

## METABOLISMO DEL AZUFRE DE AISLADOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE UN HUMEDAL ARTIFICIAL EMPLEADO PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CURTIDORA

Juan Ramiro PACHECO AGUILAR<sup>1\*</sup>, María MALDONADO VEGA<sup>2</sup> y Juan José PEÑA CABRIALES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental. Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Km. 9.6. Libramiento Norte, carretera Irapuato-León. Apdo. Postal 629, C.P. 36500. Irapuato, Gto. México

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Ambiental. Centro de Innovación en Tecnologías Competitivas, CIATEC A.C. Omega 201, Fracc. Industrial Delta. C.P. 37545, León Gto. México

\*Autor responsable; juanramiro29@yahoo.com.mx

(Recibido marzo 2011, aceptado abril 2012)

Palabras clave: oxidación, sulfuro ( $S^{2-}$ ), azufre elemental ( $S^0$ ), tiosulfato ( $S_2O_6^{2-}$ ), tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*

### RESUMEN

Los humedales artificiales constituyen una alternativa para el tratamiento de efluentes, donde los procesos biológicos de oxidación originados por la rizósfera de las plantas y los microorganismos presentes *in situ*, contribuyen para la remoción de contaminantes. En el presente trabajo se caracterizó el metabolismo del azufre (S) de diez bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas*, las cuales fueron aisladas de un humedal construido para el tratamiento de efluentes con alto contenido de materia orgánica (demanda bioquímica de oxígeno: DBO<sub>5</sub> 1320 mg/L) y sulfuros (54 mg/L) provenientes de la industria del curtido de piel. Los ensayos bioquímicos indican que todos los aislados pueden emplear alguna especie de S como azufre elemental ( $S^0$ ), tiosulfato ( $S_2O_6^{2-}$ ) o sulfuro ( $S^{2-}$ ) como única fuente de S. También se encontró que las cepas del género *Pseudomonas* fueron las más versátiles, ya que oxidan el  $S^{2-}$  (2 mM) y  $S_2O_6^{2-}$  (4 mM) transformándolos a  $S^0$  y tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), respectivamente, mientras que las cepas de *Acinetobacter* sólo oxidan el  $S^0$  a  $S_2O_6^{2-}$ . También se observó que las cepas de los géneros *Alcaligenes* y *Ochrobactrum* oxidan el  $S_2O_6^{2-}$  (4 mM) a  $S_4O_6^{2-}$ . La actividad de estos microorganismos a través del sistema de tratamiento y la integración de sus metabolismos podrían participar activamente en la remoción de sulfuros.

Key words: Oxidation, sulfide ( $S^{2-}$ ), elemental sulfur ( $S^0$ ), thiosulfate ( $S_2O_6^{2-}$ ), tetrathionate ( $S_4O_6^{2-}$ ), *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*

### ABSTRACT

Constructed wetlands are an alternative for the treatment of effluents where biological oxidation processes caused by the rhizosphere of plants and microorganisms present *in situ*, contribute to the removal of contaminants. In the present work, we characterized the sulfur (S) metabolism of ten bacteria belonging to the genera *Acinetobacter*,

*Alcaligenes*, *Ochrobactrum* and *Pseudomonas*, which were isolated from a wetland constructed for the treatment of effluents with high organic matter content (biochemical oxygen demand: BOD<sub>5</sub> 1320 mg/L) and sulfides (54 mg/L) from the leather tanning industry. Biochemical assays indicate that all the isolates can use some sulfur species such as elemental sulfur (S<sup>0</sup>), thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) or sulfide (S<sup>2-</sup>) as the sole source of S. We also found that strains of *Pseudomonas* genus were the most versatile base on the fact that they oxidize S<sup>2-</sup> (2 mM) and S<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> (4 mM) transforming them to S<sup>0</sup> and tetrathionate (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), respectively, whereas *Acinetobacter* strains only oxidize S<sup>0</sup> to S<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>. We also found that the strains of the genera *Alcaligenes* and *Ochrobactrum* oxidize S<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> (4 mM) to S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>. The activity of these microorganisms through the treatment system and the integration of their metabolism might actively participate in the removal of sulfur compounds.

## INTRODUCCIÓN

Los humedales artificiales son sistemas construidos con base en el principio de los humedales naturales, donde el agua y el suelo proveen las características principales para el desarrollo de las plantas y microorganismos, actuando como biofiltros, removiendo sedimentos y contaminantes de los efluentes a través de esta tecnología (Stottmeister *et al.* 2003). Estos sistemas biológicos son considerados versátiles debido a su alta eficiencia para tratar efluentes de la industria eléctrica y minera contaminados con metales como el selenio (Se), arsénico (As), boro (B), zinc (Zn), plomo (Pb) y hierro (Fe) (O'Sullivan *et al.* 1999, Ye *et al.* 2003). También se ha reportado su empleo para la degradación de contaminantes orgánicos provenientes de efluentes domésticos, de la industria química y de los alimentos (Rivera *et al.* 1997, Philippi *et al.* 1999, Da Motta *et al.* 2001, Kao *et al.* 2001, Larsen *et al.* 2001, Haberl *et al.* 2003). Pacheco *et al.* (2008) reportan la construcción de un sistema de humedales para tratar los efluentes generados por la industria del curtido, observando que la demanda química de oxígeno (DQO: 17 520 mg/L), demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>: 1320 mg/L), cromo total (Cr: 31 mg/L), nitrógeno total (NTK: 267 mg/L), sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 2518 mg/L) y sulfuros (HS<sup>-</sup>: 54 mg/L), fueron reducidos en un 98, 95, 99, 94, 92 y 99 %, respectivamente, en el efluente final.

La actividad de las poblaciones microbianas es determinante durante el tratamiento por humedales. Algunos procesos microbianos que han sido identificados incluyen la desnitrificación, sulfato-reducción, sulfoxidación y la oxido-reducción de metales (Da Motta *et al.* 2001, Stottmeister *et al.* 2003, Lloyd *et al.* 2004, Whitmire y Hamilton 2005). Particularmente la degradación anaerobia de la materia orgánica y la sulfato-reducción aunado a los sulfuros provenientes del proceso del curtido, generan efluentes con alto

contenido de sulfuros de hasta 54 mg/L, los cuales resultan tóxicos para la vida acuática (Bagarinao y Vetter 1989). Sin embargo, dentro de la ecología microbiana también han sido identificadas poblaciones bacterianas sulfoxidantes (BSO), las cuales reoxidan el sulfuro formado. Algunas reacciones de oxidación del S identificadas en microorganismos, indican la transición de las siguientes especies químicas: S<sup>2-</sup> (sulfuro) → S<sup>0</sup> (S elemental) → SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (sulfito) → SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfato), aunque los intermediarios pueden interactuar químicamente, haciendo la ruta más compleja, tal es el caso de la formación del tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), el cual se forma por la combinación química del S<sup>0</sup> y el SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, este compuesto también puede ser oxidado por microorganismos a tetratiónato (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) a través de la siguiente reacción general: S<sup>0</sup> + SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> → S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> → S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> (Suzuki 1999).

Los géneros microbianos sulfoxidantes más estudiados incluyen especies de los géneros de *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thermothrix*, *Thiothrix* y *Beggiatoa* (Greene *et al.* 2003, Beller *et al.* 2006, Syed *et al.* 2006). En el humedal construido para el tratamiento de efluentes provenientes de la industria del curtido, fueron obtenidos diez aislados bacterianos creciendo en el medio de cultivo *Thiobacillus* B para microorganismos sulfoxidantes, los cuales fueron identificados por análisis del gen 16S ribosomal, pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas*. El objetivo del presente estudio fue determinar las capacidades de estos aislados bacterianos para metabolizar especies reducidas del S.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislados bacterianos

Los aislados de estudio (depositados en el cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental en el

Departamento de Bioquímica y Biotecnología del CINVESTAV campus Guanajuato) fueron obtenidos del humedal construido en la tenería “La Europea” en León, Gto., e identificados por el análisis del gen ribosomal 16S. Cuatro aislados pertenecen al género *Pseudomonas* (A11, A12, A14 y B12), tres aislados al género *Alcaligenes* (C11, C14 y C15), dos al género *Acinetobacter* (E1 y E2) y uno al género *Ochrobactrum* (D11) (Pacheco *et al.* 2008).

### Oxidación de compuestos reducidos de S

Para la caracterización bioquímica de oxidación de fuentes reducidas de S, se empleó el medio líquido de cultivo modificado *Thiobacillus B* reportado por Leduc (1999), el cual contiene (g/L): 2.9 citrato de sodio, 3.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0  $\text{KNO}_3$ , 0.1  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1  $\text{MgCl}_2$ , 0.1  $\text{CaCl}_2$ , 0.2  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.05  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , ajustado a pH 7.0. Como fuente reducida de S se utilizó tiosulfato de sodio 20 mM, S elemental 1 % o sulfuro de sodio 2 mM. Todos los ensayos fueron inoculados a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL (densidad óptica 0.01) e incubados en agitación a 150 rpm por 72 h, a 28 °C. Al término de la incubación, la densidad óptica fue medida y el  $\text{S}^0$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  fueron analizados. El ensayo de oxidación de  $\text{S}^{2-}$  fue llevado a cabo bajo condiciones anaerobias, cuantificando en el medio, la disminución del  $\text{S}^{2-}$  y la reducción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ).

### Fuentes reducidas de S

Para determinar la capacidad de los aislados para utilizar  $\text{S}^0$  o  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  como única fuente de S, se empleó el medio modificado *Thiobacillus B*, sustituyendo el  $\text{MgSO}_4$  por  $\text{MgCl}_2$ , y utilizando S elemental (1 %) o tiosulfato de sodio (20 mM) (Rossetti *et al.* 2003).

## TÉCNICAS DE ANÁLISIS

### Sulfuros

La cuantificación de  $\text{S}^{2-}$  se llevó a cabo mediante la formación del complejo de azul de metileno con sulfato de N', N dimetil -p-fenilendiamina, en

presencia de  $\text{FeCl}_3$ , el cual fue medido a 665 nm (Rodier 1981).

### Tiosulfato y tetratiónato

El  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  fueron cuantificados como tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) por medio de la reacción de cianólisis con KCN en presencia de  $\text{CuCl}_2$ , el producto formado fue medido a 460 nm. Para discriminar el  $\text{SCN}^-$  formado a partir del  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ , la muestra fue incubada por 30 minutos con KCN y  $\text{NH}_4\text{OH}$  previo a la adición de  $\text{CuCl}_2$  (Masau 1999).

### Azufre elemental

El  $\text{S}^0$  fue extraído del medio de cultivo con éter de petróleo y posteriormente llevado a cianólisis con NaCN en acetona, el producto final fue medido a 460 nm (Masau 1999).

### Sulfito

Este método está basado en la formación de un complejo colorido generado por la p-rosanilina y el formaldehído, en presencia de tetracloromercurato (II), el producto fue medido a 554 nm (Masau 1999).

## RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de oxidación se presentan en el **cuadro I**. La mayoría de los aislados mostraron crecimiento en el medio *Thiobacillus B* con  $\text{S}^0$ . Sólo en el medio donde crecieron los aislados pertenecientes al género de *Acinetobacter* (E11 y E12) se encontró  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  como especie oxidada. La formación de  $\text{SO}_3^{2-}$  y la combinación con  $\text{S}^0$  probablemente formaron  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , el cual no fue oxidado, acumulándose en el medio de cultivo como ha sido reportado por Suzuki (1999). De la misma manera, todos los aislados crecieron en medio *Thiobacillus B* con tiosulfato de sodio (20 mM), detectándose en los medios de cultivo  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  como producto de oxidación, con excepción donde crecieron los aislados del género *Acinetobacter*. En ninguno de los ensayos de oxidación de especies reducidas de S se encontró  $\text{SO}_4^{2-}$ , ni hubo acidificación del medio. El pH final

**CUADRO I.** OXIDACIÓN DE  $\text{S}^0$  Y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$

Fuentes de S	Aislado									
	A11	A12	A14	B12	C11	C14	C15	D11	E11	E12
$\text{S}^0 \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (mM)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.13	1.90
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ (mM)	1.9	1.65	1.5	1.4	1.85	0.14	1.8	2.15	ND	ND

$\text{S}^0$ : S elemental,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ : tiosulfato,  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ : tetratiónato. ND: No detectado

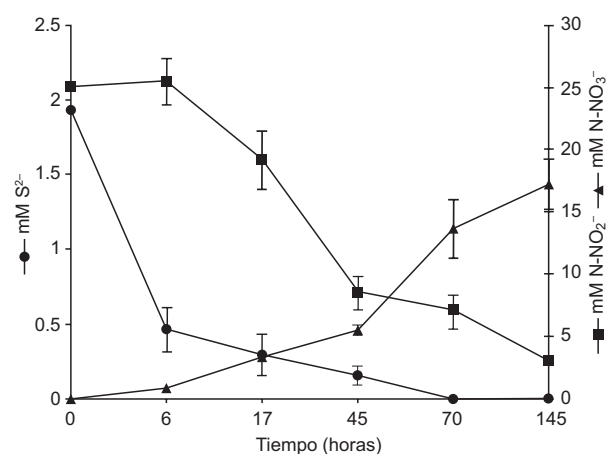
fluctuó entre 7.2 - 8.8, siempre más alcalino que el pH inicial, debido probablemente a la formación de hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) durante las reacciones de oxidación del tiosulfato:  $4\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 + 4\text{NaOH}$  (Mason y Kelly 1988, Suzuki 1999).

En relación a la oxidación de  $\text{S}^{2-}$ , sólo fue detectada la disminución en la concentración en el medio de cultivo donde se inocularon los aislados A11, A12, A14 y B12 pertenecientes al género *Pseudomonas* (Cuadro II). No se detectó alguna especie oxidada del S, por lo que pudieron haber utilizado el  $\text{S}^{2-}$  como fuente de S (Okada *et al.* 1982) o haberlo oxidado a  $\text{S}^0$  intracelular (Chung *et al.* 1997). Este ensayo fue llevado en condiciones anaerobias por lo que se empleó  $\text{NO}_3^-$  como aceptor alternativo de electrones durante el consumo de  $\text{S}^{2-}$ . La cinética de la disminución en la concentración de  $\text{S}^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ , así como la producción de  $\text{NO}_2^-$  se muestra en la figura 1. Los resultados muestran que alrededor de las 70 h el sulfuro había sido completamente metabolizado por los aislados A11, A12 y A14.

**CUADRO II.** CONSUMO DE SULFUROS ( $\text{S}^{2-}$ ) POR AISLADOS DEL GÉNERO *Pseudomonas*

Aislado	A11	A12	A14	B12
$\Delta \text{S}^{2-}$ (mM)	-2.0	-2.0	-2.0	-0.7

Concentración  $\text{S}^{2-}$  inicial 2 mM,  $-\Delta =$  consumo



**Fig 1.** Consumo de sulfuros ( $\text{S}^{2-}$ ) por el aislado A12 del género *Pseudomonas*

El  $\text{S}^0$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  fueron metabolizados como única fuente de S por todos los aislados, en términos de crecimiento bacteriano determinado por un aumento en la densidad óptica. Sin embargo, este aumento no estuvo correlacionado con el consumo de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,

también pudo detectarse la acumulación de  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  como especie oxidada del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (Cuadro III). La diferencia en la producción de  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  entre los aislados pudo deberse a la presencia de  $\text{SO}_3^{2-}$ , producto de la acción enzimática de la rodanasa sobre el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , el  $\text{SO}_3^{2-}$  actúa como inhibidor del sistema enzimático (S-oxidante dependiente del citocromo *c*) que lleva a cabo la oxidación de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  (Suzuki 1999, Sekowska *et al.* 2000). En los ensayos realizados con *Acinetobacter* (E11 y E12) creciendo en tiosulfato de sodio, no se detectó  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ , el crecimiento mínimo observado en el aislado E12 probablemente se debió por el consumo de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  en cantidades no detectables por el método analítico.

## DISCUSIÓN

La presencia de plantas en humedales construidos promueve procesos químicos y biológicos en la zona de la rizósfera que participan en la mejora de la calidad de los efluentes, mediante la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos (Stubner *et al.* 1998, Baptista *et al.* 2003). La actividad microbiana aerobia sulfoxidante es dependiente de la rizósfera o de aceptores alternos de electrones como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Mn}^{4+}$  cuando ocurre en sedimentos bajo condiciones anaerobias (Stubner *et al.* 1998, Eckord *et al.* 2002, Leduc 1999).

La participación de los géneros bacterianos de los aislados de estudio en el ciclo del S ha sido previamente reportada, tal es el caso de *Pseudomonas*, género cosmopolita, el cual ha sido aislado de suelos, de reactores empleados en tratamiento de efluentes y hasta de respiraderos marinos. Su metabolismo incluye la oxidación de  $\text{S}^{2-}$  a  $\text{S}^0$  y de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ , además del uso de dimetil sulfuro (DMS) como fuente de S al igual que *Acinetobacter* (Ruby *et al.* 1981, Chung *et al.* 1996, Fuse *et al.* 2000, Okabe *et al.* 2005).

La degradación de compuestos organosulfurados como los bencensulfonatos, ha sido ampliamente estudiada en bacterias del género *Alcaligenes*, debido a que pueden emplearlos como fuente de C y S (Cook *et al.* 1999). *Ochrobactrum* es un género que se ha encontrado presente en la ecología microbiana de lodos activados de reactores anaerobios sulfoxidantes, con capacidades de oxidación de  $\text{S}^{2-}$  a  $\text{S}^0$  o a  $\text{SO}_4^{2-}$  (Mahmood *et al.* 2009).

Todos los aislados de este estudio pueden utilizar  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}^0$  o  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  como fuente de S y como producto de la oxidación de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , acumulan  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  sin la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Las poblaciones sulfoxidantes formadoras de  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  están presentes en diversos

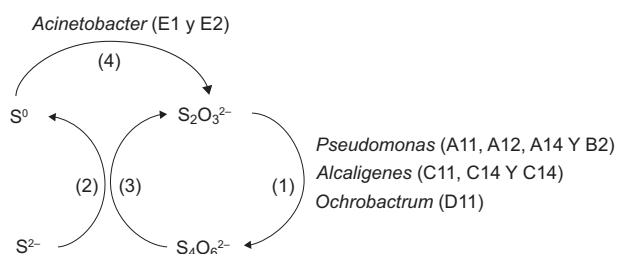
**CUADRO III.** USO DE  $S^0$  Y  $S_2O_3^{2-}$  COMO ÚNICA FUENTE DE S POR LOS AISLADOS DE ESTUDIO

Ensayo	Aislado									
	A11	A12	A14	B12	C11	C14	C15	D11	E11	E12
D.O. $_{600} S^0$	0.08	0.20	0.18	0.16	0.47	0.31	0.42	0.25	0.21	0.10
D.O. $_{600} S_2O_3^{2-}$	0.13	0.25	0.17	0.13	0.52	0.22	0.47	0.11	0.26	0.11
$\Delta S_2O_3^{2-}$ (mM)	-5.7	-8.1	-9.5	-9.7	-7.1	-2.4	-6.2	-6.4	-0.3	ND
$\Delta S_4O_6^{2-}$ (mM)	2.05	1.85	1.45	1.45	2.05	0.01	1.85	2.15	ND	ND

$S^0$  S elemental,  $S_2O_3^{2-}$  tiosulfato,  $S_4O_6^{2-}$  tetrionato,  $-\Delta$  = consumo,  $\Delta$  = producción, ND No detectable.

ambientes como suelos, lagos sódicos, biorreactores y sedimentos marinos (Podgorsek e Imhoff 1999, Sorokin 2003).

El papel del  $S_4O_6^{2-}$  dentro del ciclo del S ha sido descrito por Sorokin *et al.* (1996) en la cepa *Catenococcus thiocyclus* LMD 92.12. Ensayos en medios de cultivo muestran que el  $S_4O_6^{2-}$  producido por la oxidación biológica del  $S_2O_3^{2-}$ , promueve la oxidación química de  $S^{2-}$  hacia  $S^0$  cuando se adiciona  $S^{2-}$  al medio. La cepa reoxida el  $S_2O_3^{2-}$  a  $S_4O_6^{2-}$ , y de esta manera se oxida más  $S^{2-}$ . Este mecanismo acopla reacciones químicas y biológicas que pudieran ocurrir también en el humedal en estudio. De esta manera, los géneros de *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Ochrobactrum* pudieran estar llevando a cabo la oxidación indirecta de  $S^{2-}$  de la misma manera que *Catenococcus thiocyclus*, mientras que el  $S^0$  producido pudiera ser oxidado a  $S_2O_3^{2-}$  por *Acinetobacter* (Podgorsek *et al.* 2004). La **figura 2** muestra el ciclo del S propuesto por Sorokin *et al.* (1996) adaptado con los aislados microbianos del presente estudio.



**Fig. 2.** Posible acoplamiento de reacciones del ciclo del S en el humedal de estudio. (1) Oxidación biológica de  $S_2O_3^{2-}$  a  $S_4O_6^{2-}$  por los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Ochrobactrum*, (2) y (3) oxido-reducción química del  $S^{2-}$  y  $S_4O_6^{2-}$  para producir  $S^0$  y  $S_2O_3^{2-}$ , (4) Oxidación biológica del  $S^0$  por *Acinetobacter* para producir  $S_2O_3^{2-}$

## CONCLUSIONES

Los resultados en el presente trabajo indican que las poblaciones microbianas sulfoxidantes presentes

en el humedal poseen capacidades diversas para metabolizar compuestos reducidos de azufre por asimilación y oxidación pudiendo participar en la mejora de la calidad de los efluentes. El conocimiento y mantenimiento de estas poblaciones es necesario para el adecuado funcionamiento del humedal.

## REFERENCIAS

- Bagarinao T. y Vetter R.D. (1989). Sulfide tolerance and detoxification in shallow-water marine fishes. *Mar. Biol.* 103, 291-302.
- Baptista J. D.C., Donnelly T., Rayne D. y Davenport R.J. (2003). Microbial mechanisms of carbon removal in subsurface flow wetlands. *Wat. Sci. Tech.* 48, 127-134.
- Beller H.R., Letain T.E., Chakicherla A., Kane S. R., Legler T. C. y Coleman M. A. (2006). Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thio-sulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions. *J. Bacteriol.* 188, 7005-7015.
- Chung Y.C., Huang C. y Tseng C.P. (1996). Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter. *Biotechnol. Prog.* 12, 773-778.
- Chung Y.C., Huang C. y Tseng C.P. (1997). Removal of hydrogen sulphide by immobilized *Thiobacillus* sp. strain CH11 in a biofilter. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 69, 58-62.
- Cook A. M., Laue H. y Junker F. (1999). Microbial desulfonation. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 399-419.
- Da Motta M.D.M.L., Leite G.R. y Giovannini S. G.T. (2001). Performance of two macrophyte species in experimental wetlands receiving variable loads of anaerobically treated municipal wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 44, 311-316.
- Eckford R.E. y Fedorak P.M. (2002). Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 83-92.

- Fuse H., Takimura O., Murakami K., Yamaoka Y. y Omori T. (2000). Utilization of dimethyl sulfide as a sulfur source with the aid of light by *Marinobacterium* sp. strain DMS-S1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5527-5532.
- Greene E.A., Hubert C., Nemati M., Jenneman G.E. y Voordouw G. (2003). Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* 5, 607-617.
- Habelr R., Grego S., Langergraber G., Kadlec R.H., Cicalini A. R., Dias S. M., Novais J. M., Aubert S., Gerth A., Hartmurt T. y Hebner A. (2003). Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants. *J. Soils Sed.* 3, 109-124.
- Kao C.M., Wang J.Y. y Wu M.J. (2001). Evaluation of atrazine removal processes in a wetland. *Wat. Sci. Tech.* 44, 539-544.
- Larsen L., Jørgensen C. y Aamand J. (2001). Potential mineralization of four herbicides in a ground water-fed wetland area. *J. Environ. Qual.* 30, 24-30.
- Leduc D. (1999). Quantification of bacterial populations indigenous to acidic drainage streams. Master of Science Thesis. School of Graduate Studies. Laurentian University of Sudbury. Ontario, Canadá, pp126.
- Lloyd J.R., Klessa D.A., Parry D.L., Buck P. y Brown N.L. (2004). Stimulation of microbial sulphate reduction in a constructed wetland: microbiological and geochemical analysis. *Wat. Res.* 38, 1822-1830.
- Mahmood Q., Hu B., Cai J., Zheng P., Azim M.R., Jilani G. e Islam E. (2009). Isolation of *Ochrobactrum* sp. QZ2 form sulfide and nitrite treatment system. *J. Hazard. Mater.* 165, 558-565.
- Masau R.J.Y. (1999). The mechanism of thiosulfate oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* 8085. Master of Science Thesis. Department of Microbiology. University of Manitoba. Winnipeg, Canadá. 158 pp.
- Mason J. y Kelly D.P. (1988). Thiosulfate oxidation by obligately heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 15, 123-134.
- Okabe S., Ito T., Sugita K. y Satoh H. (2005). Succession of internal sulfur cycles and sulfur-oxidizing bacterial communities in microaerophilic wastewater biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2520-2529.
- Okada J., Murata K. y Kimura A. (1982). Assimilation of elemental sulfur by a mutant of *Escherichia coli* B. *Agr. Biol. Chem.* 46, 1915-1916.
- O'sullivan A.D., McCabe O.M., Murray D.A. y Otte M.L. (1999). Wetlands for rehabilitation of metal mine wastes. *Biol. Environ.* 99B, 11-17.
- Pacheco A.J. R., Peña C.J.J. y Madonado V.M. (2008). Identification and characterization of sulfur-oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery. *Int. J. Phytoremed.* 10, 359-370.
- Philippi L.S., Da Costa R.H.R. y Sezerino P.H. (1999). Domestic effluent treatment through integrated system of septic tank and root zone. *Wat. Sci. Tech.* 40, 125-131.
- Podgorsek L. e Imhoff J.F. (1999). Tetrathionate production by sulfur oxidizing bacteria and the role of the tetrathionate in the sulfur cycle of Baltic Sea sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 255-265.
- Podgorsek L., Petri R. e Imhoff J.F. (2004). Cultured and genetic diversity, and activities of sulfur-oxidizing bacteria in low-temperature hydrothermal fluids of the North Fiji Basin. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266, 65-76.
- Rivera F., Warren A., Curds C.R., Robles E., Gutiérrez A., Gallegos E. y Calderón A. (1997). The application of the root zone method for the treatment and reuse of high-strength abattoir waste in México. *Wat. Sci. Tech.* 35, 271-278.
- Rodier J. (1981). *Análisis de las aguas*. 1a ed. Omega, Barcelona, 1080 pp.
- Rossetti S., Blackall L.L., Levantesi C., Uccelletti D. y Tandoi V. (2003). Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1271-1276.
- Ruby E.G., Wirsén C.O. y Jannasch H.W. (1981). Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 317-324.
- Sekowska A., Kung H.F. y Danchin A. (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: Facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 145-177.
- Sorokin D.Y., Robertson L.A. y Kuenen J.G. (1996). Sulfur cycling in *Catenococcus thiocyclus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, 117-125.
- Sorokin D.Y. (2003). Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligately organotrophic bacteria. *Microbiology.* 72, 725-739.
- Stottmeister U., Wiebner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R.A. y Moormann H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 93-117.
- Stubner S., Wind T. y Conrad R. (1998). Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 569-578.
- Suzuki I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45, 97-105.
- Syed M., Soreanu G., Falletta P. y Béland M. (2006). Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. *Can. Biosyst. Eng.* 48, 1-14.

Whitmire S.L. y Hamilton S.K. (2005). Rapid removal of nitrate and sulfate in freshwater wetland sediments. *J. Environ. Qual.* 34, 2062-2071.

Ye Z.H., Lin Z.Q., Whiting S.N., De Souza M.P. y Terry N. (2003). Possible use of constructed wetland to remove selenocyanate, arsenic, and boron from electric utility wastewater. *Chemosphere* 52, 1571-1579.