

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**FLORA BACTERIANA AEROBIA Y ANAEROBIA MESÓFILA PRESENTE
EN LOS SEDIMENTOS DE UN HUMEDAL NATURAL DE LA
UNIVERSIDAD EARTH**

PATRICIA DANIELS CHAN



CARTAGO, 2005

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**FLORA BACTERIANA AEROBIA Y ANAEROBIA MESÓFILA PRESENTE
EN LOS SEDIMENTOS DE UN HUMEDAL NATURAL DE LA
UNIVERSIDAD EARTH**

PATRICIA DANIELS CHAN



CARTAGO, 2005

FLORA BACTERIANA AEROBIA Y ANAEROBIA MESÓFILA PRESENTE EN LOS SEDIMENTOS DE UN HUMEDAL NATURAL DE LA UNIVERSIDAD EARTH

PATRICIA DANIELS CHAN*

RESUMEN

Dentro de la gran cantidad de ambientes de humedal que existen, los humedales dulceacuícolas se encuentran entre los ecosistemas más productivos de la tierra, por su función vinculada a la aportación de agua y a la productividad primaria de la que dependen las especies silvestres. Estos ecosistemas desempeñan algunas funciones vitales para la sociedad, siendo la principal en este caso, la purificación de las aguas mediante la retención de los nutrientes, los sedimentos y los contaminantes.

Debido a la reconocida importancia de las bacterias en los procesos de depuración de las aguas, la Universidad EARTH por medio de la presente investigación exploratoria pretende dar a conocer los grupos de las comunidades de bacterias, que se pueden cultivar y están presentes en los sedimentos del humedal natural "La Reserva". Para lograr lo anterior, se hizo uso de la metodología de ecología microbiana, aislando las bacterias que crecían en los medios: agar sangre, MacConkey y Cetrimida, para luego ser identificados con las pruebas Bioquímicas: API®.

Entre los géneros aerobios identificados en este estudio se encontraron: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bordetella*, *Ochrobactrum*, *Oligella* y *Shingomonas*. Además se identificaron bacterias aaerobias facultativas, de los géneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Moellerella*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Serratia*.

Y por último se logró la identificación de bacterias anaerobias de los grupos: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*.

Algunas de las especies aisladas son consideradas perjudiciales para el hombre, sin embargo, la mayoría de las bacterias son benéficas para el ambiente, ya que tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes inorgánicos y orgánicos en minerales inocuos, que pueden ser reciclados al medio ambiente y de esa forma mantener el equilibrio de la naturaleza.

En cuanto a los recuentos de las bacterias anaerobias y aerobias presentes variaban constantemente entre los sitios de entrada, parte media y salida del humedal. De manera general los recuentos en el primer muestreo fueron los más altos, y se obtuvo un mayor recuento de bacterias anaerobias en el segundo y tercer muestreo

Palabras clave: humedales naturales, bacterias aerobias, anaerobias, sedimentos.

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**FLORA BACTERIANA AEROBIA Y ANAEROBIA MESÓFILA PRESENTE
EN LOS SEDIMENTOS DE UN HUMEDAL NATURAL DE LA
UNIVERSIDAD EARTH**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Julio César Tejada Ramírez
Profesor Asesor- EARTH**

**Ph.D. Miguel Rojas
Asesora- ITCR**

**MSc. Evelyn Rodríguez
Lectora-UCR**

DEDICATORIA

*A Jesús el Hijo de Dios por ser mi sentido de vida,
ya que sin él nada puedo hacer.
A mis padres y hermanos, por su inmenso amor,
comprensión, apoyo y por creer siempre en mí.*

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo de graduación:

Mi agradecimiento al MSc. Julio César Tejada, por haber confiado en mí, brindándome la oportunidad de trabajar en este proyecto y por sus importantes sugerencias durante la redacción del Informe.

A la MSc. Evelyn Rodríguez y a la MSc. María del Mar Gamboa por su paciencia, apoyo, dirección y entrega.

Al Sr. Pablo Vargas, por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas.

Al apreciado Ph.D. Miguel Rojas, por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A la Universidad EARTH, y a todas las personas de la Universidad de Costa Rica que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis queridos amigos Jose David Rojas y Fabiana Rojas, por su incondicional amistad y porque con ellos compartí muchos de los gratos momentos que he pasado en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO=

	Página
RESUMEN	i
DEDICATORIA	lii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Anexos	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo General	6
2.2 Objetivo Específico	6
3. REVISIÓN LITERARIA	7
3.1 HUMEDALES EN COSTA RICA	8
3.1.1 Clasificación	8
3.1.2 Componentes	8
3.1.2.1 El agua	8
3.1.2.2 Animales	9
3.1.2.3 Vegetación	10
3.1.2.4 El suelo en los humedales	10
3.1.2.4.1 Propiedades físicas del suelo en humedales	13
3.1.2.4.2 Propiedades químicas del suelo en humedales	14
3.1.2.4.2.1 Capacidad de intercambio de cationes	14
3.1.2.4.2.2 Reacciones de oxidación y reducción	15
3.1.2.4.2.3 pH	16
3.1.2.4.3 Transformaciones químicas en humedales	17
3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Nitrógeno	17
3.1.2.4.3.2 Transformaciones del Hierro y Manganeso	17
3.1.2.4.3.3 Transformaciones del Sulfuro	17
3.1.2.4.3.4 Transformaciones del Carbono	18
3.1.2.4.3.5 Transformaciones del Fósforo	18
3.1.2.5 Microorganismos	18
3.1.2.5.1 El papel microbiano en los ecosistemas naturales	18
3.1.2.5.1.1 Las bacterias	20

3.1.2.5.1.2	Morfología	21
3.1.2.5.1.3	Metabolismo bacteriano	22
3.1.2.5.1.4	Respiración celular	24
3.1.2.5.1.4.1	Respiración aerobia	24
3.1.2.5.1.4.2	Respiración anaerobia	25
3.1.3	FUNCIONES, PRODUCTOS y ATRIBUTOS	26
3.1.3.1	Funciones	26
3.1.3.1.1	Retención de nutrientes	27
3.1.3.1.2	Retención de sedimentos y sustancias tóxicas	28
3.1.3.1.2.1	Función depuradora de los humedales	28
3.1.3.1.2.2	Descomposición de la materia orgánica	30
3.1.3.1.3	Recarga de acuíferos	33
3.1.3.1.4	Descarga de acuíferos	34
3.1.3.1.5	Control de inundaciones	34
3.1.3.1.6	Captación de energía solar	35
3.1.3.1.7	Otras funciones importantes	35
3.1.3.2	Productos	37
3.1.3.2.1	Forestales	37
3.1.3.2.2	Vida silvestre	37
3.1.3.2.3	Recursos agropecuarios	37
3.1.3.2.3.1	Pastoreo	37
3.1.3.2.3.2	Agrícolas	37
3.1.3.2.4	Fuente de energía	38
3.1.3.3	Atributos	38
3.1.3.3.1	Diversidad biológica	38
3.1.3.3.2	Características patrimoniales y culturales	38
3.2	MÉTODOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA	39
3.2.1	Crecimiento microbiano	39
3.2.2	Cultivo de microorganismos	39
3.2.2.1	Fuentes de energía y carbono	40
3.2.2.2	Medios de cultivo	40
3.2.2.2.1	Crecimiento microbiano en medio sólido	41
3.2.3	Métodos de aislamiento	42
3.2.4	Cultivo puro	42
3.2.5	Cultivo de anaerobios	43
3.2.6	Crecimiento y enumeración de microorganismos	43
3.2.6.1	Factores físicos y químicos que influyen en el	45

crecimiento microbiano	
3.2.6.1.1 Temperatura	45
3.2.6.1.2 Actividad de agua	46
3.2.6.1.3 pH	47
3.2.6.1.4 Potencial redox	48
3.3 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	49
3.3.1 Pruebas Bioquímicas: API®	49
4. METODOLOGÍA	55
4.1 Sitio de estudio	55
4.2 Toma de muestras	55
4.3 Transporte de las muestras	55
4.4 Análisis microbiológicos	55
4.4.1 Aislamiento de bacterias aerobias	55
4.4.2 Cultivo puro	56
4.4.3 Sistema API® para identificación bacteriana	59
4.4.4 Aislamiento de bacterias anaerobias	59
4.4.5 Estudio de las características físicas de los cultivos	60
4.4.6 Identificación bacteriana anaerobia	61
5. RESULTADOS	64
6. DISCUSION	78
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	94
8. LITERATURA CITADA	97
9. ANEXOS	107

LISTA DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Comparación de suelos orgánicos y minerales en Humedales	12
2	Funciones de humedales no vinculadas directamente con los humedales dulceacuícolas (Dugan, 1992)	36
3	Tipos de microorganismos en función de su temperatura de crecimiento	46
4	Pruebas de diagnóstico de bacterias	51
5	Unidades formadoras de colonias por gramo de la superficie del suelo del humedal natural de la Universidad EARTH	64
6	Unidades formadoras de colonias por gramo del suelo a una profundidad de 20 cm del humedal natural de la Universidad EARTH	65
7	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la entrada del humedal natural de la Universidad EARTH	70
8	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la entrada del humedal natural de la Universidad EARTH	71
9	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la parte media del humedal natural de la Universidad EARTH	72
10	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la parte media del humedal natural de la Universidad EARTH	73
11	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la salida del humedal natural de la Universidad EARTH	74
12	Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la salida del humedal natural de la Universidad EARTH	75
13	Bacterias aerobias encontradas en el medio agar MacConkey en los distintos puntos de muestreo	76
14	Bacterias aerobias encontradas en el medio agar Cetrimida en los distintos puntos de muestreo	77

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Metabolismo de microorganismos aerobios.	24
2	Flujo de carbono y energía en distintos tipos de metabolismo microbianos	25
3	Principales funciones de los de humedales dulceacuícolas	27
4	Fotografía de una prueba oxidasa positiva	58
5	Fotografía de la prueba de catalasa, negativa y positiva respectivamente	58
6	Esquema resumen de la metodología para la identificación de bacterias aerobias	62
7	Esquema resumen de la metodología para la identificación de bacterias anaerobias	63
8	Unidades formadoras de colonias por gramo en la superficie del sedimento del humedal de la Universidad EARTH	66
9	Promedio de las UFC/g en los sedimentos superficiales	67
10	Unidades formadoras de colonias por gramo en el sedimento a 20 cm de profundidad del humedal natural de Universidad EARTH	68
11	Promedio de las UFC/g en los sedimentos a 20 cm de profundidad	69

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Clasificación de los humedales modificada por Scoth (1989)	107
2	Fotografías de los sitios de muestreo del humedal natural	110
3	Tabla de lectura API® 20 E	113
4	Ensayos complementarios	114
5	Tabla de identificación API® 20 NE	114
6	Tabla de identificación API® 20 A	115
7	Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias aerobias de los sedimentos del humedal natural	116
8	Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias aerobias bacilos positivos de los sedimentos del humedal natural	118
9	Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias anaerobias de los sedimentos del humedal	119
10	Recuento bacteriano aerobio mesofílico del tercer muestreo	120
11	Recuento bacteriano anaerobio mesofílico del tercer muestreo	122
12	Recuento bacteriano aerobio mesofílico por duplicado del tercer muestreo	124
13	Ejemplos de pruebas de aerotolerancia	125
14	Fotografías de bacterias aerobias	128
15	Fotografías de bacterias bacilos positivos	134
16	Fotografías de bacterias anaerobias	137
17	Características coloniales de las bacterias aerobias identificadas en el Humedal Natural	141
18	Características coloniales de las bacterias aerobias bacilos positivos identificadas en el Humedal Natural	143
19	Características coloniales de las bacterias anaerobias identificadas en el Humedal Natural	144
20	Información de los 36 géneros bacterianos identificados	145

1. INTRODUCCIÓN

El término humedal agrupa a una gama amplia de ambientes distribuidos por toda la superficie terrestre, en los que el agua es el elemento principal, y estos se han definido de formas muy diversas. Una de las definiciones de mayor uso y aplicación, por su amplitud y aceptación a escala global, es la utilizada por la Convención Ramsar, la cual define los humedales como: "extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros" (Ramsar, 1971).

Estos ambientes, considerados por una parte de la sociedad como lugares improductivos e insalubres, sólo útiles al ser drenados, han pasado a ser reconocidos como críticos en los programas internacionales sobre la conservación de la naturaleza (Dirección General de la Red de Espacios Naturales Protegidos y Servicios Ambientales, 2002).

Al final de los años setenta, la desecación de los humedales constituía una actividad de interés nacional y un símbolo de progreso de los países desarrollados, mientras que en la actualidad el símbolo de progreso es tener una política nacional de conservación y restauración de estos ecosistemas (Baker, 1992 y Van der Valk *et al.*, 1992). Este gran cambio ocurrió en las tres últimas décadas, por el conocimiento generado sobre su papel ecológico y el mantenimiento de los procesos básicos, en la conservación y la disponibilidad de los recursos hídricos, a escala regional y global (Mitsch, 1992), lo que les ha valido el reconocimiento de ser uno de los ecosistemas del planeta que aporta una gran cantidad y variedad de bienes y servicios a la sociedad y a la supervivencia de muchas comunidades biológicas (Unión Mundial para la Naturaleza, 2002).

Dentro de la gran cantidad de ambientes de humedal que existen, los humedales dulceacuícolas se encuentran entre los ecosistemas más productivos de la tierra, por su función vinculada a la aportación de agua y a la productividad primaria de la que dependen las especies silvestres (UICN, 2002). Además de albergar una alta diversidad biológica, estos ecosistemas desempeñan algunas funciones vitales para la sociedad, tales como: almacenar agua, proteger contra las tormentas e inundaciones, controlar la erosión, recargar y descargar los acuíferos subterráneos, estabilizar las condiciones climáticas locales, particularmente la precipitación y la temperatura y purificar las aguas mediante la retención de los nutrientes, los sedimentos y los contaminantes (Pérez *et al.*, 2000).

Los animales, las plantas y los suelos (sedimentos) de los humedales desempeñan una función apreciable en la depuración de las aguas, debido a su capacidad de eliminar eficazmente las altas concentraciones de los nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, asociados comúnmente al desarrollo de las actividades productivas como la agrícola (Convención sobre los humedales de Ramsar, 2000).

Esta función natural de limpieza de las aguas de los humedales es importante para prevenir los procesos de eutrofización, que originan un crecimiento rápido de las plantas y las algas, el agotamiento del oxígeno disuelto y el efecto negativo sobre otras especies; además de reducir las concentraciones altas de estos nutrientes y su movilización hacia las aguas superficial y subterráneas, susceptibles de ser aplicadas para el uso y el consumo humano (Convención sobre los humedales de Ramsar, 2000).

Los datos disponibles muestran que los ecosistemas de humedal pueden reducir las concentraciones elevadas de los nutrientes de forma muy efectiva y que las plantas presentes en ellos son capaces de eliminar, al incorporarlos

a su biomasa vegetal, algunos compuestos como los plaguicidas procedentes de las actividades agrícolas y las sustancias tóxicas presentes en las descargas industriales y las actividades mineras (Mitsch y Gosselink, 1993). Una parte de los compuestos y sustancias presentes en la columna de agua, que no se incorpora a la biomasa vegetal, pasa al compartimiento de los sedimentos (Chocair, 1982).

Los sedimentos en los humedales funcionan como una fuente o como un sumidero, de muchos de los nutrientes esenciales involucrados en el proceso de la eutrofización (Gómez, 1995). En estos, el intercambio de los nutrientes en la interfase de los sedimentos y el agua depende de las características químicas, tanto, del agua como del sedimento (Lara, 2000).

Este compartimiento ecosistémico actúa como una reserva tampón de los nutrientes para la columna de agua ya que, por un lado amortigua los aumentos de los nutrientes en el medio provenientes de los aportes directos de la descomposición de la materia orgánica (función de sumidero), reteniendo una parte de los mismos. Por otro lado, compensa las disminuciones de los nutrientes en los periodos de alta demanda biológica (función de fuente), liberando una parte de estas formas retenidas (Johnston, 1991). Ya sea que el humedal actúe como una fuente o un sumidero, en esta función, la participación de los microorganismos es esencial (Chocair, 1982).

Dentro de un humedal la diversidad de las comunidades de microorganismos es amplia y se reconoce formada, principalmente, por: bacterias, levaduras, hongos y protozoarios (Atlas y Bartha, 2002). Sin embargo, es de aceptación general que en lo referente a la descomposición de la materia orgánica, la función de las bacterias tiene una significación mayor que el resto de los

otros grupos de microorganismos, debida principalmente a sus altas concentraciones y gran actividad (Rheinheimer, 1987).

La importancia de las poblaciones bacterianas presentes en los sedimentos, se relaciona, además de los procesos de la descomposición de la materia orgánica, con las varias transformaciones geoquímicas y como fuente alimenticia; ya que son capaces de convertir las sustancias orgánicas de la materia particular y de esta manera ponerla a la disposición de los primeros eslabones de la cadena alimentaria (Chocair, 1982).

Sin embargo, las poblaciones bacterianas que realizan estas funciones en el fondo de los sistemas acuáticos, son diferentes a las que ocupan las capas superiores del agua, tanto unas como las otras, están altamente adaptadas a los sedimentos y a las condiciones de la materia orgánica específicas de su medio ambiente (Ecological Society of America, 2003); actualmente se utilizan las bacterias en los sistemas de tratamiento secundarios de las aguas residuales en donde los procesos de depuración y limpieza de las aguas se basan en la actividad de las bacterias, tal y como sucede en las plantas de tratamiento de las aguas residuales (Rittmann y McCarty, 2001).

Debido a la reconocida importancia de las bacterias en los procesos de depuración de las aguas, resulta de interés conocer los grupos principales de estas comunidades presentes en los sedimentos de los ecosistemas de humedal. Esta importancia crece debido a las normativas vigentes que, en Costa Rica y en los países de la América Central, exigen que las aguas residuales originadas en el desarrollo de las actividades productivas cumplan ciertos requisitos en sus características físicas y químicas, antes de ser vertidas a un curso natural de agua (Decreto N° 31176-MINAE).

El reclamo de esta exigencia legal en Costa Rica (Decreto N° 31545-S-MINAE), ha llevado a considerar a los ecosistemas de humedal, en su papel de limpiadores naturales de aguas, como una opción práctica y útil para cumplir esta normativa. Particularmente, en la zona del Caribe de Costa Rica, región tropical húmeda, en donde existe aún mucho espacio, agua y humedales y en donde el establecimiento de las empresas ha crecido constantemente en la última década (Álvarez, 1999).

El interés por la conservación y el buen uso dado a los ecosistemas de humedal, ha llevado a la universidad EARTH a formalizar sus esfuerzos de investigación para comprender mejor el funcionamiento integral de estos ecosistemas y su vinculación con el desarrollo de algunas actividades productivas, en una iniciativa conocida internamente como el Proyecto 5 DOE. Es dentro de este proyecto que se desarrolla la presente investigación exploratoria, que propone caracterizar los grupos de las comunidades de bacterias, que se pueden cultivar y están presentes en los sedimentos del humedal natural “La Reserva” de la universidad EARTH, localizado en el Caribe de Costa Rica, cuya zona de localización ha experimentado un marcado crecimiento de las empresas y en donde los humedales son utilizados para limpiar las aguas residuales que estas originan.

Se espera que, los resultados de esta investigación favorezcan una comprensión mayor de la función de limpieza de las aguas que realizan los humedales, de manera que permitan diseñar herramientas útiles y prácticas, para que los humedales sean aprovechados de formas más eficientes y conservados de manera más exitosa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar la diversidad de la flora bacteriana, susceptible de ser cultivada y colectada de los sedimentos del humedal natural “La Reserva” de la universidad EARTH, para comprender mejor la función de limpieza natural de las aguas.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar un recuento de las bacterias anaerobias y aerobias mesofílicas presentes.
- Caracterizar las especies bacterianas cultivables del humedal natural “La Reserva”
- Analizar sus variaciones espacial y temporal.

3 REVISIÓN LITERARIA

3.1 HUMEDALES EN COSTA RICA

Costa Rica posee una rica diversidad biológica, representada por más de 500.000 especies de flora y fauna; cientos de miles de especies de insectos; 1.700 especies de orquídeas; 208 de mamíferos y 850 de aves (Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo CCAD, 1999).

Un 5% de la flora y fauna existentes en el planeta se encuentra en este territorio que cubre tan solo 0.03% de toda la superficie terrestre (CCAD, 1999).

Esta diversidad y heterogeneidad, se encuentra reflejada también en los humedales costarricenses: unas 350,000 hectáreas se han inventariado en todo el país, distribuidas en 320 humedales, que representan 7% del territorio nacional (CCAD, 1999).

Desde la perspectiva de la riqueza natural de Costa Rica, los ecosistemas de humedal favorecen la riqueza de sus especies, al ser las zonas de transición entre los sistemas terrestres y los acuáticos, lo que ha permitido el desarrollo de una gran diversidad biológica y el ser reconocidos como uno de los sistemas más productivos del mundo (Mitsch y Gosselink, 1993).

Sin embargo, los humedales se están convirtiendo rápidamente en uno de los hábitats más amenazados en el mundo debido a la sobreexplotación, la contaminación indiscriminada y el desarrollo insostenible (Rodríguez, 1995). Amenaza que varía en atención al tipo de humedal de que se trate y al conjunto de las demandas que, originadas en la sociedad, los presionan y afectan negativamente (Rodríguez, 1995).

3.1.1 Clasificación

La definición de humedal que ofrece la Convención de Ramsar permite la inclusión de una amplia variedad de ambientes, que se encuentran distribuidos por todo lo largo y ancho de la superficie terrestre (excepción hecha de las regiones polares), por ello, se advertirá que cualquier intento por clasificarlos plantea un reto de consideración.

Una de las clasificaciones más utilizadas, ordena a todos los ambientes de humedal en atención a la unidad paisajística de la cual forma parte (Scott, 1989). De esta manera se reconoce unidades paisajísticas que incluyen 30 categorías de humedales naturales y 9 artificiales (Scout, 1989 en: Dugan, 1992).

De esta clasificación, el humedal sujeto de estudio en esta investigación correspondió al tipo *palustre boscoso tipo a*), es decir pantanos de arbustos, incluyendo pantanos de agua dulce dominados por arbustos y malezas sobre suelos inorgánicos, tal y como se muestra en el anexo 1.

3.1.2 Componentes

Todo humedal está formado por una serie de componentes biológicos, físicos y, químicos, que interactúan entre sí, en el espacio y el tiempo, e incluyen el agua, las especies de animales y plantas y el suelo (con sus microorganismos) (Lara, 2000). Los microorganismos, integrantes del componente biológico, lo trataremos vinculado al suelo por razones de conveniencia.

3.1.2.1 El agua

El es el componente clave en la conformación de un humedal; si ésta no está presente, el humedal deja de existir (García *et al.*, 1997). En atención a la presencia de agua, los humedales se pueden formar donde se acumule una

pequeña lámina de agua sobre la superficie del terreno y donde exista una capa relativamente impermeable del subsuelo que prevenga su filtración (Reed, 1990).

Existen diversos factores que intervienen directamente con la dinámica del agua en relación con los humedales, entre ellos:

- Cambios en la hidrología local.
- La lluvia y la evapotranspiración ya que debido al área superficial del agua y su poca profundidad, un sistema actúa recíproca y fuertemente con la atmósfera a través de dicha combinación.
- La densidad de la vegetación, ya que obstruye caminos de flujo siendo sinuoso el movimiento del agua a través de la red de tallos, hojas, raíces y rizomas y bloquea la exposición al viento y al sol.

3.1.2.2 Animales

Los humedales proveen un hábitat para una rica diversidad de invertebrados y vertebrados. Los animales invertebrados, como los insectos y los gusanos, contribuyen al proceso de tratamiento de la materia orgánica fragmentando el detritus. Las larvas de muchos insectos son acuáticas y consumen cantidades significantes de materia durante sus fases larvales. Los invertebrados también tienen varios papeles ecológicos; por ejemplo, las ninfas de la libélula son rapaces importantes de larvas de mosquito (García *et al.*, 1997). Aunque los invertebrados son los animales más importantes en cuanto a la mejora de la calidad del agua, los humedales también atraen a una gran variedad de anfibios, tortugas y mamíferos, así como a una gran variedad de aves y patos silvestres (García *et al.*, 1997).

3.1.2.3 Vegetación

En el contexto de este trabajo, uno de los mayores mayores beneficios de las plantas, es la transferencia de oxígeno a la zona de la raíz (Kadlec y Knight, 1995). Su presencia física en el sistema (los tallos, raíces y rizomas) permite la penetración a la tierra o medio de sustrato y transporta el oxígeno de manera más eficiente, de lo que llegaría a través de la sola difusión (Martínez, 1989). En los humedales las porciones sumergidas de las hojas y los tallos se degradan y se convierten en lo que se llaman restos de vegetación, que sirven de sustrato para el crecimiento de una película microbiana fija que es la responsable de una gran parte de la función de limpieza, en el tratamiento de purificación de las aguas (Martínez, 1989).

Se puede señalar como las funciones de las plantas acuáticas, más relevantes dentro de un ecosistema de humedal, a las siguientes (Martínez, 1989):

- Estabilizan el sustrato y limitan la canalización del flujo.
- Dan lugar a velocidades de agua bajas y permiten que los materiales suspendidos sedimenten.
- Toman el carbono, nutrientes y los elementos de traza y los incorporan a los tejidos de la planta.
- Transfieren gases entre la atmósfera y los sedimentos.
- Oxigenan otros espacios dentro del sustrato, debido al escape de oxígeno desde las estructuras subsuperficiales de las plantas.

3.1.2.4 El suelo en los humedales

Los suelos de los humedales son iguales a otros suelos, excepto por la influencia del agua en éste, la cual modifica sus características físicas y químicas por la exposición reducida a la atmósfera con la subsiguiente reducción de las condiciones aeróbicas (Kadlec y Knight, 1995). El aporte de agua puede proceder tanto de un nivel freático superficial, como de origen

pluvial. En estos últimos casos se necesita que el aporte de agua se produzca a mayor velocidad de la que el suelo pueda drenar, con lo que se origina una capa de agua colgada con carácter temporal.

La difusión de oxígeno en suelos inundados y con pobre drenaje es aproximadamente 10.000 veces más lenta que en suelos aeróbicos (Amstrong, 1978) ya que la superficie de los suelos experimentan rápidamente una declinación en el oxígeno y una reducción del potencial redox (Mitsch y Gosselink, 1993). La inundación continua o estacional, combinada con la producción de grandes cantidades de materia orgánica, resulta en suelos anaeróbicos en muchos humedales (Hammer, 1992). Esta condición lleva a la formación de la primera clasificación taxonómica de suelo de los humedales, bajo el término de hídrico (Reddy y D'Angelo, 1994).

Según Kadlec y Knight (1995), los suelos hídricos son definidos por la Nacional Technical Comitte for Hidric Soils como: Suelos que por la condición de escaso drenaje interno, son saturados e inundados y que por lo tanto a través del tiempo desarrollan condiciones anaeróbicas que favorecen el crecimiento y regeneración de la vegetación hidrofítica.

Estos suelos hídricos se pueden clasificar en dos categorías:

1. Suelos orgánicos o histosoles los cuales contienen comúnmente al menos 12 a 20% de carbono orgánico (20 a 30% de materia orgánica) sobre una base de peso seco (Johnston, 1991) y
2. Suelos minerales como algunos entisoles, ultisoles e inceptisoles que típicamente tienen menos del 12 a 20% de carbono orgánico (20 a 30% de materia orgánica) (Johnston, 1991)

Algunas de las características de los suelos orgánicos y suelos minerales, se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación de suelos orgánicos y minerales presentes en humedales

Propiedades	Suelos minerales	Suelos orgánicos
Contenido orgánico (%)	Menos de 20 a 35	Más del 20-35
Carbono orgánico (%)	Menos de 12-20	Más de 12-20
pH	Usualmente neutro	Acido
Densidad	Alta	Baja
Porosidad	Baja (45-55%)	Alto (80%)
Conductividad hidráulica	Alta (excepto por arcillas)	Baja a alta
Capacidad de retención del agua	Baja	Alta
Disponibilidad de nutrientes	Generalmente alta	Frecuentemente baja
Capacidad de intercambio de cationes	Bajo, dominado por cationes principalmente	Alto, dominado por iones hidronio

Fuente: (Kadlec y Knight, 1995).

Modificado por Mitsch and Gosselink, 1993

Algunos humedales naturales tienen perfiles suelo/sedimento que incluye horizontes o capas orgánicas y minerales y también espacios heterogéneos, así que algunas propiedades físicas, químicas y biológicas de cada tipo de suelo pueden tener una influencia sobre una particular ecología del humedal (Faulkner y Richardson, 1989).

Una capa de hojas y raíces se puede formar en el primer horizonte del suelo en muchos humedales. Esta capa de suelo consiste en depósitos recientes o parcialmente descompuestos de plantas (hojas, tallos y raíces) que pueden ser fácilmente removibles de la superficie del suelo. Estas capas de detritos no se consideran parte del suelo, pero en muchos casos puede ser la precursora para el desarrollo de suelos en humedales (Faulkner y Richardson, 1989).

3.1.2.4.1 Propiedades físicas del suelo en humedales

Los histosoles ocurren en ambientes donde la acumulación de materia orgánica es más alta que la velocidad de su descomposición (Buol *et al.*, 1980). Esta condición es frecuente en áreas con bajo oxígeno disuelto, condiciones de nutrientes bajos y alta fijación de carbono por macrófitas emergentes (maderables y herbáceas), musgos y algas (Buol *et al.*, 1980).

Los suelos orgánicos pueden ser clasificados por la capacidad de descomposición y suelen ser llamados turba (Mitsch y Gosselink, 1993). El suborden Fibrist incluye los suelos en los que los materiales orgánicos fibrosos son de color amarillo y pardo, tienen bajas densidades aparentes y altas capacidades de retención de agua. Por otra parte, los altamente desintegrados Saprist, de color oscuro, tienen densidades aparentes relativamente altas (a menudo más de 0,2) y las de retención de agua. El suborden Hemíst abarca suelos intermedios en grado de desintegración y con propiedades entre las de los Fibrists y Saprist (Buol *et al.*, 1980).

Aunque el volumen de nutrientes disponibles de los suelos de humedales a menudo es bastante bajo, se dan cantidades grandes de nitrógeno, fósforo, azufre y otros componentes orgánicos pero en forma no disponible. La oxidación destruye estos componentes orgánicos recalcitrantes y descarga las sustancias asociadas (Kadlec y Knight, 1995).

Los suelos orgánicos de los humedales comparten las siguientes características (Kadlec y Knight, 1995):

- Los suelos orgánicos no pueden ser fácilmente caracterizados por el tamaño de la partícula, porque el hecho necesario de desecamiento destruye la estructura física y química.
- Los suelos orgánicos y sedimentos presentan un deficiente drenaje ya que retienen un alto porcentaje de agua.

- Los suelos orgánicos son típicamente muy oscuros, en un rango de turba negra y turba café.

3.1.2.4.2 Propiedades químicas del suelo en humedales

Para los propósitos de este trabajo interesan: la capacidad de intercambios catiónico, las reacciones de oxidación-reducción y el pH.

3.1.2.4.2.1 Capacidad de intercambio de cationes

El cambio iónico se define como los procesos reversibles por los cuales las partículas sólidas del suelo, adsorben iones de la fase líquida liberando al mismo tiempo otros iones en cantidades equivalentes, estableciéndose el equilibrio entre ambos. Es un proceso dinámico que se desarrolla en la superficie de las partículas (Mitsch y Gosselink, 1993).

Como los iones adsorbidos quedan en condición asimilable constituyen la reserva de los nutrientes para las plantas. Las condiciones que originan el intercambio iónico son los desequilibrios eléctricos de las partículas del suelo. Para neutralizar las cargas se adsorben iones, que se pegan a la superficie de las partículas. Estos quedan débilmente retenidos sobre las partículas del suelo y se pueden intercambiar con la solución del suelo (Mitsch y Gosselink, 1993).

Dentro del cambio iónico el más importante y mejor conocido es la capacidad de intercambio catiónico (Kadlec y Knight, 1995). Estos mismos autores, definen tres valores para un suelo.

- **T**: capacidad de cambio total. S: suma de bases de cambio, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- **T-S**: acidez potencial (Al_3^+ e H^+).
- **V**: grado de saturación en bases en % S/T.

Cuando $V > 50\%$ el suelo está saturado. Si $V < 50\%$ el suelo se encuentra desaturado.

3.1.2.4.2 Reacciones de oxidación y reducción

Los humedales son ambientes idóneos para las transformaciones químicas por la oxidación que ocurre naturalmente en sus suelos. La medida del potencial redox (Eh) en un suelo demuestra la capacidad de óxido-reducción del mismo, causada directamente por sus condiciones químicas, que muy a menudo son inducidas por actividades microbiológicas (por ejemplo, bacterias sulfato-reductoras y ferrobacterias) (Mitsch y Gosselink, 1993).

La medida de este parámetro no es fácil y su dificultad aumenta en los suelos hídricos y esta dificultad se debe a diferentes causas, algunas de las cuales incluyen: la presencia de pares redox a bajas concentraciones; su electroactividad en relación con el electrodo de medida (Pt, Au, grafito); la existencia de equilibrios como el sistema H_2O/O_2 , de difícil medida, entre otros (Kadlec y Knight, 1995). Cuando el $Eh > 300$ Mv, las condiciones son aeróbicas porque la disolución de oxígeno es disponible. Cuando el $Eh < -100$ Mv, las condiciones son anaeróbicas porque no hay oxígeno disuelto (Kadlec y Knight, 1995).

Esta característica guarda relación con la aireación (velocidad de difusión del O_2) y el pH, que también determinan la actividad microbiana. El agua influye en estos procesos al modificar la distribución de la atmósfera del suelo y por ello, la difusión del O_2 (Mitsch y Gosselink, 1993).

El potencial redox afecta a aquellos elementos que pueden existir en más de un estado de oxidación (por ejemplo C, N, S, Fe, Mn y Cu) (Kadlec y Knight, 1995).

3.1.2.4.2.3 pH

El pH tiene una influencia decisiva en los procesos genéticos del suelo, en la asimilación de los nutrientes y en el desarrollo de la actividad microbiana; se ve influido por la alteración mineral, la evolución de la materia orgánica, la absorción de iones por las plantas y el lavado del suelo (Kadlec y Knight, 1995).

Todos los procesos que generan modificaciones del pH no coexisten en el tiempo por lo que se generarían bruscos cambios en la reacción del suelo y dada la trascendencia de su valor para procesos de enorme importancia, estos cambios podrían provocar modificaciones fatales en el comportamiento del suelo frente a los microorganismos y al desarrollo de las plantas. Por ello es necesario que estas modificaciones sean amortiguadas y el suelo dispone de los mecanismos necesarios para ello, lo que se conoce como "poder tampón del suelo" (Buol *et al.*, 1980).

Previo a la inundación, los suelos pueden tener una variación amplia de pH de 3 a 10 unidades (Hammer, 1992). Después de la inundación, el pH puede inicialmente declinar debido a la descomposición aeróbica que libera dióxido de carbono en el agua intersticial. De cualquier modo, este pH inicial fluctúa constantemente y es seguido por una característica tendencia en ambos pH hacia la neutralidad.

Este comportamiento se considera que es por la reducción del hierro cuando el suelo esta inundado (Hammer, 1992). En algunos suelos orgánicos, el pH puede quedar muy bajo, si hay periodos de inundación continuos. Este resultado es probable debido a la oxidación lenta de compuestos de sulfuro orgánico resultando en la producción de ácido sulfúrico y debido a la presencia de ácidos húmicos (Mistch and Gosselink, 1993).

3.1.2.4.3 Transformaciones químicas en humedales

Dentro de los humedales se llevan a cabo transformaciones químicas de varios elementos, entre las más importantes se encuentran las siguientes: la del nitrógeno, hierro, manganeso, sulfuro, carbono y fósforo.

3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Nitrógeno

Según Reddy y D'Angelo (1994), una de las vías más significativas donde el nitrógeno (N) se pierde a la atmósfera está en los humedales. El N orgánico se mineraliza al amonio (NH_4^+). En condiciones aerobias, la nitrificación ocurre a través de *Nitrosomonas* luego *Nitrobacter* dando por resultado el nitrito y luego nitrato. El nitrato a menudo es lixiviado pues es muy móvil en solución; de lo contrario, puede ser sujeto de desnitrificación que da lugar a las formas gaseosas del nitrógeno que se pierden a la atmósfera. La desnitrificación se inhibe en suelos ácidos del humedales (Reddy y D'Angelo, 1994).

3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Hierro y del Manganeso

El hierro se reduce del ión férrico insoluble Fe^{3+} a hierro soluble y tóxico Fe^{2+} . El manganeso se reduce de mangánico insoluble (Mn^{4+}) a manganeso soluble y tóxico (Mn^{2+}) (Hammer, 1992).

3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Sulfuro

Según Reddy y D'Angelo (1994), a bajos potenciales redox, el sulfuro es reducido y liberado como sulfuro de hidrógeno (H_2S). Porque la concentración de sulfatos es más alta en humedales que en agua salada, la emisión de sulfuro de hidrógeno es también más alta y la toxicidad mayor. La toxicidad puede ocurrir como resultado del contacto con las raíces, o con la disponibilidad reducida del sulfuro a las plantas porque este precipita con los metales traza. El zinc y el cobre pueden también limitarse porque se precipitan con el sulfuro. Si el hierro ferroso está presente, se precipitará con

los sulfuros. El sulfuro de hierro (FeS) da a muchos suelos de humedales su color negro (Reddy y D'Angelo, 1994).

3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Carbono

Ocurre metanogénesis cuando ciertas bacterias utilizan CO₂ como aceptor de electrones y producen el metano gaseoso (CH₄) (Hammer, 1992).

3.1.2.4.3.1 Transformaciones del Fósforo

El fósforo es el mayor nutriente limitante en los pantanos de agua dulce, los turbas norteños y pantanos profundos. Está más disponible en humedales agrícolas y los sanjones. La retención del fósforo se considera a menudo una función importante del ecosistema en humedales naturales y se diseña a menudo en humedales construidos.

El fósforo ocurre en un ciclo sedimentario más bien que gaseoso como el nitrógeno. Está a menudo presente en humedales como catión y puede unirse en sedimentos orgánicos o inorgánicos, así como volverse inaccesible. En columnas del agua, las condiciones anaerobias lo hacen soluble (Kadlec y Knight, 1995).

3.1.2.5 Microorganismos

Una característica fundamental de los humedales es que sus funciones son principalmente reguladas por los microorganismos y su metabolismo. Los microorganismos incluyen bacterias, levaduras, hongos y protozoarios. (Campbell y Ogden, 1999)

3.1.2.5.1 El papel microbiano en los ecosistemas naturales

En un ecosistema microbiano, el crecimiento celular forma poblaciones. Las poblaciones metabólicamente relacionadas se denominan gremios y los conjuntos de agrupaciones interaccionan formando comunidades

microbianas, que interaccionan con comunidades de macroorganismos y con el ambiente, todo lo cual engloba y define el ecosistema (Madigan *et al.*, 1999).

La energía entra en los ecosistemas en forma de luz solar, carbono orgánico o sustancias inorgánicas reducidas. La luz es utilizada por los organismos fototróficos para sintetizar materia orgánica nueva, que, además de carbono, también contiene nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y muchos otros elementos (Madigan *et al.*, 1999). Esta materia orgánica sintetizada, junto con la que penetra en el ecosistema desde el exterior y con sustancias inorgánicas, determina las actividades metabólicas de los organismos quimioorganotrofos y quimilitotrofos (Madigan *et al.*, 1999).

En relación con los elementos químicos claves de los sistemas vivos, se puede definir un ciclo biogeoquímico como aquel en el cual el elemento químico experimenta cambios en su estado de oxidación al moverse dentro del ecosistema. Los microorganismos intervienen activamente en los ciclos biogeoquímicos y en muchos casos son los únicos agentes biológicos capaces de regenerar formas de un elemento utilizables por otros organismos, especialmente por las plantas (Madigan *et al.*, 1999).

En un hábitat, los seres vivos interaccionan con su entorno físico y químico que difiere mucho en cuanto a las características; un hábitat favorable para el crecimiento de un microorganismo puede resultar nocivo para otro. Al realizar los procesos metabólicos los microorganismos extraen nutrientes del medio y los usan para producir nuevas células. Al mismo tiempo, excretan al medio los productos de desecho de su metabolismo y por consiguiente, a lo largo del tiempo, el medio cambia gradualmente debido a estos procesos vitales (Rheinheimer, 1987).

Si bien una célula individual no puede, por sí sola, originar un efecto perceptible sobre un hábitat, esa célula puede ser capaz de multiplicarse rápidamente y dar lugar a un número enorme, tal y como ocurre con las bacterias (Grant y Long, 1989).

3.1.2.5.1.1 Las bacterias

Las bacterias junto con las *Archaea*, son consideradas como los entes vivos más pequeños. Sus actividades son esenciales para la supervivencia de otras especies. Las bacterias se encuentran en todas partes y especies iguales o similares pueden encontrarse, generalmente en cualquier lugar del mundo.

Se encuentran presentes en la tierra, el agua, el aire y se distribuyen a través del mundo en corrientes de aire y en el movimiento del agua. Incluso si las mismas especies no están presentes en sitios diferentes, las funciones llevadas a cabo por los organismos presentes serán muy similares, tales como la mineralización de plantas y animales muertos (Rittmann y McCarty, 2001).

Las bacterias son importantes para el medio ambiente ya que tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes inorgánicos y orgánicos en minerales inocuos, que pueden ser reciclados al medio ambiente. Disponen de la capacidad de oxidar a muchos productos orgánicos sintetizados industrialmente, lo mismo que a los producidos naturalmente por medio de procesos biológicos normales, por lo que, a tal propósito, se utilizan bacterias en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Algunas pueden convertir materia orgánica residual en gas metano, que es una forma útil de energía. Otras pueden transformar materia inorgánica que bajo ciertas circunstancias puede resultar nociva, como amoníaco y nitratos,

o bien, en sustancias inocuas como gas nitrógeno, principal constituyente del aire (Coyne, 2000)

3.1.2.5.1.2 Morfología

Las bacterias tienen tres formas generales. Las de forma esférica son cocos; las de forma cilíndrica son varillas o bacilos y las de forma helicoidal son espirilos. El espesor de las bacterias varía generalmente de 0,5 a 2 μm y su longitud, de 1 a 5 μm . Los cocos tienen también un diámetro comprendido entre 0,5 y 5 μm (Rittmann y McCarty, 2001). En un gramo (peso sólido seco), hay alrededor de 10^{12} bacterias. Debido al pequeño tamaño, la superficie representada es de aproximadamente 12 m^2/g . Por ello, las bacterias tienen una gran superficie de exposición a su entorno, lo que permite una rápida difusión de alimento en la célula y grandes tasas de crecimiento (Rittmann y McCarty, 2001).

Aunque no todas las bacterias tienen las mismas características estructurales, la pared de la célula es común a todas, así como la membrana de la célula, que se sitúa justo detrás de la pared de la célula y el fluido coloidal interno llamado citoplasma (Rittmann y McCarty, 2001). La pared de la célula se compone de un esqueleto repetido llamado peptidoglucano. Cada sección de peptidoglucano consiste en N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y de un pequeño grupo de aminoácidos, como alanina, ácido glutámico y lisina o ácido diaminopimélico (Rittmann y McCarty, 2001).

La pared celular tiene, a menudo, otros componentes materias asociados que le aportan características especiales. Por ejemplo, las bacterias que no pueden ser coloreadas con la coloración de Gram (Gramnegativas), tienen un contenido más alto en liposacáridos en la pared de la célula y más aminoácidos que las bacterias Grampositivas. Por otra parte, los ácidos

teicoicos son característicos de las paredes de células de bacterias Grampositivas (Pelczar *et al.*, 1993).

Algunas bacterias, como las del género *Bacillus* y *Clostridium*, tiene una capacidad de formar endosporas (o esporas formadas en el interior de la célula). La formación de esporas ocurre, generalmente, cuando el entorno sufre un cambio a un estado adverso al crecimiento de la bacteria, tal como la desaparición de un nutriente preciso, o desfavorables temperaturas o pH.

Estas características ayudan a impartir gran resistencia a célula durante años y quizás siglos. Cuando una endospora se encuentra en un entorno favorable a su crecimiento, se produce su germinación o vuelta al estado vegetativo. Las bacterias que forman endosporas son bastante difíciles de destruir mediante técnicas normales de esterilización (Varnam y Evans, 2000).

Otra característica externa de algunas bacterias son los flagelos. El número y localización de los flagelos son diferentes para las diferentes especies. Algunas pueden contener un único flagelo terminal (polar), otras pueden tener varios en un extremo, otras, varios en ambos extremos y otras tenerlos distribuidos sobre la totalidad de la célula (peritricos) (Rittmann y McCarty, 2001).

3.1.2.5.1.3 Metabolismo bacteriano

La energía requerida para el mantenimiento de la vida y para la síntesis de los componentes celulares es obtenida por la transformación ordenada de las sustancias que ingresaron a la célula. Éstas son modificadas por una serie de reacciones enzimáticas sucesivas, a través de rutas metabólicas específicas. Las vías metabólicas tienen las funciones de proveer los precursores para los componentes celulares y obtener energía para los procesos de síntesis y otros que requieran energía (Dreyfus, 1996).

El metabolismo se puede dividir en dos grandes partes: el catabolismo y el anabolismo. La fase del metabolismo que descompone las moléculas grandes en pequeñas es el catabolismo. Las moléculas grandes como las proteínas, las grasas (lípidos) o los azúcares (carbohidratos), que provienen de nutrientes del medio ambiente, se descomponen enzimáticamente (Prescott *et al.*, 1999).

El producto de esta descomposición o degradación lo forman las moléculas más simples y pequeñas como, por ejemplo, el ácido láctico, el ácido acético, el dióxido de carbono, el amoníaco y la urea, entre otros. De estas reacciones químicas de degradación se obtiene la energía química contenida en las estructuras de las grandes moléculas. Esta energía se conserva en forma de molécula conocida como adenosíntrifosfato (ATP), la cual es de vital importancia en el metabolismo de cualquier organismo vivo (Prescott *et al.*, 1999).

Por otra parte, el anabolismo es la fase del metabolismo durante la cual se sintetizan de nuevo las moléculas que la bacteria o célula utiliza para regenerarse, mantenerse o dividirse, como son: las grasas, las proteínas, los azúcares o carbohidratos y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), que forman parte funcional o estructural de los organismos (Madigan *et al.*, 1999). Esto lo lleva a cabo el microorganismo o la célula a partir de los constituyentes primarios que se obtienen de los nutrientes.

Sin embargo, tales procesos de síntesis requieren de energía y ésta la proporciona el ATP que fue generado durante el catabolismo (Madigan *et al.*, 1999). Así, el anabolismo y el catabolismo se llevan a cabo simultáneamente y cada uno está regulado en forma muy precisa ya que ambos procesos son interdependientes (Carrillo, 2003).

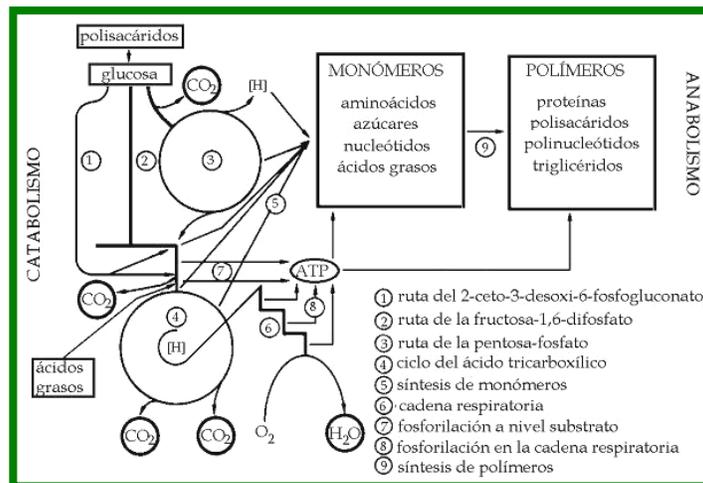
3.1.2.5.1.4 Respiración celular

La respiración celular es una parte del metabolismo, concretamente del catabolismo, en la cual la energía contenida en distintas biomoléculas, como los glúcidos, es liberada de manera controlada. Durante la respiración una parte de la energía libre desprendida en estas reacciones exotérmicas, es incorporada a la molécula de ATP, que puede ser a continuación utilizado en los procesos endotérmicos, como son los de mantenimiento y desarrollo del organismo (Dreyfus, 1996).

La respiración celular podría dividirse en dos tipos, según el papel atribuido al oxígeno:

3.1.2.5.1.4.1 Respiración aerobia

La respiración aerobia hace uso del O_2 como aceptor último de los electrones desprendidos de las sustancias orgánicas. Es la forma más extendida, propia de una parte de las bacterias y de los organismos eucariontes, cuyas mitocondrias derivan de ellas. Se llama aerobios a los organismos que, por este motivo, requieren O_2 (Prescott *et al.*, 1999). La figura 1 representa las vías metabólicas de organismos que aeróbicos (Carrillo, 2003).



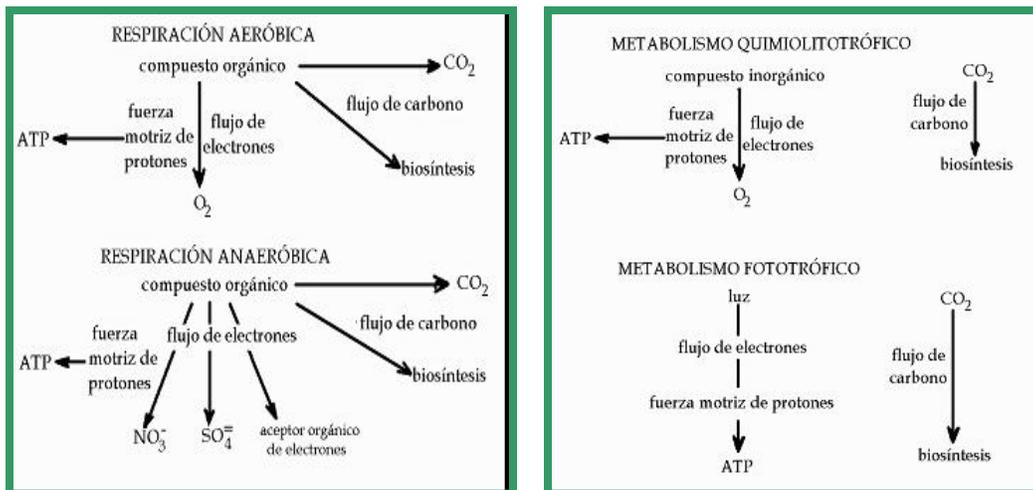
Tomado de: (Carrillo, 2003)

Figura 1. Metabolismo de microorganismos aeróbicos

3.1.2.5.1.4.2 Respiración anaerobia

En la respiración anaerobia no interviene el oxígeno, sino que se emplean otros aceptores finales de electrones, muy variados, generalmente minerales y, a menudo, subproductos del metabolismo de otros organismos. Un ejemplo de aceptor es el SO_4^{2-} (ión sulfato), que en el proceso queda reducido a H_2S . La respiración anaerobia es propia de procariontes diversos, habitantes sobre todo de suelos y sedimentos y algunos de estos procesos son importantes en los ciclos biogeoquímicos de los elementos. No debe confundirse la respiración anaerobia con la fermentación, que es una oxidación-reducción interna a la molécula procesada, en la que no se requiere ni O_2 ni ningún otro aceptor de electrones (Prescott *et al.*, 1999).

Los productos de la respiración anaeróbica son fácilmente detectados: las burbujas de N_2 , NO_2 , CH_4 (inflamable); el olor de H_2S ; la formación de óxido de hierro diamagnético (Fenchel *et al.*, 2000). La figura 2 muestra los contrastes entre la respiración aeróbica y la anaeróbica (Carrillo, 2003).



Tomado de: (Carrillo, 2003).

Figura 2. Flujo de carbono y energía en distintos tipos de metabolismo microbianos

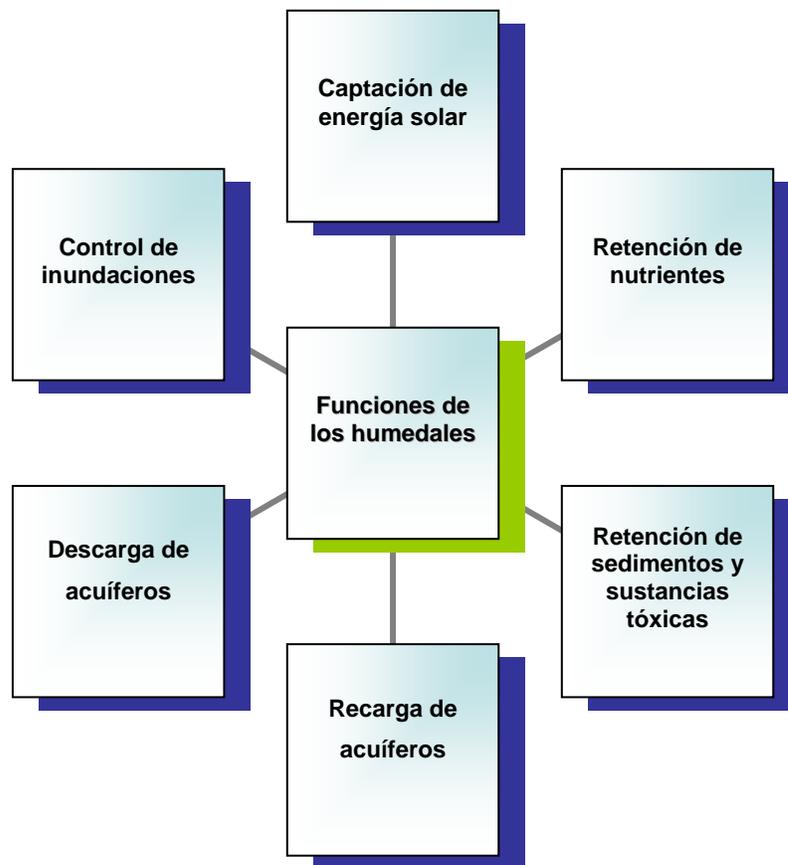
3.1.3 FUNCIONES, PRODUCTOS y ATRIBUTOS DE LOS HUMEDALES

De la interacción entre los componentes agua, suelo y biota (animales y vegetales) y dentro de ellos, se originan las funciones, los productos y atributos de los humedales (Dugan, 1992).

3.1.3.1 Funciones

Los humedales poseen unos atributos o valores intrínsecos que los distinguen de otros ecosistemas, derivado de estos valores, se desarrollan unas funciones ambientales y culturales, que vienen a ser como servicios con que los humedales contribuyen a que se desarrollen los procesos que sustentan la vida de los vegetales, de los animales y también del hombre (Viñals, 2004).

Se han identificado muchas de las funciones que son características de los humedales, pero como menciona Dugan (1992), no todas las características que se establezcan, están presentes en todos los tipos de humedales, ni todas las funciones se desempeñan de la misma manera en cada humedal. Como se observa en la figura 3, para el presente trabajo, las funciones más sobresalientes de los humedales de agua dulce incluyen:



Tomado de: (Dugan, 1992)

Figura 3. Principales funciones de los de humedales dulceacuícolas

3.1.3.1.1 Retención de nutrientes

Esta función tiene lugar cuando los nutrientes, fundamentalmente nitrógeno y fósforo, se acumulan en el subsuelo o se almacenan en la vegetación del humedal. Los humedales que remueven nutrientes mejoran la calidad del agua y ayudan a prevenir la eutrofización. En ciertas circunstancias, los humedales pueden usarse para el tratamiento de aguas domésticas servidas provenientes de pequeñas comunidades sin industrias (Dugan, 1992). Cuando los humedales extraen nutrientes se les denomina “sumideros”. Esto es de especial importancia en lo que se refiere a los nitratos, pues pueden volverse a convertir en nitrógeno gaseoso y circular nuevamente hacia la atmósfera como resultado de la desnitrificación. Cuando los materiales se

exportan, los humedales actúan como “fuentes”. Una función común de los humedales durante la estación de crecimiento es la acumulación de nutrientes cuando el agua corre lentamente. Luego, estos nutrientes alimentan la producción de peces y camarones, así como el bosque, la vida silvestre y los productos agrícolas de los humedales (Dugan, 1992).

3.1.3.1.2 Retención de sedimentos y sustancias tóxicas

El sedimento es a menudo el mayor agente contaminador del agua en muchos sistemas hidrográficos. Como los humedales ocupan cuencas comúnmente, pueden servir de pozos para el depósito de sedimentos. Donde la vegetación y el pasto disminuyen la velocidad del caudal de un río, la tasa de asentamiento de los sedimentos aumenta (Dugan, 1992).

La acumulación de demasiado sedimento en un humedal puede alterar sus funciones biológicas, el almacenamiento de aguas de inundación y el intercambio de agua subterránea. Sin embargo, la calidad de los ecosistemas río abajo se mantiene si el sedimento suspendido se retiene aguas arriba. A menudo las sustancias tóxicas (tales como pesticidas) se adhieren al sedimento suspendido; pueden entonces quedar retenidas junto con él (Dugan, 1992).

La retención de sedimento en los humedales aguas arriba alargará el tiempo de vida de los embalses y de los canales río abajo y reducirá la necesidad de remover, a altos costos, el sedimento acumulado en los diques, las esclusas, las centrales eléctricas y otras obras de este tipo (Dugan, 1992) .

3.1.3.1.2.1 Función depuradora de los humedales

La utilización de los humedales como depuradores naturales de aguas residuales se ha venido haciendo históricamente: las civilizaciones vertían sus desechos directamente en ellos. La cuestión en la actualidad es dilucidar

qué capacidad tendrán los humedales de soportar esa función ya que podrían ser un complemento a las estaciones o plantas depuradoras y, además, decidir qué se puede hacer para protegerlos (Barbier *et al.*, 1991). Si este tipo de tratamiento de aguas residuales sigue progresando se debería poner más énfasis en la conservación y recuperación de humedales naturales. De esta forma se invertiría en favorecer el incremento de la diversidad biológica y aumento del hábitat para numerosas especies adaptadas a estos ecosistemas, al tiempo que se prestaría un gran servicio ambiental (Barbier *et al.*, 1991).

Se parte de la premisa de que el humedal hace de "filtro" de numerosos contaminantes, es decir, la cantidad de sustancias que entran a este ecosistema es mayor que la que sale. Las sustancias que entran a formar parte del humedal pueden pasar por varios procesos diferentes ya sean alteraciones químicas o biológicas, simple acumulación o el paso a otro tipo de ecosistema (Johnston, 1991).

Las sustancias eliminadas del agua por sedimentación, en teoría, se eliminan de forma reversible ya que podrían volver a resuspenderse en el medio gracias a las perturbaciones físicas y a la actividad biótica. Aún así, se ha visto que, en la práctica, la acumulación de sustancias por esta vía varía poco a lo largo del tiempo, por ello, se podría considerar un mecanismo relativamente irreversible (Johnston, 1991).

De hecho, la cantidad de sustancias almacenadas en el sedimento pueden ser fruto, tanto de una alta eficacia de retención como de una baja retención que ocurre durante un largo periodo de tiempo. Así, la importancia y la efectividad de la eliminación de sustancias contaminantes del agua dependen, no sólo de la velocidad a la que son asimiladas sino también del tiempo de retención de dichas sustancias (Johnston, 1991).

Sin embargo, el factor más importante en la cantidad de sedimento acumulado en los humedales es la naturaleza de los aportes de agua y no de las características intrínsecas del humedal (Johnston, 1991).

Pérez *et al.*, (2000), mencionan que a no ser que los humedales soporten un aporte de vertidos orgánicos continuo, existen muchos factores que pueden afectar al ritmo de acumulación de la materia orgánica tales como:

1. Clima: influyen múltiples factores, tales como, la velocidad de descomposición, la formación de materia orgánica en el humedal, la flora y la fauna regional.
2. Naturaleza del material vegetal: diferentes especies de plantas tienen velocidades de descomposición diferentes.
3. Fuego: destruye la vegetación pero las cenizas aumentan la cantidad de nutrientes disponibles para los productores primarios.
4. Inundaciones que pueden provocar condiciones anaerobias.
5. Alteraciones humanas: cultivos, vertidos, desecación.

Las deposiciones de origen orgánico ocurren cuando la producción de biomasa más los componentes orgánicos provenientes del exterior del humedal es mayor que el ritmo de descomposición de esa biomasa, así, por ejemplo, las turberas suelen encontrarse en humedales debido a la lentitud de los procesos de descomposición causado por la escasez de oxígeno (Pérez *et al.*, 2000).

3.1.3.1.2.2 Descomposición de la materia orgánica

La descomposición de materia orgánica es uno de los procesos claves en el funcionamiento de todos los ecosistemas, incluidos los acuáticos (Álvarez, 2005). No obstante, aunque la descomposición constituye un proceso ecosistémico, de importancia comparable a la producción primaria, se conoce mucho mejor todo lo relacionado con esta última y el papel que

desempeñan los organismos autótrofos en la misma, que lo relativo a los procesos de descomposición y, especialmente, al papel que llevan a cabo los microorganismos en ellos (Álvarez, 2005). Existen diferentes razones para este desconocimiento, la más importante es que la descomposición es un proceso muy complejo que se manifiesta a nivel de comunidad, involucrando a múltiples organismos a distintas escalas espaciales y temporales, mientras que la producción primaria es un proceso que, en última instancia, se manifiesta a nivel de cada organismo autótrofo de forma individual e involucra a una fracción mucho menor de biodiversidad (Álvarez, 2005).

Los organismos de la zona profunda son principalmente productores secundarios y, en su mayor parte, dependen del transporte de compuestos orgánicos desde las capas de arriba. Los nutrientes particulados sedimentan gracias a la gravedad y se concentran en la superficie del sedimento. Los sedimentos de la superficie pueden ser aeróbicos, permitiendo así la descomposición aeróbica de los nutrientes orgánicos acumulados (Atlas y Bartha, 2002).

La descomposición anaerobia de compuestos orgánicos ocurre principalmente sobre o bajo la superficie de los sedimentos del fondo, donde el oxígeno a menudo se agota. El oxígeno se difunde muy lentamente entre los espacios porosos rellenos de agua del sedimento y la materia orgánica utiliza rápidamente cualquier cantidad de oxígeno disponible. Por esta razón, en los sedimentos donde abunda la materia orgánica, solamente unos pocos milímetros de la parte superior suelen estar oxigenados (Atlas y Bartha, 2002).

Es de especial importancia el área limítrofe entre el agua y el sedimento, considerando que esta región es un sitio de intensa actividad microbiana. Una gran variedad de bacterias pueden ser aisladas en altas

concentraciones, sin embargo, pocos, han sido los intentos de determinar la actividad bacteriana *in situ* de este importante sector (Chocair, 1982).

Las transformaciones llevadas a cabo por bacterias bénticas puede ser, en algunas ocasiones, la principal fuente de nueva materia orgánica en la columna de agua. Esa producción de materia orgánica está representada por una reutilización de energía almacenada, a través de procesos heterotróficos y quimosintóticos (Chocair, 1982).

Según Chocair (1982), las bacterias heterotróficas exhiben tres funciones en un ecosistema acuático:

1. Son consumidoras de materia orgánica disuelta en el medio ambiente, resultando en una autopurificación de compuestos fotosintéticos y autóctonos;
2. Contribuyen en el reciclaje de substratos inorgánicos para los productos primarios;
3. Son productoras también, en el sentido que son capaces de convertir sustancias orgánicas disueltas en materia particular y de esta manera ponerla a disposición de los primeros eslabones de la cadena alimentaria.

La materia orgánica disuelta representa una fuente intermedia de carbón entre el detritus y las bacterias. De esta manera, una medida de la dinámica de su utilización debería dar una estimación indirecta de la producción heterotrófica microbiana como también de la descomposición de los detritus. Considerando que hay muchas moléculas orgánicas complejas en el agua y en los sedimentos, a muy bajas concentraciones, a menudo es muy difícil medir el crecimiento y la actividad de microorganismos como respuesta a solutos orgánicos específicos (Chocair, 1982).

Hasta ahora no existe una técnica para determinar el ritmo de utilización de esos substratos, sin embargo, la mejor herramienta disponible para estudiar

la utilización de solutos orgánicos es la técnica denominada "potencial heterotrófico", descrita originalmente por Parsons y Strickland (1962) citado por Chocair (1982), en donde ellos estudiaron la incorporación de substratos marcados con C^{14} por parte de organismos planctónicos y descubrieron que sus datos seguían la dinámica enzimática de Michaelis-Menten. Esta técnica ha sido adoptada por muchos investigadores como una técnica estándar para determinar la actividad heterotrófica de microorganismos en el medio acuático (Chocair, 1982).

Según Wood (1970) citado por Chocair (1982), la mayoría de las investigaciones previas han estudiado la actividad heterotrófica bacteriana en el medio acuático más que en los sedimentos, sin embargo, algunos científicos han utilizado la técnica del "potencial heterotrófico" para estudiar la actividad microbiana en sedimentos.

3.1.3.1.3 Recarga de acuíferos

La existencia de una gran reserva dulceacuícola en el subsuelo de algunos humedales los hacen poseedores de un recurso inestimable como es el agua. Los humedales forman parte del ciclo hidrológico ya que pueden actuar como zona de recarga, almacenamiento y/o de descarga de las aguas superficiales y subterráneas.

Esta función se cumple cuando el agua desciende desde el humedal hacia los acuíferos subterráneos. El agua llega usualmente al acuífero más limpia que cuando comenzó a filtrarse desde el humedal. Ya en el acuífero se le puede extraer para consumo humano, o puede correr lateralmente bajo tierra hasta que alcanza la superficie en otro humedal en forma de descarga de acuíferos. Así la recarga de un humedal está ligada a la descarga de otro. La recarga también es importante para el almacenamiento de agua de

inundaciones ya que el agua se almacena temporalmente bajo tierra, en lugar de correr rápidamente y desbordarse (Dugan, 1992).

3.1.3.1.4 Descarga de acuíferos

Esta función se cumple cuando el agua que ha sido almacenada bajo tierra asciende hacia un humedal y se transforma en agua superficial. Los humedales que reciben la mayor parte de su agua por descarga del acuífero usualmente sostienen comunidades biológicas más estables ya que las temperaturas y los niveles del agua no varían tanto como en los humedales que dependen de corrientes superficiales. Los humedales que se alimentan de descargas subterráneas influyen directamente sobre el flujo de las corrientes. Algunos humedales son sitio de descarga de acuíferos en cierta época del año y, en otra, actúan como lugar de recarga, dependiendo del ascenso o descenso de los mantos freáticos locales (Dugan, 1992).

3.1.3.1.5 Control de inundaciones

Los humedales, al encontrarse en zonas deprimidas, actúan algunas veces positivamente frente a las inundaciones, haciendo de caja de expansión cuando hay crecidas fluviales, ralentizando y disminuyendo los efectos destructivos de los ríos. Es decir, hay momentos puntuales en que los ríos y barrancos llevan caudales de agua muy elevados debido a fuertes lluvias (Viñals, 2004). Pues bien, la presencia de la vegetación palustre y el efecto de presa y laminación de flujo que propicia el humedal, contribuyen a mitigar el pico de crecida al extenderse el agua sobre una gran superficie y perder velocidad y, por tanto, capacidad erosiva (Viñals, 2004).

3.1.3.1.6 Captación de energía solar

Una de las funciones menos visibles de los humedales, sobre todo de los de tipo palustre, es la de captar energía solar. Las plantas gracias a la función clorofílica, cuyas hojas actúan a modo de “paneles solares”, absorben la energía solar y la transforman en materia (sustancias nutritivas -almidón, celulosa, azúcar, etc.- a partir de sustancias minerales) (Viñals, 2004). De esta forma, se produce una gran cantidad de alimentos primarios que facilitan el comienzo de numerosas cadenas tróficas o alimentarias. Desde el punto de vista del aprovechamiento humano esta alta productividad por hectárea significa que en estos suelos tienen lugar cosechas muy numerosas (Viñals, 2004).

3.1.3.1.7 Otras funciones importantes de los humedales

Además de las funciones antes mencionadas existen otras propias de ecosistemas de humedales que no corresponden de forma directa al desarrollo de este estudio, que sin embargo, son muy importantes en el desarrollo normal de cualquier otro tipo de humedal (Dugan, 1992).

Cuadro 2. Funciones de humedales no vinculadas directamente con los humedales dulceacuícolas

<p>Estabilización de microclimas</p>	<p>Los ciclos hidrológicos, de nutrientes y de materia y los flujos de energía de los humedales, pueden estabilizar las condiciones climáticas locales, en particular las precipitaciones y las temperaturas, influyendo tanto en las actividades agrícolas como en aquellas basadas en los recursos naturales y en el humedal mismo.</p>
<p>Estabilización de la línea costera y control de la erosión.</p>	<p>La vegetación puede estabilizar la línea costera, logrando la reducción de la energía contenida en el oleaje, corrientes y el viento, al mismo tiempo que las raíces de las plantas son capaces de retener sedimentos del fondo. Esto puede prevenir tanto la erosión de valiosas tierras agrícolas o de la habitación, como el daño a la propiedad.</p>
<p>Exportación de biomasa</p>	<p>Muchos humedales sostienen la vida de densas poblaciones de peces, ganado o vida silvestre, que se alimentan de sus aguas ricas en nutrientes o de su sustrato, o bien comen sus exuberantes pastizales. Pero además de esta producción dentro de los humedales, los ambientes río abajo y en las aguas costeras también se benefician de los nutrientes llevados por las corrientes superficiales, los arroyos, o por medio de la recarga de los acuíferos.</p>
<p>Protección contra tormentas</p>	<p>Muchos humedales, como los ecosistemas boscosos costeros, ayudan a disminuir la fuerza y el daño que los huracanes y tormentas tropicales producen.</p>
<p>Transporte de agua</p>	<p>Los hábitats de aguas abiertas de los humedales sirven como medio de transporte de bienes y pasajeros y en algunos casos son una alternativa a los medios de transporte terrestres.</p>

Fuente: (Dugan, 1992)

3.1.3.2 Productos

Además de desempeñar los numerosos papeles y funciones vitales mencionados en las páginas anteriores, los humedales proporcionan a los seres humanos diversos beneficios que revisten la forma de productos susceptibles de explotarse para uso por el hombre, tales como (Viñals, 2004):

3.1.3.2.1 Forestales

El aprovechamiento directo de los recursos forestales de los humedales puede proveer de una serie de bienes maderables como la leña, la madera y la corteza; o bien, no maderables como los medicamentos y las resinas, que son productos forestales “secundarios” no maderables (Dugan, 1992).

3.1.3.2.2 Vida silvestre

Los humedales son hábitat que mantienen altas diversidades de vida silvestre, proporcionando recursos recreativos y productos comerciales tales como carne, pesquerías, pieles, mieles, huevos (Dugan, 1992).

3.1.3.2.3 Recursos agropecuarios

3.1.3.2.3.1 Pastoreo

Los humedales son ecosistemas de alta productividad primaria, por lo que se generan hojas, pastos y vainas que sirven de alimento para el ganado, principalmente durante el período seco (Dugan, 1992).

3.1.3.2.3.2 Agrícolas

Muchos humedales han sido convertidos en zonas de agricultura, mientras otros se cultivan en su estado natural. El manejo adecuado de prácticas de cultivo puede traer grandes beneficios a las comunidades rurales (Dugan, 1992).

3.1.3.2.4 Fuente de energía

Estas áreas poseen un gran potencial en términos de obtención de energía para la producción hidroeléctrica, por ejemplo en Costa Rica, el Embalse Arenal, o uso de otros energéticos contenidos en las turberas (Dugan, 1992).

3.1.3.3 Atributos

Los atributos son aquellos componentes de los humedales que poseen valor por sí mismos o porque permiten a otros usos, aunque no necesariamente son utilizados. Su valor se realza si el humedal se mantiene intacto o preservado (Álvarez, 1999).

3.1.3.3.1 Diversidad biológica

Los humedales mantienen una concentración espectacular de vida silvestre, tanto animal como vegetal, destacando el número de especies de las aves, los peces y los invertebrados. Además constituyen ambientes clave como hábitat de especies escasas o amenazadas (Gómez *et al.*, 1997).

3.1.3.3.1 Características patrimoniales y culturales

Numerosos humedales tienen una gran importancia como parte del patrimonio cultural ya que muchos de ellos están estrechamente ligados a tradiciones y leyendas, a manifestaciones culturales o religiosas o incluso a la literatura (Gómez *et al.*, 1997).

Además, que tienen un extraordinario valor como recurso paisajístico de primer orden que cada año atrae a numerosos visitantes ya que cuentan con un elevado valor científico, no solamente por sus componentes bióticos y abióticos actuales, sino también como excelentes testigos de épocas pasadas ya que en muchos casos (turberas, lagunas salinas) conservan registros polínicos de gran importancia para conocer como eran los sistemas naturales pasados (Viñals, 2004).

Gracias a todas estas funciones, productos y atributos los humedales tienen un considerable valor tanto en términos naturales y culturales como económicos (Gómez *et al.*, 1997). Hasta muy recientemente los valores o beneficios, especialmente los valores económicos, no se han considerado y su pérdida no se ha tenido en cuenta en los planes de transformación de los humedales. Es necesario incorporar la valoración económica para adjudicar un valor cuantificable a las funciones del humedal antes de acometer cualquier transformación (Gómez *et al.*, 1997).

3.2 MÉTODOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA

3.2.1 Crecimiento microbiano

Por crecimiento microbiano se entiende el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo que se denominará ciclo celular, sino al demográfico de una población (Madigan *et al.*, 1999).

A lo largo del ciclo celular tiene lugar la replicación del material genético, la síntesis de componentes celulares, la elongación de la bacteria para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición para dar lugar a dos células hijas. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos de dicha población (Madigan *et al.*, 1999).

3.2.2 Cultivo de microorganismos

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, se pueden distinguir cultivos líquidos y sólidos

en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Madigan *et al.*, 1999).

3.2.2.1 Fuentes de energía y carbono

Una característica importante de las bacterias es la enorme variedad de fuentes de energía que puedan usar para su crecimiento y mantenimiento. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico (Prescott *et al.*, 1999). La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, C₄H₇O₂N, que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%), fósforo (3%), azufre (en torno al 1%) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu (Prescott *et al.*, 1999).

3.2.2.2 Medios de cultivo

La elaboración de medios de cultivo requiere proporcionar los elementos antes citados en una forma asimilable. Así, por ejemplo, el C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como CO₂ para los autótrofos, el N en forma de NH₄, de NO₃⁻ o de NO₂⁻ o en forma de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; el P debe estar en forma de PO₄³⁻, el S procede de aminoácidos sulfurados o de SO₄²⁻. Además, en ciertos casos, es necesario añadir a los medios de cultivo algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar (Prescott *et al.*, 1999).

El conocimiento de la fórmula elemental del microorganismo que se cultiva facilita la formulación del medio de cultivo más adecuado para el mismo. Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición

química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.) (Madigan *et al.*, 1999).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (por ejemplo, el medio SPS para clostridios), diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos, selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla de una población mixta de gran tamaño (Prescott *et al.*, 1999).

3.2.2.2.1 Crecimiento microbiano en medio sólido

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de substrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo (Collins y Lyne, 1999).

Si el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un césped cuando se realizan los cultivos en placas de laboratorio. En el caso de microorganismos móviles (deslizantes) o en el de los hongos filamentosos que tienen un crecimiento trófico no se producen colonias aisladas sino formaciones más difusas o miceliares (Collins y Lyne, 1999)

3.2.3 Métodos de aislamiento

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales (un clon bacteriano) (Pelczar *et al.*, 1993).

Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las muestras ambientales son cultivables (microorganismos no cultivables). Esto es debido a dificultades intrínsecas en el cultivo (microorganismos parásitos de otros), al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir. Se estima que, sólo en torno al 1% de las bacterias del suelo, o el 0,1 - 0,01% de las bacterias marinas son cultivables (Maier *et al.*, 2000).

Existen procedimientos de enriquecimiento del número de bacterias de ambientes naturales para facilitar su aislamiento. Uno de ellos es la Columna de Winogradski que crea un microcosmos para enriquecer el número de ciertos tipos de microorganismos presentes en ambientes naturales con objeto de facilitar su aislamiento (Pelczar *et al.*, 1993).

3.2.4 Cultivo puro

Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos de la colonia tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con

seguridad (Prescott *et al.*, 1999). Sin embargo, cada vez que se conoce más sobre el funcionamiento de las comunidades bacterianas se debe reflexionar sobre el hecho de que un cultivo puro supone unas condiciones no naturales y que, por consiguiente, la fisiología de los microorganismos en ambientes naturales puede ser diferente de la que presentan en condiciones de cultivos puros (Prescott *et al.*, 1999).

3.2.5 Cultivo de anaerobios

Se necesita prestar atención especial a la recolección, manejo y procesamiento de muestras que van a ser estudiadas por anaerobiosis, pues son muy sensibles al oxígeno. Con el cultivo anaeróbico, el microbiólogo se enfrenta no sólo con los problemas habituales de obtener y conservar la muestra libre de contaminación, sino que también tiene que asegurarse que la muestra no entre en contacto con el aire (Madigan *et al.*, 1999). Cuando se precisa de una incubación en anaerobiosis, las placas de agar se colocan en una jarra sellada que se hace anóxica reemplazando la atmósfera de la jarra con una mezcla de gas libre de oxígeno o añadiendo algún compuesto que elimine el oxígeno de la atmósfera de la jarra cerrada. Por ejemplo, para incubar en anaerobiosis en esta investigación se generó H_2 y CO_2 y en presencia de un catalizador (paladio), el H_2 se combina con el oxígeno libre para formar H_2O , eliminándose de esta forma el oxígeno contaminante (Madigan *et al.*, 1999).

3.2.6 Crecimiento y enumeración de microorganismos

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. Los principales incluyen:

- 1.- Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser. Para que

la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10^5 por ml (Collins y Lyne, 1999).

2.- Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. La densidad de células debe ser del orden de 10^5 por ml (Pelczar *et al.*, 1993).

3.- Recuento de células viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de células viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una célula aislada. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar no más de 300 UFC. En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 μm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias (Pelczar *et al.*, 1993).

4.- Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero pueden dar una idea del tamaño de las partículas (Collins y Lyne, 1999).

5.- Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen de cultivo (Collins y Lyne, 1999).

6.- Medida de actividad metabólica. Cuando las bacterias cuando respiran producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno, lo que se puede evidenciar mediante la utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno (Collins y Lyne, 1999).

3.2.6.1 Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento microbiano

3.2.6.1.1 Temperatura

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si se estudia la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, se puede observar una temperatura mínima por debajo de la que no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular (Madigan *et al.*, 1999).

El incremento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura (Varnam y Evans, 2000).

La falta de crecimiento a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento por la reducción de la velocidad de reacción y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de las proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas (Varnam y Evans, 2000).

Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular se disminuye y las células paran de crecer; aunque no tienen por qué morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío. De esta manera, los microorganismos se han agrupado en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima, según se muestra en el cuadro 3. (Madigan *et al.*, 1999).

Cuadro 3. Agrupación de los microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura Máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 – 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 – 35
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 – 47
Termófilo	40 - 45	55 - 75	60 – 90

Fuente: (Madigan *et al.*, 1999)

3.2.6.1.2 Actividad de agua

Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo y la presión de vapor de agua del agua pura. El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa. El aporte de la actividad de agua da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente (Collins y Lyne, 1999). Por ejemplo: al comparar el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl), donde una parte importante de las moléculas

de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua es mucho menor que en el primero.

Conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua (Pelczar *et al.*, 1993). Cuando un microorganismo se encuentra en un substrato con una actividad de agua demasiado baja, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada (Atlas, 1988).

3.2.6.1.3 pH

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo sólo puede crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual mueren rápidamente. Usualmente el pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica (Carrillo, 2003).

El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 7.0. Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1.0 y otros alcalófilos que toleran pH=10.0. Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo (Atlas, 1988).

Por otra parte, la caída del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros

microorganismos competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio de cultivo a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5). De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante (Pisabarro, 2005).

El descenso del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos (Carrillo, 2003).

3.2.6.1.4 Potencial redox

Indica la capacidad del sustrato para aceptar o donar electrones, esto es: sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O₂] (Madigan *et al.*, 1999).

Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento (Varnam y Evans, 2000).

En el curso de ciertas reacciones metabólicas redox se forman compuestos altamente reactivos (radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar

las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células. Las células se defienden de estos compuestos reactivos mediante las enzimas siguientes: Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Los anaerobios estrictos carecen de SOD y de catalasa o tienen niveles muy bajos de estas enzimas de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. La detección de estas enzimas tiene valor taxonómico (Atlas, 1988).

3.3 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

3.3.1 Pruebas Bioquímicas: API®

La identificación de un organismo obliga a realizar una secuencia de pruebas en las que se pueden cuantificar una gama de diferentes reacciones bioquímicas. Estas pruebas miden la presencia o ausencia de enzimas que participan en el catabolismo del sustrato o sustratos que añaden al medio diferencial (Madigan *et al.*, 1999). La fermentación de los azúcares se mide incorporando indicadores de pH que cambian de color en medio ácido. La producción de gas hidrógeno o dióxido de carbono durante la fermentación de azúcar se analiza observando la producción de gas en viales de recogida de gases o en agar (Madigan *et al.*, 1999).

La producción de sulfuro de hidrógeno puede revelarse en un medio con hierro férrico que se acompleja con el H₂S para formar un precipitado negro de sulfuro de hierro (Prescott *et al.*, 1999). La utilización de ácido cítrico, un ácido de seis carbonos que contiene tres grupos ácidos carboxílicos, se acompaña de una elevación del pH, de tal manera que la adición al medio de prueba de un colorante específico vira el color cuando se dan condiciones alcalinas. Se han desarrollado cientos de pruebas diferentes para uso clínico, pero solamente se utilizan rutinariamente unas 20 (Prescott *et al.*, 1999).

Se han publicado los patrones de reacción típicos para un gran número de cepas de distintos patógenos y en el moderno laboratorio de microbiología clínica toda esta información se almacena en un ordenador. Los resultados de estas pruebas diferenciales para un patógeno desconocido se archivan en el ordenador y un programa especial permite decidir, con los resultados obtenidos, el agente etiológico del que se trate (Madigan *et al.*, 1999).

Los API[®] son versiones miniaturizadas de los procedimientos convencionales utilizados para la identificación de bacterias. Incluyen versiones específicas para una gran variedad de bacterias facultativas, microaerófilas e incluso anaerobias y también para levaduras. Fueron diseñadas en la época de 1970 y continúan siendo un método de referencia en la evaluación de los sistemas automatizados de identificación (Rodríguez *et al.*, 2005).

Estos sistemas utilizan una bandeja con una serie de pequeños depósitos, denominados microtúbulos y contienen sustratos deshidratados para diferentes pruebas. Las reacciones se leen luego de un periodo de incubación, generalmente 18 a 24 horas ya sea directamente por el desarrollo de un color; o bien, después de agregar los reactivos reveladores del producto de reacción (Rodríguez *et al.*, 2005).

El siguiente cuadro muestra algunas de las pruebas que contiene el sistema API[®] para identificar especies de distintas familias:

Cuadro 4. Pruebas de diagnóstico de bacterias

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Fermentación de hidratos de carbono	Producción de ácido y/o gas durante el crecimiento fermentativo con azúcares o alcoholes azucarados.	Un caldo de cultivo con hidratos de carbono y rojo fenol como indicador de pH, tubo invertido para el gas.	Diferenciación de enterobacterias (también para la separación de otros géneros o especies distintos de algunos azúcares determinados).
Catalasa	La enzima descompone el peróxido de hidrógeno, H ₂ O ₂ .	Añadir una gota de H ₂ O ₂ a un cultivo denso y buscar burbujas (O ₂).	<i>Bacillus</i> (+) de <i>Clostridium</i> (-); <i>Streptococcus</i> (-) de <i>Micrococcus</i> - <i>Staphylococcus</i> (+).
Utilización de citrato	La utilización de citrato como única fuente de carbono produce la alcalinización del medio.	Un medio de citrato con azul de bromotimol como indicador de pH. Buscar un color azul intenso (pH alcalino)	<i>Klebsiella</i> - <i>Enterobacter</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-), <i>Edwardsiella</i> (-) de <i>Salmonella</i> (+).
Coagulasa	La enzima provoca la aglutinación del plasma sanguíneo.	Mezclar una suspensión líquida densa de bacterias con plasma, incubar y buscar un coágulo de fibrina.	<i>Staphylococcus aureus</i> (+), de <i>S. epidermis</i> (-).
Descarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	La descarboxilación de los aminoácidos libera CO ₂ y amina.	Medio enriquecido con aminoácidos. El púrpura de bromocresol como indicador de pH vira a púrpura (pH alcalino) si actúa la enzima	Ayuda a la determinación de grupo bacteriano entre las enterobacterias.
Prueba de la B-Galactosidasa (ONOG)	El ortonitrofenil B-galactósido (ONPG) es un sustrato artificial para la enzima. Cuando se hidroliza, se forma el nitrofenol (amarillo).	Incubar una suspensión pesada de un cultivo lisado con ONPG. Buscar un color amarillo.	<i>Citrobacter t Arizona</i> (+) de <i>Salmonella</i> (-). Identificación de algunas especies de <i>Shigella</i> y <i>Pseudomonas</i> .

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Licuefacción de la gelatina	Muchas hidrolasas hidrolizan la gelatina y destruyen el gel.	Incubar un caldo con 12% de gelatina. Enfriar para comprobar la formación del gel, el tubo permanece líquido cuando se refrigera.	Ayuda a la identificación de <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Clostridium</i> .
Producción de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	La producción de H ₂ S por rotura de los aminoácidos azufrados o reducción del tiosulfato.	El H ₂ S se detecta en un medio rico en hierro a partir de la formación de sulfito ferroso negro (muchas variantes: agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar, también detectan la formación de hidratos de carbono)	En enterobacterias, ayuda a la identificación de <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i> y <i>Proteus</i> .
Prueba de indol	Conversión del triptófano de las proteínas del indol.	Detección de indol en el medio de cultivo con dimetilaminobenzaldehído (color rojo).	Distinguir <i>Escherichia</i> (+) de <i>Klebsiella</i> (-) y <i>Enterobacter</i> (-); <i>Edwardsiella</i> (+) de <i>Salmonella</i> (-)
Prueba del rojo de metilo	La fermentación mixtos de ácidos producen suficiente ácido para disminuir el pH por debajo de 4,3	Caldo de glucosa. Después de la incubación, añadir indicador rojo de metilo a la muestra.	Diferenciar <i>Escherichia</i> (+, cultivo rojo) de <i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> (generalmente -, cultivo amarillo)

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Reducción del nitrato	El nitrato como un aceptor de electrones alternativo, reducido a NO^{-2} o N_2	Caldo con nitrato. Tras la incubación, detectar nitrito con ácido α -naftilamina sulfanílico (color rojo). Si es negativo, confirmar que el NO^{-3} está aún presente añadiendo polvo de zinc para reducir el NO^{-3} a NO^{-2} . Si tras la adición del zinc no hay color, entonces $\text{NO}^{-3} \rightarrow \text{NO}^{-2}$. Si tras la adición del zinc no hay color, entonces $\text{NO}^{-3} \rightarrow \text{NO}^{-2}$.	Ayuda a la identificación de enterobacterias (generalmente +).
Prueba de la oxidasa	El citocromo c oxida al aceptor de electrones artificial: tetrametil (o dimetil)-p-fenilendiamina.	Caldo o agar. Las colonias oxidasa positivas en agar pueden detectar sumergiendo la placa en un reactivo y buscando colonias azuladas o marrones.	Separa <i>Neisseria</i> y <i>Moraxella</i> (+) de <i>Acinetobacter</i> (-). Separar enterobacterias (todas -) de pseudomonas (+). Ayudar a la identificación de <i>Aeromonas</i> (+).
Prueba de la oxidación-fermentación (O/F)	Algunos organismos producen ácido solamente cuando crecen en aerobiosis.	Producción de ácido en la parte alta del tubo que contiene azúcar, el agar blando se utiliza para disminuir la mezcla durante la incubación.	Diferenciar <i>Micrococcus</i> (producción de ácido solamente en aerobiosis) de <i>Staphylococcus</i> (producción anaeróbica de ácido). Caracterizar <i>Pseudomonas</i> (producción aeróbica de ácido) de enterobacterias (producción anaeróbica de ácido).

Prueba	Principio	Método	Utilización más frecuente
Prueba de la fenilalaníndesaminasa	La desaminación produce ácido fenilpirúvico que se detecta en una prueba colorimétrica.	Medio enriquecido en fenilalanina. Después del crecimiento, añadir cloruro férrico y buscar el color verde.	Caracterizar el género <i>Proteus</i> y el grupo <i>Providencia</i> .
Hidrólisis del almidón	El yodo-ioduro da un color azul con el almidón.	Crecimiento de un organismo en una placa que contiene almidón. Sumergir la placa en ioduro de Gram y buscar zonas claras alrededor de las colonias.	Identificar los hidrolizadotes típicos de almidón como <i>Bacillus spp.</i>
Prueba de la ureasa	La urea ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$) se escinde en $2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	Medio con un 2% de urea y rojo fenol como indicador.	Distinguir <i>Klebsiella</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-). Distinguir <i>Proteus</i> (+), de <i>Providencia</i> (-).
Prueba del Voges-Proskauer	La acetoina es producida a partir de la fermentación de azúcares.	Prueba química para acetoina utilizando α -naftol.	Separar <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-). Caracterizar los miembros <i>Bacillus</i> .

Fuente: (Madigan *et al.*, 1999)

4. METODOLOGÍA

4.1 Sitios de recolección y número de muestras

1. El muestreo se realizó en el humedal natural de la Universidad EARTH conocido popularmente con el nombre de “La Reserva” que tiene un perímetro de 2346 m, el cual es cerrado y mantiene un flujo continuo.
2. Se utilizaron tres puntos de muestreo a dos profundidades.

4.2 Toma de muestras

1. Con una pala y después de eliminar el agua de la superficie, se tomaron aproximadamente 500g de sedimento superficial y se repartió en dos partes: una se colocó inmediatamente en una bolsa a la que se le eliminó el aire (pruebas anaerobias) y la otra mitad se colocó en una bolsa plástica bien sellada (pruebas aerobias).
2. En el mismo lugar pero con un barreno limpio, marcado para una profundidad de 20 cm, se tomó una muestra de 500 g y se repartió en dos, realizando el mismo repartimiento que en el paso anterior.

4.3 Transporte de las muestras

1. Las muestras se transportaron y mantuvieron a temperatura ambiente antes de ser procesadas.
2. El tiempo máximo entre la toma de muestras y el análisis fue de 12 horas.

4.4 Análisis microbiológicos

4.4.1 Aislamiento de bacterias aerobias

A partir de cada una de las muestras, se tomó 25 g y se diluyeron en 225 ml de solución salina estéril, luego fueron colocadas en un stomacher®, que es un triturador de paletas, que actuó golpeando rítmicamente la mezcla de

suelo y solución salina que fue introducida previamente en una bolsa de plástico estéril por 30 segundos, para lograr una buena homogeneización.

- **Diluciones seriadas**

1. A partir de la muestra anterior se prepararon diluciones decimales en agua peptonada conteniendo 9 ml por tubo hasta la dilución de 10^{-5} .
2. Se pipeteó 0,1 ml de las diluciones preparadas y se inocularon por duplicado en una placa Petri estéril con agar sangre. El inóculo se esparció homogéneamente en la placa.
3. La incubación se realizó a temperatura ambiente por 48 horas.
4. Adicionalmente se inoculó la muestra sin diluir y la dilución de 10^{-1} en agar MacConkey, y en el agar Cetrimida. Todas las placas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas.
5. Se consideró el número de UFC/g de la muestra tomándose en cuenta el factor de dilución de la placa, seleccionando de manera que el número de colonias estuviera comprendido en un ámbito de 30 a 300 colonias.

4.4.2 Cultivo puro

1. Se seleccionaron entre 5 y 8 colonias con apariencia y forma diferente y se sembraron en distintas placas en agar sangre, con la técnica de aislamiento por rayado.
2. Se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente, hasta obtener un cultivo puro.

- **Preparación de un extendido de bacterias (frotis):**

1. Se tomó un portaobjetos limpio, se flameó una de las caras para eliminar la grasa y se dejó enfriar.
2. Se esterilizó el asa bacteriológica en la llama del mechero.

3. Se tocó la superficie de cada colonia diferente con el borde del anillo del asa y fue suspendida en la gotita pequeña de agua destilada estéril previamente colocada.
4. La preparación se dejó secar al aire y luego ésta fue fijada al calor, pasándola ligeramente por la llama.

La pureza de los cultivos se confirmó por medio de tinción de Gram y se anotaron las características microscópicas de cada bacteria.

- **Tinción de Gram**

Modificación de Kopeloff y Beerman

1. Se preparó un extendido de los cultivos y se fijaron a la llama.
2. Se cubrió con cristal violeta y se le adicionó 2 ó 3 gotas de bicarbonato, se mezclaron moviendo cuidadosamente la lámina y se dejó en reposo durante 1 min.
3. Se lavó con agua y posteriormente se cubrió la lámina con lugol y se dejó en reposo durante 2 minutos.
4. Se lavó con agua y se escurrió por un momento.
5. Se decoloró con éter-acetona y se lavó inmediatamente con agua.
6. Se escurrió el exceso de agua y se aplicó safranina por 10 seg.
7. Por último se lavó con agua, se escurrió y se observó al microscopio (1000X).

◆ A continuación se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa a cada una y con base en ello se ubicaron en el grupo bacteriano correspondiente.

Prueba de oxidasa

1. Se tomó con un palillo de madera varias colonias de la placa.
2. Se pusieron las colonias sobre la tira de papel en la zona que contiene el sustrato y se extendió cuidadosamente con el palillo de siembra.
3. Se realizó la lectura antes de que transcurrieran 20 segundos.

Prueba positiva:

La zona del papel inoculada con la bacteria se tornó orada en 10 segundos.

Prueba negativa:

No hay cambio de color en los primeros 20 segundos.



Figura 4. Fotografía de una prueba oxidasa positiva

Prueba de catalasa

1. Con el asa bacteriológica se transfirió una colonia bien aislada a un portaobjetos limpio.
2. Se añadió una o dos de peróxido de hidrógeno al 15%, observándose si se forman burbujas inmediatamente después de añadir el reactivo.

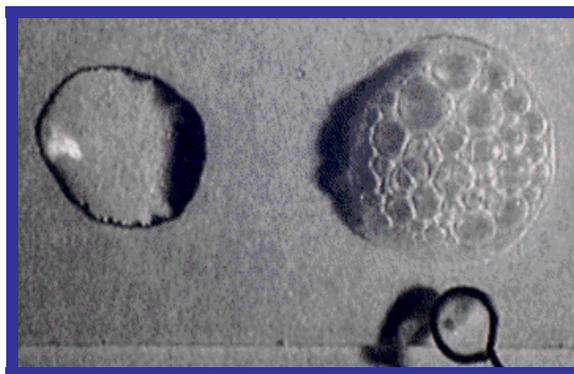


Figura 5. Fotografía de la prueba de catalasa, negativa y positiva respectivamente.

Determinación de la movilidad de las bacterias en tubo

1. Con la aguja bacteriológica, se inoculó por picadura, cada cultivo en sendos tubos de medio de movilidad. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 48 horas.
2. Transcurrido el tiempo de incubación, se observó al microscopio la movilidad de las bacterias entre cubre y portaobjetos y se determinó si eran móviles o no, dependiendo si presentaban desplazamiento bacteriano.
3. La prueba de movilidad se realizó a las bacterias oxidasa negativa y catalasa positiva.

4.4.3 Sistema API® para identificación bacteriana

1. De acuerdo con los resultados de las pruebas anteriores, se seleccionó e inoculó una galería miniaturizada de pruebas bioquímicas (API®) según las indicaciones del fabricante, y fueron incubadas a temperatura ambiente y leídas a las 48 horas.
2. Para la identificación de las bacterias se utilizó el programa API®-Plus.
3. Cada aislamiento se congeló en caldo infusión cerebro corazón complementado con glicerol a -80°C.

• *Lectura e interpretación de la Galería*

1. Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse de acuerdo a los anexos 2, 3 y 4.

4.4.4 Aislamiento de bacterias anaerobias

1. Se preparó diluciones decimales en agua peptonada conteniendo 9 ml por tubo hasta la dilución de 10^{-5} .
2. Se inoculó, por duplicado, cada dilución en una placa Petri estéril con agar sangre. La incubación se llevó a cabo temperatura ambiente por 72 horas en jarra para anaerobiosis con sobre generador de anaerobiosis,

catalizador e indicador siguiendo las indicaciones del fabricante (BBL Microbiologt Systems, Cockeysville, Md.). La jarra Se cerró inmediatamente.

3. Se reportó en U.F.C. el contenido bacteriano de la muestra tomando en cuenta el factor de dilución de lectura de la placa correspondiente el cual debe estar en un rango de 30 a 300 colonias
4. Se seleccionaron los diferentes morfotipos coloniales y se anotaron sus características. Se inoculó cada morfotipo por duplicado en placas con agar sangre para realizar la prueba de aerotolerancia.
5. Para determinar la tolerancia al oxígeno de cada morfotipo colonial, se incubaron las placas en dos formas:
 6. 5.a En atmósfera incrementada de CO₂, y para esto se colocaron la mitad de las placas en un frasco de vidrio y una vez colocadas se encendió una candela y se cerró inmediatamente la jarra.
 7. 5.b La otra mitad en jarra de anaerobiosis como se indicó anteriormente.
8. Transcurrido el tiempo de incubación en anaerobiosis, se verificaba que el indicador estuviera reducido antes de abrir la jarra de anaerobiosis.
9. Se seleccionaron como bacterias anaerobias: aquellas cuyo crecimiento fue exclusivo o mejor bajo condiciones anaerobias.
10. Cada plato se examinó cuidadosamente para verificar la pureza del cultivo.
11. Se realizó tinción de Gram (modificación de Koppeloff) a las bacterias anaerobias.

4.4.5 Estudio de las características físicas de los cultivos

Con la ayuda del estereoscopio se observaron cuidadosamente las colonias en los platos de agar nutritivo. Y a las colonias aisladas se le determinó:

- ◆ Tamaño: midiendo el diámetro de la colonia.

- ◆ Consistencia: con el asa se tomó una o varias colonias y fue determinado si la consistencia fue butirácea viscosa, membranosa o quebradiza.
- ◆ Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular o rizoide.
- ◆ Elevación: plana, levantada, convexa, pulvinada o embonada.
- ◆ Margen o borde: entero, ondulado, lobulado, filamentoso o irregular.
- ◆ Color: incolora, blanquecina, amarillenta.
- ◆ Superficie: lisa, áspera, arrugada, seca.

4.4.6 Identificación bacteriana anaerobia

1. Se inoculó una galería miniaturizada de pruebas bioquímicas (API® 20 A) incubar a temperatura ambiente y se leyó de acuerdo con las recomendaciones de la casa fabricante (Anexo 5).
2. Las bacterias fueron identificadas utilizando el programa API®-Plus.
3. Se congeló cada aislamiento a -80°C.

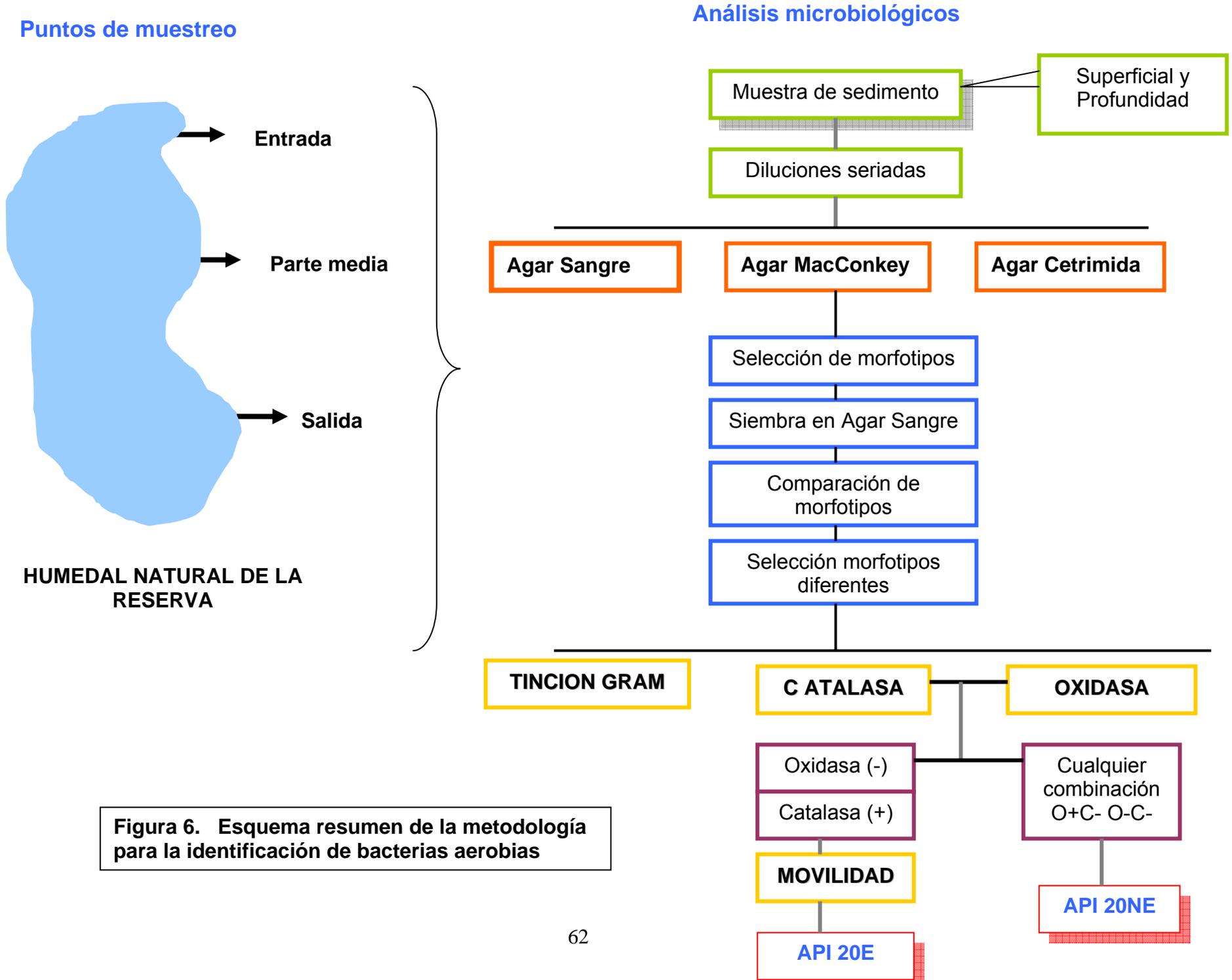
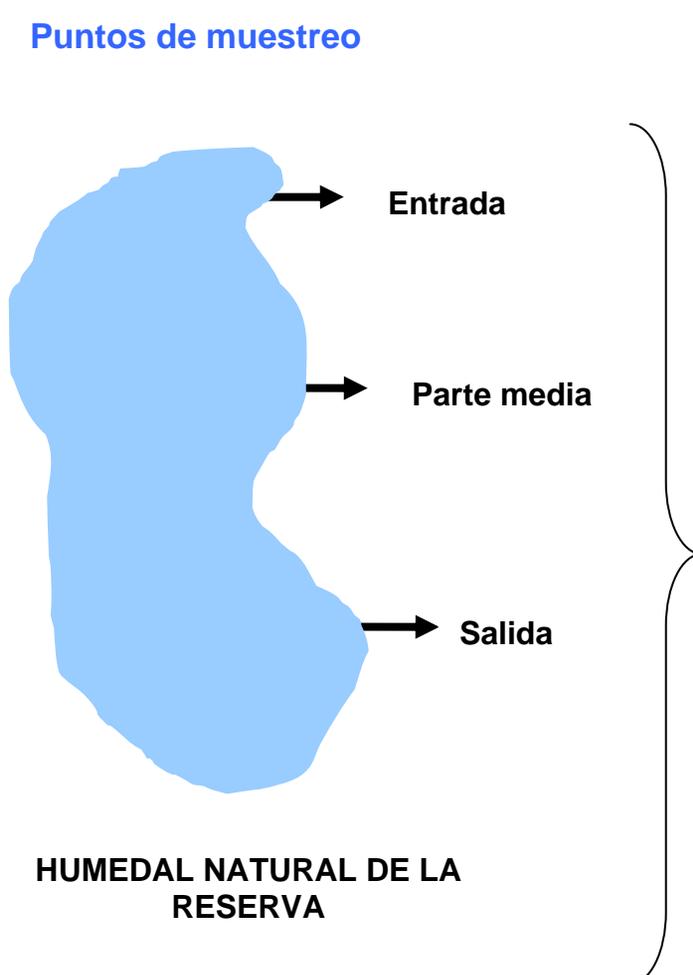


Figura 6. Esquema resumen de la metodología para la identificación de bacterias aerobias



Análisis microbiológicos

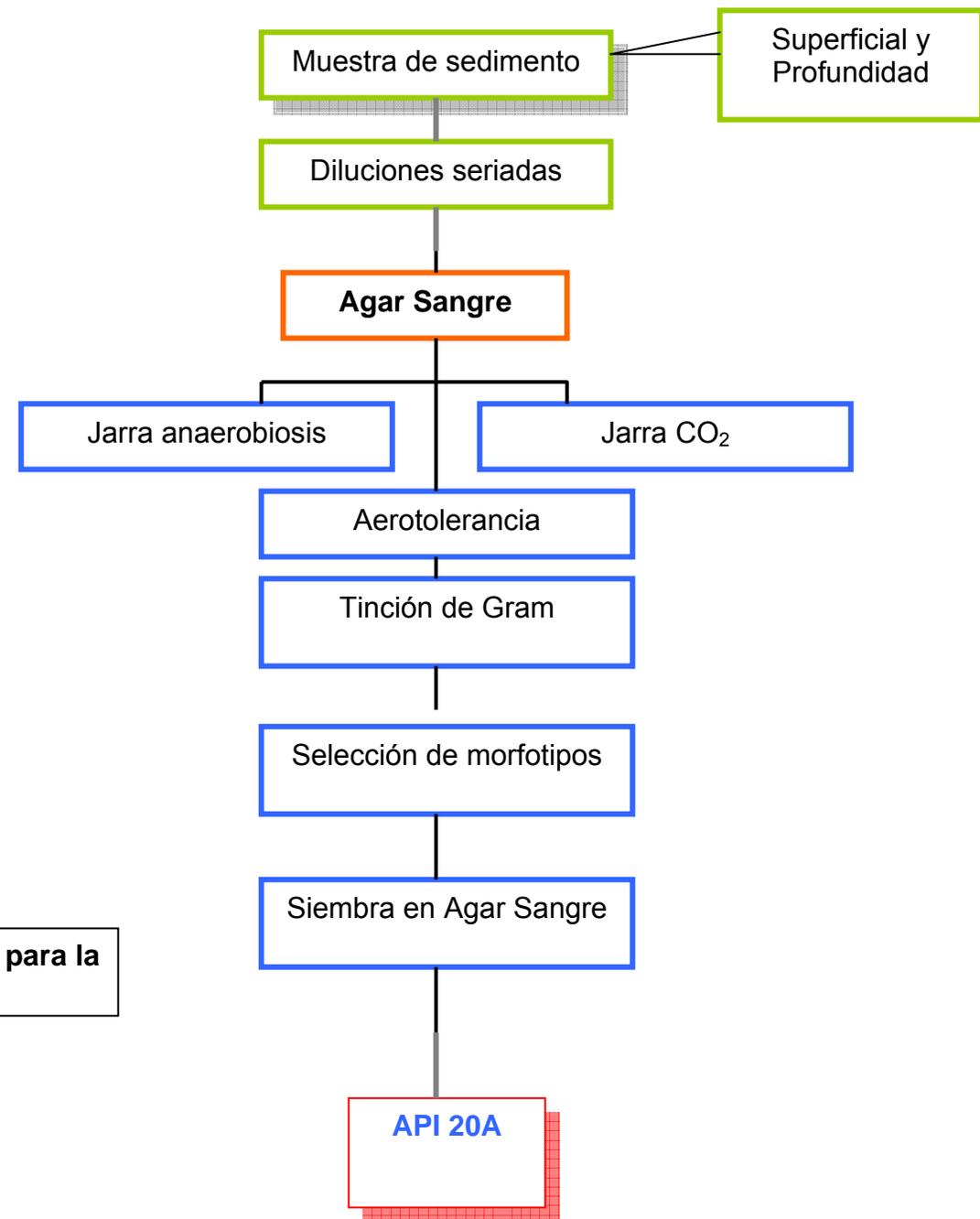


Figura 7. Esquema resumen de la metodología para la identificación de bacterias anaerobias

4. RESULTADOS

El siguiente cuadro muestra los resultados del Recuento Bacteriano Mesofílico de las muestras del sedimento superficial en los distintos sitios de muestreo del Humedal Natural a las 48 horas (aerobios) y 72 horas (anaerobios) de incubación a temperatura ambiente.

Cuadro 5. Unidades formadoras de colonias por gramo de la superficie del suelo del humedal natural de la Universidad EARTH

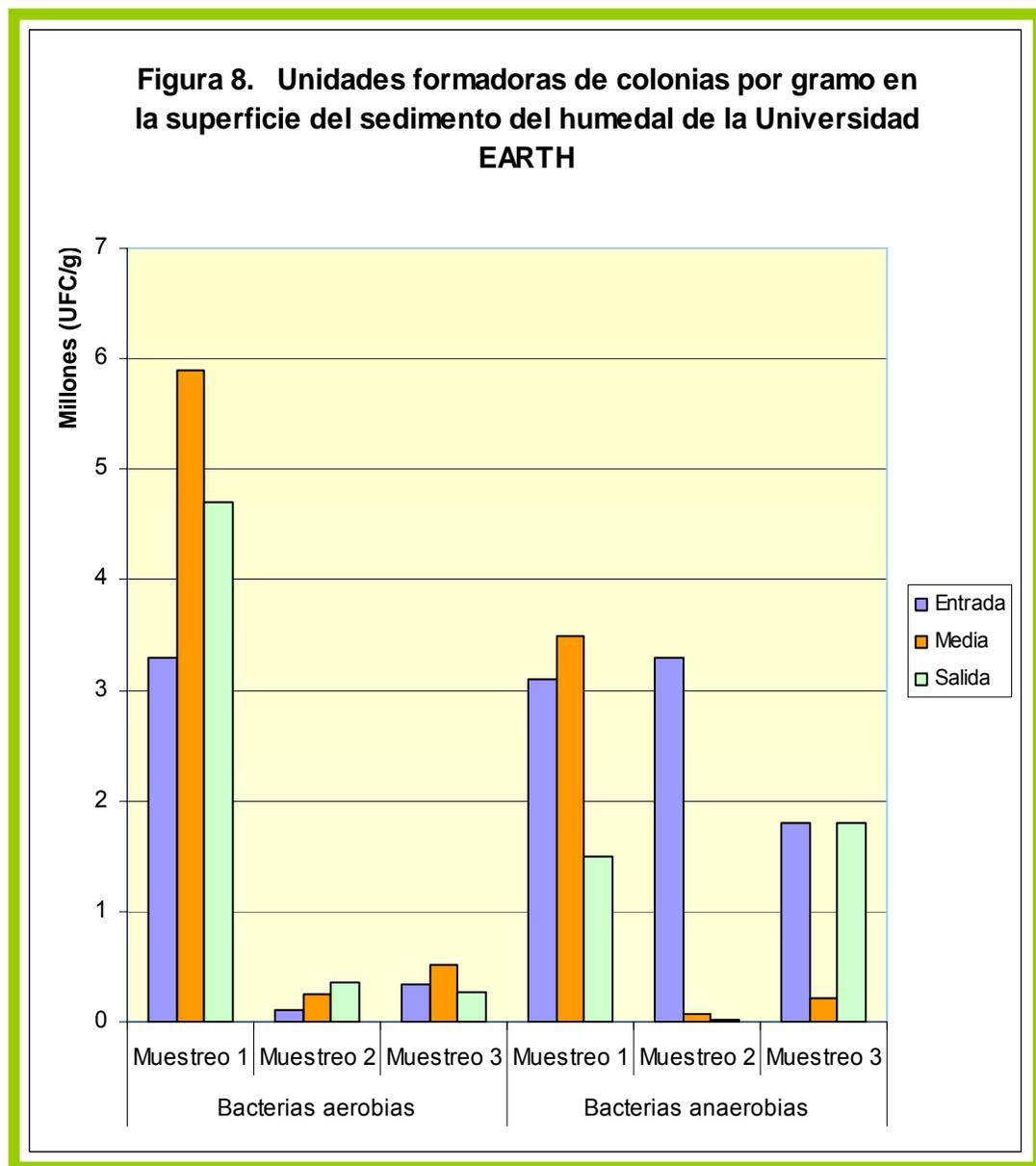
Superficie	Bacterias aerobias			Bacterias anaerobias		
Sitio	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
Entrada	$3,30 \times 10^6$	$1,03 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$3,10 \times 10^6$	$3,30 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$
Parte media	$5,90 \times 10^6$	$2,50 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$	$3,50 \times 10^6$	$7,40 \times 10^4$	$2,20 \times 10^5$
Salida	$4,70 \times 10^6$	$3,60 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	$1,50 \times 10^6$	$1,70 \times 10^4$	$1,80 \times 10^6$

El siguiente cuadro muestra los resultados del Recuento Bacteriano Aerobio y Anaerobio Mesofilico de las muestras del sedimento a una profundidad de 20 cm en los distintos sitios de muestreo del Humedal Natural a las 48 horas (aerobios) y 72 horas (anaerobios) de incubación a temperatura ambiente.

Cuadro 6. Unidades formadoras de colonias por gramo del suelo a una profundidad de 20 cm del humedal natural de la Universidad EARTH

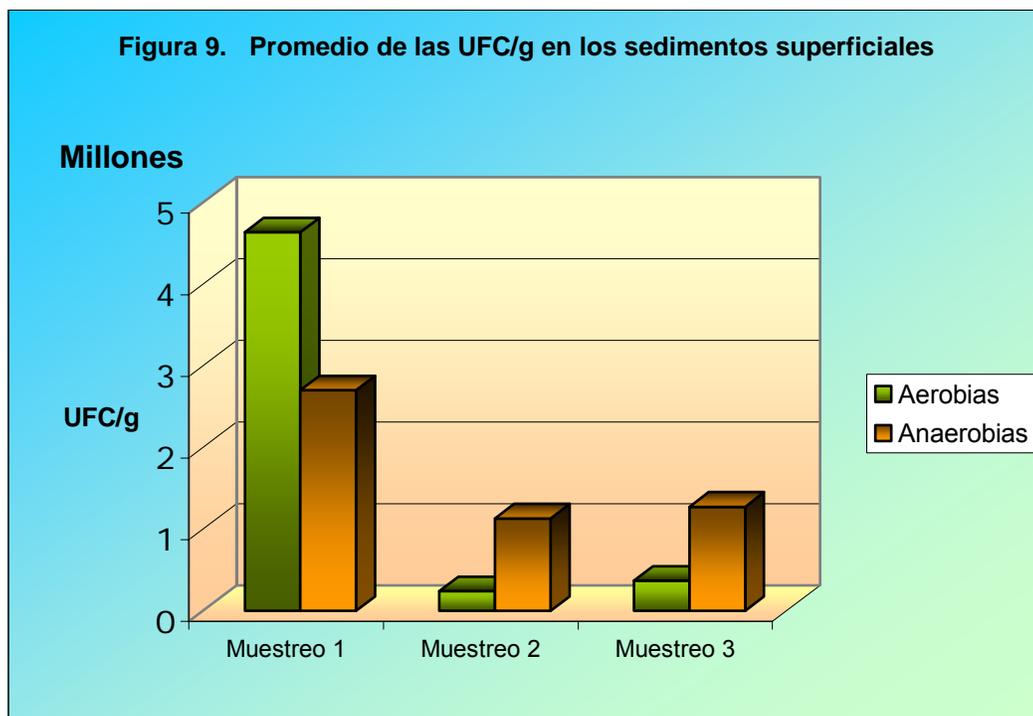
Profundidad	Bacterias aerobias			Bacterias anaerobias		
Sitio	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
Entrada	$4,10 \times 10^6$	$1,12 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$	$2,00 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	$4,80 \times 10^5$
Parte media	$3,40 \times 10^6$	$6,70 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$9,80 \times 10^4$	$4,40 \times 10^6$
Salida	$2,40 \times 10^6$	$7,20 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$3,50 \times 10^6$	$1,10 \times 10^4$	$4,40 \times 10^5$

La siguiente figura muestra los resultados en detalle de los Recuentos Bacterianos expresados en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de las muestras del sedimento superficial, en los distintos puntos de muestreo. Se puede observar como en el muestreo 1, las bacterias aerobias presentan el recuento más alto y que en el segundo y tercer muestreo disminuyen notablemente. Con respecto a las bacterias anaerobias los recuentos en forma general presentan valores muy altos.



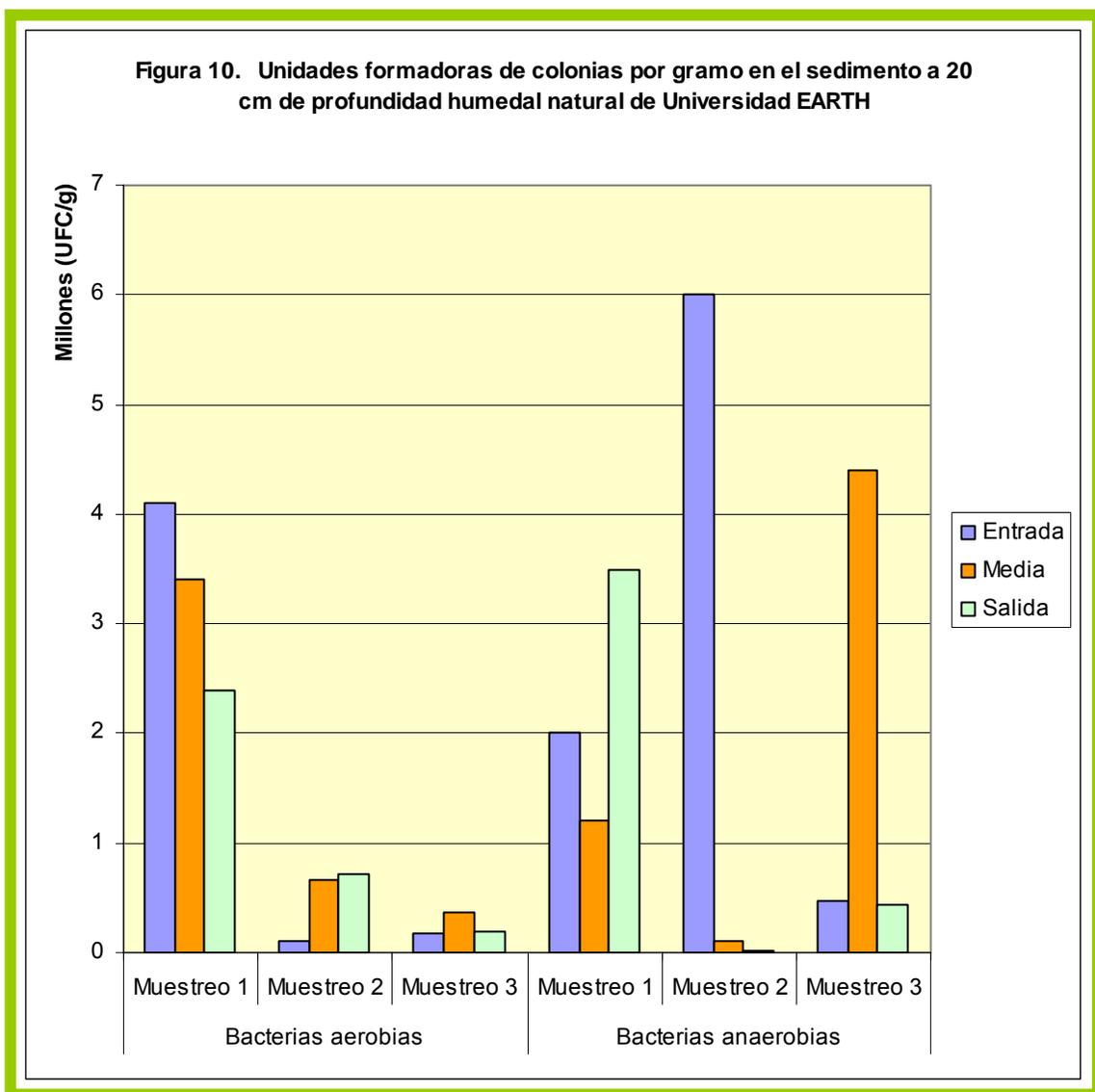
Según la figura 9, donde se muestran los promedios de las UFC/g de las bacterias aerobias y anaerobias en los distintos muestreos, se tiene que el número de bacterias aerobias en los tres puntos de muestreo del humedal decrece en el segundo muestreo y aumenta en el tercero levemente, en general el número promedio de bacterias aerobias es de $4,6 \times 10^6$ para el muestreo uno, $2,4 \times 10^5$ para el muestreo dos y $3,7 \times 10^5$ para el muestreo tres. En cuanto al recuento de las bacterias anaerobias, éste se comportó de la misma que las bacterias aerobias y en promedio se obtuvieron, $2,7 \times 10^6$ para el muestreo uno, $1,1 \times 10^6$ para el muestreo dos y $1,3 \times 10^6$ para el tercer muestreo.

De acuerdo a la misma figura, si se realiza una comparación entre las bacterias aerobias y anaerobias, entre cada muestreo, se tiene que el primer muestreo (más alto), se contabilizaron mayor cantidad de bacterias aerobias que de anaerobias y por lo contrario, en los muestreos 2 y 3, las UFC/g de bacterias anaerobias se encontraron en mayor cantidad.



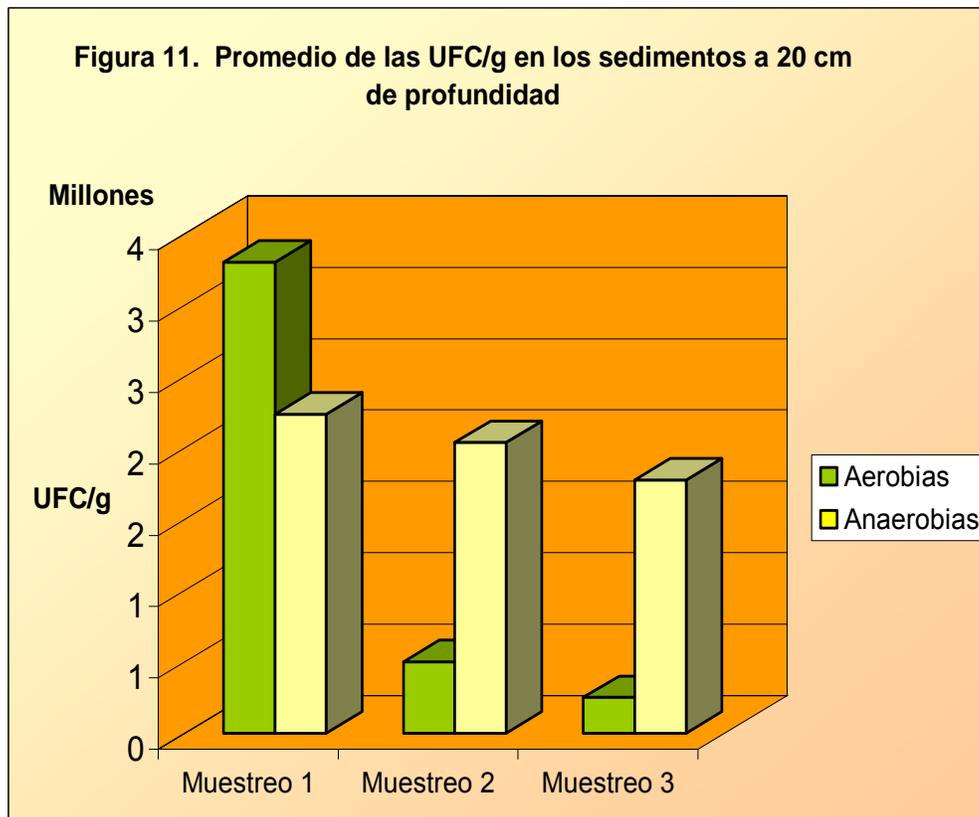
La siguiente figura muestra los resultados en detalle de los Recuentos Bacterianos expresados en Unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de las muestras del sedimento a 20 cm de profundidad, en los distintos puntos de muestreo.

Se puede observar como en el muestreo 1, las bacterias aerobias presentan el recuento más alto y que en el segundo y tercer muestreo disminuyen notablemente, y que con respecto a las bacterias anaerobias los recuentos en forma general presentan valores muy altos, a excepción de la parte media y salida del humedal en el segundo muestreo.



Según la figura 11, donde se muestran los promedios de las UFC/g de las bacterias aerobias y anaerobias en los distintos muestreos de los sedimentos a 20 cm de profundidad, se tiene que el número de bacterias aerobias en los tres puntos de muestreo del humedal va decreciendo conforme se realizaron los muestreos, $3,3 \times 10^6$ para el muestreo uno, $5,0 \times 10^5$ para el muestreo dos y $2,5 \times 10^5$ para el muestreo tres. En cuanto al recuento de las bacterias anaerobias, éste mostró leves diferencias entre los distintos muestreos, ya que en promedio se obtuvieron, $2,2 \times 10^6$ para el muestreo uno, $2,0 \times 10^6$ para el muestreo dos y $1,8 \times 10^6$

De acuerdo figura mencionada anteriormente, si se realiza una comparación entre las bacterias aerobias y anaerobias, entre cada muestreo, se tiene que el primer muestreo (más alto), se contabilizaron mayor cantidad de bacterias aerobias que de anaerobias, por lo contrario, en los muestreos 2 y 3, las UFC/g de bacterias anaerobias se encontraron en mayor cantidad.



El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados en la superficie del suelo de la entrada del humedal natural (HN).

Cuadro 7. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la entrada del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (2)</i> <i>Bacillus spp (3)</i> <i>Bacilo no esporulado (1)</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Oligella ureolytica</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (2)</i> <i>Bacillus spp (3)</i> <i>Bacilo no esporulado (1)</i> <i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (2)</i> <i>Chryseomonas luteola</i> <i>Ewingella americana</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymuthica</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Actinomyces meyeri/odontolyticus</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i> <i>Propionibacterium granulosum</i>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Eubacterium aerofaciens</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Prevotella oris/buccae</i> <i>Propionibacterium granulosum</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianas cultivables e identificados 20 cm de profundidad del suelo de la entrada del humedal natural.

Cuadro 8. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la entrada del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Bacillus spp</i> (1) <i>Bacillus spp</i> (4) <i>Bacillus spp</i> (5) <i>Bacilo no esporulado</i> (2) <i>Oligella ureolytica</i>	<i>Bacillus spp</i> (2) <i>Bacillus spp</i> (4) <i>Bacillus spp</i> (5) <i>Bacillus spp</i> (6) <i>Bacilo no esporulado</i> (2) <i>Bacilo no esporulado</i> (3) <i>Burkolderia cepacia</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Bacillus spp</i> (3) <i>Burkolderia cepacia</i> <i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i> <i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i> <i>Serratia ficaria</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Clostridium spp</i> <i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados en la superficie del suelo de la parte media del humedal natural.

Cuadro 9. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la parte media del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Bacillus spp (8)</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i> <i>Pantoea spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia plymuthica</i>	<i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (2)</i> <i>Bacillus spp (6)</i> <i>Bacillus spp (9)</i> <i>Bacilo no esporulado (3)</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Chryseomonas luteola</i> <i>Moraxella spp</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Bacillus spp (8)</i> <i>Bacillus spp (9)</i> <i>Bacillus spp (10)</i> <i>Bacillus spp (11)</i> <i>Bacilo no esporulado (1)</i> <i>Bacilo no esporulado (2)</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Clostridium cadaveris</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i>	<i>Actinomyces meyeri/odontolyticus</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados a 20 cm de profundidad del suelo de la parte media del humedal natural.

Cuadro 10. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la parte media del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i> <i>Bacillus spp</i> (6) <i>Bacillus spp</i> (7) <i>Bacilo no esporulado</i> (3) <i>Chryseobacterium indologenes</i> <i>Pantoea spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia plymuthica</i>	<i>Bacillus spp</i> (7) <i>Bacillus spp</i> (8) <i>Bacillus spp</i> (9) <i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Burkolderia cepacia</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Chryseomonas luteola</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus spp</i> (4) <i>Bacillus spp</i> (5) <i>Bacillus spp</i> (6) <i>Bacilo no esporulado</i> (1) <i>Burkolderia cepacia</i> <i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia plymuthica</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium cadaveris</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Eubacterium lentum</i>	<i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Eubacterium lentum</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados en la superficie del suelo de la salida del humedal natural.

Cuadro 11. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas en la superficie del suelo de la salida del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (3)</i> <i>Bacilo no esporulado (4)</i> <i>Bacilo no esporulado (5)</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Moellerella wisconsensis</i> <i>Oligella ureolytica</i> <i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Bacillus spp (1)</i> <i>Burkolderia cepacia</i> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Pantoea spp</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Bacillus spp (14)</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> <i>Serratia plymuthica</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium cadaveris</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium spp</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Eubacterium limosum</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium cadaveris</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Porphyromonas assacharolytica/ limosum</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados a 20 cm de profundidad del suelo de la salida del humedal natural.

Cuadro 12. Bacterias aerobias y anaerobias identificadas a 20 cm de profundidad del suelo de la salida del humedal natural de la Universidad EARTH

Identificación	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
BACTERIAS AEROBIAS	<i>Bacillus spp (7)</i> <i>Bacilo no esporulado (3)</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i> <i>Moellerella wisconsensis</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus spp (1)</i> <i>Bacillus spp (2)</i> <i>Bacillus spp (6)</i> <i>Bacillus spp (9)</i> <i>Bacillus spp (10)</i> <i>Shingomonas paucimobilis</i>	<i>Bacillus spp (15)</i> <i>Bacillus spp (16)</i> <i>Bacilo no esporulado (3)</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia plymuthica</i>
BACTERIAS ANAEROBIAS	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium cadaveris</i> <i>Clostridium cadaveris</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Porphyromonas assacharolytica/ limusum</i> <i>Prevotella intermedia/disiens</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> <i>Eubacterium limosum</i> <i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i> <i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados el medio agar MacConkey en los distintos puntos de muestreo.

Cuadro 13. Bacterias aerobias encontradas en el medio agar MacConkey en cualquier de los puntos de muestreo

MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
<p><i>Burkholderia cepacia</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> <i>Serratia marcescens</i></p>	<p><i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> <i>Serratia marcescens</i></p>	<p><i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> Bacilo no esporulado (4) <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Comamonas testosteronii/Ps. Alcaligenes</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella ornithinolytica</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia plymuthica</i></p>

El siguiente cuadro muestra los distintos géneros y especies bacterianos cultivables e identificados en el medio agar Cetrimida en los distintos puntos de muestreo.

Cuadro 14. Bacterias aerobias encontradas en el medio agar Cetrimida en los distintos puntos de muestreo

MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Alcaligenes xilosoxidans</i>
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

6. DISCUSIÓN

Recuento bacteriano mesofílico

El presente estudio pretendía realizar un recuento de las bacterias anaerobias y aerobias presentes para observar como variaban éstas a través del tiempo. Aunque la toma de las muestras se realizó en un transcurso de tiempo de 45 días, la flora bacteriana aerobia y anaerobia según las figuras 8 y 10, varió constantemente entre los sitios de entrada, parte media y salida del humedal, pero esta gran variación lo que sugiere es utilizar un mayor número de puntos en cada uno de los sitios para tener una representación más adecuada y así poder conocer lo que está sucediendo en el humedal ya que para este estudio se contaba con pocas muestras y algunas condiciones básicas como pH y temperatura se desconocían.

Además de lo anterior se podría decir que es evidente que las bacterias en estos sitios no están distribuidas regularmente, pues hay un mosaico discontinuo de microambientes dentro de los sedimentos (Nogales, 2003). Por lo tanto se podría asegurar, que las bacterias de estos sitios de muestreo se distribuyen al azar y que los sedimentos del humedal no tienen escalas diferentes que se superponen como las que tiene un suelo común (Ettema, *et al.*, 2002).

En los recuentos bacterianos que se muestran en los cuadros 5 y 6, a pesar de que la lectura se realizó en distintos momentos, así de bacterias aerobias a las 48 horas y de las anaerobias a las 72 horas, esta prolongación en el tiempo de incubación no se tomó en cuenta para explicar el mayor o menor número de UFC/g, ya que esta diferencia en el tiempo de incubación se fundamentó en que, aunque algunas bacterias anaerobias tienen un tiempo de generación que permite obtener crecimiento visible en placas en 24 ó 48 horas, hay otras que necesitan varios días para crecer o para observar

algunas propiedades esenciales en su caracterización, como la pigmentación negra de algunas especies de *Prevotella* y *Porphyromonas* (Alcalá et al., 2004).

Además como se puede observar en las figuras 9 y 11, para ambos gráficos, los recuentos en el primer muestreo fueron los más altos, esto se debe a que en el segundo y tercer muestreo se presentaron condiciones lluviosas que hicieron que algunos factores como: pH, composición de la atmósfera, temperatura y la cantidad de nutrientes disponibles se vieran afectados y que de forma indirecta las poblaciones bacterianas fueran reducidas. Ahora bien, estas mismas condiciones de lluvia podrían explicar porqué hay un mayor recuento de bacterias anaerobias en el segundo y tercer muestreo (Figura 9 y 11), y esto es porque la difusión del oxígeno se volvió extremadamente lenta en condiciones de anegación y por lo tanto los procesos anaeróbicos se vieron favorecidos.

A manera de resumen, se podría decir que los resultados coinciden con lo esperado, con lo respecto a la difusión de oxígeno, donde se esperaría que la cantidad de bacterias aerobias sea más abundante en la superficie del sedimento, puesto que hay una mayor cantidad de oxígeno disuelto que favorece su crecimiento (Coyne, 2000). En cambio la falta de oxígeno en las capas profundas, o sea, en las muestras a 20 cm de profundidad se esperaría lo contrario, una mayor cantidad de bacterias anaerobias ya que la demanda de los procesos aeróbicos heterotróficos no puede ser satisfecha, y de ahí que las bacterias anaerobias se ven favorecidas, además que se vuelven indispensables para la descomposición de materia orgánica en ausencia de aire y para la fijación de CO₂ en condiciones de metanogénesis y por lo tanto, las bacterias anaerobias pueden determinar cambios globales importantes en los niveles de oxidación del material orgánico en ambientes anóxicos (Coyne, 2000).

Bacterias Gram negativas y positivas

Un resultado destacable obtenido mostrado en el cuadro 13, es el predominio en el suelo del humedal natural de bacterias gram negativas que comprenden un 74% de las bacterias aisladas e identificadas, de las cuales en su gran mayoría se obtuvieron en el medio selectivo y diferencial de agar MacConkey que contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben a las bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Rodríguez *et al.*, 2005).

El hecho de que se obtuviera mayor cantidad de gram negativos se puede correlacionar con lo hallado en algunos estudios sobre microbiología de suelo, donde se afirma que las bacterias gram negativas, poseen estrategias competitivas como: la producción de antibióticos, de sideróforos, liberación de enzimas como quitinasas y glucanasas (que actúan sobre la pared de los hongos e insectos fitopatógenos), favoreciendo su desarrollo y limitando la presencia de bacterias Gram positivas (Grant y Long, 1989). En menor pero no menos importante, un 26% de las bacterias son gram positivas, que fueron cultivables en el medio agar sangre principalmente, por tratarse de un medio cuyo fin es el aislamiento general de microorganismos (Rodríguez *et al.*, 2005).

En cuanto al medio agar cetrimida utilizado para el aislamiento selectivo e identificación de *Pseudomonas*, en este estudio se demostró que la cetrimida es capaz de seleccionar especies de *Pseudomonas*, que no fueron aisladas a partir de otros medios de cultivo, como Agar Sangre o MacConkey. Sin embargo, no es específico para este grupo pues permitió el crecimiento de otra bacteria identificada como *Alcaligenes xilosoxidans*, como se muestra en el cuadro 11, esto se puede deber a que dicha especie no se ve inhibida como otras por la cetrimida del medio de cultivo.

Identificación bacteriana

En este primer estudio realizado en el humedal natural de “La Reserva” de la Universidad EARTH, se pretendió dar a conocer la diversidad de la flora bacteriana que se encuentra en el sedimento, para esto se trabajó con dos tipos de muestra, la primera del denominado ambiente bentónico, que es la zona de transición entre la columna de agua y el sedimento, la cual colecta todo el material orgánico que sedimenta de la columna de agua, siendo esta zona muy importante en los sistemas acuáticos, debido al reciclaje de los elementos esenciales tales como el carbono, nitrógeno y el azufre (Wikipedia, 2005 y Maier *et al.*, 2000).

El segundo tipo de muestras, se trataba principalmente de una capa de restos orgánicos en descomposición, que según Adrián (2005), en un corte vertical de un suelo maduro vendría siendo el Horizonte A, donde el suelo es rico en materia orgánica y de color oscuro.

Los microorganismos que se encuentran en el fondo de los sistemas acuáticos son diferentes a los que ocupan las capas superiores del agua ya que están altamente adaptados a los sedimentos y a las condiciones de materia orgánica específicas de su medio ambiente (Ecological Society of America, 2003).

Aunque en este estudio exploratorio, el conocimiento de las bacterias del suelo queda muy limitado a aquellos pocos que pueden cultivarse en las condiciones indicadas en el laboratorio, más de 35 géneros cultivables aeróbicos, anaeróbicos y facultativos fueron aislados del sedimento del humedal natural e identificados por medio del test API[®].

Para explicar este fenómeno se ha discutido, que no todos los microorganismos presentes en las muestras ambientales son cultivables

(microorganismos no cultivables). Esto es debido a dificultades intrínsecas en el cultivo (microorganismos parásitos de otros), al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir. Se estima que en sólo en torno al 1% de las bacterias del suelo son cultivables (Maier *et al.*, 2000).

Bakken (1997) ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados; la base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden ser viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables, por tanto, 90.0 a 99.9% de las bacterias no cultivables están representadas por su contraparte cultivable.

Bacterias aerobias

En este estudio prevalecieron algunas bacterias correspondientes a bacilos gram negativos aeróbicos, pero entre los géneros que comúnmente se encuentran en el suelo y el agua correspondieron a los *géneros*: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* y los géneros *Bordetella*, *Ochrobactrum*, *Oligella* y *Shingomonas*, se encuentran en mamíferos y como contaminantes en el laboratorio por lo que no son propios del ambiente natural.

La presencia de *Pseudomonas* en todos los sitios de muestreo (Cuadro 14), pone de manifiesto que las bacterias pertenecientes a este género, son bacterias que generalmente se encuentran en altas proporciones en el medio edáfico, debido a que poseen requerimientos nutricionales muy sencillos y

utilizan variadas fuentes de carbono, lo que les imprime una alta versatilidad para colonizar rápidamente las raíces de las plantas y sus zonas adyacentes (Molina *et al* , 2000). Además, presenta una especial capacidad para degradar una gran variedad de compuestos orgánicos; es productora de bacteriocinas y muy reconocida por su actividad como promotora de crecimiento, también puede suprimir algunas enfermedades de plantas a través de un antagonismo directo con fitopatógenos presentes en el suelo (Polonskaya y Sadovskaya, 1997).

Dentro de este grupo es reconocida la especie *Pseudomonas fluorescens* por la producción de piosinas, sustancias antibióticas de naturaleza proteica y activas contra especies y cepas estrechamente relacionadas tal vez favoreciendo de esta forma, su presencia en el extracto de la rizosfera en descomposición (Kozdroj, 1996).

Además, varias especies del *Pseudomonas* y *Chryseomonas* contienen plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados. Estas enzimas suelen ser inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede permitir reducir los niveles de contaminación por estos compuestos xenobióticos (Vullo, 2003).

Además de los papeles ecológicos mencionados, *Pseudomonas* es un género que presenta bacterias nitrificantes que cumplen una función muy importante en la depuración de aguas residuales ya que ellas reducen biológicamente los nitratos a nitrógeno en su forma gaseosa. Durante el proceso de reducción las bacterias transforman el nitrato a nitrito y éste en óxido nítrico, óxido nitroso y finalmente a nitrógeno gas que es liberado a la atmósfera (Lennetech, 2005).

En cuanto a las cepas de *Alcaligenes* que se obtuvo en el medio de agar Cetrimida solamente pero en todos los sitios, se tiene que éstas son heterótrofas y que pueden crecer también quimiolitotróficamente usando hidrógeno como fuente de electrones y, además, fijar carbono a partir de CO₂, como las plantas. Asimismo, varias cepas son capaces de degradar contaminantes ambientales prioritarios como pesticidas, resistir el efecto de metales pesados y también producir polihidroxitiratos (Arias *et al.*, 2001).

En el caso de *Acinetobacte* que se aisló solamente en el medios agar MacConkey, puede llevar a cabo la eliminación de fosfatos del agua acumulando polifosfatos en los tejidos celulares, ya que pueden absorber mayor cantidad de fosfatos de la que necesita para su síntesis celular (Lennetech, 2005).

Este almacenamiento de polifosfatos hace que las *Acinetobacter* sean capaces de sobrevivir temporalmente en circunstancias anaeróbicas (Lennetech, 2005) y cuando ellas residen en una zona anaeróbica en las aguas residuales, absorben ácidos grasos y los almacenan como sustancias de reserva. Durante este proceso, los polifosfatos se descomponen para obtención de energía, haciendo que se liberen fosfatos en la zona aeróbica. Una vez que las *Acinetobacter* entran en la zona aeróbica absorben fosfatos y los almacenan lo que provoca que el contenido en fosfatos del agua residual disminuya (Lennetech, 2005).

Algunas bacterias del género *Burkholderia* encontradas principalmente en la entrada y parte media del humedal, se les ha agrupado con otras bacterias con las que están muy relacionadas como *Stenotrophomonas* y *Comamonas*, ya que el conjunto de estos géneros de bacterias se suele expresar como organismos ambientales (Rossboth, 2001). Según el autor citado, *B. cepacia*

presenta algunas características asombrosas, como la metabolización de compuestos nitroaromáticos y la degradación de solventes clorados como el monocloroetano. En particular, esta última propiedad de la *B. cepacia* ya se aplicó a efectos de bioamplificación, lo que significa una inyección de bacterias en aguas subterráneas para eliminar estos compuestos químicos (Rossoth, 2001).

Otra de las bacterias identificadas pertenece al género *Moraxella* que se encuentra normalmente degradando materia orgánica en el suelo y en la rizosfera de plantas, razón por la cual, es probable haber hallado este género en las muestras de suelo (Coyne, 2000) y además según Kathiresan (2003) están involucradas en la biodegradación de las bolsas de polietileno y vasos de plástico.

En cuanto a *Chryseobacterium* que es un género distribuido en ambientes naturales y que se encontró tanto en la entrada y parte media del humedal, presenta especies como *Chryseobacterium meningosepticum* las cuales producen fosfatasas alcalinas beneficiando a muchas plantas. Su presencia en este estudio, podría ser el resultado de la atracción de exudados provenientes de las raíces en estado de agregación de las plantas debido al rol que este microorganismo puede cumplir dentro de la rizosfera o simplemente porque se encontraba allí como saprofito (Berlutti *et al.* 2001).

Flavimonas es un género muy abundante en la naturaleza donde juega un papel fundamental en la degradación aerobia de la materia orgánica, se encontró solamente en el primer muestreo en la parte media del humedal, las bacterias de este género son muy interesantes desde el punto de vista medioambiental por: su papel en la depuración aerobia de aguas residuales y por su capacidad para degradar compuestos antropogénicos y recalcitrantes (Coyne, 2000).

En cuanto a las bacterias cuyo principal hábitat se encuentra en los humanos (aislamiento clínicos) tales como *Bordetella*, *Ochrobactrum*, *Oligella* y *Shingomonas*, se tiene que a pesar de ser reportadas como bacterias de imoportancia clínica, recientes estudios han demostrado que *Ochrobactrum* es capaz de degradar sustancias cerosas en el suelo y de esta forma se convierten en una solución al limitante que estas sustancias tendrían en el crecimiento de la vegetación, pues evitarían la absorción del agua en el suelo (Roper, M. 2004).

Además *Oligella* y *Ochrobactrum*, pueden llevar a cabo el proceso de desnitrificación (Zumft, 2002), el cual implica la transferencia de electrones entre un dador de electrones reducido a un aceptor de electrones oxidado (oxígeno, nitrito, nitrato, o sulfato), para llevar a cabo el proceso de desnitrificación estas bacterias requieren necesariamente esta fuente de carbono orgánico para oxidar, la cual es la materia orgánica presente en el sedimento y agua (Wieland *et al.*, 2001).

En cuanto a otros géneros encontrados en este estudio como: *Shingomonas* y *Pantoea*, se les ha relacionado con una enfermedad denominada bacteriosis del palmito, la cual está caracterizada por lesiones foliares que inician con zonas cloróticas sobre las que aparece un exudado y se forman vesículas, que luego se necrosan. Estas bacterias se localizan principalmente en espacios intercelulares de la epidermis abaxial y del mesófilo esponjoso, además, en el interior de algunas de las células de estos tejidos y en el parénquima de los tejidos vasculares (Sánchez *et al.*, 2004).

Bacilos aerobios positivos

De acuerdo a la literatura, los bacilos positivos aerobios pueden aislarse fácilmente del suelo o de partículas de polvo en suspensión y son uno de los organismos más corrientes cuando se siembran por estría muestras de suelo en placas que contengan diferentes medios nutritivos (Martín, 1994; Mayea *et al.* 1991), por ésta razón, a los largo del proyecto se logró el aislamiento de 17 bacilos positivos, tanto esporulados como sin esporular en las muestras del sedimento del humedal natural.

Muchos bacilos positivos producen enzimas hidrolíticas extracelulares, que degradan polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que les permite usar dichos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Muchos bacilos producen antibióticos como la bacitracina, polimixina y en la mayoría de los casos la producción de antibióticos parece guardar relación con el proceso de esporulación ya que el antibiótico se libera cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de su crecimiento, tras lo cual inicia la esporulación (Martín, 1994).

Para efectos de este proyecto, si la bacteria aislada era aerobia, esporulada y Gram positivo, se le nombraba *Bacillus spp*, ahora, para afinar más e intentar dar con la especie, se recomienda la realización de al menos cuatro pruebas bioquímicas.

La primera de ellas es la de Voges-Proskawer en la que se busca la presencia de acetoina o acetil-metil carbonil, la segunda de las pruebas se trata de saber si fermenta a la glucosa produciendo ácido, la tercera consiste que en el mismo tubo de la prueba anterior se introduzca una campana de Durham en posición invertida, que dependiendo de que aparezca una burbuja o no, va a indicar si es gas positivo o negativo y la última de las

pruebas bioquímicas consiste en investigar la producción o no de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón.

Bacterias aerobias facultativas

Como se vio anteriormente, entre las bacterias de los sedimentos existen representantes de géneros con metabolismo aerobio-oxidativo, pero también se identificaron bacterias aerobias facultativas, que son fermentativas en ausencia de sustratos oxigenados, de los géneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Moellerella*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Serratia*, de los cuales *Citrobacter*, *Escherichia*, *Ewingella* y *Providencia*, no se encuentran comúnmente en los suelos y aguas (Holt *et al.*, 1994)

Sin embargo, Fenchel *at al.*, (2000), afirma que el género *Providencia* aislado en este estudio, se especializa en la descomposición de la materia orgánica del suelo y algunas bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Escherichia*, pueden respirar reduciendo el nitrato a nitrito, que se acumula en el ambiente, pero no producir N_2 . Luego reducen el nitrito a amonio por la vía asimilatoria, si hay deficiencia de NH_4^+ en el medio. Y algunas especies de *Chromobacterium* debido a su metabolismo facultativo, pueden ayudar a los procesos de desnitrificación, mientras que en ausencia de oxígeno intervienen en procesos fermentativos (Mora, 2004)

A pesar de que los principales procesos de eliminación del fósforo están atribuidos a *Acinetobacter*, hay otros géneros bacterianos de agua dulce como los identificados en esta investigación que permiten una eliminación exitosa de estos compuestos tales como *Aeromonas* y *Klebsiella* (Lennetech, 2005).

Klebsiella fue un género ampliamente distribuido en el humedal ya que habita normalmente en el suelo, en el agua y en la superficie de las raíces de algunas plantas; algunas especies se han reportado como bacterias fijadoras de nitrógeno y como productora de giberelinas, auxinas y citoquininas, que se consideran sustancias promotoras del crecimiento de plantas (Castellanos, 2001)

Además es necesario destacar la presencia de *Serratia* en los distintos puntos de muestreo, ya que algunas especies como *Serratia marcesens* han sido reportadas por Ryals *et al.* (1996) como inductoras de resistencia sistémica y las demás se encuentran generalmente cumpliendo funciones saprofiticas en este ambiente edáfico por lo que no se encargan de la descomposición directa de la materia orgánica sino son simples acompañantes de estos procesos degradativos, al igual que *Citrobacter*.

Por otro lado *Pantoea* es un género que se ha encontrado en suelos y aguas como oportunista o cumpliendo funciones benéficas como la fijación de nitrógeno en la rizosfera de plantas de sorgo y ha sido reportada como controlador biológico de *Erwinia amylovora* en orquídeas, según (Stockwell, 2002), de ahí que su presencia en el humedal sea persistente a lo largo de los muestreos.

Con respecto a *Pasturella*, no se ha reportado recientemente en muestras de suelo ni realizando funciones degradativas de compuestos, sino que solamente se ha encontrada en la flora oral, respiratoria, genital y gastrointestinal de especies domésticas y al igual que *Ewingella*, son nuevos géneros dentro de la familia Enterobacteriaceae, que hasta el momento se desconoce cuál es la importancia de estos en patología humana (Aguado y Lumbreras, 1998).

Bacterias anaerobias

Según lo informado por Madigan *et al.*, (1999), las bacterias anaerobias se encuentran en abundantes ambientes anóxicos en la Tierra, como fangos y otros sedimentos lacustres, ríos y océanos por lo que se les ha considerado miembros destacados de la microbiota de estos hábitats, aunque su suerte ha sido crítica para sustentar los ecosistemas de agua dulce dado que ellos son responsables de la mayoría del trabajo de purificación (Atlas y Bartha, 2002).

Sin embargo, el conocimiento de estas bacterias es poco y relativamente reciente ya que para poder lograr condiciones de anaerobiosis en el laboratorio se necesitaban, equipos costosos y técnicas bacteriológicas muy dificultosas. Pero a partir de la introducción de sistemas simples para producir anaerobiosis con equipos y reactivos de bajo costo el conocimiento de los anaerobios se desarrolla intensamente.

Para el presente estudio de la diversidad metabólica bacteriana anaerobia se hizo uso de jarras plásticas cilíndricas, que se cierran herméticamente y en los que la atmósfera anaerobia se obtiene entre 1 ó 2 horas después de introducir unos sobres (GasPak®) en los que, al añadir H₂O se libera H₂ y CO₂ y el H₂ se combina con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador (Madigan *et al.*, 1999). A lo largo del proyecto no se presentaron fallos en estas jarras ya que el buen funcionamiento se comprobaba con la introducción de un indicador de oxígeno, que eran tiras de papel con azul de metileno, que se decoloran al desaparecer la presencia del oxígeno (Alcalá *et al.*, 2004).

La digestión anaerobia es uno de los mecanismos más frecuentemente utilizados por la naturaleza para degradar las sustancias orgánicas. Este proceso biológico se basa en la transformación, a través de una serie de

reacciones bioquímicas de la materia orgánica en componentes principales como el CH₄ y el CO₂ (Lettinga, 1995). Según Smith y Smith (2001), las bacterias anaerobias usan los detritos como fuente de carbono y les añaden nitrógeno y fósforo que obtienen del agua y los sedimentos circundantes. Ésta acumulación de los nutrientes en el material descompuesto ayuda a la retención de N y P en el sedimento, donde permanecen disponibles para las plantas emergentes y de otros tipos.

Las bacterias anaerobias identificadas se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: bacilos gramnegativos (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*), cocos grampositivos (*Streptococcus*), bacilos grampositivos formadores de esporas (*Clostridium*) y no formadores de esporas (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*) (Alcalá *et al.*, 2004).

En este estudio es muy importante resaltar la presencia continua de *Clostridium*, por lo que se puede decir que es un habitante normal y fundamental del humedal, este género puede fijar el nitrógeno elemental, ya que utilizan los residuos orgánicos como fuente de energía, además que se ha reportado que *Clostridium* puede realizar la reducción del hierro férrico en el fango de tratamiento de aguas residuales (Olivares, J. 2004).

A las bacterias de *Clostridium* junto con otras de los géneros: *Bacteroides* y *Staphylococcus*, se les han considerado bacterias hidrolíticas, ya que rompen los enlaces complejos de las proteínas, celulosa, lignina o lípidos en monómeros o moléculas como aminoácidos, glucosa, ácidos grasos y glicerol.

Luego estos monómeros pasan al siguiente grupo de bacterias, en el cual también se incluyen a los clostridios y *Lactobacillus*, que son capaces de

convertir azúcares, aminoácidos y lípidos en ácidos orgánicos (propiónico, fórmico, láctico, butírico o succínico), alcoholes y cetonas (etanol, metanol, glicerol, acetona), acetato, CO₂ y H₂ (Branco, 1984).

Además de las anteriores se encuentran otras bacterias conocidas como simtróficas (de nutrición mutua), es decir, que solo se desarrollan como productoras de H₂ junto a otras bacterias consumidoras de esta molécula (Madigan *et al.*, 1999). *Propionibacterium*, por un lado se especializa en la oxidación de propionato y *Eubacterium*, oxida ácidos grasos que tienen de 4 a 8 átomos de carbono, y además convierten algunas sustancias como el propiónico, butírico y algunos alcoholes en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, el cual posteriormente se utiliza en la metanogénesis (Branco, 1984).

En cuanto a la metodología de ecología microbiana seguida, se puede decir que fue la más adecuada de acuerdo a las condiciones existentes para realizar este estudio, sin embargo, se debe tomar en cuenta que existen otras técnicas a nivel molecular que darían resultados mucho más certeros en cuanto al número total de microorganismos presentes. Sin embargo, para efectos de este proyecto, la principal limitación en la metodología fue la toma de las muestras ya que la utilización del barreno y pala no permitía la toma correcta de la muestra, para este procedimiento idealmente se deberían utilizar cilindros huecos, denominados “corers” (Andreu y Camacho, 2002).

Los corers se utilizan para obtener perfiles de sedimentos tanto para ensayos físicos, químicos o biológicos y la obtención de las muestras se puede realizar manualmente (presionando verticalmente el tubo en el lodo o el sedimento) o mediante algún procedimiento vibratorio o por gravedad (Andreu y Camacho, 2002).

El hecho de no contar con la instrumentación adecuada permitió que las muestras vinieran con agua del humedal, situación que podría provocar que un alto número de bacterias aerobias del agua logran adherirse a las partículas del suelo y restos en descomposición. Además, posterior a la toma de muestra, lo recomendable sería que el procesamiento se realizara de forma inmediata, en especial las que se utilizarían en las pruebas anaeróbicas ya que éstas son muy susceptibles al oxígeno.

Además se debe tomar en cuenta que los ensayos para la identificación presentan la limitación de que la caracterización está restringida a una base de datos, por lo que el sistema no tiene la capacidad de identificar otros microorganismos o excluir su presencia, pero gracias a estos sistemas se puede hacer una indagación general de la diversidad bacteriana.

En los resultados resumidos en el anexo 7, el porcentaje de identificación, especialmente para el API[®] 20 A presentó porcentajes muy bajos y en algunos casos hasta perfiles inaceptables ya que este sistema está diseñado para bacterias de importancia clínica y no para microorganismos ambientales. Sin embargo, los porcentajes de identificación obtenidos para el API[®] 20 E y NE, en su mayoría tenían un grado de confiabilidad del 99,9%.

En cuanto a la identificación, que se realizó con el sistema API[®], tanto el 20 E, 20 NE y 20 A, se siguieron todas las precauciones de la utilización y los reactivos complementarios, pero no así las condiciones de incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas ya que si se seguía esta instrucción las altas temperaturas producirían que las bacterias crecieran lentamente, por lo que se procedió a realizarla bajo las condiciones ambientales que el laboratorio de Microbiología básica y de Anaerobios de la Universidad Costa Rica presentaba, y la lectura a las 48 horas, para que las bacterias pudieran degradar completamente los sustratos que se encontraban en los microtúbulos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- ✓ Los humedales naturales dulceacuícolas son uno de los ecosistemas más productivos de la tierra, por su función vinculada a la aportación de agua y a la productividad primaria de la que dependen las especies silvestres.
- ✓ Los sedimentos en los humedales funcionan como una fuente o como un sumidero, de muchos de los nutrientes esenciales involucrados en el proceso de la eutrofización. En estos, el intercambio de los nutrientes en la interfase de los sedimentos y el agua depende de las características químicas, tanto, del agua como del sedimento.
- ✓ Las transformaciones llevadas a cabo por las bacterias del sedimento puede ser, en algunas ocasiones, la principal fuente de nueva materia orgánica en la columna de agua. Esa producción de materia orgánica está representada por una reutilización de energía almacenada, a través de procesos heterotróficos y quimosintóticos.
- ✓ Los recuentos bacterianos realizados variaban a través del tiempo, pero el desconocimiento de factores, al menos de, temperatura y pH, no permiten correlacionar estas variaciones en los distintos sitios.
- ✓ Los recuentos en el primer muestreo, tanto para bacterias aerobias como anaerobias fueron los más altos.
- ✓ Las condiciones lluviosas presentadas en el segundo y tercer muestreo afectaron el pH, composición de la atmósfera, temperatura y la cantidad de nutrientes disponibles.

- ✓ Los muestreos 2 y 3 mantuvieron el mismo comportamiento, o sea, una mayor cantidad de UFC/g de bacterias anaerobias.

- ✓ El valor elevado de los recuentos anaerobios en el segundo y tercer muestreo, se deben a la difusión del oxígeno extremadamente lenta provocada por las condiciones de anegación.

- ✓ Se obtuvo información valiosa de un lugar del cual no se había realizado un estudio de la flora bacteriana, como es la identificación de 54 especies bacterianas que correspondían a 36 géneros diferentes, de los cuales 14 eran bacilos gram negativos aeróbicos, 12 aerobios facultativos y 10 anaerobios. Además del aislamiento de 17 bacilos positivos aerobios.

- ✓ Los medios de cultivo utilizados (Agar sangre, MacConkey y Cetrimida, permitían el crecimiento de una gran cantidad de especies bacterianas, sin embargo, estudios tradicionales como éste, permite que las técnicas de cultivo recuperen únicamente entre el 1% de las bacterias.

- ✓ La mayoría de las bacterias aerobias identificadas están asociadas al hábitat del suelo y agua, no ocurriendo así con las anaerobias que se encuentran en seres humanos y animales principales. Y aunque algunas bacterias ambientales o pertenecientes a la flora normal identificadas pueden causar enfermedad en ciertas ocasiones (generalmente en pacientes inmunosuprimidos) muchas especies juegan un papel beneficioso para el hombre.

Recomendaciones

- Se recomienda la continuación de este tipo de proyectos, donde se destaca el trabajo interinstitucional, que aporta información no conocida y que indica las necesidades futuras en equipo y reactivos necesarias para continuar este tipo de estudio.
- Las condiciones de pH y temperatura del sedimento deberían ser monitoreadas para recrear estas condiciones en el laboratorio y favorecer el crecimiento de las comunidades microbianas.
- Es muy importante la continuación de este tipo de estudio con el fin de que los humedales abundantes en la zona del Caribe se conviertan en una tecnología viable para la depuración de las aguas residuales.
- Aunque el sistema API[®] proporciona información valiosa de géneros y especies a nivel clínico, se recomienda el uso de otras tecnologías como Biolog EcoPlate creado específicamente para el análisis de la comunidad y los estudios ecológicos microbianos del sedimento, pudiéndose mezclar con la utilización de técnicas moleculares para mayor rapidez (PCR)
- Para la obtención de muestras sería recomendable la utilización de corers para tomar solamente el sedimento del sitio y evitar el traspaso de las bacterias de la columna del agua al sedimento.
- Ampliar el número de muestras dentro de un mismo sitio de muestreo, para tener una mejor representación de lo que sucede en el humedal.

8. LITERATURA CITADA

- Adrián, M. 2005. Características físicas del suelo: Un sistema heterogéneo y disperso. Disponible en: <http://www.educarargentina.com>. Consultado: 13 de diciembre, 2005.
- Aguado J.M. y Lumbreras, C. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*: 7(78): 3622-3628
- Alcalá, L; Betriu, C; García, E; Reig, M. 2004. Bacterias Anaerobias. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap16.htm>. Consultado: 8 de diciembre, 2005.
- Álvarez S. 2005. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Revista Ecosistemas*. 2005/2. Disponible en: http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=118&Id_Categoria=2&tipo=portada. Consultado el: 17 de junio, 2005.
- Álvarez, M. 1999. Información general acerca de los humedales que se encuentran en Costa Rica. Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC).
- Andreu, E y Camacho, A. 2002. Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, Spain. 226 pp.
- Arias. A; De La Fuente, L; Bajsa, N; Quagliotto, L; Fabiano, E; Battistoni, F; Platero, R; Bagnasco, P. 2001. Una alternativa al uso de pesticidas químicos: Bacterias del suelo. Disponible en: <http://iibce.edu.uy/2001-07>. Consultado el: 8 diciembre, 2005.
- Armstrong, W. 1978. Root Aeration in the Wetland Environment. *C Ann Arbor Science*. Estados Unidos. 567 pp.
- Atlas, R. 1988. *Microbiology: Fundamentals and Applications*. 2ªed. Macmillan. New York, London. 807 p.

- Atlas, R. y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Traducido por: Guerrero, R. 4ª edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 696 pp.
- Baker, L. 1992. Introduction to nonpoint source pollution in the United States and prospects for wetland use. *Ecological Engineering* 1: 1-26.
- Bakken, L. R. 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil,. *In* J. D. van Elsas, J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, N.Y. p. 47-61.
- Barbier E; Constanza R; Twilley R. 1991. Lineamientos para la evaluación de humedales tropicales. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Proyecto Conservación para el Desarrollo Sostenible en América Central. 63 pp.- Informe Técnico.
- Berlutti, F; Passariello, C; Selan, T; Thaller, M. y Rassolini, G. 2001. The *Chryseobacterium mingosepticum* PafA enzyme: prototype of a new enzyme of procariotyc phosphate-repressible alkaline phosphatases? *Microbiology*. 147(pt10): 2831-2839.
- Branco, S.M. 1984. Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales. Monografía científica N° 28, serie Biología, OEA. 119 Págs. <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biodegrada.htm>. consultado el: 6 de diciembre, 2005.
- Buol, S; Hole F; McCracken, R. 1980. *Soil Genesis and Clasification*. Segunda edición. Universidad del Estado de Iowa.
- Campbell, C. y Ogden M. 1999. *Constructed Wetlands in the Sustainable Landscape*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, Estados Unidos. 270 pp.
- Carrillo, L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Capítulo 3: Actividad microbiana. Universidad Nacional de Salta Disponible en: (<http://www.unsa.edu.ar/matbib>). Consultado: 12 de setiembre, 2005.
- Castellanos, D. 2001. Identificación de microorganismos aislados a partir de un caldo microbiano de rizosfera de plantas sanas de papa (*Solanum*

- tuberosum* L) provenientes de un cultivo bajo tratamiento orgánico. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. 188 p.
- Cauich, P; Alatríste, F; García, E. 2001. Identification of Anaerobic Nonsporeforming Gram-Positive. Revista Latinoamericana de Microbiología (2001) 43:27-35
- Chamy, R. 2003. Capítulo 1: Avances en biotecnología ambiental: Tratamiento de Residuos Líquidos y Sólidos. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Archivos de ingeniería bioquímica
- Chocair, J. 1982. Actividad heterotrófica de microorganismos de sedimento y agua en isla Iona, Columbia Británica, Canadá. Simon Fraser University, Department of Biological Sciences, Burnaby, B. C., Canada.
- Collins C, Lyne P. 1999. Métodos Microbiológicos Acribia. Zaragoza. 196 pp. com.ar/JUN2005/educ68.htm. Consultado el: 6 de diciembre, 2005.
- Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo (CCAD). 1999. Programa Ambiental Regional para Centroamérica/Costas PROARCA/Costas. Unión Mundial para la Naturaleza UICN. Memorias del Taller Conservación y Manejo de Humedales y Zonas Costeras en América Central: Metodologías y Prioridades. CCAD/PROARCA/Costas/UICN. Guatemala. 216 pp
- Convención sobre los humedales de Ramsar. 2000. Notas informativas sobre los valores y las funciones de los humedales: Depuración de las aguas. Disponible en: http://www.ramsar.org/info/values_waterpurification_s.htm. Consultado: 9 de noviembre, 2005.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Traducido por: Martín Rasskin. Editorial Paraninfo. España. 416 pp.
- Decreto N° 31176-MINAE. Reglamento de creación de Canon ambiental por vertidos. 22/04/2003.

- Decreto N° 31545-S-MINAE. Reglamento de aprobación y operación de sistemas de tratamiento de aguas residuales. 09/04/2003
- Dirección General de la Red de Espacios Naturales Protegidos y Servicios Ambientales. 2002. Plan Andaluz de Humedales, España.
- Dreyfus, G. 1996. Fondo de cultura económica. Disponible en: http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/html/sec_6.html. Consultado: 9 de noviembre, 2005.
- Dugan, P.J. 1992, Conservación de humedales. Un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias. UICN, Gland, Suiza. 100 pp.
- Ecological Society of America. 2003. Tópicos en ecología. Ecosistemas de agua dulce sustentables. Número 10. Volumen 2.
- Escalante, A; Gosset, G; Martínez, A. y Zapata, F. 2001. Diversidad bacteriana del suelo y el agua: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. UNAM.10 pp.
- Ettema, C.H. y Wardle, D.A. 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17: 177-183.
- Faulkner, S; y Richardson, 1989. Physical and Chemical Characterist of Freshwater Wetlan Soils. Capítulo 4.pp-41-72 en Hammer, D. 1989. Construsted Wetlands for Wastewater Treatment: Municipal,Industrial and Agricultural. MI: Lewis PublishersChelsea.
- Fenchel T; King G.M; Blackburn T.H. 2000. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling. 2°ed. Academic Press, San Diego; 457 pp.
- Fontúrbel, F e Ibáñez, C. 2004. Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. Disponible en: <http://www.biologia.org/?pid=5000&id=85&page=0>. Consultado: 10 de diciembre, 2005.

- García, J; Ruiz, A; Junqueras, X. 1997. Depuración de aguas residuales urbanas mediante humedales construidos. *Tecnología del agua* (165). Pp 58-65
- Gómez, R. 1995. Función de los humedales en la dinámica de nutrientes (NyP) de una cuenca de características áridas: experiencias en el sureste ibérico. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Gómez, R; Moreno, J; Pérez B; Vidal, M; Suárez, M. 1997. Valores naturales y potencialidades de uso de los humedales asociados a ramblas del sureste ibérico. Departamento de Ecología e Hidrología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.
- Grant, W. y Long P. 1989. *Microbiología ambiental*. Traducido por: Gómez, M. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 222 pp.
- Hammer, D. 1992. Designing constructed wetlands systems to treat agricultural nonpoint source pollution. *Water Science Technology*. 29(4):15-27.
- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J; Williams, S. 1994. *Bergeys Manual of determinative bacteriology*. William & Wilkins Editor. 9th edition. 787 pp.
- Johnston, C.A., 1991. Sediment and Nutrient Retention by Freshwater wetlands: Effects on Surface Water Quality. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21 (5, 6): 491- 565.
- Joseph, S; Hugenholtz, P; Sangwan, P; Osborne, C; Janssen P. 2002. *Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria*. Universidad de California Berkeley.
- Kadlec, R; Knight, R. 1995. *Treatment wetlands*. University of Michigan and Wetland Management Services. 893 pp.
- Kathiresan, K. 2003. Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Rev. Biol. Trop.* 51(3): 629-634.
- Kozdroj, J. 1996. Competition between different mutants of *Pseudomonas fluorescens* introduced into soil. In: *Journal of Environmental Science*

- and Health. Part A, Environmental Science and Engineering and Toxic and Hazardous Substance Control. 31: 5, 1111-1125.
- Lara, J. 2000. Depuración de aguas municipales con humedales artificiales. Tesis para optar el grado de Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental. Instituto Catalán de Tecnología-Universidad Politécnica de Cataluña España.
- Lenntech, 2005. FAQ de la microbiología del agua. Disponible en: <http://www.lenntech.com/espanol/FAQ-microbiologiadel-agua.htm>. Consultado: 8 de diciembre, 2005.
- Lettinga G.1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems Antonie van Leeuwenhoek, 67: 3-28.
- Madigan, M; Martinko J; Parker, J. 1999. Brock: Biología de los Microorganismos. Traducido por: Gacto, M. *et al.* 8ª edición. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 1064 pp.
- Maier, R; Pepper, I; Gerba, C. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. Canada. 585 pp.
- Martin, A.1994. Microbiología del suelo. AGT Editores. Mexico. 473 pp.
- Martínez, M. 1989. Depuración de aguas con plantas emergentes, en Hojas Divulgadoras. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Mayea, S., Novo, R. y Valiño, A., 1991. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial. Pueblo y educación. Ciudad de la Habana. Pág.123-129
- Mitsch, W.J. 1992. Landscape design and the role of created, restored and natural riparian wetlands in controlling nonpoint source pollution. Ecological Engineering, 1:27-47.
- Mitsch, W.J. y J.G. Gosselink. 1993. Wetlands. Van Nostrand Reinhold. 539 pp. New York.
- Molina, L.; Ramos, C; Duque, E; Roncchel, M; García, J.M; Wyke, L y Ramos, J.L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and

in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 32.

Mora, J. 2004. La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Disponible en:

http://www.ucaldas.edu.co/lunaazul/numero_05_06/articulo_070.asp.

Consultado: 14 de diciembre, 2005.

Nogales, B. 2003. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Disponible en: http://www.revistaecosistemas.net/index_frame.asp?pagina=http%3A/www.revistaecosistemas.net/articulo.asp%3FId%3D116%26Id_Categoria%3D1%26tipo%3Dportada. Consultado: 10 de diciembre, 2005.

Olivares, J. 2004. Fijación biológica de Nitrógeno. Disponible en:

<http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>. Consultado: 6 de diciembre, 2005.

Pelczar, M, Chan, E. y Krieg, N. 1993. *Microbiology: Concepts and Application*. McGraw-Hill College Div. New York. 368 pp.

Pérez, M; Sánchez, S; Rojo, C. 2000. Función depuradora de los humedales II: Una revisión bibliográfica sobre el papel del sedimento. SEHUMED. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia. España. pp. 123-130

Pisabarro, A. 2005. Curso de Microbiología clínica: Crecimiento y muerte de microorganismos. En línea. Universidad Pública de Navarra.

Polonskaya, D.E. y Sadovskaya, G.M. 1997. Influence of rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas* on the growth of wheat seedlings under conditions of complete mineral suly and nitrogen deficiency. *Microbiology New York*. 66: 4, 461-465.

Prescott., L.M., J. P. Harley and D.A. Klein. 1999. *Microbiología*. 4^a ed. McGraw-Hill- Interamericana España. Madrid. 1168 pp.

Ramsar, Convención de 1971. Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional Especialmente como Hábitat de Aves

- Acuáticas. Ramsar, 2.2.1971. Modificada según el protocolo de París, 3.12.1982. 4 p.
- Reddy, K; D'Angelo E. 1994. Soil Processes Regulating Water Quality in Wetlands.pp 309-324. en Mitsch. W. 1994. Global Wetlands: One World and New. Elsevier, Amsterdam.
- Reed, S. 1990. Natural System for Wastewater Treatment, Manual of Practice FD-16. Water Pollution Control Federation (WEF), Alexandria, V.A.
- Rheinheimer, G. 1987. Microbiología de las aguas. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 298 pp
- Rittmann, B. y McCarty, P. 2001. Biotecnología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones. Traducido por: Fernando Garralda. McGraw-Hill, Inc. Madrid, España. 745 pp.
- Rodríguez, E; Gamboa M; Hernández F y García J. 2005. Bacteriología General Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. 263 pp.
- Rodríguez, R. 1995. Humedal: Sistema de tratamiento natural de Aguas Residuales. Informe de proyecto de graduación para obtener el grado de licenciado en Ingeniería Civil. Universidad de Costa Rica. 86 pp..
- Roper, M. 2004. The isolation and characterisation of bacteria with the potential to degrade waxes that cause water repellency in sandy soils. Australian Journal of Soil Research 42(4) 427 – 434
- Rosboth, D. 2001. *Burkholderia cepacia* en el medio ambiente. Disponible en: http://www.cfww.org/pub/edition_2/Spanish/And_
- Ryals, J.A, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y and Hunt MD(1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell 8: 1809–1819
- Sánchez, E; Hernández, F; Solórzano, A; Cartagena y Iwasawa H. 2004. *Pantoea agglomerans* y *Sphingomonas paucimobilis* en la bacteriosis del palmito de pejíbaye (*Bactris gasipaes* K.): un estudio ultraestructural. Rev. Biología Tropical - 2004

- Smith, R; Smith, T. 2001. Ecología. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 642 pp.
- Stockwell, V.O. 2002. Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology*. 92(11):1202-1209.
- The_Question_Is_Spanish.asp. Consultado: 8 de diciembre, 2005.
- Unión Mundial para la Naturaleza. 2002. Convenios Internacionales Relacionados con los Humedales. Publicado por: Unión Mundial para la Naturaleza, Oficina Regional para Mesoamérica. San José, Costa Rica. 98 pp.
- Vullo, D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. Vol. 2, número 3. Disponible en: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar. Consultado: 6 de diciembre, 2005.
- Wieland, G., Neumann, R. y Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5849-5854.
- Wikipedia, la enciclopedia libre. 2005. Bentos. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bentos>. Consultado: 30 de noviembre, 2005.
- Zumft, W, 2002. Distribution of Denitrifying Ability http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/023/02_00.htm. Consultado: 2 de diciembre, 2005.
- Van der Valk. A. 1992. Recommendations for research to develop guidelines for the use of wetlands to control rural nonpoint source pollution. *Ecological Engineering*. 1:115-134.
- Varman, A y Evans M. 2000. *Environmental Microbiology*. Manson Publishing Ltd. London. 289 pp.

Viñals, M. 2004. Los valores y funciones de los humedales. V Congreso Internacional de Medio Ambiente de Andorra, Universidad Politécnica de Valencia. España.

Anexo 1. Clasificación de los humedales modificada por Scoth (1989)

1. De agua salada	
1.1 Marinos	1. Submareales
	<ul style="list-style-type: none"> a) Aguas someras, permanentemente desprovistas de vegetación, con menos de 6 m de profundidad, en marea baja. Incluye bahías y estrechos marinos. b) Vegetación acuática submarina, incluyendo bancos de algas, pastos marinos y pradera marinas tropicales. c) Arrecifes de coral.
	2. Intermareales
	<ul style="list-style-type: none"> a) Costas marinas rocosas, incluyendo acantilados y playas rocosas. b) Playas con piedras y cantos rodados. c) Planicies intermareales, sin vegetación, dunas de arenas, barro o salitre. Salinas albinas o salitrales. d) Sedimentos intermareales, cubiertos por vegetación, incluyendo marismas y manglares en costas protegidas.
1.2 Estuarinos	1. Submareales
	a) Aguas estuarinas, aguas de estuario permanentes y sistemas de deltas estuarinos.
	2. Intermareales
	<ul style="list-style-type: none"> a) Planicies intermareales, salinas de barro y de arena, con escasa cobertura vegetal. b) Pantanos Intermareales, incluyendo marismas, praderas salinas, pantanos elevados de agua salada, pantanos salobres y de agua dulce influenciada por los mares. c) Humedales boscosos de entre mareas, incluyendo manglares, pantanos de nipa, bosques inundados por agua dulce influenciados por las mareas.
1.3 Lagunar	a) Lagunas salobres o salinas con conexiones estrechas al mar.
1.4 Lago salada	a) Lagos, planicies o pantanos, permanentes o temporales, salobres, salinos o alcalinos. Lagunas saladas alto-andinas.

2. De agua dulce	
2.1 Ribereños	1. Permanentes
	1. Ríos y arroyos permanentes, incluyendo cascadas. 2. Deltas interiores.
	2. Temporales
	a) Ríos y arroyos estacionales o irregulares. b) Llanuras ribereñas de inundación, incluyendo planicies de ríos, cuencas hidrográficas inundadas, praderas de inundación estacional.
2.2 Lacustres	1. Permanentes
	a) Lagos de agua dulce permanentes, incluyendo las orillas sujetas a inundaciones estacionales o irregulares. b) Estanques de agua dulce permanentes.
	2. Estacionales
	a) Lagos de agua dulce estacionales , incluyendo lagos de llanuras de inundación.
2.3 Palustres	1. Emergentes
	a) Pantanos y ciénagas de agua dulce permanentes sobre suelos inorgánicos, con vegetación emergente cuyas bases se encuentran por debajo del manto freático durante la mayor parte de su estación de crecimiento. b) Pantanos de agua dulce que generan turba, incluyendo valles pantanosos tropicales de tierra adentro, dominados por <i>Papyrus</i> , <i>Typha</i> o <i>Scyrpus</i> . c) Pantanos de agua dulce estacionales sobre suelos inorgánicos, incluyendo lodazales, hoyas, bañados, praderas de inundación estacional y juncales. d) Turberas, incluyendo suelos acidófilos, ombrogénicos o soleisoles cubiertos por musgo, hierbas o vegetación arbustiva enana y turberas de todo tipo. e) Humedales alpinos, andinos y polares, incluyendo praderas de inundación estacional, alimentadas por aguas temporales provenientes del deshielo. f) Manantiales de agua dulce y oasis con vegetación circundante. g) Fumarolas volcánicas continuamente humedecidas por vapor vapor de agua emergente o condensado.

	2. Boscosos
	<ul style="list-style-type: none"> a) Pantanos de arbustos, incluyendo pantanos de agua dulce dominados por arbustos y malezas sobre suelos inorgánicos. b) Bosques pantanosos de agua dulce, incluyendo bosques de inundación estacional y pantanos con bosques maderables sobre suelos inorgánicos. c) Turberas boscosas incluyendo bosques con pantanos de turba.
3. Humedales artificiales	
Agricultura/ Maricultura	Estanques para acuicultura, incluyendo estanques para peces y camarones.
Agricultura/ Ganadería	<ul style="list-style-type: none"> a) Estanques, incluyendo estanques de fincas y estanques para el ganado. b) Tierras irrigadas y canales de drenaje y escurrimiento, incluyendo arrozales, canales y acequias. c) Tierras arables estacionalmente inundadas.
Explotación de sal	a) Salinas, salineras o salitrales.
Urbanos- Industriales	<ul style="list-style-type: none"> a) Excavaciones, incluyendo canteras, zanjas y pozos de minería. b) Áreas de tratamiento de aguas servidas, incluyendo depósitos de aguas negras, estanques de sedimentación y estanques de oxidación.
Áreas de almacenamiento de aguas	<ul style="list-style-type: none"> a) Reservorios de agua para irrigación o consumo humanos, con un patrón de vaciado gradual y estacional. b) Represas hídricas con fluctuaciones regulares, semanales o mensuales, del nivel del agua.

Anexo 2. Fotografías de los sitios de muestreo del humedal natural

Entrada del Humedal Natural



Parte media del Humedal Natural



Salida del Humedal Natural



Anexo 3. Tabla de lectura API® 20 E

Tests	Componentes activos	Negativo	Positivo
ONPG	2-nitro-fenil-D galactopiranosida	Incoloro	Amarillo (1)
ADH	L-arginina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
CIT	Citrato trisódico	Verde pálido/ amarillo	Azul-verde/azul (3)
HS	Tiosulfato sódico	Incoloro/grisáceo	Depósito negro
URE	Urea	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	Amarillo	Marrón/rojizo
IND	L-triptófano	Incoloro, verde pálido/ amarillo	Rosa
VP	Piruvato sódico	Incoloro	Rosa/rojo (5)
GEL	Gelatina (origen bovino)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	Azul/azul verdoso	Amarillo/amarillo grisáceo (4)
MAN	D-manitol	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
INO	Inositol	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
SOR	D-sorbitol	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
RHA	L-ramnosa	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
SAC	D-sacarosa	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
MEL	D-melibiosa	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
AMY	Amigdalina	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
ARA	L-arabinosa	Azul/azul verdoso	Amarillo (4)
OX	Se realiza previamente		

(1) Un color amarillo también implica resultado positivo

(2) La aparición de color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa.

(3) Lectura de la cúpula (zona aerobia).

(4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.

(5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.

Anexo 4. Ensayos complementarios

Tests	Componentes	Reacciones/Enzimas	Negativo	Positivo
Reducción de nitratos tubo GLU	Nitrato potásico	Producción de NO ₂	Amarillo	Rojo
		Reducción al estado N ₂	Naranja-rojo	Amarillo
MOB	API [®] M Médium o microscopio	Movilidad	Inmóvil	Móvil
McC	Medio de MacConkey	Cultivo	Ausencia	Presencia
OF-F	Glucosa (API [®] OF Médium)	Fermentación: bajo aceite	Verde	Amarillo
OF-O		Oxidación al aire	Verde	Amarillo

Anexo 5. Tabla de identificación API[®] 20 NE

Tests	Componentes activos	Negativo	Positivo
NO ₃	Nitrato potásico	NIT 1+NIT 2/5min	
		Incoloro	Rosa-rojo
		Zn/5min	
		Rosa	Incoloro
TRP	L-triptófano	JAMES/inmediato	
		Incoloro, verde pálido/amarillo	Rosa
GLU	D-glucosa	Azul a verde	Amarillo
ADH	L-arginina	Amarillo	Naranja/rosa/rojo
URE	Urea	Amarillo	Naranja/rosa/rojo
ESC	Esculina citrato férrico	Amarillo	Gris/marrón/negro
GEL	Gelatina	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	Incoloro	Amarillo
GLU	D-glucosa	Transparencia	Turbio
ARA	L-arabinosa	Transparencia	Turbio
MNE	D-manosa	Transparencia	Turbio
MAN	D-manitol	Transparencia	Turbio
NAG	N-acetil-glucosamina	Transparencia	Turbio
MAL	D-maltosa	Transparencia	Turbio
GNT	Gluconato potásico	Transparencia	Turbio

CAP	Ácido cáprico	Transparencia	Turbio
ADI	Ácido atípico	Transparencia	Turbio
MLT	Ácido málico	Transparencia	Turbio
CIT	Citrato trisódico	Transparencia	Turbio
PAC	Ácido fenilacético	Transparencia	Turbio
OX	Se realiza previamente		

Anexo 6. Tabla de identificación API® 20 A

Test	Componentes activos	Negativo	Positivo
IND	L-triptófano	XYL-mezclar/2-3min + EHR/5min	
		Amarillo	Rojo
URE	Urea	Amarillo	Rojo
GLU	D-glucosa	Púrpura	Amarillo/verde-amarillento
MAN	D-manitol		
LAC	D-lactosa		
SAC	D-sacarosa		
MAL	D-maltosa		
SAL	Salicina		
XIL	D-xilosa		
ARA	L-arabinosa		
GEL	Gelatina	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
ESC	Esculina	Amarillo	Marrón-negro
		Bajo rayos UV	
		Fluorescencia	Sin fluorescencia
GLY	Glicerol	Púrpura	Amarillo/verdeamarillento
CEL	D-celobiosa		
MNE	D-manosa		
MLZ	D-melecitosa		
RAF	D-rafinosa		
SOR	D-sorbitol		
RHA	L-rhamosa		
TRE	D-trehalosa		
CAT		Después de 30 min al aire libre H2O2 en un tubo positivo	
		Ausencia de burbujas	Presencia de burbujas
SPOR	Esporas	Ausencia	Presencia
GRAM	Coloración gram	Rosa	Violeta
COCC	Morfología	Bacilo	Coccus

Anexo 7. Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias aerobias de los sedimentos del humedal natural

Especie	Tinción de Gram	Catalasa	Oxidasa	Movilidad	API®	% ID
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	-	20 E	66,4
<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	-	+	+		20 NE	99,3
<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	+	+		20 NE	99,9
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	+		20 NE	49,4
<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	-	+	+		20 NE	45,6
<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp</i>	-	+	-	-	20 E	64
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	+	+		20 NE	93,7
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	+		20 NE	99,1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	+	+		20 NE	99,9
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	+	+		20 NE	99,9
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	-	+	+		20 NE	99,1
<i>Chryseomonas luteola</i>	-	+	-	+	20 E	94,6
<i>Citrobacter farmeri</i>	-	-	+		20 NE	55,7
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	+		20 NE	99,8
<i>Comamonas testosteronii/Ps. alcaligenes</i>	-	+	+		20 NE	95,7
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	+	-	+	20 E	67,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	+	20 E	95
<i>Escherichia vulneris</i>	-	+	-	+	20 E	74,0

Especie	Tinción de Gram	Catalasa	Oxidasa	Movilidad	API®	% ID
<i>Ewingella americana</i>	-	+	-	-	20 E	98,9
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	-	+	-	-	20 E	92,0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	-	+	-	-	20 E	84,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	-	20 E	95,0
<i>Moellerella wisconsensis</i>	-	+	-	-	20 E	99,8
<i>Moraxella lacunata</i>	-	+	+		20 NE	86,0
<i>Moraxella spp</i>	-	+	+		20 NE	85,8
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	+	-	+	20 E	88,7
<i>Oligella ureolytica</i>	-	+	+		20 NE	89,2
<i>Pantoea spp</i>	-	+	-	+	20 E	99,0
<i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i>	-	+	-	-	20 E	99,9
<i>Providencia stuartii</i>	-	+	-	+	20 E	92,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	+	20 E	99,8
<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	-	+	+		20 NE	99,6
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	+		20 NE	52,6
<i>Serratia ficaria</i>	-	+	-	+	20 E	---
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+	-	+	20 E	93,7
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	+	20 E	99,9
<i>Serratia plymuthica</i>	-	+	-	-	20 E	95,7
<i>Shingomonas paucimobilis</i>	-	+	+		20 NE	99,6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	-	+	20 E	99,3

Anexo 8. Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias aerobias bacilos positivos de los sedimentos del humedal natural

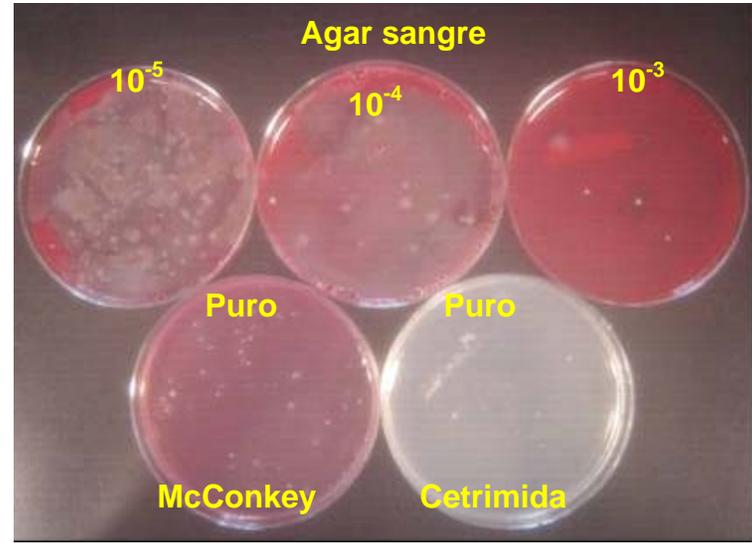
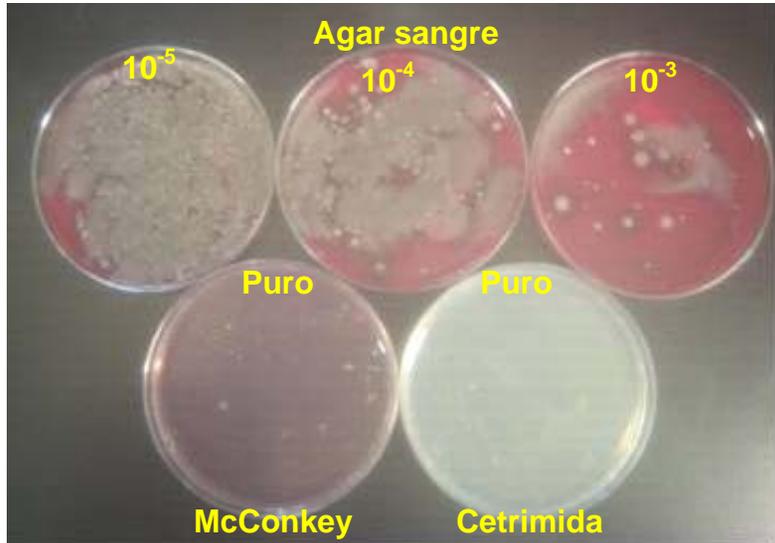
Número	Especie	Tinción de Gram	Catalasa	Oxidasa	Esporulación
1	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
2	<i>Bacillus spp</i>	+	+	-	+
3	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
4	<i>Bacillus spp</i>	+	-	+	+
5	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	+	-
6	<i>Bacillus no esporulado</i>	+	+	+	-
7	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	-	-
8	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	-	-
9	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
10	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
11	<i>Bacillus spp</i>	+	-	-	+
12	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
13	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	-	-
14	<i>Bacillus spp</i>	+	+	+	+
15	<i>Bacillus spp</i>	+	+	-	+
16	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	+	-
17	<i>Bacilo no esporulado</i>	+	+	-	+

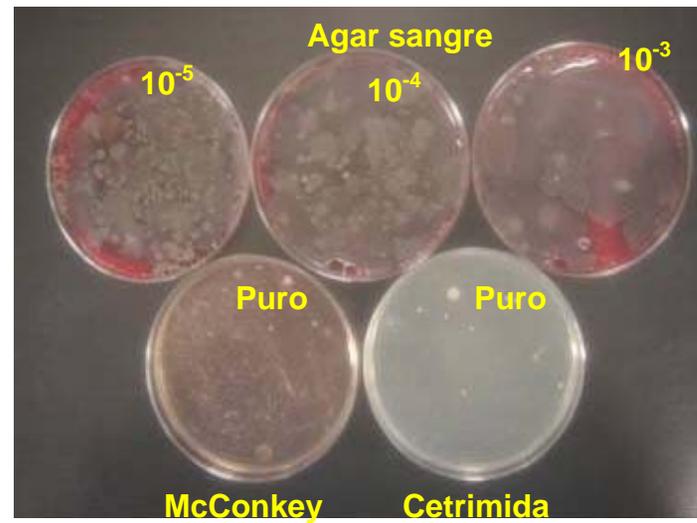
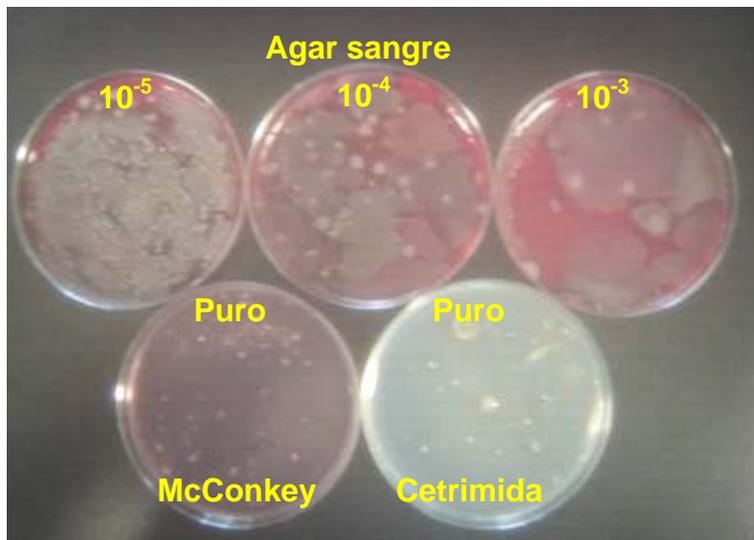
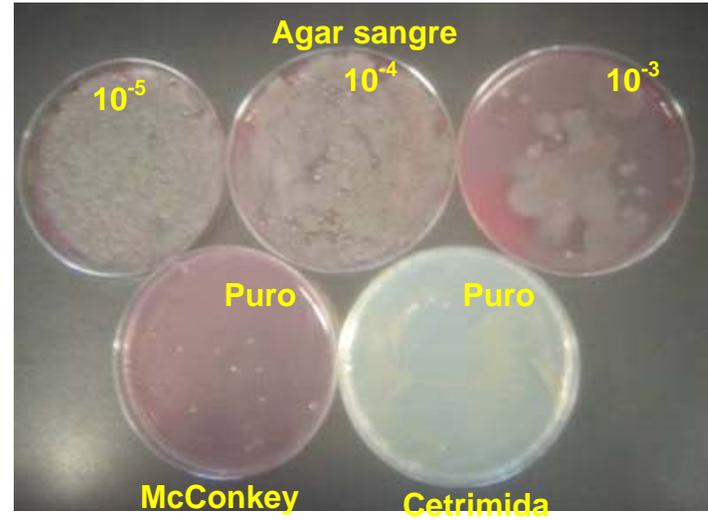
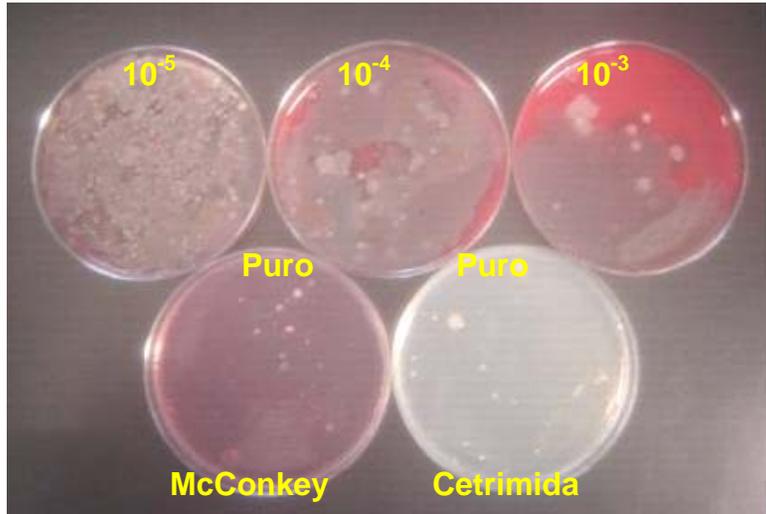
Anexo 9. Datos obtenidos de las pruebas realizadas a las bacterias anaerobias de los sedimentos del humedal

Especie	Tinción de Gram	Esporulación	Aerotolerancia	% ID
<i>Actinomyces israeli</i>	+	-	-	98,1
<i>Actinomyces meyeri/odontolyticus</i>	+	-	-	---
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	-	-	80,2
<i>Bacteroides ovatus/thetaiotaomicron</i>	-	-	-	---
<i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i>	-	-	-	---
<i>Clostridium bifermentans</i>	+	+	-	99,7
<i>Clostridium cadaveris</i>	+	+	-	79,7
<i>Clostridium histolyticum</i>	+	+	-	73,3
<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	-	99,9
<i>Clostridium septicum</i>	+	+	-	91,2
<i>Clostridium sporogenes</i>	+	+	-	96,5
<i>Clostridium spp</i>	+	+	-	90,5
<i>Eubacterium lentum</i>	+	-	-	94,2
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	+	-	-	89,1
<i>Eubacterium limosum</i>	+	-	-	80,7
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	-	-	-	94,1
<i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>	+	-	-	96,6
<i>Porphyromonas assacharolytica/ limosum</i>	-	-	-	37,3
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	-	-	-	98,8
<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	-	-	-	55,9
<i>Prevotella oris/buccae</i>	-	-	-	72,6
<i>Propionibacterium granulosum</i>	+	-	+	53
<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>	+	-	-	97,4
<i>Streptococcus constellatus</i>	+	-	-	---

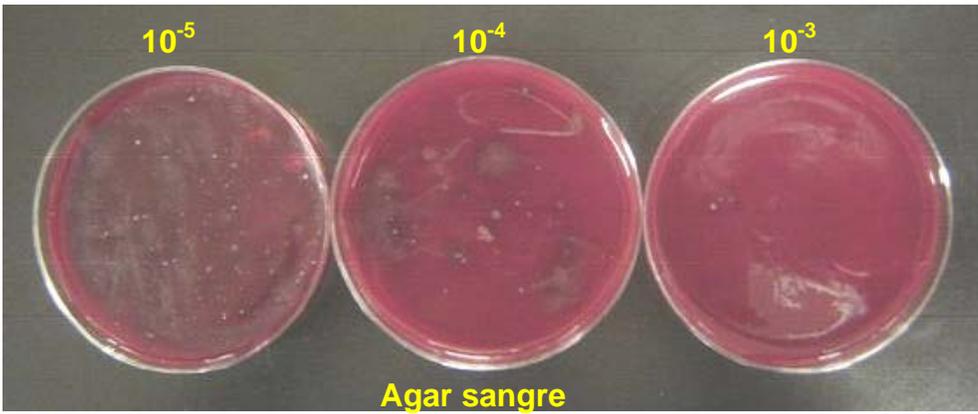
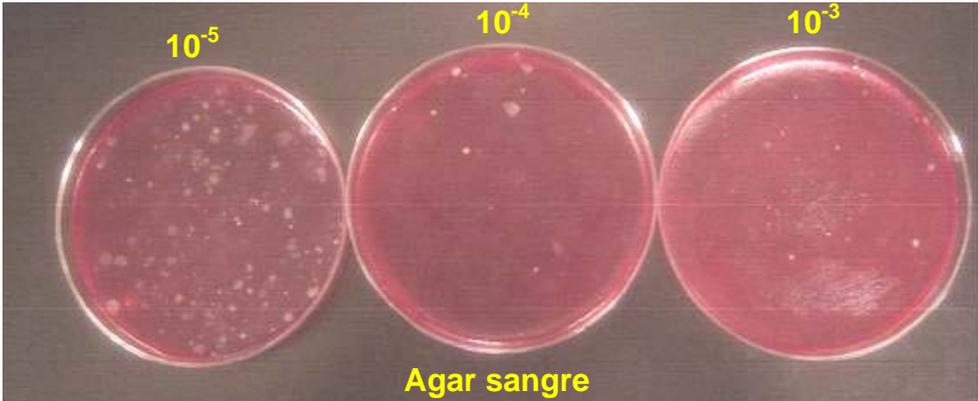
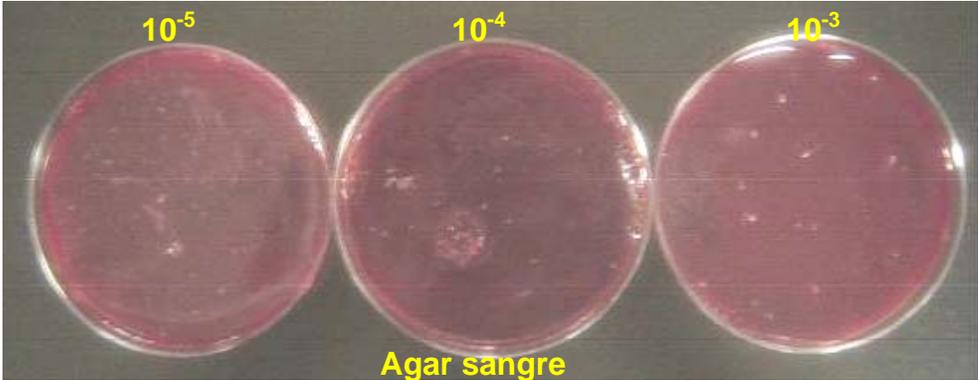
Nota: %ID: porcentaje de identificación, --- = Perfil inaceptable

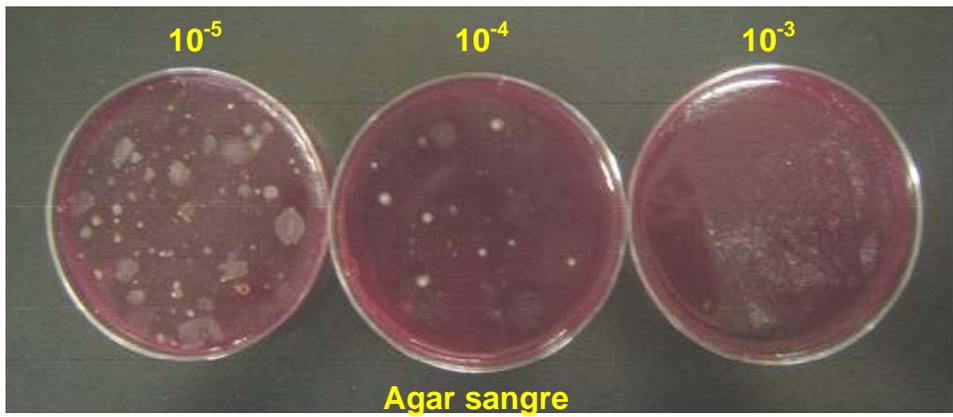
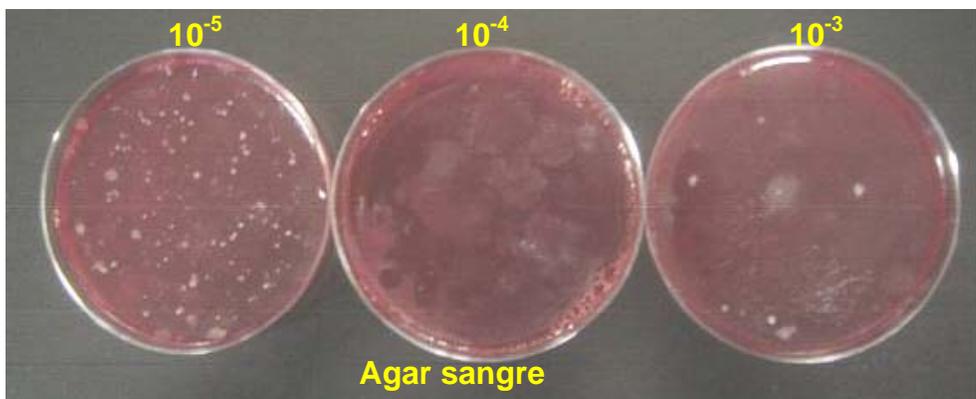
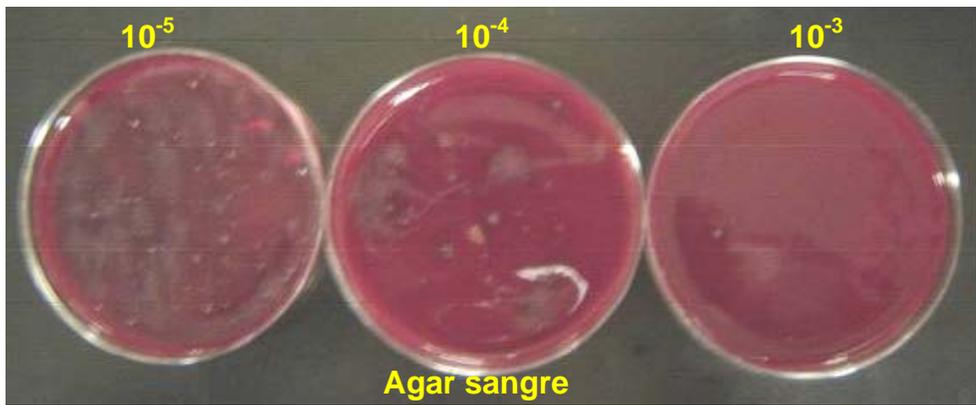
Anexo 10. Recuento bacteriano aerobio mesofílico del tercer muestreo



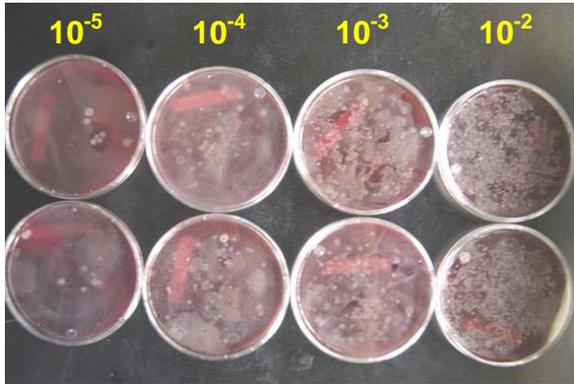


Anexo 11. Recuento bacteriano anaerobio mesofílico del tercer muestreo

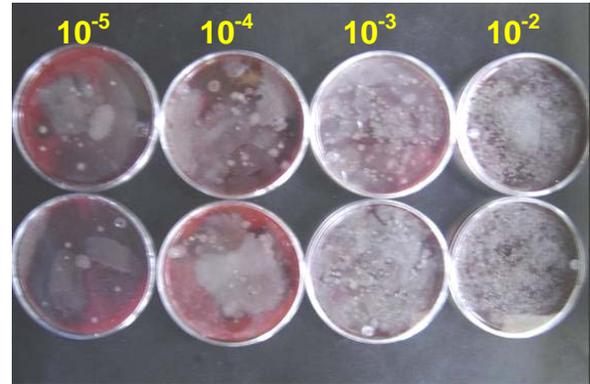




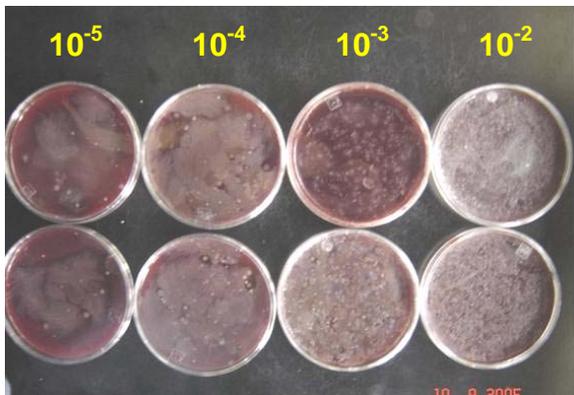
Anexo 12. Recuento bacteriano aerobio mesofílico por duplicado del tercer muestreo



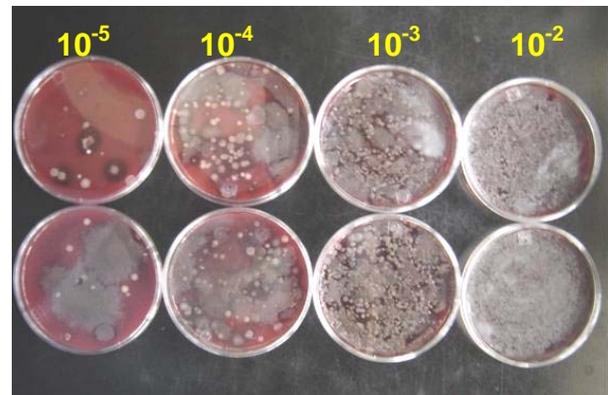
I CO₂ Profundidad



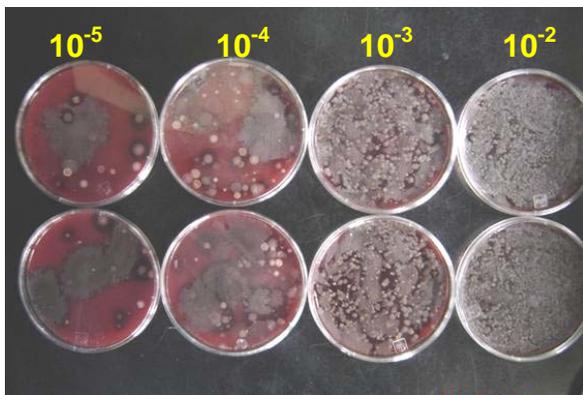
I CO₂ Superficie



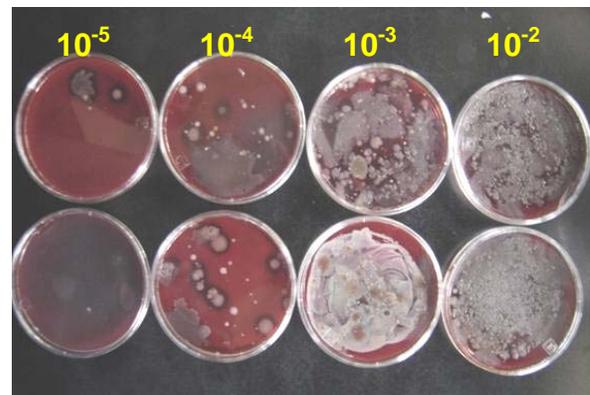
II CO₂ Profundidad



II CO₂ Superficie



III CO₂ Superficie

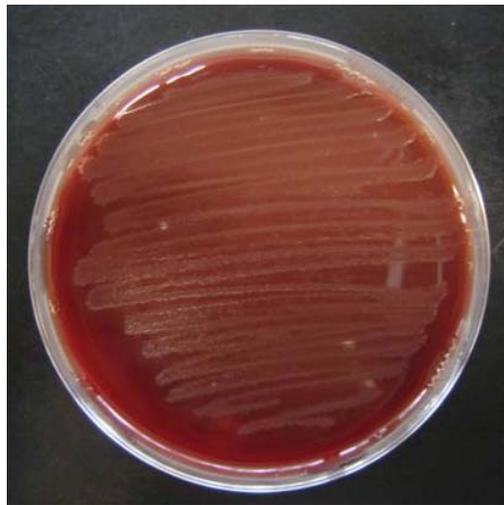


III CO₂ Profundidad

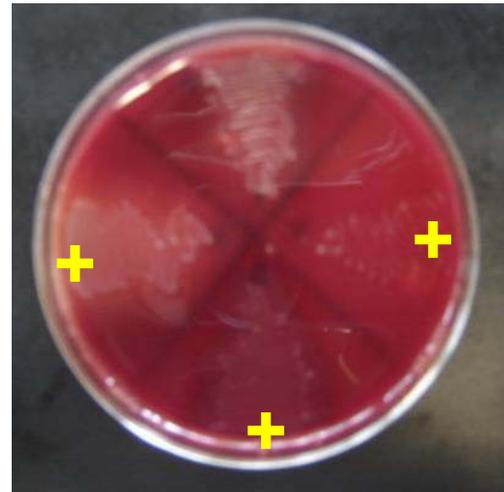
Anexo 13. Ejemplos de pruebas de Aerotolerancia



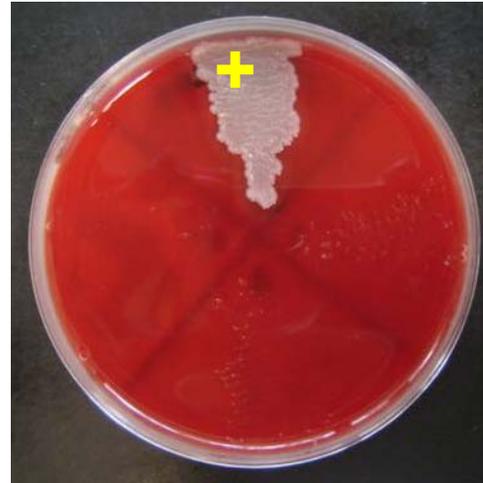
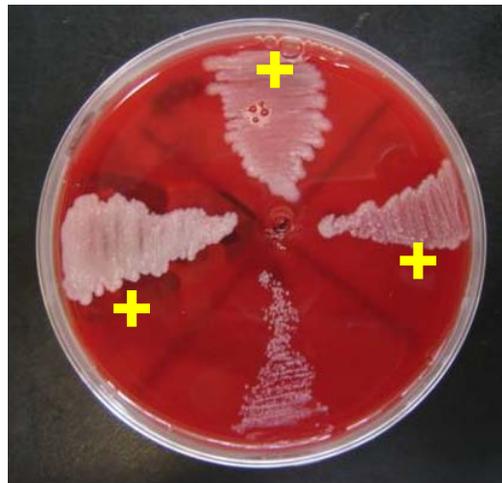
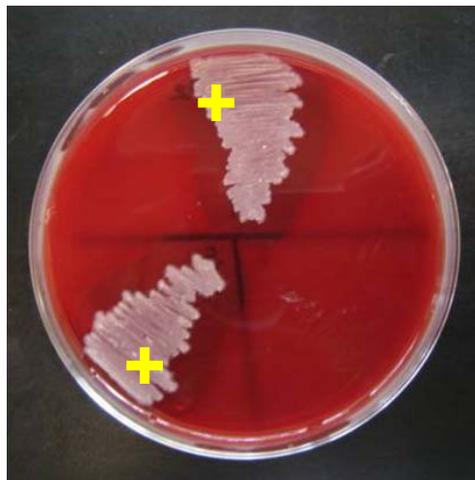
ANAEROBIOSIS



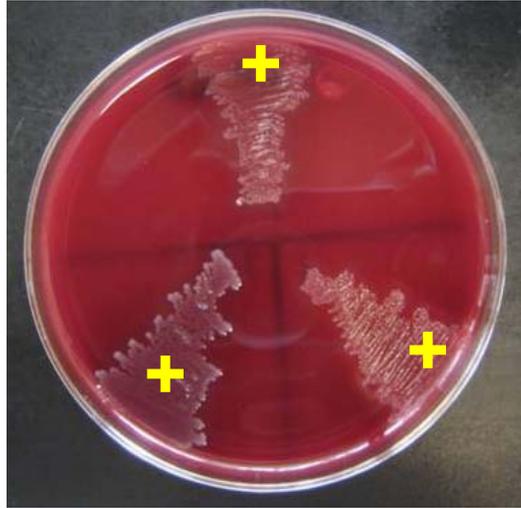
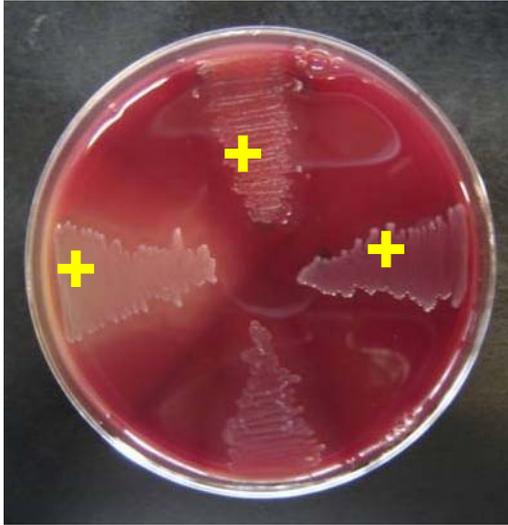
AEROBIOSIS



ANAEROBIOSIS



AEROBIOSIS



ANAEROBIOSIS



AEROBIOSIS

Anexo 14. Fotografías de las bacteras aerobias



Acinetobacter baumannii/calcoaceticus



Alcaligenes xiloxidans



Aeromonas hidrophilia/caviae



Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp



Aeromonas salmonicida



Brevundimonas vesicularis



Citrobacter farmeri



Com. testosteronii/Ps. Alcaligenes



Citrobacter freundii



Enterobacter cancerogenus



Chryseomonas luteola



Enterobacter cloacae



Escherichia vulneris



Klebsiella ornithinolytica



Ewigella americana



Klebsiella pneumoniae



Flavimonas oryzae



Moellerella wisconsinensis



Moraxella lacunata



Oligella ureolytica



Moraxella spp



Pantoea spp



Ochrobactrum anthropi



Past. pneumotropica/haemolytica



Providencia stuartii



Serratia ficaria



Pseudomonas aeruginosa



Serratia licuefaciens



Pseudomonas putida



Serratia marcescens



Serratia plymuthica



Stenotrophomonas maltophilia



Shingomonas paucimobilis

Anexo 15. Fotografías de bacterias bacilos positivos



Baccillus spp (1)



Baccillus spp (4)



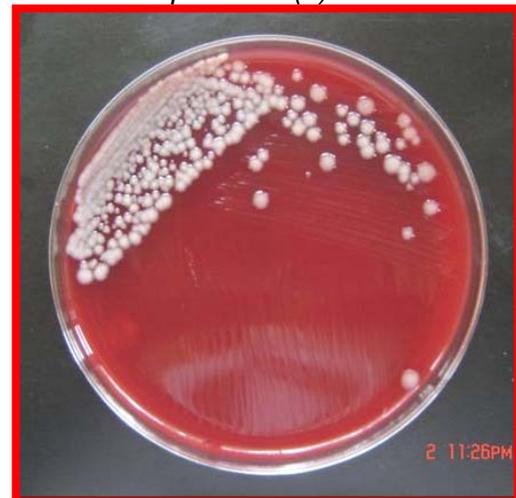
Baccillus spp (2)



Bacilo no esporulado (5)



Baccillus spp (3)



Bacilo no esporulado (6)



Bacilo no esporulado (7)



Baccillus spp (10)



Bacilo no esporulado (8)



Baccillus spp (11)



Baccillus spp (9)



Baccillus spp (12)



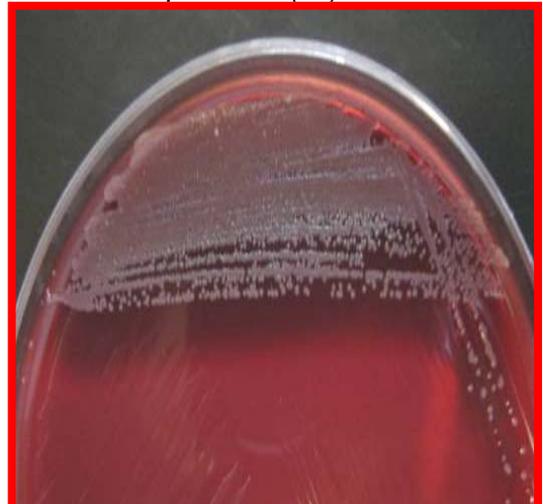
Bacilo no esporulado (13)



Bacilo no esporulado (16)



Bacillus spp (14)



Bacilo no esporulado (17)



Bacillus spp (15)

Anexo 16. Fotografías de bacterias anaerobias



Clostridium histolyticum



Fusobacterium mortiferum



Porphyromonas assacharolytica/ limosum



Clostridium bifermentans



Eubacterium limosum



Actinomyces naeslundii



Prevotella intermedia/disiens



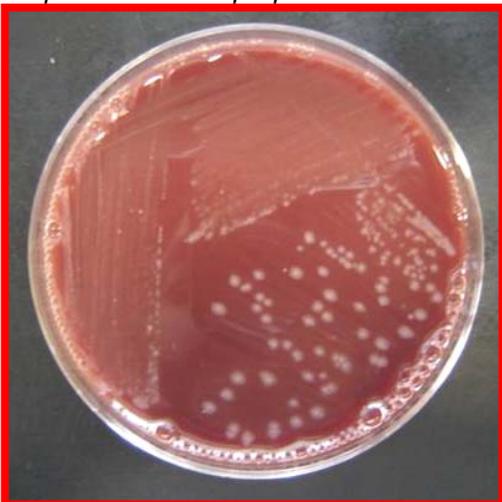
Lactobacillus acidophilus/jensenii



Propionibacterium propionicum/avidum



Bacteroides stercoris/eggerthii



Prevotella oris/buccae



Eubacterium aerofaciens



Eggertella lenta



Prevotella melaninogenica/oralis



Clostridium perfringens



Propionibacterium granulosum



Clostridium sporogenes



Streptococcus constellatus



Clostridium cadaveris



Actinomyces meyeri/odontolyticus



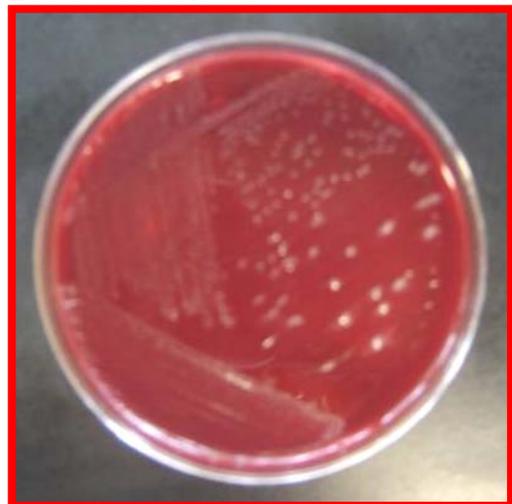
Clostridium septicum



Bacteroides ovatus



Clostridium spp



Actinomyces israelii

Anexo 17. Características coloniales de las bacterias aerobias identificadas en el Humedal Natural

Especie	Tamaño (mm)	Consistencia	Forma	Elevación	Borde	Color	Caracteres ópticos	Hemólisis
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	1,5	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Beige	Opaca	-
<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	2,0	Butirácea	Circular	Umbonada	Entero	Verde musgo	Opaca	+
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1,0	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Translúcida	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	--	Cremosa	Puntiforme	Convexa	Entero	Café	Opaca	-
<i>Alcaligenes xilosoxidans</i>	---	Butirácea	Puntiforme	Levantada	Entero	Amarillo tenue	Opaca	-
<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp</i>	2,5	Butirácea	Irregular	Plana	Ondulado	Café	Opaca	+
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1,5	Viscosa	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Translúcida	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	2,0	Butirácea	Irregular	Plana	Entero	Beige	Opaca	+
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0,5	Butirácea	Circular	Levantada	Entero	Morado	Opaca	-
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1,0	Butirácea	Circular	Levantada	Entero	Café	Opaca	-
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2,0	Butirácea	Irregular	Plana	Entero	Amarillo	Opaca	+
<i>Chryseomonas luteola</i>	1,0	Membranosa	Circular	Levantada	Ondulado	Café	Opaca	-
<i>Citrobacter farmeri</i>	2,0	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Opaca	+
<i>Citrobacter freundii</i>	---	Butirácea	Puntiforme	Plana	Ondulado	Amarillo	Opaca	-
<i>Comamonas testosteronii/Ps. Alcaligenes</i>	1,0	Butirácea	Irregular	Levantada	Entero	Amarillo fuerte	Opaca	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1,0	Butirácea	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo tenue	Opaca	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,0	Butirácea	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo tenue	Opaca	-
<i>Escherichia vulneris</i>	0,7	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Beige	Opaca	-

Especie	Tamaño (mm)	Consistencia	Forma	Elevación	Borde	Color	Caracteres ópticos	Hemólisis
<i>Ewingella americana</i>	---	Viscosa	Puntiforme	Convexa	Entero	Amarillo t	Translúcida	-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	3,0	Viscosa	Circular	Convexa	Ondulado	Café	Translúcida	-
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3,0	Viscosa	Irregular	Levantada	Ondulado	Marrón	Translúcida	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,0	Viscosa	Irregular	Levantada	Ondulado	Marrón	Translúcida	-
<i>Moellerella wisconsensis</i>	0,7	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Beige	Opaca	-
<i>Moraxella lacunata</i>	1,0	Butirácea	Circular	Convexa	Ondulado	Cafè	Opaca	+
<i>Moraxella spp</i>	---	Butirácea	Puntiforme	Plana	Entero	Beige	Traslúcida	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	---	Butirácea	Puntiforme	Plana	Entero	Café	Traslúcida	-
<i>Oligella ureolytica</i>	4,0	Quebradiza	Irregular	Umbonada	Lobulado	Verde	Opaca	+
<i>Pantoea spp</i>	1,0	Viscosa	Circular	Convexa	Ondulado	Crema	Opaca	-
<i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i>	3,0	Viscosa	Circular	Pulvinada	Ondulado	Amarillo	Opaca	-
<i>Providencia stuartii</i>	4,0	Butirácea	Irregular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Traslúcida	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,0	Viscosa	Circular	Pulvinado	Entero	Crema	Translúcida	-
<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	0,5	Butirácea	Circular	Levantada	Entero	Beige	Opaca	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,0	Butirácea	Irregular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Opaca	-
<i>Serratia ficaria</i>	---		Puntiforme	Levantada	Entero	Beige	Translúcida	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	5,0	Viscosa	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Tranlúcida	-
<i>Serratia marcescens</i>	1,0	Butirácea	Circular	Convexa	Pulvinada	Vino	Opaca	+
<i>Serratia plymuthica</i>	2,0	Butirácea	Circular	Pulvinada	Entero	Amarillo	Opaca	-
<i>Shingomonas paucimobilis</i>	1,0	Butirácea	Circular	Plana	Entero	Café	Opaca	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,0	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Opaca	-

Anexo 18. Características coloniales de las bacterias aerobias bacilos positivos identificadas en el Humedal Natural

Número	Especie	Tamaño (mm)	Consistencia	Forma	Elevación	Borde	Color	Caracteres ópticos	Hemólisis
1	<i>Bacillus spp</i>	8,0	Membranosa	Irregular	Plana	Filamentoso	Rosado	Opaca	+
2	<i>Bacillus spp</i>	7,0	Membranosa	Irregular	Plana	Filamentoso	Rosado	Opaca	+
3	<i>Bacillus spp</i>	7,0	Membranosa	Irregular	Plana	Filamentoso	Crema	Opaca	+
4	<i>Bacillus spp</i>	8,0	Butirácea	Irregular	Plana	Irregular	Café	Opaca	+
5	<i>Bacilo no esporulado</i>	Swarming	Membranosa				Crema	Opaca	-
6	<i>Bacillus no esporulado</i>	5,0	Viscosa	Circular	Levantada	Entero	Rosada	Opaca	-
7	<i>Bacilo no esporulado</i>	1,5	Viscosa	Circular	Plana	Irregular	Beige	Opaca	-
8	<i>Bacilo no esporulado</i>	5 mm	Viscosa	Circular	Levantada	Ondulada	Beige	Opaca	-
9	<i>Bacillus spp</i>	10,0	Membranosa	Irregular	Plana	Irregular	Verde	Opaca	+
10	<i>Bacillus spp</i>	4,0	Viscosa	Circular	Entero	Plana	Café	Opaca	+
11	<i>Bacillus spp</i>	10,0	Membranosa	Irregular	Irregular	Levantada	Beige	Opaca	+
12	<i>Bacillus spp</i>	Swarming	Butirácea				Beige	Opaca	+
13	<i>Bacilo no esporulado</i>	Swarming	Butirácea				Rosado	Opaca	-
14	<i>Bacillus spp</i>	Swarming	Butirácea				Beige	Opaca	+
15	<i>Bacillus spp</i>	3,0	Membranosa	Circular	Plana	Irregular	Amarillo	Opaca	+
16	<i>Bacilo no esporulado</i>	Swarming	Butirácea				Blanco	Opaca	-
17	<i>Bacilo no esporulado</i>	3,0	Butirácea	Puntiforme	Conveza	Entero	Beige	Translúcida	+

Anexo 19. Características coloniales de las bacterias anaerobias identificadas en el Humedal Natural

Especie	Tamaño (mm)	Consistencia	Forma	Elevación	Borde	Color	Caracteres ópticos	Hemólisis
<i>Actinomyces israelii</i>	2	Butirácea	Irregular	Plana	Irregular	Amarillo	Opaca	-
<i>Actinomyces meyeri/odontolyticus</i>	1	Membranosa	Circular	Plana	Entero	Rosado	Opaca	-
<i>Actinomyces naeslundii</i>	4,0	Butirácea	Circular	Convexa	Irregular	Amarillo tenue	Opaca	-
<i>Bacteroides ovatus</i>	1	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Café	Opaca	-
<i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i>	3,0	Butirácea	Circular	Convexa	Irregular	Rosado	Opaca	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	3,0	Butirácea	Circular	Pulvinada	Entero	Beige	Opaca	-
<i>Clostridium cadaveris</i>	3	Butirácea	Circular	Plana	Entero	Crema	Opaca	-
<i>Clostridium histolyticum</i>	5,0	Membranosa	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Opaca	+
<i>Clostridium perfringens</i>	3,0	Butirácea	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Opaca	+
<i>Clostridium septicum</i>	1	Membranosa	Circular	Plana	Entero	Beige	Opaca	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	8,0	Butirácea	Irregular	Umbonada	Irregular	Beige	Opaca	-
<i>Clostridium spp</i>	1	Membranosa	Circular	Plana	Entero	Amarillo	Opaca	-
<i>Eubacterium lentum</i>	Swarming	Butirácea				Beige	Translúcida	-
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	7,0	Membranosa	Irregular	Plana	Lobulado	Rosado	Translúcida	-
<i>Eubacterium limosum</i>	4,0	Membranosa	Irregular	Plana	Entero	Beige	Opaca	+
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	2,0	Butirácea	Irregular	Convexa	Lobulado	Café	Translúcida	-
<i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>	2,0	Butirácea	Circular	Convexa	Irregular	Café	Opaca	-
<i>Porphyromonas assacharolytica/limosum</i>	2,0	Butirácea	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Opaca	-
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	1,0	Butirácea	Circular	Levantada	Entero	Crema	Opaca	-
<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	6,0	Butirácea	Irregular	Umbonada	Irregular	Café	Opaca	+
<i>Prevotella oris/buccae</i>	3,0	Membranosa	Circular	Levantada	Irregular	Verde	Opaca	
<i>Propionibacterium granulosum</i>	--	Butirácea	Puntiforme	Pulvinada	Entero	Beige	Opaca	-
<i>Propionibacterium propionicum/avidum</i>	4,0	Membranosa	Irregular	Plana	Lobulado	Blaca	Opaca	-
<i>Streptococcus constellatus</i>	2	Membranosa	Circular	Plana	Entero	Amarillo	Opaca	+

**Anexo 20. Información de los 36 géneros bacterianos identificados,
tomada de Holt *et al.*, 1994.**

Bacilos gran negativos aeróbicos y microaerófilicos

Género: Acinetobacter

Bacilos con un diámetro de 0.5 - 2.5 μm y un largo de 1.5 - 2.5 μm . Comúnmente se encuentran en pares o en cadenas de tamaño variable,

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Aerobio, tienen un estricto sistema respiratorio donde el oxígeno es el aceptor final de electrones

Temperatura óptima de crecimiento: Todas las especies crecen entre 20-30°C, pero la temperatura óptima es de 33 - 35°C

Características generales: Oxidasa negativa, catalasa positiva, la D-Glucosa es el único carbohidrato utilizado por algunas especies

Hábitats comunes: Suelo y agua

Tipos de especies: *Acinetobacter calcoaceticus*

Género: Alcaligenes

Bacilos rectos

Movilidad: A través de 1 a 8 flagelos peritricos.

Metabolismo: Aerobio, tienen un estricto sistema respiratorio donde el oxígeno es el aceptor final de electrones. Algunas especies son capaces de llevar a cabo la respiración anaeróbica con nitrito, pero no con nitrato como aceptor de electrones.

Temperatura óptima de crecimiento: 20 - 37 °C

Características generales: Los carbohidratos no son utilizados como fuente de carbono. Presentan buen crecimiento en medios con ácidos y aminoácidos. Son oxidasa positiva y catalasa positivo. El álcali es producido a partir de algunas sales y amidas.

Hábitats comunes: Aislados de suelos, aguas, heces, orina, sangre, fluidos pleurales, esputo, heridas, nemátodos e insectos.

Especies: *Alcaligenes faecalis*, *A. xiloxidans*

Género: Bordetella

Cocobacilos diminutos de 0,2 - 0,5 x 0,5 - 2,0 µm.

Movilidad: Pueden ser o no móviles, si son móviles, tienen flagelos peritricos.

Metabolismo: Estrictamente aeróbico. El metabolismo es respiratorio nunca fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 35 - 37°C

Características generales: Requiere para su crecimiento nicotiamida, azufre orgánico y nitrógeno orgánico. Parásito de mamíferos y patógeno.

Hábitats comunes: Localizado entre el cilio epitelial del tracto respiratorio.

Especies: *Bordetella avium*

Género: Burkolderia

Bacilos rectos y ligeramente curvados de 0,5 – 1,0 µm de diámetro y 1,5-4,0 µm de largo

Movilidad: A través de uno o más flagelos polares.

Metabolismo: Quimioorganotróficos aeróbicos que no muestran nunca un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 30°C

Características generales: Gran versatilidad nutricional, algunas cepas son patógenas para las plantas.

Hábitats comunes: Muy distribuidos en la naturaleza, son organismos ecológicamente importantes en suelos y aguas y es probable que causen la degradación de muchos compuestos solubles de la degradación de materiales de plantas y animales en ambientes tóxicos. No crecen en medios

ácidos, son oxidasa positiva o negativa, catalasa positiva, algunos pueden ser patógenos para humanos, plantas y animales

Especies: *Burkholderia cepacia*

Género: Comamonas

Bacilos rectos o levemente curvados, de 0,5 - 1,0 x 1 - 4 µm. Las células se encuentran individuales o en pareja.

Movilidad: A través de un flagelo polar.

Metabolismo: Aerobio estricto, no fermentativo y quimiorganotrofo

Temperatura óptima de crecimiento: 30°C

Características generales: No produce endosporas. Acumula poli-β-hidroxibutirato dentro de la célula. Oxidasa y catalasa positiva.

Hábitats comunes: Muy distribuidos en la naturaleza, son organismos ecológicamente importantes en suelos y aguas y es probable que causen la degradación de muchos compuestos solubles de la degradación de materiales de plantas y animales en ambientes tóxicos. No crecen en medios ácidos, son oxidasa positiva o negativa, catalasa positiva, algunos pueden ser patógenos para humanos, plantas y animales

Especies: *Comamonas testosteroni*

Género: Chryseobacterium (Flavobacterium)

Bacilos de 0,5 x 1,0-3,0 µm.

Movilidad: No móviles.

Metabolismo: Aerobio, tiene un metabolismo estrictamente respiratorio.

Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C

Características generales: Son oxidasa, catalasa y fosfatasa positivas. Quimiorganotrofo. A partir de carbohidratos se produce ácido.

Hábitats comunes: Ampliamente distribuido en suelos y aguas, también se encuentra en carnes crudas, leche y otras comidas y en muestras clínicas de humanos.

Especies: *Chryseobacterium indologenes*, *C. meningosepticum*

Género: *Chryseomonas*

Bacilos, con bordes curvados.

Movilidad: A través de 10 a 12 flagelos polares

Metabolismo: Aerobios, tienen un estricto sistema de respiración

Temperatura óptima de crecimiento: 18 - 42 °C

Características generales: Oxidasa negativa, catalasa positiva.

Hábitats comunes: Se han encontrado en muchos ambientes, generalmente son saprófitos, que pueden ser ocasionalmente patógenos

Especies: *Chryseomonas luteola*

Género: *Flavimonas*

Bacilos con lados paralelos y extremos redondeados de 1 mm de diámetro.

Movilidad: A través de un solo flagelo polar o no móviles pueden ser.

Metabolismo: Aeróbicos, tienen un metabolismo respiratorio estricto.

Temperatura óptima de crecimiento: 18-42 °C

Características generales: Catalasa positiva, oxidasa negativa

Hábitats comunes: Encontrada generalmente en el medio ambiente, son aparentemente saprófitas o comensales de humanos y otros animales de sangre caliente, en los cuales son ocasionalmente patógenos.

Especies: *Flavimonas oryzihabitans*

Género: *Moraxella*

Bacilos o cocos. Los bacilos son frecuentemente más cortos y ensanchados muy parecidos a los cocos (1,0 - 1,5 x 1.5 - 2.5 µm), usualmente se encuentran en pares y cadenas cortas

Movilidad: Flagelos ausentes.

Metabolismo: Aeróbico, pero algunas pueden crecer débilmente bajo condiciones anaeróbicas.

Temperatura óptima de crecimiento: 33 - 35° C

Características generales: La mayoría de las especies son nutricionalmente fastidiosas, pero los requerimientos específicos son desconocidos. Usualmente catalasa positiva.

Hábitats comunes: Parásita de las membranas mucosas de humanos y otras animales de sangre caliente.

Especies: *Moraxella lacunata*

Género: *Ochrobactrum*

Bacilos con lados paralelos y extremos redondeados de 1 mm de diámetro, usualmente se encuentran en forma individual.

Movilidad: A través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Aerobios estrictos, poseen un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones.

Temperatura óptima de crecimiento: 20 - 37°C

Características generales: Oxidasa y catalasa positivas. Quimiorganotrofos, usando una variedad de aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos como fuente de carbono.

Hábitats comunes: Se encuentra en muestras clínicas de humanos.

Especies: *Ochrobactrum anthropi*

Género: *Oligella*

Bacilos muy pequeños, la mayoría no se excede de 1 µm y frecuentemente se encuentra en parejas.

Movilidad: La mayoría son no móviles pero algunas especies como *O. ureolytica* tienen flagelos peritricos.

Metabolismo: Aeróbico

Características generales: Moderadamente fastidiosos quimiorganotrofos. Bioquímicamente son bastante inertes y solamente unos pocos ácidos orgánicos y aminoácidos son utilizados como la única fuente de carbono. Los carbohidratos no son fermentados ni oxidados. Oxidasa positiva y usualmente oxidasa negativa.

Hábitats comunes: Principalmente aislados de orina de humanos.

Especies: *Oligella ureolytica*

Género: Pseudomonas

Bacilos rectos y curvados de 0.5-1.0 µm de diámetro y 1.5-4.0 µm de largo

Movilidad: A través de uno o múltiples flagelos polares

Metabolismo: Metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, puede producir aeróbicamente pequeñas cantidades de ácido procedentes de glucosa; utiliza compuestos orgánicos de bajo peso molecular, no polímeros; algunos son quimiolitotróficos y utilizan H₂ o CO₂ como únicos donadores de electrones; algunos usan nitrato como aceptor de electrones anaeróbicamente; algunos son capaces de utilizar arginina como fuente de energía en anaerobiosis.

Temperatura óptima de crecimiento: 30° C

Características generales: Oxidasa, casi siempre positiva, catalasa positiva. Utiliza una gran variedad de compuestos orgánicos que usa como fuente de carbono y como donadores de electrones para la producción de energía. Algunas especies usan más de cien compuestos diferentes y solo unas pocas especies usan menos de veinte.

Hábitats comunes: Muy distribuidos en la naturaleza, son organismos ecológicamente importantes en suelos y aguas y es probable que causen la degradación de muchos compuestos solubles de la degradación de materiales de plantas y animales en ambientes tóxicos. No crecen en medios ácidos, son oxidasa positiva o negativa, catalasa positiva, algunos pueden ser patógenos para humanos, plantas y animales

Especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*.

Género: Shingomonas

Bacilos rectos y curvados de 0.5-1.0 μm de diámetro y 1.5-4.0 μm de largo

Movilidad: A través de un flagelo polar y la movilidad ocurre a 18-22° C pero no a 37° C.

Metabolismo: Aerobio, metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, puede producir aeróbicamente pequeñas cantidades de ácido procedentes de glucosa.

Temperatura óptima de crecimiento: No crece a 5 o 42°C.

Características generales: Oxidasa positiva, las células tienen lípidos, inclusiones, probablemente poli- β -hidroxibutirato.

Hábitats comunes: aislados como especies contaminantes en el laboratorio.

Especies: *Shingomonas paucimobilis*

Género: Stenotrophomonas

Bacilos rectos, usualmente de 0,4-0,7 x 0,7-,1,8 μm , se encuentran predominantemente en forma individual.

Movilidad: A través de múltiples flagelos polares.

Metabolismo: Aeróbicos, tienen un metabolismo respiratorio estricto con el oxígeno como aceptor terminal de electrones. Reduce nitrato a nitrito.

Temperatura óptima de crecimiento: 25-30° C

Características generales: Oxidasa negativa, catalasa positiva. Quimiorganotrofo, puede usar una variedad de carbohidratos y sales. Pequeñas cantidades de ácidos son producidas a partir de algunos carbohidratos.

Hábitats comunes: el acuático, pero también se encuentra en el suelo, en las plantas y en los animales y actualmente se considera un patógeno nosocomial emergente

Especies: *Stenotrophomonas maltophilia*

Bacilos gram negativos y anaerobios facultativos

Género: Aeromonas

Bacilos rectos con un diámetro de 0.3 -1.0 μm y 1.0 - 3.5 μm de largo. Comúnmente se encuentran en pares y pequeñas cadenas.

Movilidad: Poseen un solo flagelo polar.

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: La temperatura óptima de crecimiento es de 22-28°, algunas crecen bien a 37°C pero algunas especies no.

Características generales: Son oxidasa positiva y catalasa positiva y reducen nitratos.

Hábitats comunes: Agua limpia y contaminada.

Especies: *Aeromonas hydrophilia*, *A. caviae*, *A. salmonicida*

Género: Chromobacterium

Bacilos de 0.6 - 09 μm de diámetro y 1.5 - 3.5 μm de largo.

2.1 Movilidad: Utilizan un flagelo polar y usualmente de 1-4 flagelos laterales

Metabolismo: Aerobio facultativo, que crece fermentativamente a partir de azúcares y aeróbicamente a partir de diferentes fuentes de carbono.

Temperatura óptima de crecimiento: 25°C

Características generales: Algunas cromobacterias producen violaceína, un pigmento morado que tiene propiedades antibióticas y es producida sólo en medios que contengan el aminoácido triptófano. colonias moradas en medio sólido, tienen un metabolismo fermentativo, son oxidasa positivo, catalasa positivo e indol negativo.

Hábitats comunes: Son microorganismo de suelo y de ambientes acuáticos.

Especies: *Chromobacterium violaceum*

Género: *Citrobacter*

Bacilos de 1 µm de diámetro y 2 - 6 µm de largo.

3.1 Movilidad: A través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobios facultativos.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: Son oxidasa negativa, catalasa positiva.

Hábitats comunes: La mayoría de estos géneros se han encontrado en heces de humanos y animales, diversos estudios demuestran que es un habitante natural del tracto intestinal.

Especies: *Citrobacter farmeri*, *C. freundii*

Género: *Enterobacter*

Bacilos de 0.6 - 1.0 µm de diámetro y 1.2 - 3.0 µm de largo

4.1 Movilidad: A través de flagelos peritricos

Metabolismo: Anaerobios facultativos quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 30-37°C

Características generales: D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y gas

Hábitats comunes: Comúnmente distribuidos en la naturaleza, especialmente en agua, suelo, vegetales y heces humanas.

E. cloacae, *E. sakasaki*, *E. aerogenes*, *E. Agglomerans* y *E. Gergoviae*, son patógenos oportunistas, causan quemaduras, infecciones urinarias y meningitis.

Especies: *Enterobacter cancerogenus*, *E. cloacae*

Género: *Escherichia*

Bacilos rectos, 1,1 - 1,5 µm, se encuentran individuales o en pareja.

Movilidad: Móviles a través de los flagelos peritricos o no móviles.

Metabolismo: Anaerobio facultativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: Oxidasa negativa, catalasa positiva. Reducen nitratos. Son la mayor causa de infecciones de tracto urinario e infecciones nosocomiales incluyendo meningitis.

Hábitats comunes: Son raramente patógenos oportunistas, usualmente asociados a infecciones en heridas.

Especies: *Escherichia vulneris*

Género: Ewingella

Bacilos rectos, 0,6 - 0,7 μm x 1 - 1,8 μm .

Movilidad: A través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobio facultativo y el metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: D-Glucosa y algunos otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido. Oxidasa negativa, catalasa positiva e indol negativo. Reduce nitratos.

Hábitats comunes: Aislados de humanos, más frecuente de esputo, heridas y sangre. Es un patógeno oportunista.

Especies: *Ewingella americana*

Género: Klebsiella

Bacilos con 0.3 -1.0 μm de diámetro y 0.6 - 6.0 μm de largo. Normalmente están en pares o en cadenas pequeñas.

5.1 Movilidad: No móviles

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: Son oxidasa negativa, catalasa positiva, reducen nitratos. La mayoría de las especies fermentan todo tipo de carbohidratos.

Hábitats comunes: Comúnmente se encuentran en heces humanas, suelo, agua, frutas y vegetales. La mayoría de las especies son parásitos oportunistas que pueden causar neumonía e infecciones urinarias.

Especies: *Klebsiella ornithinolytica*, *K. pneumoniae*

Género: Moellerella

Bacilos rectos.

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Facultativos anaerobios, quimiorganotrofos y tienen un metabolismo respiratorio y fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido, pero no de gas. Oxidasa negativa, catalasa negativa. Reduce nitratos

Hábitats comunes: Encontrados en excremento de humanos y en el agua. Asociados pero no probados con la diarrea humana.

Especies: *Moellerella wisconsensis*

Género: Pantoea

Bacilos de 0.5 - 1.0 µm de diámetro y 1 - 3 µm de largo

6.1 Movilidad: Se movilizan con la ayuda de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 30°C

Características generales: La mayoría de las especies producen un pigmento amarillo, son oxidasa negativa, catalasa positiva e indol negativo. Reducen nitratos.

7.1 Hábitats comunes: Superficies de plantas, semillas, suelo, agua, sangre y orina. Son patógenos oportunistas

Especies: *Pantoea spp.*

Género: Pasteurella

Bacilos esféricos u ovoides, de 0,3 - 1,0 μm de diámetro y 1,0 - 2,0 de largo. Se encuentran en forma individual y menos frecuente en cadenas cortas.

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Anaeróbico facultativo. Quimiorganotrófico, tienen un metabolismo respiratorio y fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37° C

Características generales: D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido pero no de gas. Muchas especies son oxidasa y catalasa positivas. Los nitratos son reducidos a nitritos.

Hábitats comunes: Parásitos o comensales de las membranas mucosas del tracto respiratorio y digestivo de mamíferos (raramente humanos) y pájaros.

Especies: *Pasteurella pneumotropica* y *P. haemolytica*

Género: Providencia

Bacilos con un diámetro de 0.6 - 0.8 μm y un largo de 1.5 - 2.5 μm .

Movilidad: A través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: La D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y algunas especies producen gas. Son oxidasa negativa, catalasa positiva e indol positivo.

Hábitats comunes: Se han encontrado en infecciones urinarias, es un patógeno humano.

Especies: *Providencia stuartii*

Género: Serratia

Bacilos de 0.7 - 1.5 μm de diámetro y 2 - 5 μm de largo

Movilidad: A través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.

Temperatura óptima de crecimiento: 37 - 40 °C

Características generales: D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y algunas especies producen gas. Son oxidasa negativo, catalasa positivo e indol negativo (excepto para *S. fonticola*). Reducen nitratos.

Hábitats comunes: Algunas son de importancia clínica, se pueden encontrar en el suelo, agua, superficie de plantas y otros ambientes diferentes, son comunes en el tracto respiratorio de insectos y roedores.

Especies: *Serratia marcescens*, *S. ficaria*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. plymuthica*

Bacilos gram negativos anaerobios

Género: Bacteroides

Presenta bacilos y formas variables. Muchas especies son pleomórficas.

Movilidad: generalmente no móviles.

Metabolismo: Anaeróbico, quimiorganotrofos, metabolizan carbohidratos, peptona o intermediarios metabólicos.

Características generales: Muchas especies contienen una gran cantidad de ácidos grasos.

Hábitats comunes: Aislados de un amplio rango de hábitats anaerobios: tracto intestinal, lodo y de condiciones infecciosas en humanas y animales.

Especies: *Bacteroides ovatus*, *B. stercoris* y *B. eggerthii*

Género: Fusobacterium

Bacilos pleomórficos no esporulados.

Movilidad: No móviles.

Metabolismo: Quimiorganotrofo, metaboliza peptona o carbohidratos, pero y un débil metabolismo fermentativo. Mayor producto del metabolismo es butirato, frecuentemente con acetato y menor cantidad de propionato, succinato y formato.

Hábitats comunes: Se encuentra generalmente en gingival sulcus y en los tractos intestinales y genitales, aislados de sangre y lesiones en humanos y animales y en úlceras tropicales.

Especies: *Fusobacterium mortiferum*

Género: Porphyromonas

Bacilos cortos de 0,5 - 0,8 x 1,0 - 3,0 µm, no esporulados

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Asacarolítica: el crecimiento no es significativamente afectado por los carbohidratos pero sí por proteínas hidrolizantes como extracto de peptona o levadura. Los productos de la fermentación son n-butírico y ácidos acéticos.

Hábitats comunes: aislados de infecciones orales e infecciones.

Especies: *Porphyromonas assacharolyticus* y *P. limusum*

Género: Prevotella

Bacilos pleomórficos, no esporulados.

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Anaerobios obligados. Quimiorganotrofos. Moderadamente sacarolíticos, los productos de mayor fermentación son acetato y succinato, con bajos niveles de isobutirato y lactato.

Bacilos gram positivos formadores de endosporas

Género: Clostridium

Las células son bacilos, de 0,3 - 2,0 x 1,5 - 20,0 µm y se encuentran frecuentemente en parejas o cadenas cortas. Comúnmente pleomorficos. Forma esporas esféricas u óvalas.

Movilidad: a través de flagelos peritricos.

Metabolismo: Anaerobio estricto

Temperatura óptima de crecimiento: 10 - 65°C

Características generales: Muchas células son quimiorganotrofas o quimiolitotrofas. Usualmente producen mezclas de ácidos orgánicos y alcoholes a partir de carbohidratos y peptonas. No lleva a cabo la reducción de sulfato. Usualmente catalasa negativa. Si el crecimiento ocurre en el aire, la esporulación es inhibida.

Hábitats comunes: en una amplia cantidad de ambientes.

Especies: *Clostridium bifermentans*, *C. cadaveris*, *C. histolyticum*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sporogenes*

Bacilos regulares gram positivos no esporulados

Género: Lactobacillus

Bacilos usualmente regulares, 0,5 - 1,2 x 1,0 - 10,0 µm y algunos tienen una forma cocoide y se encuentran en cadenas cortas

Movilidad: Raramente móviles

Metabolismo: Anaerobios facultativos, algunos microaerófilicos. Su metabolismo es fermentativo y sacaroclástico y menos de la mitad de los productos finales a partir de carbono es lactato. Los nitratos no son reducidos. Quimiorganotrofo

Temperatura óptima de crecimiento: 30-40 °C

Características generales: Crecen pobremente en el aire pero mejor bajo condiciones de oxígeno reducido. Catalasa y citocromo negativos

Hábitats comunes: Está ampliamente distribuido en el ambiente, especialmente en animales y productos vegetales, ellos generalmente habitan el tracto gastrointestinal de pájaros y mamíferos y en la vagina de mamíferos. Son raramente patógenos.

Especies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. jensenii*

Bacilos irregulares gram positivos no esporulados

Género: Actinomyces

Bacilos rectos o curvados, 0,2 - 1,0 x 2 - 5 μm y filamentos 10 - 50 μm de largo con verdaderos ramificaciones. Se encuentran en forma individual o en pares.

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Anaerobios facultativos, requieren de CO_2 para un buen crecimiento. Quimiorganotrofos y fermentativo, producen ácido pero no gas a partir de carbohidratos como ácido fórmico, láctico y succínico pero no propiónico. La producción de catalasa y reducción de nitrato es variable.

Temperatura óptima de crecimiento: 35-37°C

Hábitats comunes: Se encuentra principalmente en la cavidad oral y en las membranas mucosas de vertebrados de sangre caliente, comúnmente causa infecciones asociadas con otras bacterias concomitantes.

Especies: *Actinomyces israelii*, *A. meyeri/odontolyticus*, *A. naeslundii*

Género: Eubacterium

Los bacilos usualmente tienen una forma irregular, varían considerablemente entre especies (0,2 - 2,0 x 0,3 - 10 μm) y raramente forman filamentos. Usualmente se encuentran en forma individual, parejas o formando cadenas cortas.

Movilidad: es variable

Metabolismo: Anaerobios estrictos, muchos requieren técnicas especiales de anaerobiosis y requerimientos específicos. Quimiorganotrofo, con metabolismo fermentativo, algunos degradan carbohidratos. Los productos del metabolismo a partir de glucosa y peptona incluye: ácido butírico, acético y fórmico, con H₂ gaseoso visible.

Características generales: Catalasa negativa e indol negativo. El nitrato puede ser reducido.

Hábitats comunes: Encontrado en cavidades de animales y heces, animales, productos de plantas y suelos. Algunas especies son patógenos oportunistas de vertebrados.

Especies: *Eubacterium aerofaciens*, *E. limosum*, *E. lentum*

Género: Propionibacterium

Bacilos pleomórficos, 0,5-0,8x1-5 µm con los fines redondeados y otros delgados, algunas células pueden ser cocoides. Pero no son filamentosas. Las células se encuentran individualmente, en pares o cadenas cortas en configuraciones de V o Y.

Movilidad: No móviles

Metabolismo: Anaerobio facultativo pero tiene una aerotolerancia variable, algunas crecen un poco en el aire pero mejor anaeróticamente. Quimiorganotrofo, con requerimientos complejos. Tienen un metabolismo fermentativo, produciendo a partir de glucosa y otros carbohidratos un gran cantidad de ácido propiónico y acético y una pequeña cantidad de gas.

Temperatura óptima de crecimiento: 30-37°C

Características generales: Usualmente catalasa positivo.

Hábitats comunes: Se encuentran principalmente en quesos y productos lácteos y en la piel humana.

Especies: *Propionibacterium granulosum*, *P. propionicum*, *P. avidum*.

Cocos gram positivos

Género: Streptococcus

Células esféricas u ovoides, 0,5 - 2,0 μm de diámetro se encuentran en pares o cadenas cuando el crecimiento es en medio líquido. No forman esporas.

Movilidad: No móviles.

Metabolismo: Anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, requieren de un medio muy rico y algunas de 5% de CO_2 . Metabolismo fermentativo, que produce especialmente lactato pero no gas.

Temperatura óptima de crecimiento: 37°C

Características generales: Catalasa negativa.

Hábitats comunes: parásito de vertebrados, especialmente habitantes de la boca y del tracto respiratorio, algunas especies son patógenas para humanos y animales.

Especies: *Streptococcus constellatus*

