young RW. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant soil.* 1992;130:75-84.
39. Khammas KM; Ageron E; Grimont, PAD; Kaiser P. The nitrogen-fixing bacteria from Iraqi rice-field soils. *Eur. J. Soil. Biol.* 1994; 30:101-106.
40. Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J. Microbial activity in the rhizosphere. *Soil biology.* Springer, New York; 2006.
41. Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Global patterns in below ground communities. *EcolLett.* Cleveland CC. 2009;12:1238–1249.
42. Ettema CH, Wardle DA. Spatial soil ecology. *Trends Ecol* vol.2002;17:177–183.

43. Wardle DA. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecol Lett.*2006;9:870–886.
44. Fierer N, Lennon JT. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am. J. Bot.*2011; 98:439–448.
45. Sharma KD. *Microbiology*. India. Alpha Science International Ltd. Oxford, U.K. 2013.
46. Belmont M, Cantellano E, Thompson S, Williamson M, Sanchez, Metcalfle CD. Treatment of domestic wastewater in a pilot-scale natural treatment suestem in central México. *Ecol. Eng.* 2004; 23:299-311.
47. Gutknecht JLM, Goodman RM, Balsler TC. Linking soil process and microbial ecology in fresh water wetland ecosystems. *Plant and soil*. Springer. Oct. 2006;289:17-34.
48. Shipin O, Kootatep T, Khonan NTT, Polprasert C. Integrated natural treatment system for developing comunites: low-tech N-remoral through the fluctuating microbial pathways. *WaterSci. Technol.* 2005;51:299-306.
49. Faulwatter JL, Gangnon V, Sundberg C, Chazarenc F, Burr MD, Brisson J, Camper AK, Stein OR. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecol. Eng.* 2009; 35:987-1004.
50. Wanda M. Relationship between water pollution and bacterial flora in review water. *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 1993; 48(3): 707-720.
51. Scheng YF, Chen G, Scheng JF. Comprehensive remediation of a heavily pollute driver in Guangzhous, South China. *Aquat. Ecosyst. Healt Manage.* 2012; 15:219-226.
52. Janda JM. Recent advances in the study of taxonomy pathogenicity and infections syndromes associated with genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4:397-410.
53. Joseph SW, Carnaham AM. Update of the genus *Aeromonas*. *ASM News.* 2003; 66:218-223.
54. Rippey S, Cabelli V. Use of thermotolerant *Aeromonas* group for the trophic classification of fresh waters. *Water research.* 1989;23: 1107-1114.
55. Arbaciauskiene VS, Kazlauskiené N, Vosyliené MZ, Virbickas T. *Aeromonas salmonicida* infected fish transfer disease to healthy fish via water. *Cent. Eur. J. Biol.* 2012 May 25; 7(5): 878-885.

56. Miranda LAS, Sant'Anna ES, Porto ACS. The growth of *Micrococcus varians* by utilizing sugar cane blackstrap molasses as substrate. *Rev. Microbiol.* 1999 May 21; 30(2): 125-129.
57. Zhao L, Wang F, Zhao J. Identification and functional characteristic of chlorpyrifos-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Basic Microbiol.* 2013 May 26; 00: 1-7.
58. Dindar E, Sagban FOT, Baskaya HS. Biorremediation of petroleum-contaminated Soil. *J. Biol. Environ. SCI.* 2013 May 27; 7(19): 39-47.
59. Garder BM. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *The American Phytopathological Society.* 2004 Jun 23;94(11): 1252-1258.
60. Hernandez JP, de Bashan LE, Rodríguez DJ, Rodríguez Y, Bashan Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumillus* from a rid zone soils. 2009. *Eur J Soil Biol.* 45: 88-93.
61. Saunders BD, Overderest J, Fortes E, Windham K, Schunkken Y, Lembo A, Wiedman M. Diversity of *Listeria* species in urban an natural environments. *App. Environ. Microbiol.* 2012 April 13: 78(12): 4420-4433.
62. De Vicente A, Codina J, Borrego C, Romero P. Relationship *between Pseudomonas aeruginosa* and bacteria indicators in polluted natural waters. *Wat. Sc. Tech.* 1991;24: 121-124.
63. Pacheco JRA, Maldonado MV, Peña JJC. Metabolismo del azufre de aislados bacterianos provenientes de un humedal artificial empleado para el tratamiento de efluentes de la industria curtidora. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 2012; 28(3): 195-201.