

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA CAMPUS MEXICALI

BIOINGENIERÍA



**“MICROORGANISMOS CULTIVABLES AISLADOS DE UN HUMEDAL
ARTIFICIAL EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO DE AGUA GRIS”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOINGENIERO

PRESENTA

NAJLA GEORGETTE ROSILLO MURÚA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ASENETH HERRERA MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. FERNANDO AMÍLCAR SOLÍS DOMÍNGUEZ

MEXICALI B. C., MÉXICO

JUNIO DE 2016

RESUMEN.

En la actualidad es importante buscar alternativas para el tratamiento de aguas residuales, ya que la población mundial está en aumento lo cual contribuye a la generación de más contaminación y a la reducción de los recursos hídricos. Encontrar soluciones sustentables a problemas de contaminación en aguas residuales podría mejorar las condiciones de vida de la población y contribuir a la conservación del medio ambiente. Los humedales artificiales representan una alternativa a este problema pues podrían ser utilizados como una etapa más en los procesos de depuración de aguas residuales, tomando en cuenta que, estos sistemas son de bajo costo y su instalación no requiere gran dificultad. Además, se ha reconocido que los humedales artificiales pueden tener la misma efectividad que un humedal natural al momento de reducir contaminantes en dichas aguas. Durante esta investigación se aislaron microorganismos cultivables de un humedal artificial situado en el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Mexicali y se realizaron pruebas para identificar los géneros a los que pertenecen dichos microorganismos. En futuras investigaciones se buscará determinar el papel que estos microorganismos tienen en el sistema de depuración de agua del humedal.



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de ingeniería

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES
PRESENTES EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL EMPLEADO EN EL
TRATAMIENTO DE AGUA GRIS”**

TESIS
Que para obtener el grado de
BIOINGENIERO

Presenta
Najla Georgette Rosillo Murúa

APROBADA POR:

Dra. Aseneth Herrera Martínez
Directora de Tesis

Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez
Co-Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Jorge Ismael Rosillo Murñozcana** y **Maricela Murúa León**, por el apoyo y paciencia que me brindaron durante todos mis estudios.

A mi directora de tesis **Dra. Aseneth Herrera Martínez** y mi co-director de tesis **Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez** por brindarme todo su apoyo y sabiduría en los momentos de mi formación como estudiante y tesista.

A la **Dra. M. Socorro Romero Hernández** por permitir mi colaboración en su sistema de humedal artificial y brindarme su apoyo.

A la **Universidad autónoma de Baja California** por todos los años de sabiduría que me ha brindado durante mi etapa de formación como estudiante.

A la **M.I Susana Norzagaray Plasencia** y su equipo de laboratorio por permitirme realizar mis investigaciones en las instalaciones de los laboratorios de bioingeniería.

DEDICATORIA

A mi padre **Jorge Ismael Rosillo Muñozcano**. Aunque no estés conmigo quiero que sepas que te extraño y te pienso diariamente; quiero agradecerte por permitirme ser alguien en mi vida, alentarme a salir adelante con tus consejos y paciencia y por amarme incondicionalmente todos los días de tu vida, sin ti no hubiera llegado hasta donde estoy.

Gracias papá, siempre estarás en mi corazón te amo.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Humedales y su importancia.....	1
1.2 Importancia de la vegetación en los humedales.....	5
1.3 Importancia de los microorganismos en los humedales.....	7
1.4 Soporte en humedales artificiales y su importancia.....	9
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	10
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4 HIPÓTESIS.....	13
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 Humedal artificial.....	14
5.2 Aislamiento de microorganismos del humedal.....	14
5.3 Identificación microbiológica de los microorganismos.....	16
5.4 Extracción de ADN.....	25
5.5 Determinación de la calidad y concentración de ADN genómico extraído.....	27
5.6 Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
5.7 Secuenciación y análisis de secuencias obtenidas.....	29
6 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	30
6.1 Morfología colonial y bacteriana de los nueve aislados microbianos del humedal artificial.....	30
6.2 Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados microbianos cultivables del humedal artificial.....	31

6.3	Análisis de la integridad y concentración del ADN extraído.....	37
6.4	Amplificación y análisis de secuencias generadas de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados microbianos.....	38
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipo de humedales artificiales.....	3
Figura 2. Tipos de vegetación utilizados en humedales naturales y artificiales.....	6
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico.....	37
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de morfología colonial de los aislados microbianos.....	30
Tabla 2. Tinción de Gram de los aislados microbianos obtenidos del sistema de depuración de agua gris artificial.....	31
Tabla 3.1. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados del humedal artificial.....	32
Tabla 3.2. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados del humedal artificial.....	35
Tabla 4. Concentración de ADN extraído de los aislados microbianos cultivables del sistema de humedal artificial.....	38
Tabla 5. Análisis comparativo de las secuencias de productos de PCR de los ocho aislado microbianos del humedal artificial.....	40

1. ANTECEDENTES

1.1 Humedales y su importancia.

Los humedales son ecosistemas complejos que actúan como interface entre los hábitats terrestres y acuáticos (Lefeuvre y col., 2003), son ricos en biodiversidad y altos en productividad pues exportan nutrientes del medio marino (Valiela y col., 1978). Además sirven como zonas de desove, desarrollo y reclutamiento de invertebrados y peces (Halpin, 2000), zonas de anidación para aves (Haig y col., 1998) y contribuyen al control de la erosión costera e inundaciones, en la producción de recursos pesqueros, y también fungen como activo turístico (Ramsar Convention Secretariat, 2004).

A través del tiempo, los humedales naturales han ayudado a mantener un balance en nuestro ecosistema. Los humedales alimentaron a las grandes civilizaciones de Mesopotamia y Egipto, y a aquellas de los valles del Níger, el Indio y el Me-kong, y aún en la actualidad estos ecosistemas siguen siendo esenciales para la salud, el bienestar y la seguridad de los pueblos que viven en sus alrededores y en ellos. La mayor parte de los peces que consumimos dependen de los humedales en alguna etapa de su ciclo de vida, en tanto que millones de especies silvestres se alimentan del pasto que crece en llanuras de inundación (Dungan, 1992) por todo esto es notorio la importancia que estos sistemas tienen en la vida y la salud de los seres vivos.

Por otro lado, los humedales artificiales simulan capacidades de tratamiento a las de un humedal natural con la ventaja de poder ser controlados (Moreno y col., 2002). Éstos generalmente poseen un fondo o base impermeable donde se deposita el soporte (grava, arena, suelo o algún otro medio) que proporciona el

desarrollo de las plantas tomando en cuenta su área y demanda de oxigenación pues son uno de los elementos vitales para la depuración en el sistema.

De acuerdo con Moreno y col. (2002), existen dos tipos de humedales artificiales (Figura 1) desarrollados para el tratamiento de agua residual, dependiendo de la situación del nivel de agua, los cuales son:

- **Humedal de superficie libre de agua (FWS):** en el que el agua está en contacto con la atmósfera y constituye la fuente principal de oxígeno para aireación. Suelen consistir en balsas o canales paralelos con el fondo constituido por suelo relativamente impermeable o con una barrera superficial, vegetación emergente y niveles de agua poco profundos (0.1 a 0.6 m). Normalmente, se aplica agua residual pretratada de forma continua, y el tratamiento se produce durante la circulación del agua a través de los tallos y raíces de la vegetación emergente.
- **Humedal de flujo superficial (SFS):** donde la superficie del agua se mantiene a nivel de la superficie del lecho permeable o por debajo de la misma. Éstos se diseñan con el objetivo de proporcionar un tratamiento secundario avanzado. Consisten en canales o zanjas con fondos relativamente impermeables rellenos de cantos o arena para el crecimiento de vegetación emergente.

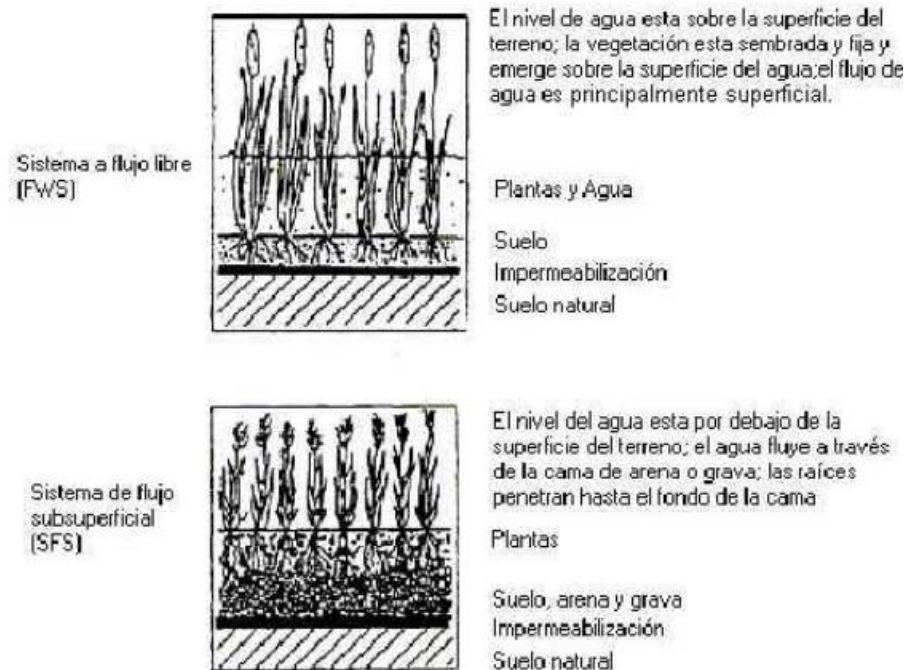


Fig. 1. Tipos de humedales artificiales (Tomado de Moreno y col., 2002)

Los humedales artificiales son sistemas de fitodepuración de aguas residuales. El sistema consiste en el desarrollo de un cultivo de macrófitas enraizadas sobre un lecho generalmente de grava impermeabilizado. La acción de las macrófitas hace posible una serie de complejas interacciones físicas, químicas y biológicas a través de las cuales el agua residual o efluente es depurada progresiva y lentamente.

El tratamiento de aguas residuales para depuración se realiza mediante sistemas que tienen tres partes principales: recogida, tratamiento y evacuación al lugar de restitución (Fernández y col., 2004). Los humedales construidos se han utilizado para tratar una amplia gama de aguas residuales: - Aguas domésticas y urbanas. - Aguas industriales, incluyendo fabricación de papel, productos químicos y

farmacéuticos, cosméticos, alimentación, refinерías y mataderos entre otros. - Aguas de drenaje de extracciones mineras. - Aguas de escorrentía superficial agrícola y urbana. - Tratamiento de fangos de depuradoras convencionales, mediante deposición superficial en humedales de flujo subsuperficial donde se deshidratan y mineralizan (García., 2004). Cuando el agua llega a una estación depuradora, pasa por una serie de tratamientos que extraen los contaminantes del agua y reducen su peligro para la salud pública. El número y tipo de tratamientos dependen de las características del agua contaminada y de su destino final. Estos sistemas purifican el agua mediante remoción del material orgánico (DBO), oxidando el amonio, reduciendo los nitratos y removiendo fósforo. Los mecanismos son complejos e involucran oxidación bacteriana, filtración, sedimentación y precipitación química (Cooper y col., 1996).

Los humedales eliminan contaminantes mediante varios procesos que incluyen sedimentación, degradación microbiana, acción de las plantas, absorción, reacciones químicas y volatilización (Stearman y col., 2003). Reemplazan así el tratamiento secundario e inclusive, bajo ciertas condiciones, al terciario y primario de las aguas residuales. El funcionamiento de los humedales artificiales se fundamenta en tres principios básicos: la actividad bioquímica de microorganismos, el aporte de oxígeno a través de los vegetales durante el día y el apoyo físico de un lecho inerte que sirve como soporte para el enraizamiento de los vegetales, además de servir como material filtrante.

Hoy en día los sistemas de humedales artificiales han tomado lugar en el aprovechamiento de tratamiento para la depuración de aguas grises o residuales; esto trae ventajas a las comunidades debido a su bajo costo y sobre todo por el

uso de un tratamiento más natural y libre de otros compuestos químicos o contaminantes que son utilizados para dar un proceso de eliminación de contaminantes a las aguas residuales.

El agua residual está formada por un elevado número de compuestos de diferente naturaleza, que pueden variar en tipo y concentración en función de la procedencia de la misma (Villaseñor Camacho, 1998). Éstas pueden clasificarse en aguas residuales industriales, agrícolas y domésticas. Cada año estas aguas son vertidas en diferentes zonas acuosas en el mundo, incluso ilegalmente por compañías industriales, aumentando así la concentración de contaminantes.

1.2 Importancia de la vegetación en los humedales.

En todo humedal ya sea artificial o natural es fundamental la función de las plantas que los constituyen. Según Fernández González y col. (2005), las principales funciones de las plantas en estos sistemas son:

- Airear el sistema radicular y facilitar oxígeno a los microorganismos que viven en la rizósfera.
- Absorción de nutrientes (nitrógeno y fósforo).
- Eliminación de contaminantes asimilándolos directamente en sus tejidos.
- Filtración de los sólidos a través del entramado que forma su sistema radicular.
- Estabilizan el substrato y limitan la canalización del flujo.
- Dan lugar a velocidades de aguas bajas y permiten que los materiales suspendidos se depositen.

- Toman el carbono, nutrientes y elementos traza y los incorporan a los tejidos de la planta.
- Transfieren gases entre la atmósfera y los sedimentos.
- Permite la oxigenación en espacios dentro del sustrato.
- El tallo y los sistemas de la raíz dan lugar a sitios para la fijación de microorganismos.
- Cuando se mueren y deterioran dan lugar a restos de vegetación.

Existe una gran variedad de plantas que pueden ser empleadas en la implementación de humedales artificiales (Figura 2), como por ejemplo:

- Juncos de agua, enneas o espadañas (*Typha sp.*)
- Esparganios (*Sparganium sp.*)
- Diversas especies de juncos (*Cyperus sp.*, *Scirpus*, *Juncus etc...*)
- Carrizos (*Phragmites sp.*).



Typha Sp.



Sparganium Sp.



Cyperus Sp.



Scirpus Sp.



Phragmites Sp.

Fig. 2. Tipos de vegetación utilizados en humedales naturales y artificiales.

1.3 Importancia de los microorganismos en los humedales.

No solo se toma en cuenta el gran papel que desarrollan las plantas en estos sistemas si no también el de diversos tipos de microorganismos habitando dentro de éstos tanto en suelo, superficie y raíces de la planta, los cuales interactúan de manera favorable mediante distintos procesos fisicoquímicos ayudando así a la descontaminación de aguas residuales en algunas ocasiones con mayor rapidez. Los microorganismos presentes en los humedales se encargan de realizar el tratamiento biológico o dicho de otra forma, se encargan de la reducción de componentes contaminantes de manera natural.

De acuerdo con Arias (2004), las colonias de microorganismos aerobios se desarrollan en las zonas superiores de los humedales ya que ahí predomina el oxígeno liberado por las raíces de las plantas y el oxígeno proveniente de la atmósfera y los microorganismos aerobios predominan en el resto del lecho granular. Los principales procesos que llevan a cabo los microorganismos son la degradación de la materia orgánica, la eliminación de nutrientes y elementos traza (o metales pesados) y la desinfección. Los microorganismos más frecuentemente presentes en los humedales son bacterias, levaduras, hongos y protozoarios. La biomasa microbiana consume gran parte del carbono y muchos nutrientes. La actividad microbiana tiene como función transformar un gran número de sustancias orgánicas e inorgánicas en sustancias inocuas e insolubles y alterar las condiciones de potencial de reducción y oxidación del sustrato afectando así la capacidad de proceso del humedal. Asimismo, gracias a la actividad biológica, muchas de las sustancias contaminantes se convierten en gases que son liberados a la atmósfera (Delgadillo y col., 2010). Algunos de los microorganismos

más utilizados para la eliminación de contaminantes son ciertas especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

La remoción de materia orgánica se lleva a cabo principalmente mediante la biodegradación aeróbica, la cual se realiza en presencia del oxígeno, o también por biodegradación anaeróbica de los microorganismos donde no es necesaria la presencia de oxígeno. En algunos humedales artificiales una pequeña porción de materia orgánica también es removida mediante procesos físicos tales como la sedimentación y filtración, cuando esta materia orgánica se encuentra fija a los sólidos suspendidos. Los microorganismos se encuentran adheridos a la planta, en particular en raíces y la superficie de los sedimentos (Delgadillo y col., 2010).

Todos los microorganismos involucrados en este proceso de tratamiento requieren una fuente de energía y carbono para la síntesis de nuevas células, como también otros nutrientes y elementos traza. De acuerdo a su fuente de nutrientes, están clasificados como heterótrofos o autótrofos. Los heterótrofos requieren material orgánico como fuente de carbono para la síntesis de nuevos microorganismos, en cambio, los autótrofos no utilizan materia orgánica sino dióxido de carbono. Ambos grupos usan luz o una reacción química de óxido reducción como fuente de energía para todas las síntesis y son llamados fotótrofos y quimiótrofos, respectivamente (Cooper, 1996). Por lo tanto la biodegradación microbiana que ocurre en humedales artificiales se debe a dos clases distintas de biodegradación, la aeróbica o la anaeróbica, dependiendo de la presencia de oxígeno disuelto.

1.4 Soporte en humedales artificiales y su importancia.

Los humedales artificiales incluyen substratos en sus sistemas tales como son la arena, el suelo, la grava, roca y materiales orgánicos como la composta. Sedimentos y restos de vegetación se acumulan en el humedal debido a la baja velocidad del agua y a la alta productividad de estos sistemas. El substrato, sedimentos y los restos de vegetación son importantes por varias razones (Lara Borrero, 1999):

- Soportan a muchos de los organismos vivientes en el humedal.
- La permeabilidad del substrato afecta el movimiento de agua a través del humedal.
- Muchas transformaciones químicas y biológicas (sobre todo microbianas) tienen lugar dentro del substrato.
- El substrato proporciona almacenamiento para muchos contaminantes.
- La acumulación de restos de vegetación aumenta la cantidad de materia orgánica en el humedal. La materia orgánica da lugar al intercambio de materia, la fijación de microorganismos y es una fuente de carbono, que es la fuente de energía para algunas de las más importantes reacciones biológicas en el humedal.

A pesar de la importancia ambiental de los humedales, históricamente han sido de las comunidades naturales más dañadas por las actividades humanas, masivamente drenados para crear terrenos agrícolas, zonas urbanas o como medida para reducir poblaciones de mosquitos (Sánchez., 2005). Como ya se mencionó anteriormente, los humedales son una parte vital para la supervivencia

humana. Estos entornos son unos de los más productivos del mundo según Ramsar, y son cunas de diversidad biológica y fuentes de agua y productividad primaria de las que innumerables especies vegetales y animales dependen para subsistir.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El agua se considera contaminada cuando se altera su composición o condición natural por una degradación instantánea o paulatina de su calidad, hasta dejar de ser apta para un uso previsto. La contaminación del agua puede ser física, química y/o biológica y se origina principalmente por descargas de desechos líquidos y sólidos, por lo que el grado de contaminación del agua depende de la cantidad y concentración de los compuestos perjudiciales vertidos en ella (Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, 2011).

Las principales fuentes de contaminación del agua en México según reportes del Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED) en el 2006 son:

- **Actividad agrícola:** en la cual los plaguicidas (principales contaminantes), son llevados de manera indirecta hasta los ríos por efecto de la lluvia y la erosión del suelo, y de manera directa por las aguas de retorno agrícola, cuyo impacto se manifiesta en el alto porcentaje de cuerpos de agua que se encuentran en condiciones de eutrofización.
- **Urbanización:** mediante las descargas de aguas residuales municipales o el vertido directo del sistema de alcantarillado a los cuerpos de agua.
- **Actividad industrial:** mediante las descargas generadas por las actividades de extracción y transformación. Las descargas industriales

contienen metales pesados y otras sustancias químicas tóxicas que no se degradan fácilmente en condiciones naturales. Entre las actividades más contaminantes destacan la industria azucarera, química, petrolera, metalúrgica y de papel y celulosa.

- **Sector pecuario:** por los efluentes y residuos sólidos provenientes de las instalaciones dedicadas a la crianza y engorda de ganado bovino, vacuno y granjas avícolas, entre otras.

El agua, indispensable para la vida, puede ser vehículo de agentes infecciosos tales como bacterias, virus, hongos, protozoarios y helmintos (lombrices) que causan diversas afectaciones a la salud humana; como también puede contener sustancias químicas (sean éstas orgánicas o inorgánicas) en concentraciones inadecuadas o superiores a las especificadas en las normas existentes para aguas de consumo humano y afectar a quien la ingiere o a quien entra en contacto con ella. Entre los contaminantes químicos que existen se pueden mencionar los nitritos, fluoruros, arsénico, mercurio, ácidos grasos, petróleo, detergentes, plaguicidas y otras muchas sustancias más a las que se suman las posibles combinaciones químicas que se producen entre ellas. El agua también puede ser contaminada por elementos o residuos radioactivos (Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, 2011).

Según Piédrola (2002), el agua puede actuar como vía de transmisión de enfermedades al vehiculizar los microorganismos hasta el individuo y esto puede suceder de distintas formas, entre ellas:

1. Por la ingestión de agua contaminada, es decir, aguas incorrectamente cloradas, en servicios de abastecimiento mal controlados, o provenientes

de canales o pozos contaminados. Los microorganismos que más frecuentemente producen brotes son:

Escherichia coli, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholera*, rotavirus, agente *Norwalk*, *Calicivirus*, *Giarda lamblia*, *Cryptosporidium*, entre otros.

2. Por contaminación hídrica de alimentos, con especial importancia en verduras y frutas que se han regado con aguas residuales, ya que éstas se ingieren crudas; o bien, en el consumo de moluscos que proceden de aguas contaminadas con aguas residuales.
3. Por contacto cutáneo-mucoso. Esto puede ocurrir por el contacto con el agua contaminada durante los usos recreativos, ocupacionales o terapéuticos (pie de atleta, conjuntivitis, amiba de vida libre).
4. Mediante vectores. En las infecciones transmitidas por vectores (*Aedes*, *Anopheles*, *Virus del Oeste del Nilo*) el agua interviene en alguna fase del ciclo biológico.

La presente investigación se enfoca en la importancia de contribuir a la resolución de contaminación de aguas en la ciudad de Mexicali Baja California, identificando microorganismos presentes en humedales artificiales que puedan ser aprovechados en un futuro en procesos de depuración de aguas residuales residenciales. Es de vital importancia encontrar soluciones que aporten una mejor calidad de vida a la región de Mexicali pues esta ciudad posee el tercer lugar a nivel mundial en contaminación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Identificar microorganismos presentes en el tren de tratamiento de un humedal artificial.

3.2 Objetivos específicos:

Aislar microorganismos presentes en muestras de influente, efluente y humedal artificial.

Caracterizar macro y microscópicamente los microorganismos aislados.

Determinar el género de los microorganismos aislados.

4. HIPÓTESIS

El aislamiento y caracterización de microorganismos cultivables presentes en el humedal artificial permitirá determinar su posible participación en el proceso de depuración de las aguas residuales introducidas en este sistema.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Humedal Artificial.

El presente trabajo de investigación tuvo como objeto de estudio microorganismos cultivables aislados de un humedal artificial horizontal a nivel piloto, diseñado y elaborado por el grupo de investigación de la Dra. Socorro Romero Hernández del Instituto de Ingeniería de la UABC, con las siguientes características: celda de acero inoxidable de 1.90m de largo y 0.88m de ancho; un área de 1.67m²; como soporte partículas de arena fina y grava con diámetros de 0.2mm y 3 cm respectivamente, plantas de tule (*Typha dominguensis*). El influente alimentado fue agua gris procedente de lavadora. La eficiencia de depuración que obtuvieron se evaluó por DQO (demanda química de oxígeno) durante 9 días. Obtuvieron una concentración máxima de influente de 1500mg/l y del efluente 120mg/l y una remoción promedio de 71%, pH de 8.2 a la entrada y 7.9 a la salida, una conductividad eléctrica de 2264 μ S/cm a la entrada y 167 μ S/cm a la salida.

5.2 Aislamiento de microorganismos del humedal.

El verano del año 2015, se muestreó 2 veces el humedal artificial. Los puntos considerados fueron: entrada del influente, suelo rizosférico, suelo superficial y salida del agua o efluente. Las muestras líquidas se colectaron en frascos estériles de 100 ml mientras que las muestras sólidas fueron colectadas en bolsas estériles. Todas las muestras se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio donde se almacenaron a 4°C para su posterior procesamiento y análisis microbiológico. De las muestras del influente y efluente, se realizaron diluciones seriales de 10⁻¹ hasta 10⁻⁶, se agitó con vortex para obtener muestras

homogéneas, para el caso de las muestras de suelo rizosférico, las raíces con suelo adherido se lavaron en 100 ml de agua destilada y se agitó en vortex por 30 min (Muratova y col., 2003), se dejó sedimentar las partículas de suelo y de esa suspensión se realizaron diluciones seriales desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , del suelo superficial del humedal se tomaron 10 g y se mezclaron con 100 ml de agua destilada estéril y se agitó con vortex por 30 min, de la suspensión se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} . Posteriormente se sembraron 100 μ l de las últimas 3 diluciones de cada muestra en cajas de Petri conteniendo 25 ml de medio R2A y se incubó a 37°C (temperatura del humedal) por 48 horas. Se seleccionaron las colonias microbianas diferenciales de cada muestra y se conservaron en medio R2A a 4°C para su uso posterior.

Se seleccionaron 9 aislados bacterianos diferenciales codificadas como E1, E2, E4, E5, E6, (E por efluente y los números del 1 al 6 se refieren a la cantidad de aislados microbianos); S1, S2 (S por superficie y los números 1 y 2 se refieren a la cantidad de aislados microbianos), SG1 y SG3 (SG por suelo-grava y los números 1 y 3 se refieren al número de aislados microbianos). Estos aislados se cultivaron de manera individual en R2A contenido en placas de Petri y se incubaron a 37°C por 48 horas. Las muestras del influente no se consideraron para su análisis microbiológico por no desarrollarse colonias en medio R2A.

5.3 Identificación microbiológica de los microorganismos.

Los aislados fueron caracterizados teniendo en cuenta su morfología colonial, respuesta fisiológica a la tinción de Gram (Prescott, 2002), observación al microscopio (objetivo 100X) y algunas pruebas bioquímicas. Basados en la literatura, se identificaron rasgos de morfología colonial de los 9 aislados microbianos, como crecimiento colonial (circular, puntiforme, etc.), borde, elevación, color, entre otros. Se realizó tinción de Gram para observar características morfológicas a detalle. La tinción de Gram divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Según el grupo al que pertenezcan las bacterias, se tiñen de forma distinta debido a las diferencias en la estructura de su pared celular. Así pues, la pared de las células Gram positivas es gruesa y consiste de más de una capa de peptidoglicano mientras que las células Gram negativas poseen sólo una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una membrana exterior de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas (Rodríguez Cavallini E. y col., 2005). Para efectuar la tinción de Gram, se hicieron frotis de los 9 aislados microbianos en portaobjetos, colocando una gota de agua destilada estéril, se tomó una asada de una colonia bacteriana y se mezcló, la muestra fue fijada por calor. Una vez fijadas las muestras, se realizó la tinción de Gram; se añadieron de 3 a 5 gotas de cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto, se enjuagó con agua corriente el portaobjetos. Después se añadió Yodo-Lugol durante un minuto y se enjuagó, añadiéndose añadieron de 3 a 5 gotas de alcohol-acetona y se dejó reposar por 30 segundos y luego safranina dejando interactuar por 45 segundos y finalmente se lavó con agua corriente. Una vez teñidas las

muestras, éstas se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en el microscopio a 100X con aceite de inmersión.

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de análisis que determinan la actividad de una ruta metabólica determinada en las bacterias. En medicina son muy utilizadas, junto con otros ensayos moleculares, en el diagnóstico de bacterias patogénicas. Estas pruebas, muestran cambios fáciles de detectar en diferentes medios de cultivo (coloración, desplazamiento del mismo, crecimiento o no del aislado bacteriano, fermentación o no de un azúcar, entre otros). Dichos resultados se consideran positivos o negativos de acuerdo al tipo de análisis realizado por lo que estos ensayos contribuyen a la identificación de microorganismos en estudio. Las pruebas bioquímicas realizadas durante esta investigación se hicieron por triplicado y fueron las siguientes:

Prueba Catalasa:

La catalasa es conocida como una enzima que la mayoría de las bacterias aerobias poseen. Ésta descompone el peróxido de hidrógeno en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). El desprendimiento de burbujas que proceden del oxígeno indican que la prueba es positiva, si no se presenta la formación de burbujas la prueba se cataloga como negativa. Para realizar esta prueba se añadió 1ml de peróxido de hidrógeno a tubos de ensayo estériles; con un asa, igualmente en condiciones de esterilidad, se tomó una muestra del aislado microbiano de interés y se añadió en el tubo con peróxido de hidrógeno. Finalmente se observó si la prueba fue positiva o negativa.

Agar Hierro de Kligler:

El Agar Hierro de Kligler se utiliza para diferenciar cultivos puros de bacilos Gram negativos en base a su capacidad para fermentar la dextrosa y la lactosa y a la producción de sulfuro de hidrógeno. Este medio de cultivo contiene para su realización en 1L: extracto de vacuno (3g), extracto de levadura (3g), peptona (15g), peptona de proteosa (5g), lactosa (10g), glucosa (1g), sulfato ferroso (0.2g), cloruro de sodio (5g), tiosulfato de sodio (0.3g), agar (12g), rojo fenol (0.024g), agua destilada hasta igualar 1L y un pH final de 7.4 ± 0.2 (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina).

Para la realización de este medio se sacó una relación de la cantidad de Agar Hierro de Kligler que se necesitaría en base a 1L; una vez obtenida la cantidad deseada del agar se vertió en un matraz de 500 ml y se aforó hasta los mililitros deseados, sometiéndolo en agitación con un magneto hasta llegar a su punto de ebullición, dejándolo hervir por 1 minuto. Una vez enfriado el medio se tomó su pH para compararlo con el pH deseado en el rango de 7.4 ± 0.2 . El medio de cultivo fue esterilizado durante 15 minutos junto con tubos de ensayo limpios y pipetas a 120 psi. Posteriormente, se añadieron 10 ml de Agar hierro de Kligler a tubos de ensayo y se dejaron solidificar en posición inclinada. Se dejaron a prueba de esterilidad por un día. Después, a partir de cultivos puros de los distintos aislados microbianos en estudio, se sembró el medio de cultivo, picando el fondo con un asa estéril y se extendió la muestra sobre la superficie del medio. Se incubó a 37°C por 48 horas.

Los posibles resultados en esta prueba fueron:

1. **Pico alcalino/fondo ácido (Pico rojo/fondo amarillo):** el microorganismo solo fermenta la glucosa.
2. **Pico ácido/fondo ácido (Pico amarillo/fondo amarillo):** el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
3. **Pico alcalino/fondo alcalino (Pico rojo/fondo rojo):** el microorganismo no fermenta azúcares.
4. La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Nota: Durante la interpretación de los resultados en la tabla 3 la palabra ácido será interpretada con la letra "A" y la palabra alcalino será representada por la letra "B".

Medio MIO:

Es un medio semisólido, generalmente utilizado para identificar miembros de la especie *Enterobacteriaceae* basándose en su movilidad, actividad de ornitina decarboxilasa y producción de indol.

Para preparar 1L: dextrosa (1g), extracto de levadura (3g), peptona (10g), tripteína (10g), clorhidrato de L-ornitina (5g), agar (2g) y púrpura de bromocresol (0.02g) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). La elaboración de este medio fue similar a la de hierro de Kligler. Una vez llevado a ebullición el medio se colocó 7 ml en tubos de ensaye. Se observó que el medio mantuviera un pH estable de

6.5±0.2; los tubos con el medio fueron esterilizados a 121 psi por 15 min. Finalmente los microorganismos fueron inoculados por punción profunda con aguja de inoculación y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Los posibles resultados en este medio fueron:

1. Movilidad:

- Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Resultado negativo: crecimiento sólo en la línea de siembra.

2. Ornitina decarboxilasa:

- Resultado positivo: cambio de color en el medio a púrpura.
- Resultado negativo: cambio de color en el medio a amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.

3. Prueba indol:

La prueba de indol se realizó una vez determinada la prueba de movilidad y de ornitina añadiendo de 2 a 3 gotas de reactivo de Erlich o reactivo de Kovac.

- Resultado positivo: color rojo al agregar el reactivo revelador.
- Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

Medio Hierro y Lisina (LIA):

Este medio de cultivo se utiliza para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella spp.*, basándose en la decarboxilación, la desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

El medio LIA contiene para su preparación a 1L: peptona de gelatina (5g), extracto de levadura (3g), glucosa (1g), lisina (10g), citrato de hierro y amonio (0.5g), tiosulfato de sodio (0.04g), púrpura de bromocresol (0.02g), y agar (15g) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina).

Al igual que los medios anteriores se vertieron 7ml del medio LIA en tubos de ensayo. Se observó que su pH final fuera de 6.7 ± 0.2 ; los tubos con medio LIA se esterilizaron a 121 psi por 15min. Una vez esterilizado el medio contenido en los tubos, se solidificaron de forma inclinada, se inocularon los microorganismos por punción profunda y jalando la muestra por estriado con un asa estéril. Los cultivos se incubaron a 37°C de 24 a 48 horas.

Los posibles resultados en este medio fueron los siguientes:

1. Descarboxilación de la lisina:

- Prueba positiva: Pico violeta/fondo violeta.
- Prueba negativa: Pico violeta/ fondo amarillo.

2. Desaminación de la lisina:

- Pico rojizo/fondo amarillo: esto sucede generalmente con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella spp.*

3. Producción de ácido sulfhídrico:

- Prueba positiva: ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo).

Agar Citrato de Simmons:

Es utilizado para diferenciar enterobacterias, esto debido a que sólo utiliza el citrato como única fuente de carbono y energía. Este medio contiene para su preparación a 1L: citrato de sodio (2g), cloruro de sodio (5g), fosfato dipotásico (1g), fosfato monoamónico (1g), sulfato de magnesio (0.2g), azul de bromotimol (0.08g), agar (15g) y finalmente un pH final de 6.9 ± 0.2 (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina).

En condiciones de esterilidad, se colocaron 7ml de agar citrato de Simmons a una serie de tubos de ensayo inclinados. Los microorganismos fueron inoculados con un asa estéril, iniciando con una picadura un poco profunda y arrastrando la muestra en forma de estriado hacia la superficie. Una vez inoculados los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas (algunos microorganismos pueden requerir hasta 3 días de incubación).

Los posibles resultados en este medio fueron los siguientes:

- **Resultado positivo:** crecimiento y coloración azul en el pico del medio, indica alcalinidad.
- **Resultado negativo:** el medio permanece de color verde ya que no hay desarrollo bacteriano y no indica cambio de color alguno.

Agar McConkey:

Es utilizado para aislar bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. En este medio se desarrollan todas las especies de *Enterobacteriaceae*. Contiene los siguientes elementos en base a su

preparación a 1L: peptona (17g), pluripeptona (3g), lactosa (10g), mezcla de sales biliares (1.5g), cloruro de sodio (5g), agar (13.5g), rojo neutro (0.03g), cristal violeta (0.001g) y un pH final de 7.1 ± 0.2 (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). En la preparación de este medio de cultivo se utilizaron placas de Petri estériles a las cuales se añadieron aproximadamente 30 ml de agar McConkey estéril. Se inocularon las muestras por estriado simple y se sometieron a incubación a 37°C por 48 horas.

Los posibles resultados fueron los siguientes:

- **Microorganismos fermentadores de lactosa:** colonias rosadas-rojizas. Puede observarse un halo de precipitación biliar.
- **Microorganismos no fermentadores de lactosa:** colonias del color del medio, incoloras (transparentes en algunos casos).

Agar Fenilalanina:

Es utilizado para diferenciar especies de *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, la mayoría de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, etc. en base a la presencia de la enzima fenilalanina deaminasa. Este medio contiene los siguientes elementos para su preparación en base a 1L: extracto de levadura (3g), DL-Fenilalanina (2g), fosfato sódico (1g), cloruro de sodio (5g), agar (12g) y un pH final de 7.3 ± 0.2 (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). Para la realización de este medio se utilizaron tubos de ensayo con 7ml de agar fenilalanina. Los microorganismos fueron inoculados con un asa estéril mediante estriado. Se sometieron a incubación a 37°C durante 24 horas.

La determinación de los posibles resultados en este medio, se dentro de los primeros 5 minutos, agregando de 3 a 5 gotas de una solución acuosa de cloruro férrico al 10%.

- **Resultado positivo:** desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico del medio y en el líquido de condensación.
- **Resultado negativo:** sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

Agar DNAsa:

Este medio se utiliza para la detección de enzimas desoxirribonucleasas. Se utiliza especialmente para la diferenciación entre especies de estafilococos, así como para la diferenciación de *Serratia spp.* De especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. Para su preparación a 1L: tripteína (20g), ácido desoxirribonucleico (2g), cloruro de sodio (5g), agar (15g) y un pH final de 7.3 ± 0.2 (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). En condiciones de esterilidad se prepararon cajas de Petri con este medio. Los microorganismos fueron inoculados mediante la técnica de estriado, los cultivos se incubaron a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Para obtener un posible resultado en este medio, se cubrió con ácido clorhídrico 1N el cultivo en la placa Petri y se observaron los resultados dentro de los primeros 5 minutos.

- **Resultado positivo:** visualización de un halo claro o transparente alrededor del crecimiento bacteriano.
- **Resultado negativo:** el medio se observa opaco, sin aparición de halos alrededor del crecimiento bacteriano.

Base Caldo Rojo de Fenol:

El caldo rojo de fenol es utilizado para la diferenciación de cultivos puros, en base a su capacidad para fermentar la sacarosa. El rojo de Fenol actúa como indicador, virando de color rojo-naranja a amarillo en presencia del ácido producido por la fermentación del azúcar (Medios de Cultivo Deshidratados (MDC) LAB, México). Es necesario agregar un carbohidrato a este medio de cultivo para observar los resultados de fermentación.

Este medio contiene para su preparación en base a 1L: Cloruro de sodio (5.0g), peptona de caseína (10.0g), Rojo fenol (0.018g), una concentración de 5-10g del carbohidrato sacarosa y un pH final de 7.4 ± 0.2 . Otros carbohidratos frecuentemente utilizados son: inulina, maltosa, manitol, trehalosa, sorbitol, xilosa, etc. Se agregaron 7 ml de caldo rojo de fenol en tubos de ensaye conteniendo campanas de Durham (para observar producción de gas) y se esterilizaron. El caldo ya estéril fue inoculado con los 9 aislados microbianos, se incubó a 37°C por 48 horas.

5.4 Extracción de ADN.

Se extrajo ADN (ácido desoxirribonucleico) de ocho de los nueve aislados microbianos (E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2, y SG1), el aislado codificado como SG3 fue excluido por no presentó crecimiento en caldo nutritivo. Para la extracción de ADN primero se hicieron los cultivos correspondientes, que consistieron en la inoculación de 5 ml de caldo nutritivo contenidos en tubos de ensaye, estos cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas en agitación oscilatoria (200 rpm) hasta

alcanzar una absorbancia en espectrofotómetro de 1.0×10^9 . Antes de realizar la extracción de ADN, se tomó una muestra, de cada cultivo, con un asa estéril y se inocularon por separado y estría cruzada, en agar R2A contenido en cajas Petri, para verificar que los aislados no estuviesen contaminados. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico con el kit "Wizard Genomic DNA Purification Kit Technical Promega" siguiendo las especificaciones del fabricante que se indican a continuación: Se añadió 1ml de un cultivo de 24 horas a un microtubo de 1.5 ml nuevo y estéril. Se centrifugó a 13,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 2 minutos para sedimentar las células. Posteriormente se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células a fondo en 480µl de EDTA 50mM. Una vez añadido y mezclado el EDTA las muestras fueron sonicadas durante 30 minutos, esto con el propósito de debilitar o romper la pared celular y para que la lisis celular se diera con una mayor eficiencia. Se incubaron las muestras a 37°C en un termoblock (Bio-Rad, Digital Dry Bath) por 30 o 60 minutos, después se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 600µl de solución de lisis de núcleos. Se pipeteó suavemente hasta resuspender. Las muestras fueron incubadas a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; después se enfrió a temperatura ambiente. Una vez obtenidas las muestras a temperatura ambiente se añadió 3µl de RNasa a la solución de lisado celular y se invirtieron los tubos 2-5 veces para mezclarlos. Se incubaron las muestras a 37°C en un termoblock durante 30 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se agregaron 200µl de solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNasa y se mezcló con vortex a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de

proteínas con el lisado celular. Después las muestras fueron puestas en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo y estéril que contenía 600µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formaran una masa visible. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos. Una vez centrifugadas las muestras, se vertió cuidadosamente el sobrenadante y se dejaron secar los tubos sobre papel absorbente limpio. Se añadieron 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtieron suavemente los tubos varias veces para lavar el paquete de ADN. Se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos y después se desechó con cuidado el etanol. Se vaciaron los tubos sobre papel absorbente limpio y se permitió que el precipitado se secase al aire durante 15 minutos. Se añadieron 100µl de solución de rehidratación de ADN a los tubos con el ADN y se incubó a 65°C en el termoblock durante 1 hora. Se guardaron las muestras de ADN contenidas en microtubos a -20°C para su posterior procesamiento.

5.5 Determinación de la calidad y concentración de ADN genómico extraído.

Una vez extraído el ADN de los ocho distintos aislados microbianos, se determinó la concentración de éstos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se disolvieron 0.5g de agarosa en 50 ml de Buffer 0.5x TBE (Tris EDTA, ácido bórico), se calentó con agitación hasta disolver por completo la agarosa, se llevó a ebullición, se dejó enfriar hasta aproximadamente 65°C para posteriormente verter la agarosa en un portageles, se colocó un peine en las muescas del portageles y

se dejó polimerizar por alrededor de 20 minutos. Se removió el peine formando los pozos donde se depositaron las muestras de ADN. Posteriormente el gel fue introducido a una cámara de electroforesis y se añadió Buffer 0.5x TBE hasta cubrir el gel y sus pozos por completo. Por otra parte, se mezclaron por separado 5µl de las diferentes muestras de ADN genómico con 2µl del Buffer de carga Azul de Bromofenol 6x y se depositaron en los pozos del gel. Las muestras de ADN se corrieron en el gel de agarosa a 120mV alrededor de 40 minutos. Luego de esto, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio 100 µM durante 15 minutos, se lavó con agua destilada por 30 minutos para eliminar el exceso de Bromuro de Etidio. Se observó en un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System, y mediante el Software Image Lab versión 5.1 (*Bio-Rad, Carlsbad CA, USA*) se obtuvo una imagen de la corrida de las muestras de ADN. Adicionalmente, se analizó la concentración y pureza de las muestras de ADN extraídos mediante espectrometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) con un radio de excitación de A260/A280 y A260/A230 (Johnson J. L., 1994). La relación de absorbancia 260/280 sirve para evaluar la pureza de ADN. Un resultado en esta relación cercano a 1.8 es aceptable. Si la relación es menor a este valor, puede indicar la presencia de proteínas, fenol y otros contaminantes que absorben fuertemente en una longitud de onda de 280 nm. La relación A260/A230, es una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos. Los valores de esta relación para un ácido nucleico “puro” están en el rango de 1.8 a 2.22. Si la relación es menor a estos valores, esto puede deberse a la presencia de contaminantes.

5.6 Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez determinada la integridad y concentración de las muestras de ADN, se realizó amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S (forma parte de la subunidad 30S de los ribosomas procariotes) mediante PCR utilizando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Marchesi y col., 1998). La reacción de PCR se llevó a cabo según especificaciones del fabricante de la mezcla maestra PCR Master Mix (5x), Gene and Cell Technologies. Para una reacción de 50 µl: 38 µl de agua Milli Q, 10 µl de PCR Master Mix (5x), 1 µl de primer 27F, 1 µl de primer 1541R y 1 µl de templado. Como control negativo se empleó la mezcla de reacción mencionada excluyendo la adición de ADN. La reacción se realizó en un termociclador Multigene Gradient (Labnet, Edison, NJ USA); bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 59°C durante 50 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 5 minutos. Los productos derivados de esta reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el fotodocumentador y el software Image Lab versión 5.1.

5.7 Secuenciación y análisis de secuencias obtenidas.

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar y las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas con secuencias contenidas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa Blastn para su posterior análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Morfología colonial y bacteriana de los nueve aislados microbianos del humedal artificial.

En la Tabla 1 se muestran fotografías y características morfológicas de las colonias que forman los distintos aislados microbianos, trabajados en la presente tesis de licenciatura, (E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2, SG1, SG3) sobre medio R2A. Mientras que en la Tabla 2 se indican los resultados de la tinción diferencial de Gram de dichos aislados.

Tabla 1. Características de morfología colonial de los aislados microbianos E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2, SG1 y SG3.



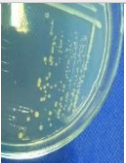
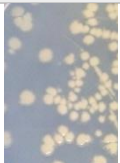


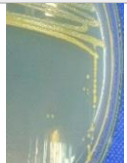
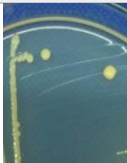


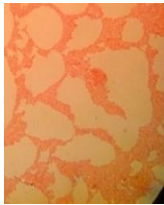


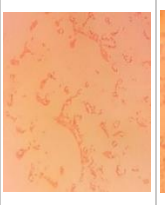

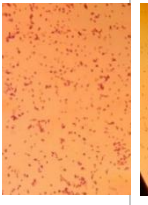


Morfología colonial de los aislados								
E1	E2	E4	E5	E6	S1	S2	SG1	SG3
								
Forma Circular	Forma Puntiforme	Forma Puntiforme	Forma Irregular	Forma Irregular	Forma Puntiforme	Forma Puntiforme	Forma Circular	Forma Puntiforme
Borde Entero	Borde Entero	Borde Entero	Borde Ondulado	Borde Ondulado	Borde Entero	Borde Entero	Borde Entero	Borde Entero
Elevación Elevada	Elevación Convexa	Elevación Plana	Elevación Plana	Elevación Plana	Elevación Convexa	Elevación Plana	Elevación Elevada	Elevación Elevada
Superficie Lisa	Superficie Lisa	Superficie Rugosa	Superficie Lisa	Superficie Lisa	Superficie Lisa	Superficie Lisa	Superficie Lisa	Superficie Lisa
Consistencia Dura	Consistencia Cremosa	Consistencia Cremosa	Consistencia Cremosa	Consistencia Cremosa	Consistencia Mucosa	Consistencia Cremosa	Consistencia Mucosa	Consistencia Dura
Color Amarillo	Color Crema	Color Crema	Color Blanco	Color blanco	Color Amarillo	Color Crema	Color Crema	Color Rosa
Luz transmitida Traslucida	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca	Luz Transmitida Opaca
Luz reflejada Brillante	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Opaca	Luz reflejada Brillante















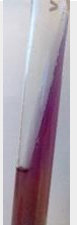





Tabla 2. Tinción de Gram de los nueve aislados microbianos obtenidos del sistema de depuración de agua gris artificial.
















Aislado Microbiano								
E1	E2	E4	E5	E6	S1	S2	SG1	SG3
								
Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram(-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (-)	Cocos Gram (-)

6.2 Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados microbianos cultivables del humedal artificial.

Con el fin de identificar el tipo de metabolismo celular presente en los diferentes aislados microbianos, se realizaron algunas pruebas bioquímicas (Catalasa, MIO, hierro de Kligler, citrato de Simmons, hierro y lisina, McConkey, fenilalanina, DNasa y rojo fenol). En las tablas 3.1 y 3.2 se observan los resultados de tales pruebas bioquímicas. Los aislados E5 y E6 mostraron características bioquímicas similares, al igual que su morfología colonial (véase Tabla 1), por lo que fue necesario el proceso de secuenciación para descartar la posibilidad de que se tratase del mismo microorganismo.

Tabla 3.1. Pruebas bioquímicas (Catalasa, MIO, hierro de Kligler, citrato de Simmons y hierro y lisina) realizadas a los aislados del humedal artificial.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
AISLADO MICROBIANO	Catalasa	MIO	Hierro de Kligler	Citrato de Simmons	Hierro y Lisina
Controles (-)					
E1	 (+)	 M: (-) I: (-) O: (+)	 B/B Microorganism o no fermentador de azúcares. (-)	 Citrato Negativo	 Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
E2	 (+)	 M: (+) I: (-) O: (+)	 B/B Microorganism o no fermentador de azúcares. (-)	 Citrato negativo	 Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
E4	 (+)				

		M: (-) I: (-) O: (+)	B/B Microorganism o no fermentador de azúcares. (-)	Citrato positivo	Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
E5	 (+)	 M: (-) I: (-) O: (-)	 B/A EI microorganism o sólo fermenta glucosa.	 Citrato negativo	 Decarboxilación de la Lisina: (-) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
E6	 (+) Nota: Baja presencia de burbujas.	 M: (-) I: (-) O: (-)	 B/A EI microorganism o sólo fermenta glucosa.	 Citrato negativo	 Decarboxilación de la Lisina: (-) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
S1	 (+)	 M: (-) I: (-) O: (+)	 B/A EI microorganism o sólo fermenta glucosa.	 Citrato negativo	 Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)
















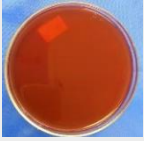

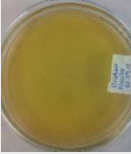





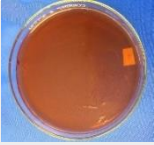





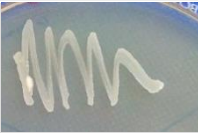





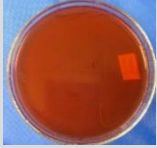







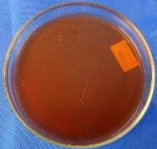



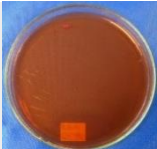



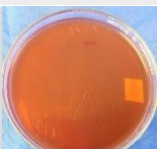



<p>S2</p>	 <p>(+)</p>	 <p>M: (-) I: (-) O: (+)</p>	 <p>B/B Microorganismo o no fermentador de azúcares. (-)</p>	 <p>Citrato negativo.</p>	 <p>Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)</p>
<p>SG1</p>	 <p>(+)</p>	 <p>M: (-) I: (-) O: (+)</p>	 <p>B/A EI microorganism o sólo fermenta glucosa.</p>	 <p>Citrato negativo</p>	 <p>Decarboxilación de la Lisina: (+) Desaminación de la Lisina: (-) Producción de ácido sulfhídrico: (-)</p>
<p>SG3</p>	 <p>(-)</p>	 <p>M: (-) I: (-) O: (-)</p>	 <p>B/B Microorganismo no fermentador de azúcares. (-)</p>	 <p>Citrato negativo</p>	 <p>(-) Sin crecimiento en el medio</p>

Tabla 3.2. Pruebas bioquímicas (McConkey, fenilalanina, DNasa y rojo fenol) realizadas a los aislados del humedal artificial.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
AISLADO MICROBIANO	McConkey	Fenilalanina	DNasa	Rojo Fenol
Controles (-)				
E1	 (-) Sin crecimiento en el medio.	 (-)	 (-) Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.	 (-)
E2	 (-) Sin crecimiento en el medio	 (-)	 (-) Sin crecimiento en el medio	 (-)
E4	 (+) Microorganismos fermentadores de lactosa.	 (-)	 (-) Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.	 (-)
E5	 (+) Microorganismos fermentadores de lactosa.	 (-)	 (-) Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.	 (-)

				Cambio del medio a naranja tenue (+)
E6	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p> <p>Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.</p>	 <p>Cambio del medio a naranja tenue (+)</p>
S1	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p> <p>Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.</p>	 <p>(-)</p>
S2	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>
SG1	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p> <p>Sin presencia de halo transparente alrededor del medio.</p>	 <p>(-)</p>
SG3	 <p>(-)</p> <p>Sin crecimiento en el medio.</p>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p> <p>Sin presencia de halo transparente alrededor del microorganismo.</p>	 <p>(-)</p>

6.3 Análisis de la integridad y concentración del ADN extraído.

El ADN genómico obtenido de los nueve aislados microbianos fue corrido en un gel de agarosa al 1% para determinar su integridad. Como puede observarse en la figura 3, el material genético obtenido fue de buena calidad pues no presentó degradación.

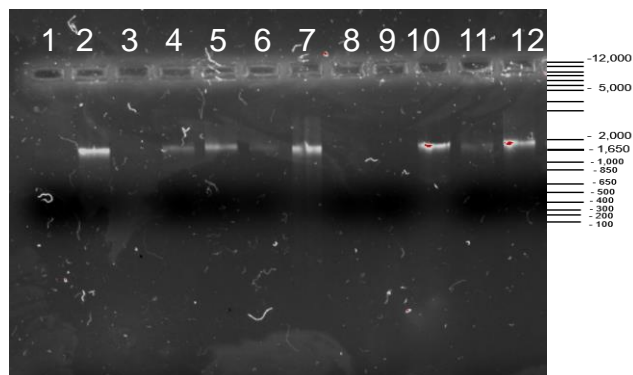


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observa el ADN extraído de los distintos aislados microbianos. Carriles 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11 y 12: ADN genómico extraído de los aislados E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2 y SG1.

También se determinó la concentración de las ocho muestras de ADN. En la tabla No. 4 pueden observarse los valores obtenidos para la concentración, representada en ng/ μ l, así como los valores de absorbancia a 260 y 2870 nm y las relaciones de $A_{260}/280$ y $A_{260}/230$ para las distintas muestras de ADN. Las muestras de ADN más concentradas fueron las correspondientes a los aislados E2, E6 y S2 seguidas de las muestras de ADN de los aislados E5, E4, SG1, E1 y S1. Posteriormente, estas muestras de ADN fueron empleadas para realizar ensayos de PCR y secuenciación y así encontrar el género al que pertenecen los distintos aislados.

Tabla 4. Concentración de ADN extraído de los aislados microbianos cultivables del sistema de humedal artificial.

Aislado microbiano	[ADN] ng/ μ l	A260	A280	A260/280	A260/230
E1	4.9	0.097	0.039	2.47	0.78
E2	23	0.460	0.261	1.76	0.87
E4	7	0.139	0.067	2.08	0.81
E5	7.3	0.146	0.066	2.22	2.98
E6	22.9	0.457	0.238	1.92	2.00
S1	3.3	0.065	0.025	2.65	1.07
S2	21	0.450	0.250	1.80	1.15
SG1	5.2	0.125	0.047	2.65	0.82

6.4 Amplificación y análisis de secuencias generadas de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados microbianos.

Empleando los oligonucleóticos universales 27F y 1491R y DNA genómico de ocho aislados microbianos (E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2 y SG1) como templado, se logró amplificar por PCR una banda de aproximadamente 1500 pb (Fig. 4) para cada uno de los ocho ADNs. Se obtuvieron las secuencias de los productos de PCR y al hacer su análisis, se encontró que estas secuencias correspondían a regiones del gen ribosomal 16S de distintas bacterias.

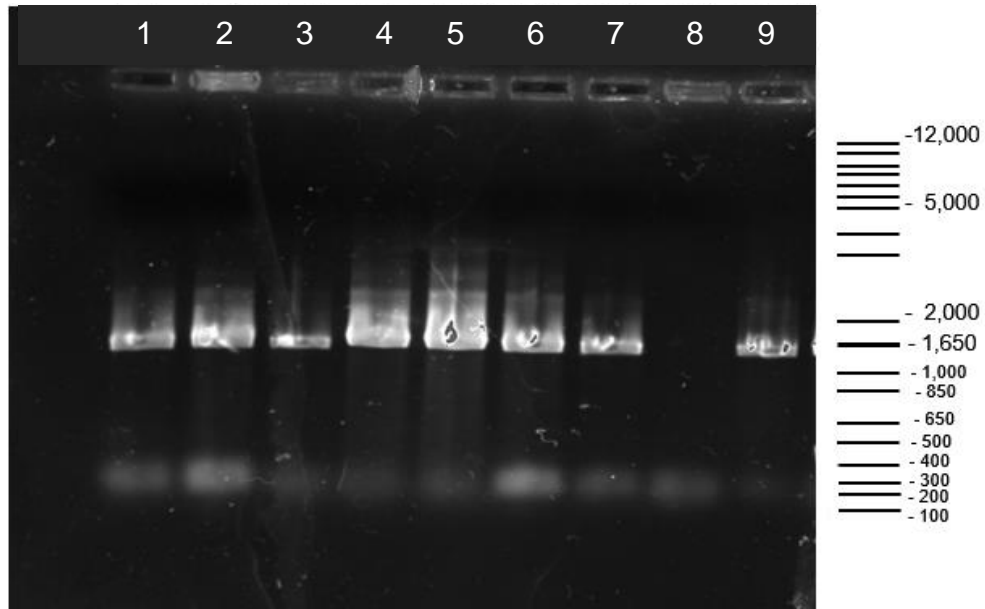


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de PCR obtenidos a una T_m de 59°C. Carriles del 1 al 7 y 9: productos de la amplificación por PCR usando como templado ADN extraído de los aislados E1, E2, E4, E5, E6, S1, S2 y SG1, carril 8: control (-).

En la Tabla 5 se indica la codificación de los aislados microbianos empleados en la presente investigación, la longitud de nucleótidos de las secuencias obtenidas en la secuenciación, los valores de identidad (I), la probabilidad de que la identidad, arrojada por el programa Blast(n), sea producto de la casualidad (E), los nombres de las bacterias con las secuencias más parecidas que encontró el programa Blast(n) en la comparación con las secuencias que se le introdujeron, los números de acceso de las secuencias de estas bacterias en la base de datos del NCBI, y de estar publicado algún artículo al respecto, los nombres del o los autores y el año de publicación. En dicha tabla puede notarse que las secuencias de los fragmentos amplificados por PCR comparten identidad con genes ribosomales 16S de distintas bacterias.

Tabla 5. Análisis comparativo de las secuencias de productos de PCR de los ocho aislados microbianos del humedal artificial.

AISLADO	LONGITUD DE SECUENCIA En pares de bases (pb)	E	I (%)	Gen de MICROORGANISMO COMPARADO	ACCESO	AUTOR(ES) Y AÑO
E1	858	1X10 ⁻⁶³	90	<i>Xanthobacter sp.</i> IMCC1720 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	DQ664202.1	Cho, J. C. y Song J. 2006
E2	1420	1x10 ⁻⁵⁵	96	<i>Rhizobium sp.</i> HW-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	KP152650.1	Wang L. y col. 2014
E4	1500	0	89	<i>Bacillus sp.</i> BBN3C-04d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	FJ357603.1	Indiragandhi P. y Kim G.H. 2008
E5	1053	1x10 ⁻¹⁴⁵	94	<i>Xanthobacter sp.</i> ZYYR3 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB847934.1	Ding L. X y col. 2013
E6	1542	0	91	<i>Bacillus sp.</i> BG3-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	KP992110.1	Xiong L. y Chen Q. 2015
S1	1410	1x10 ⁻⁸¹	93	<i>Xanthomonas sp.</i> ML-122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	AF139997.1	Venkateswara N. K. y Nealson K. H. 1999
S2	517	1x10 ⁻⁸⁴	95	<i>Bacillus sp.</i> cp-h57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	EU584550.1	Cui P. y Liu X. 2008
SG1	995	0	97	<i>Mycobacterium sp.</i> Is2.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	HQ224877.1	Johnson R. J., y col. 2010

Pese a que los productos de PCR generados de los distintos aislados microbianos mostraron tamaños de alrededor de las 1500 pb (Fig. 4), las secuencias de los aislados E1, S2 y SG1 presentaron longitudes de 850, 517 y 995 pb de largo respectivamente, esto debido a que la secuenciación de estos ADNs en particular fue difícil por contener alto contenido de GC en su secuencia.

Las secuencias de los fragmentos de PCR de los aislados E1 y E5, compartieron identidad con el gen ribosomal 16S de *Xanthobacter sp.* que es una proteobacteria clase Alfa. Las especies reconocidas de *Xanthobacter* se entremezclan con especies de los géneros *Aquabacter* y *Azorhizobium* por lo que pertenecen al mismo grupo. Las células de *Xanthobacter sp.* poseen forma de bastoncillo o

varilla, algunas veces torcido entre 0.4 y 1.0 μm de diámetro y 0.8 y 6.0 μm de longitud. Este género puede presentar o no movilidad dependiendo de las condiciones de la especie (por flagelos peritricos). Su tinción de Gram frecuentemente da falsos positivos o variable debido a que posee gránulos de polifosfato; sin embargo, ultraestructural y bioquímicamente, la pared celular es del tipo Gram negativo (Baumgarten y col., 1978). Es un microorganismo aerobio por poseer un tipo de metabolismo estrictamente respiratorio con el oxígeno como último aceptor de electrones. Las colonias son opacas y viscosas, de color amarillo debido a un pigmento carotenoide insoluble en agua (Zeaxantina dirhamnosido). El género *Xanthobacter* es considerado como fijador de nitrógeno (N_2). Generalmente lo hace en medios deficientes en este elemento en condiciones de crecimiento heterótrofo o quimiolitautótrofo bajo una disminución de presión de O_2 . Bacterias de vida libre de este género se producen en agua dulce, principalmente *X. agilis*, en suelo húmedo con materia orgánica en descomposición puede encontrarse *X. autotrophucus* y *X. flavus*, mientras que en sedimentos marinos es común *X. flavus*. Este género se asocia a las raíces de las plantas, incluyendo arroz inundado por lo que, dadas las condiciones del humedal artificial, es muy probable que los aislados E1 y E5 pertenezcan al género *Xanthobacter* (Brenner y col., 2005).

El aislado E2 presentó identidad con el género *Rizobium*. Las bacterias pertenecientes a este género son Gram negativas, viven en el suelo de forma saprófita utilizando el nitrógeno combinado. Son aerobios y su temperatura óptima de crecimiento varía entre 25 y 30°C; pertenecen a la familia Rhizobiaceae y se

caracterizan por su habilidad para infectar raíces de leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de N₂ en las raíces, aunque en algunos casos los nódulos pueden formarse también en el tallo. El género *rizobium* se subdivide en dos grupos: en el género *Bradyrhizobium* se ubican las bacterias de crecimiento lento, que producen alcalinidad en el medio de cultivo, con un tamaño en sus colonias de más de 3mm de diámetro en los primeros 3 a 5 días de incubación. Las bacterias de crecimiento rápido, que producen acidez en el medio de cultivo, se clasifican en el género *Rhizobium* cuyas colonias tienen tamaño de entre 1 y 5 mm de diámetro en los primeros 5 a 20 días de incubación (Sierra Posada J. O., 2005). Estas cepas pueden ser utilizadas en procesos de biodegradación, fitorremediación y recuperación de suelos, y, a su vez, las cepas que producen sideróforos han demostrado que pueden aportar una protección importante en las raíces de las plantas contra diferentes hongos patógenos.

Las secuencias de los productos de PCR de los aislados E4, E6 y S2 presentaron identidad con secuencias del gen ribosomal 16S de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. Este género se caracteriza por tener tamaños de entre 4 y 10 µm, son Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Además son capaces de formar esporas muy resistentes a condiciones desfavorables. La presencia de *Bacillus spp.* es frecuente en una gran variedad de ambientes naturales, como agua y suelo. Estos microorganismos se detectan con frecuencia en aguas de consumo, incluso en aquellas tratadas y desinfectadas. Esto debido a la resistencia de sus esporas a los procesos de desinfección (Bartram y col. 2003). Pese a que una gran variedad de especies del

género *Bacillus* son consideradas patógenos de humano y animales, también hay cepas con aplicación en la agricultura como *Bacillus subtilis*, que se emplea como un fungicida agrícola, coloniza raíces de las plantas previniendo la infección de otros hongos patógenos a las plantas, promueve un desarrollo de raíces más fuertes y sanas debido a la secreción de fitohormonas. También la especie *thuringensis* es utilizada como bioinsecticida (Mohamed., 2010).

La secuencia del producto de PCR del aislado S1 compartió identidad con el género *Xanthomonas* que son células Gram negativas con forma de varilla recta con un tamaño entre 0.4 a 1.0 μm de ancho por 1.2 a 3.0 μm de largo (Schaad y col., 2001), móviles por un solo flagelo polar. Su crecimiento suele ser mucoso, convexo y usualmente amarillo en medio YDC (Levadura, Dextrosa, Calcio; por sus siglas en inglés Yeast, Dextrose, Calcium). Este género causa manchas pues es plaga en las hojas, tallos y frutos de una gran variedad de especies de plantas (Boch y Bonas , 2010). Algunas especies de este género ayudan a degradar hidrocarburos (Barrios San Martín, 2011) y promover la degradación de materia orgánica presente en agua de formación (Castro y col., 2008).

La secuencia del producto de PCR del aislado SG1 mostró identidad con el gen ribosomal 16S del microorganismo *Mycobacterium sp.*, que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, incluye a bacilos o cocobacilos de entre 0.2 y 0.6 μm de ancho y 1 y 10 μm de longitud. Son aerobios, inmóviles y no esporulados. Aunque son difícilmente teñibles por la tinción de Gram son considerados Gram positivos (Sempere Alcocer y col., 1993). El crecimiento de estos microorganismos es muy variable, pudiéndose encontrar en el hombre, animales, aguas, suelos, vegetación,

etc. Entre sus aplicaciones se tiene a la especie *Mycobacterium gilvum*, la cual es aislada de agua de mar y es utilizada para degradar hidrocarburos aromáticos (Figueroa., 2005). También *Mycobacterium austrofricanum* ha sido utilizada para degradar compuestos como el benceno, tolueno, etilbenceno, entre otros, mediante biodegradación de gasolina por microflora de suelo y agua de sitios contaminados (Benavides López. y col., 2005).

Mediante pruebas microbiológicas, bioquímicas y técnicas de biología molecular, se logró aislar e identificar el género del 89% de los aislados microbianos bajo estudio en este trabajo. Las descripciones de los cinco géneros bacterianos encontrados (*Xanthobacter*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Mycobacterium*) indican la presencia de microorganismos posiblemente capaces de aportar beneficios en el proceso de depuración de agua gris alimentada al humedal artificial. En investigaciones posteriores se buscará encontrar la contribución específica de estos microorganismos en sistemas controlados de depuración de agua.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias, O., (2004). Estudio de la biodegradación de la materia orgánica en humedales construidos de flujo subsuperficial. Universidad Politécnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Hidràulica, Marítima i Ambiental. Tesina, Barcelona.
2. Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, (2011), sección 4: peligros sanitarios, pp. 199.
3. Barrios San Martín Y., (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo, pp. 66.
4. Bartram J. y col., (2003). Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing.
5. Baumgarten J. y col., (1978). Transfer of the Nitrogen-fixing Hydrogen Bacterium *Corynebacterium autotrophicum* Baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen, pp. 580.
6. Benavides López de Mesa J. y col. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. pp. 88.
7. Brenner Don J. y col., (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two. Second edition, part 3.* pp. 555-564.
8. Boch J. y Bonas U., (2010). *Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.*
9. Castro F. y col., (2008). Diminution of the COD in formation waters using bacterial stocks. pp. 263.
10. Cooper, P. F., Job, G. D., Green, M. B. & Shutes, R. B. E. (1996) *Reed Beds and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment.* WRc Publications, Medmenham, Marlow, UK.
11. Delgadillo O., Camacho A., Pérez L. F., Andrade Mauricio, 2010. Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales, pp. 14-15.
12. Dugan J. P., 1992. Conservación de humedales: Un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias, cap. 3.
13. Fernández González J. y col., 2005. Manual de depuración mediante el uso de macrofitas, pp.79, 87.

14. Figueroa B. E., (2005). Biodiversidad marina: valoración, usos y perspectivas: ¿Hacia dónde va Chile?, pp. 360.
15. García, J. (2004). Humedales construidos para controlar la contaminación: perspectivas sobre una tecnología en expansión. Nuevos criterios para el diseño y operación de humedales construidos. Ed. CPET. Barcelona.
16. Haig y col. (1998). Avian movements and wetland connectivity in landscape conservation. *Conservation Biol.* 12. pp. 749-758.
17. Halpin P. M., (2000). Habitat use by an intertidal salt-marsh fish: trade-offs between predation and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 198. pp. 203–214.
18. Instituto de investigaciones sociales, UABC. Atlas de riesgos del municipio de Mexicali, 2011, pp. 199-200.
19. Johnson, J. L., (1994). Similarity analysis of DNAs. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 655–681. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
20. Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina. Link: <http://www.britanialab.com/productos.php>
21. Lara Borrero J., 1999. Depuración de Aguas Residuales Municipales con Humedales Artificiales, pp.7.
22. Lefeuvre JC, Laffaille P, Feunteun E, Bouchard V, Radureau A., (2003). Biodiversity in salt marshes: from patrimonial value to ecosystem functioning. The case study of the Mont-Saint-Michel bay. *C. R. Biol.* 326(Suppl 1): pp.125-131.
23. Marchesi Julian R. y col., (1998). Design and Evaluation of useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. pp. 795-798.
24. MCD (Medios de Cultivo Deshidratados) LAB, México. Link: <http://www.mcclab.net/products.html>
25. Moreno Merino L. y col., (2002). La depuración de aguas residuales urbanas de pequeñas poblaciones mediante infiltración directa en el terreno, pp. 22-23.
26. Mohamed I. A., (2010). *Bacillus Thuringensis*: A genomics and proteomics perspective, pp. 31.
27. Muratova, A. y col., (2003). Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil, pp. 140.

28. Prescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A., (2002). Microbiology.
29. Ramsar Convention Secretariat, (2004). The RAMSAR Convention manual: a guide to the Convention on Wetlands (RAMSAR, Iran, 1971). RAMSAR Convention Secretariat, Gland Switzerland, pp. 75.
30. Rodriguez Cavallini E. y col., (2005). Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio.
31. Sánchez O., (2005). Temas Sobre restauración ecológica, pp. 202.
32. Schaad, NW, Jones, JB, Chun, W. (2001). "Guía de Laboratorio para la Identificación de bacterias fitopatógenas 3ª Ed.": pp. 175-199.
33. Sempere Alcocer M. A. y col., (1993). Composición química, biosíntesis, actividad biológica y estructuración de lípidos y polisacáridos de mycobacterium. pp. 2-3.
34. Sierra Posada J. O., (2005). Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros, pp. 185.
35. Stearman y col, (2003). Pesticide removal from container nursery. Article Link: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/32/4/1548>
36. Thermo Fisher Scientific, (2009). NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer V1.0 User Manual, pp. 3-4, 3-5.
37. Valiela I, y col., (1978). Nutrient and Particulate Fluxes in a Salt Marsh Ecosystem Tidal Exchanges and Inputs by Precipitation and Ground Water. Limnol. Oceanogr. 23(4): pp. 798–812.
38. Villaseñor Camacho J., (1998). Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas, pp.7.