

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN EL SEDIMENTO DE UN
HUMEDAL EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO DEL DRENAJE DE UNA MINA DE
CARBÓN (GUACHETA, CUNDINAMARCA).**



TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de
**Microbióloga Industrial y
Ecóloga**

**Director
FABIO ROLDAN, PhD.
Codirectora
YANETH VASQUEZ**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS, FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES
CARRERAS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y ECOLOGIA
Bogotá, D.C.
2014**

**ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN EL SEDIMENTO DE UN
HUMEDAL EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO DEL DRENAJE DE UNA MINA DE
CARBÓN (GUACHETA, CUNDINAMARCA).**

YELLY CAMILA DIAZ VANEGAS

APROBADO

**JANETH ARIAS PALACIOS
DIRECTORA CARRERAS DE
MICROBIOLOGÍA**

**CONCEPCIÓN PUERTA, PhD.
DECANA ACADÉMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS, FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES
CARRERAS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y ECOLOGÍA
BOGOTÁ, D.C.
2014**

**ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN EL SEDIMENTO DE UN
HUMEDAL EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO DEL DRENAJE DE UNA MINA DE
CARBÓN (GUACHETA, CUNDINAMARCA).**

YELLY CAMILA DIAZ VANEGAS

APROBADO

Fabio Roldán, PhD.

Director

Sandra Baena, PhD.

Jurado Microbiología

Maria Angela Echeverry, PhD.

Jurado Ecología

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIA Y ECOLOGÍA
BOGOTÁ, D.C.
2014**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado Sólo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

Este trabajo lo dedico a mi madre, por su amor y dedicación, quien con amor, sacrificio y esfuerzo me ha dado las mejores herramientas para construir y trazar mi camino. Este logro es de las dos por lo cual les agradecemos a todos las personas que contribuyeron a su desarrollo. (E.M.A).

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo para la financiación y ejecución de este trabajo.

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana que permitió el desarrollo de este estudio.

A la Universidad Central por su colaboración y préstamo de equipos.

No tuve duendes que trabajaran en la noche mientras dormía, pero tuve personas increíbles que me acompañaron en las largas jornadas y que me tendieron la mano cuando creí fracasar. Y por ello debo empezar a por darle las gracias a Dios por ponerlas en mi camino.

Al doctor Fabio Roldán, por haberme apoyado, guiado, regañado y motivado tanto en este camino, por enseñarme tantas cosas que no solo me han convertido en una mejor profesional sino una mejor persona, profe enserio gracias.

A mi equipo DAM: Yaneth Vasquez eres una mujer increíble, te admiro, aprendí mucho a tu lado y Maria Camila Escobar fue un gusto trabajar y viajar con ustedes.

A los chicos de ByB: Johan Saenz gracias por tu ayuda y conocimientos varios. Hernan Avellanada e Iván Prieto gracias por su apoyo y hacer que los días en el laboratorio fueran muy amenos y por sus aportes.

A la doctora Sandra Baena y al doctor Ziv Arveli, por sus valiosos aportes.

A las chicas anaerobias: Ginna López, Carolina Rubiano, Luisa Fernanda Bernal, Carolina Díaz gracias por su paciencia con mis mil preguntas diarias, su apoyo, enseñanzas, risas, buenos ratos y grandes aportes.

A Yaris Eulegelo por su ayuda y colaboración constante en el laboratorio.

A Elizabeth Vanegas, gracias por su esfuerzo, apoyo, fuerza y amor, eres el motor de mi vida.

A Luz Mery Vanegas y Ana Gómez gracias por ser los ángeles de mi vida, por su fuerza y amor constante.

A Juan Felipe Osorio y Laura Gómez por su apoyo y motivación diaria.

A mi familia y amigos por su interés y preocupación constante.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. MARCO TEORICO.....	15
4.1 Drenaje de minas	15
4.2 Remediación	16
4.3 Humedales artificiales	17
4.3.1 Ecología microbiana en humedales	17
4.3.2 Especie vegetal (<i>Typha sp</i>)	¡Error! Marcador no definido.
4.3.3 Ciclos biogeoquímicos en humedales asociados al tratamiento de drenajes de mina:	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Área de estudio	25
5.2 Metodología	26
5.2.1 Muestreo.....	27
5.2.2 Análisis microbiológico.....	28
5.2.3 Análisis físico-químico	33
5.2.4 Análisis estadístico	35
5.2.5. Análisis de Comunidades.....	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Ensayos y cuantificación de grupos funcionales microbianos.....	36
6.1.1 Heterótrofos	38
6.1.2 Nitrificantes	38
6.1.3 Sulfato Reductoras	40
6.1.4 Denitrificantes	40
6.1.4 Bacterias oxidadoras y reductoras del hierro.....	41
6.2 Actividad deshidrogenasa	43

6.3 Evaluación de los parámetros fisicoquímico del sedimento a lo largo del humedal.	44
6.3.1 Determinación de pH y humedad.....	44
6.3.2 Concentración de sulfato soluble.....	46
6.3.2 Concentración de metales (Fe, Mn y Zn).....	46
6.3.3 Carbono orgánico en los sedimentos del humedal.....	48
6.3.4 Concentración de nitrógeno total.....	49
6.4 Correlación entre los parámetros evaluados.....	50
6.4.1 Correlación entre los parámetros fisicoquímicos.....	50
6.4.2 Efecto de los parámetros fisicoquímicos evaluados sobre la actividad deshidrogenasa.....	51
6.4.3 Efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la densidad de los grupos funcionales microbianos.....	51
6.5 Análisis de las comunidades microbianas asociadas al sedimento del humedal.....	51
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
7.1 Parámetros físico-químicos de los sedimentos.....	56
7.2 Cuantificación grupos funcionales microbianos estudiados en los sedimentos del humedal en relación con los parámetros fisicoquímicos analizados.....	59
7.3 Descripción ecológica de los sedimentos teniendo en cuenta las variables fisicoquímicas y microbiológicas analizadas.....	63
8. CONCLUSIONES.....	65
9. RECOMENDACIONES.....	66
10. BLIBIOGRAFÍA.....	67
11. ANEXOS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa ubicación sitio de estudio, Municipio de Guacheta, Cundinamarca.	25
Figura 2. Diagrama de procedimiento metodológico.	27
Figura 3. Esquema de muestreo.....	27
Figura 4. Reacción obtenida por la adición del indicador ferrozina en presencia de ión Fe+2.....	32
Figura 5. Densidad de grupos funcionales microbianos asociados con procesos de nitrificación, denitrificación, sulfato reducción y reducción del hierro.	38
Figura 6. Recuentos de heterótrofos en el sedimento del humedal	38
Figura 7. Recuentos de microorganismos nitrificantes.....	40
Figura 9. Lectura de número más probable para denitrificantes y control abiótico, correspondiente a una muestra de la zona de salida, dilución 10^{-2}	40
Figura 8. Técnica número más probable de sulfato reductoras.....	41
Figura 10. Medio ISP para recuento de bacterias oxidadoras de Fe+2.....	42
Figura 11. NMP de reductoras de hierro	43
Figura 12. Recuento de las bacterias reductoras de hierro y presentación de la prueba de Turkey-kramer.....	43
Figura 13. Actividad deshidrogenasa en los sedimentos a lo largo el humedal	44
Figura 14. Valores de pH en los sedimentos en el humedal	45
Figura 15. Porcentaje de humedad del sedimento en cada zona del humedal.	45
Figura 16. Concentración de sulfato soluble en los sedimentos a lo largo del humedal.....	46
Figura 17. Concentración de hierro total en las zonas de entrada, medio y salida del humedal.....	47
Figura 18. Concentración de Manganeso y Zinc en los sedimentos a lo largo del humedal	48
Figura 19. Porcentaje de carbono orgánico en el sedimento a lo largo el humedal	49
Figura 20. Porcentaje de nitrógeno presente en el sedimento a lo largo del humeda.	50

Anexo

Anexo 1. Grupos funcionales a evaluar y sus respectivos medios de cultivo.....	73
Anexo 2 . Descripción de medios utilizados.	74
Anexo 3. Sulfato soluble.....	77
Anexo 4. Nitrógeno total (Kjeldal).....	78
Anexo 5. Método secuencia para extracción y determinación de Metales.	79
Anexo 6. Estadística grupos funcionales microbianos Heterótrofos.....	80
Anexo 7. Estadística actividad deshidrogenasa.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 8. Estadística parámetros fisicoquímicos ..	¡Error! Marcador no definido. 79

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue el estudio de algunas de las comunidades microbianas que intervienen en los ciclos biogeoquímicos presentes en los sedimentos de un humedal construido por la Universidad Central para el tratamiento del drenaje de una mina de carbón en el municipio de Guacheta, Cundinamarca. Los sedimentos del humedal fueron empleados como inóculo en los biorreactores diseñados para el tratamiento de drenajes ácidos de minas (DAM) y por esta razón, es de la mayor importancia caracterizarlos fisicoquímica y microbiológicamente. Con el fin de estudiar las comunidades microbianas de los sedimentos se determinaron las abundancias de seis grupos funcionales (heterótrofos, bacterias sulfato reductoras- BSR, denitrificantes, nitrificantes, oxidadoras y reductoras del hierro). Estas abundancias se relacionaron con los parámetros fisicoquímicos evaluados en tres zonas del humedal y finalmente se describieron ecológicamente los sedimentos con relación a los parámetros evaluados. El humedal se dividió en tres zonas (entrada, media y salida); de cada zona se tomaron tres muestras compuestas de sedimento y para cada muestra se determinó las abundancias (número más probable y recuento en placa) de los grupos funcionales cultivables mencionados anteriormente. Los recuentos de heterótrofos (1×10^5 UFC/g_{ps}) y denitrificantes (1×10^4 NMP/g_{ps}) fueron los más abundantes en los sedimentos, mientras que las bacterias reductoras de hierro (1×10^1 NMP/g_{ps}) presentaron la menor abundancia. Se observaron recuento menores a los esperados para las BSR (1×10^2 NMP/g_{ps}). Dentro de los parámetros fisicoquímicos se evaluaron carbono orgánico, nitrógeno total, sulfato, pH, humedad, hierro, manganeso y zinc, de los cuales se identificaron altas concentraciones de Fe, Mn, Zn y SO_4^- en los sedimentos, alcanzando valores máximos de ($74,852.7 \pm 10,210.0$; 233.3 ± 54.0 ; 247.0 ± 37.7 ; 225.5 ± 43.2 mg/Kg_{ps}, respectivamente). Las concentraciones de SO_4^- y Fe presentaron cambios significativos a lo largo del humedal. El carbono presentó una concentración (~33%) elevada comparada con otros humedales en la literatura. La variabilidad de los datos obtenidos en cada parámetro determinó la gran heterogeneidad que presentó el sistema en cada zona evaluada. Finalmente, se determinó que los parámetros fisicoquímicos no describieron la distribución y abundancia de los grupos funcionales analizados ($p=0.1560$).

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 10 años Colombia busca convertirse en la locomotora minera y según el actual presidente de la República Juan Manuel Santos y el Ministerio de Minas y Energía “Colombia está en ascenso minero”, y se espera que alcance una producción de 115 millones de toneladas de carbón para finales del 2014 (Rodado, 2010). Una de las principales preocupaciones ambientales de la minería es el impacto de los residuos generados durante toda la cadena productiva, entre los cuales se encuentra el drenaje ácido de minas (DAM) (Chang *et al.*, 2000)

El DAM es producto de una oxidación química y/o biológica de los sulfuros metálicos (p.e., pirita, FeS_2) presentes en la minas y suelos (Hao *et al.*, 2010). Esta oxidación es facilitada durante la extracción del carbón por el contacto del agua y el oxígeno con estos sulfuros metálicos (Burns *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2010).

El DAM se caracteriza por presentar altas concentraciones de metales y ácido sulfúrico, propiedades que lo describen según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) como una de las principales amenazas a los ecosistemas (Bahamóndez, 2012). La composición del drenaje está determinada por la geoquímica local, por lo cual la presencia de ciertos metales contribuye a la toxicidad del drenaje en ciertas regiones geográficas (Juarez, 2004).

Los humedales se han convertido en una herramienta tanto económica y ambientalmente viable para el tratamiento de los vertimientos de mina, controlando la contaminación en los ecosistemas acuáticos y terrestres aledaños (Gutknecht *et al.*, 2006). La Convención de Ramsar (Artículo 1.1), define los humedales como “las extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, 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”.

Los humedales artificiales son sistemas que incluyen una variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos tales como la sedimentación, filtración, precipitación, volatilización y absorción para la remoción de contaminantes (Faulwetter *et al.*, 2009). Muchos de estos mecanismos están relacionados con algunos de los procesos microbianos que regulan los ciclos biogeoquímicos de dichos ecosistemas. Dentro de los procesos de mayor interés en los humedales se encuentran la denitrificación, nitrificación, metanogénesis, sulfato reducción, oxidación del sulfuro, oxidación del hierro y reducción del ión férrico (Faulwetter *et al.*, 2009; Gutknecht *et al.*, 2006). Los humedales construidos para el tratamiento de los DAM presentan una amplia diversidad funcional que ha sido poco estudiada pese a la gran importancia que tienen las comunidades microbianas en el funcionamiento y estabilidad ecológica de dichos ecosistemas (Weber *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo es el estudio de algunas de las comunidades microbianas que intervienen en los ciclos biogeoquímicos presentes en los sedimentos de un humedal empleado para el tratamiento del drenaje de una mina de carbón. Por medio de la cuantificación de bacterias asociadas a procesos como la nitrificación, denitrificación, sulfato reducción, oxidación o reducción del hierro, así como, el análisis de diferentes parámetros fisicoquímicos. Igualmente por medio de análisis estadísticos se determinó si dichas variables fisicoquímicas podían explicar las abundancias y distribución de los grupos funcionales. Finalmente, se realizó una caracterización ecológica de los sedimentos teniendo en cuenta estos recuentos y análisis fisicoquímicos.

El presente estudio está enmarcado dentro del proyecto realizado por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) y en grupo ECOBIT de la Universidad Central que evalúa un sistema de tratamiento pasivo (biorreactor) bajo condiciones sulfatorreductoras para la remediación de los drenajes ácidos de minería de carbón del distrito minero de Zipaquirá (Cundinamarca).

2. JUSTIFICACIÓN

Los humedales artificiales son una de las alternativas de mayor interés en la minería de carbón ya que contribuyen con la reducción de la concentración de iones metálicos, sulfato, e incrementan el pH y la alcalinidad de los drenajes (Hallberg & Johnson, 2005).

Estos humedales son sistemas capaces de remover contaminantes provenientes del DAM por medio de un conjunto de procesos químicos, físicos y biológicos.

En los humedales artificiales cohabitan diferentes grupos de organismos que contribuyen con los procesos de remediación (Marin & Correa, 2010), donde los microorganismos controlan gran parte de las dinámicas y mecanismos en la remoción de contaminantes (Truu *et al*, 2009). Pese a su importancia existen pocos estudios en Colombia sobre los procesos microbiológicos dentro de humedales empleados para el tratamiento de drenajes de minería. Por esta razón, estos tratamientos se perciben como cajas negras donde se conoce lo que ingresa y el producto, pero se desconocen los procesos durante el tratamiento.

La caracterización y conocimiento de las grupos funcionales que conforman las comunidades microbianas presentes en los sedimentos de un humedal que trata el drenaje de una mina de carbón, permiten comprender parte de los procesos que se llevan a cabo en dicho ecosistema y como esas dinámicas contribuyen a los procesos de remediación de los drenajes de mina.

Por otra parte se busca aportar conocimiento al proyecto de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) caracterizando los sedimentos que van a ser empleados como inóculo de los reactores pasivos. Esta caracterización permitirá comprender muchos de los procesos y reacciones que se llevan a cabo en estos reactores durante su funcionamiento.

3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.

3.1 Objetivo general

Estudiar algunas de las comunidades microbianas asociadas con los ciclos de nitrógeno, hierro y azufre presentes en los sedimentos de un humedal empleado en el tratamiento de un drenaje de mina de carbón.

Objetivos específicos

1. Estimar la abundancia de algunos grupos funcionales microbianos que intervienen en los ciclos del nitrógeno, hierro y azufre en el sedimento a lo largo del humedal.
2. Establecer la relación de los parámetros fisicoquímicos en los sedimentos con la distribución de los grupos funcionales microbianos.
3. Caracterizar ecológicamente los sedimentos con base en los grupos funcionales estudiados.

4. MARCO TEORICO

4.1 Drenaje de minas

Uno de los más graves problemas ecológicos causados por la industria minera es la producción de drenaje de minas, el cual usualmente contienen altos niveles de iones metálicos tales como el hierro, cobre, aluminio, zinc, manganeso y ácido sulfúrico y en algunos casos puede presentar arsénico (Chang *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2010, Nordstrom & Alpers, 1999). La producción de éste tipo de drenajes se presenta cuando en las actividades extractivas las rocas de las minas se exponen al contacto de agua y oxígeno, lo que ocasiona la oxidación de sus minerales sulfurosos, estimulando la disminución del pH, la cual provoca la disolución de distintos metales en corrientes de agua (Bahamóndez, 2012; Burns *et al.*, 2012).

La geología de la zona determina algunas propiedades del drenaje como son el pH y contenido de metales (Juárez, 2004), algunos drenajes presentan un pH neutro lo cual se puede presentar cuando la geología de la mina contiene suficientes especies alcalinas disueltas como es el caso de la calcita y dolomita que conllevan a la neutralización del ácido producido durante la oxidación (Hallberg & Johnson, 2005).

La disolución de metales afecta tanto ecosistemas acuáticos y terrestres cercanos, por procesos de bioacumulación, biomagnificación e infiltración. Problemáticas que finalmente tiene incidencia sobre la salud humana (Hallberg & Johnson, 2005; Hao *et al.*, 2010). Otra de las grandes preocupaciones de los drenajes de mina, es que pueden mantenerse por décadas e incluso siglos después del cese de actividades, por lo cual el cierre y abandono

de minas por lo general resulta en un legado de contaminación del medio ambiente local (Hao *et al.*, 2010).

4.2 Remediación

El tratamiento de drenajes de mina supone tiempos prolongados y grandes costos para la industria minera, en un estudio realizado por Brown y colaboradores en el 2002 se identificó que solo la industria de los Estados Unidos gasta más de un millón de dólares diario en esta problemática. Razón que ha llevado a la búsqueda de métodos novedosos y eficientes, algunos de los más empleados por las industrias han sido la evaporación, neutralización, humedales, liberación controlada y dilución por aguas naturales (Lottermoser, 2007).

Los métodos empleados en la remediación del DAM se pueden clasificar en tratamientos pasivos y tratamientos activos (Hallberg & Johnson, 2005); los tratamientos activos requieren la adición continua de reactivos, un mantenimiento y monitoreo constante, es el caso de la neutralización, entre otros. Por otra parte los tratamientos pasivos buscan reducir las concentraciones de metales disueltos y neutralizar la acidez, con poco o sin incluir manejo de equipos mecánicos, monitoreo o aireación, este tipo de tratamiento incluye tanto métodos físico-químicos como biológicos (Lottermoser, 2007).

Uno de los métodos implementados por la pequeñas industrias mineras consiste en agregar cal con el fin de aumentar el pH, pero ésta estrategia no resulta la mejor a nivel ambiental ni a nivel económico (Corrales *et al.*, 2006), por esta razón se buscó la implementación de tratamientos biológicos o pasivos que resultan más económicos y amigables con el medio ambiente. Algunos de los tratamientos pasivos empleados para el DAM son los humedales artificiales y biorreactores anaerobios (Hallberg & Johnson, 2005), los cuales tienen como principal objetivo aumentar el pH, la precipitación de los

metales pesados y la eliminación de los sólidos en suspensión (López *et al*, 2002). Una gran parte de los mecanismos de remoción de contaminantes dentro de los humedales se llevan a cabo principalmente por microorganismos, gracias a su diversidad bioquímica y su alta capacidad de adaptación (Bhattacharya *et al*, 2006).

4.3 Humedales artificiales

Los humedales construidos son sistemas dinámicos y heterogéneos, empleados en la depuración de drenajes de mina, incluyen procesos biológicos tales como actividades metabólicas microbianas y de plantas, así como procesos fisicoquímicos, tales como la sedimentación, adsorción y precipitación (en las interfaces agua-sedimento, la raíz-sedimento y de la planta-agua) (Faulwetter, 2009; Marín *et al.*, 2007; Truu, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

Los sedimentos juegan un papel de gran importancia en los humedales, ya que en muchas ocasiones son los que presentan la mayor carga microbiana y por procesos físicos concentran los metales en su interior (Sophia *et al.*, 2006). No solo los sedimentos resultan un hábitat estratégico para las bacterias, sino también las raíces de las plantas presentan numerosos hábitats y nichos adecuados para diversas comunidades microbianas, también ofrecen posibilidades para comunidades altamente especializados como es el caso de los microorganismos asociados al ciclo del hierro (Bodelier *et al.*, 2006).

4.3.1 Ecología microbiana en humedales

Los humedales son sistemas biológicos que pueden ser naturales o artificiales, presentan gran cantidad de procesos microbianos que requieren su integración para su comprensión y estudio, de allí el interés de trabajar bajo el análisis de la ecología microbiana, la cual busca entender la diversidad, composición, función y dinámica de las comunidades microbianas y su relación con factores ambientales que permiten el funcionamiento de los ecosistemas (Atlas & Bartha, 2002; He *et al.*, 2011). Específicamente a nivel de humedales la ecología microbiana tiene un gran campo de estudio, ya que resultan

ecosistemas con una alta heterogeneidad lo que permite la coexistencia de comunidades bacterianas con requerimientos metabólicos y funciones distintas (Kent, 1994).

Aún la ecología microbiana presenta muchos sesgos, ya que la mayoría de estudios sobre diversidad microbiana utilizan índices y modelos diseñados para el estudio de macroorganismos, a pesar que se ha identificado una clara diferencia tanto conceptual como práctica de manejar comunidades microbianas con manejar comunidades animales o vegetales.

Los índices de diversidad de macroorganismos que se utilizan para entender las comunidades microbianas, se pueden dividir en tres grupos: el primero relacionado con los índices de riqueza de especies donde se utilizan índices de Shannon, índice de Margalef, entre otros. El segundo grupo de índices están basados en abundancias proporcionales donde se habla de conceptos como dominancia y equitatividad, agrupa índices como el de equitatividad de Shannon, índice de Simpson, índice de Berger-Parker e índice de Lloyd; y finalmente el grupo que utiliza modelos de abundancia de especies como el modelo serie log, modelo log normal, modelo de la "bara partida" (Magurran, 2004; Yanine, 2010)

La diversidad se trabaja bajo tres enfoques; la diversidad taxonómica, la diversidad genética y la diversidad funcional (Zamora, 2012). La diversidad funcional se estudia en relación a las capacidades metabólicas presentes en un ecosistema (Trevors, 1998), propiedad que a nivel microbiano permite estudiar la estructura de las comunidades al definir las capacidades metabólicas de los microorganismos que la componen y sus consecuencias en los ciclos biogeoquímicos; por ejemplo la utilización de diferentes fuentes de energía, carbono, nitrógeno y requerimientos especiales de crecimiento (Fakruddin & Mannan, 2013; Zamora, 2012). Los grupos funcionales resultan la unidad de estudio base para medir diversidad funcional, los cuales ecológicamente se definen como el conjunto de especies que poseen características fisiológicas, morfológicas, conductuales o de historia de vida semejantes y desempeñan papeles ecológicos equivalentes (Martínez, 2008). Los grupos funcionales pueden incluir el término de gremio ecológico, el cual hace énfasis en la agrupación de especies que explotan de manera semejante un mismo recurso del ambiente (Atlas, 2005; Martínez, 2008). No existe una clasificación funcional determinada de los organismos y es común que la clasificación dependa de los objetivos de cada estudio.

Estudiar la diversidad funcional en humedales resulta de gran utilidad ya que como se mencionada anteriormente son sistemas heterogéneos que presentan gran cantidad de donadores y aceptores de electrones, donde su análisis va a permitir tener una idea de la estructura de la comunidad (Gutknecht *et al.*, 2006). Entre los aceptores de electrones más estudiados en humedales se encuentra el oxígeno ya que su gradiente de concentración permite la coexistencia de microorganismos aerobios y anerobios a diferente profundidad, donde las plantas en la mayoría de los casos son las encargadas de generar esa interface oxi-anoxigénica en los sedimentos (Bodelier *et al.*, 2006; Faulwetter *et al.*, 2009).

Estudios a nivel funcional han permitido identificar que un ecosistema con una alta diversidad funcional resulta más eficiente en términos de productividad, resiliencia y resistencia (Dirzo & Mendoza, 2008; Magurran, 2004; Tilman, 2001). En los humedales se ha determinado que la estabilidad de la comunidad microbiana es un factor crítico para el buen funcionamiento del humedal en cuanto a remoción de contaminantes, el término de estabilidad se conoce como la capacidad de un ecosistema para mantener su estructura y función durante largos períodos de tiempo a pesar de las perturbaciones (Magurran, 2011).

Y se puede manejar bajo tres perspectivas distintas: "permanecer sin cambios"; "Volviendo al estado de referencia después de una perturbación temporal"; y "la persistencia en el tiempo" (Pawłowski *et al.*, 2008).

Se puede hablar de estabilidad a nivel de ecosistema o a nivel de comunidades, según estudios se ha evidenciado que la estabilidad de la comunidad microbiana se alcanza entre los 75 a 100 días de establecida (Samsó & García, 2013). Dicha propiedad en las comunidades microbianas puede estar afectada por (i) la capacidad de adaptación metabólica a condiciones estrés (ii) las interacciones metabólicas entre los microorganismos (iii) la solidez intrínseca de los microorganismos; (iv) las interacciones antagónicas entre los microorganismos (v) un hábitat estable (Minervini *et al.*, 2013).

Gutknecht y colaboradores (2006) observaron que los humedales empleados en el tratamiento de drenajes de mina presentan una menor diversidad comparada con los humedales empleados para el tratamiento de aguas residuales domésticas, debido a la toxicidad de los afluentes de la minería.

Para caracterizar una comunidad microbiana es importante tener en cuenta que no todos los microorganismos del ambiente son cultivables, de allí la importancia que ha cobrado en la actualidad el empleo de herramientas moleculares (Schlegel & Jannasch, 2006). El estudio únicamente de microorganismo cultivables limita el análisis de la diversidad y funcionalidad de la comunidad microbiana (He *et al.*, 2011). Por otro lado las técnicas de análisis cultivables permiten evidenciar los fenotipos de las bacterias aisladas, observar sus adaptaciones morfológicas frente a condiciones de estrés y determinar morfotipos dominantes (Subrahmanyam *et al.*, 2014).

4.3.3 Ciclos biogeoquímicos en humedales asociados al tratamiento de drenajes de mina:

4.3.3.1 Carbono

El carbono forma parte de la atmósfera, hidrosfera y litosfera interviene en la composición de los seres vivos. El carbono es un elemento requerido en la formación de moléculas y como fuente de energía. Mediante el proceso de fotosíntesis el carbono es tomado de la atmósfera en forma de CO₂ y mediante el proceso de respiración de los animales regresa (Madigan *et al.*, 2001).

Existen grandes grupos funcionales que difieren en las fuentes de carbono que utilizan (autótrofos y heterótrofos), han desempeñado un papel crucial en la evolución de las propiedades físico-químicas de la atmósfera, de la hidrosfera y de los suelos (Martínez Ramos, 2008).

Los microorganismos heterótrofos obtienen energía por medio de la descomposición de la materia orgánica presente en el suelo. Poseen un papel muy importante en el ciclo de carbono ya que se encargan de los procesos de mineralización de materia orgánica, entendiendo la mineralización como la degradación completa mediante procesos de oxidación del carbono orgánico hasta CO₂ + H₂O (Atlas y Bartha, 2002). Los heterótrofos presentan una distribución ubicua, gran abundancia y capacidades metabólicas diversas (Latorre, 2007).

Se ha identificado que los microorganismos heterótrofos presentan gran diversidad metabólica respecto a fuentes de carbono orgánico, algunos de ellos utilizan fuentes sencillas como alcoholes y ácidos orgánicos, mientras que otros cuentan con grandes

complejos enzimáticos que les permiten utilizar polímeros como la celulosa y la lignina (Atlas y Bartha, 2002).

El carbono en humedales empleados para la remediación de aguas residuales y drenajes de mina juega un papel importante dependiendo de su forma puede comportarse como donador o aceptor de electrones. En grupos de gran interés en la remoción de metales y sulfatos como es el caso de las bacterias sulfato reductoras se comporta como donador de electrones por lo cual su presencia y concentración va a restringir parte de los procesos que allí se presentan (Chen *et al.*, 2014).

Las principales fuentes de carbono orgánico presentes en humedales para el tratamiento de drenajes de mina están relacionadas con la materia orgánica adicionada al humedal por fuentes secundarias y las fuentes aportadas en los exudados de plantas (Ibekwe *et al.*, 2003). Y respecto a la remoción de carbono orgánico ocurre por todos los tipos de respiración, pero la tasa y eficiencia aumenta bajo condiciones aeróbicas (Chen *et al.*, 2014; Faulwetter *et al.*, 2009).

4.3.3.2 Azufre

El azufre es el décimo elemento más abundante en la corteza de la tierra y compone aproximadamente el 1%p/p del peso seco de la célula bacteriana (Maier *et al.*, 2009). El ciclo del azufre en los humedales resulta un procesos de gran importancia en el tratamiento de aguas residuales, especialmente en los drenajes de mina (Faulwetter *et al.*, 2009), los estados de valencia que son principalmente -2 (H₂S), 0 (S₀), +2 (S₂O₃²⁻) y +6 (SO₄²⁻), de los cuales algunos resultan donadores y otras aceptores de electrones (Wu *et al.*, 2013).

Como se menciona anteriormente el drenaje de mina se puede producir por acción biológica de microorganismos quimiolitotróficos que oxidan los sulfuro metálicos como la piritita (FeS₂), calcopiritita (CuFeS₂), pirrotita (FeS) y arsenopiritita (FeAsS) lo que conlleva a la formación de ácido sulfúrico (Ecuación 1.0), el cual genera condiciones ácidas a los efluentes de mina lo que contribuye a la solubilización de iones metálicos (Hallberg & Johnson, 2005; Lottermoser, 2007).



4.3.3.2.1 Sulfato reducción

En cuanto a los procesos que se dan durante la remediación en el humedal, la reducción microbiana de (SO_4^{-2}) a H_2S conlleva a un aumento del pH y consecuente precipitación de metales sulfurosos, reacción que es reconocida como un importante mecanismo de remoción de metales dentro de los humedales (Faulwetter *et al.*, 2009; Rioux & Fortin, 2002); y es catalizada únicamente por bacterias sulfato reductoras (BSR) en condiciones anóxicas.

Las BSR utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos que provienen de la degradación de materia orgánica o producto de la fotosíntesis realizada por las plantas allí presentes (Wu *et al.*, 2013). Las bacterias sulfato reductoras resultan los organismos más ubicuos del planeta, su función es vital dentro del ciclo de azufre y tiene una función importante de generar alcalinidad dentro de los humedales (Faulwetter *et al.*, 2009), algunos de los géneros identificados como bacterias sulfato reductoras son *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio* (Maier *et al.*, 2009)

Es importante mencionar que hay otra ruta de reducción que se puede presentar en este tipo de ecosistemas, se conoce como reducción asimilativa la cual consta en reducir el sulfato a sulfuro al interior de la célula y posteriormente incorporarlo en aminoácidos, esta vía requiere un aporte significativo de energía (Maier *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2007).

4.3.3.3 Nitrógeno

El nitrógeno hace parte de los elementos esenciales en los ciclos de la naturaleza, en los organismos es componente base de los aminoácidos y proteínas, y constituye en el 79% de los gases de la atmósfera. El nitrógeno presenta estados de valencia entre -3 (NH_3) y +5 (NO_3^-) (Atlas & Bartha, 2002). La mayor remoción de nitrógeno que se presenta en los humedales esta dado por acción de plantas y microorganismos, siendo los procesos de nitrificación y desnitrificación los más más estudiados en este tipo de sistemas (Rin & Fer, 2007; Sim *et al.*, 2012).

4.3.3.3.1 Nitrificación

La nitrificación es el proceso por el cual el amonio es oxidado a nitrito y el nitrito a nitrato, procesos realizados por microorganismos oxidadores de amonio y oxidadores de nitrito respectivamente (Boer & Kowalchuk, 2001; Pérez *et al.*, 2011). El proceso de oxidación del amonio a nitrito se divide en dos reacciones; en la primera no hay generación de energía y como producto se obtiene la hidroxilamina por medio de la enzima amoniaco monooxigenasa. En la segunda reacción se oxida la hidroxilamina por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa a nitrito, en la cual se produce poca energía (Boer & Kowalchuk, 2001; Gómez, 2008). La oxidación del amonio ha sido ampliamente estudiada en bacterias quimiolitotrofas las cuales utilizan CO_2 como fuente de carbono y lo fijan mediante el ciclo de Calvin (Travers, 2007), es el caso de *Nitrosomonas* una de las bacterias más estudiadas en humedales (Maier *et al.*, 2009), pero gracias a estudios de metagenómica se han identificado archeas (*Crenarchaeota*) con potencial amonio-oxidador (Graeme & Schleper, 2006).

En la oxidación del nitrito a nitrato interviene la enzima nitrito oxido-reductasa presente en bacterias como *Nitrobacter* (Atlas & Bartha, 2002). Los procesos de nitrificación son exotérmicos con baja producción energética, lo cual se evidencia en el lento crecimiento de los dos grupos funcionales (Atlas & Bartha, 2002; Travers, 2007). El método más empleado para la detección de bacterias nitrificantes en suelos y sedimentos es Número Más Probable (NMP) (Boer & Kowalchuk, 2001; Gómez, 2008; Horz *et al.*, 2004; Pérez-peláez *et al.*, 2011)

4.3.3.3.1 Denitrificación

La denitrificación es un proceso reductivo importante en humedales ya que remueve concentraciones excesivas de nitrógeno evitando procesos de eutrofización (Dodla *et al.*, 2008). En humedales la denitrificación es un proceso sensible a la química del sedimento y al tipo de vegetación (Dodla *et al.*, 2008).

En la denitrificación, el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso por medio de bacterias aerobias facultativas y heterótrofas, las cuales utilizan el nitrato como aceptor final de

electrones para su respiración (Gómez, 2008; Paredes *et al*, 2007; Pérez *et al*, 2011) . El primer producto de la reducción del nitrato (NO_3^-) es el nitrito (NO_2^-) por medio de la enzima nitrato reductasa la cual es sensible al oxígeno, la enzima se encuentre unida a la membrana y contiene molibdeno como cofactor (Atlas & Bartha, 2002). Posterior a ello el nitrito (NO_2^-) se reduce produciendo oxido nítrico (NO) por medio de la nitrito reductasa, continua la reducción a oxido nitroso y finalmente nitrógeno gaseoso (N_2) (Gómez, 2008).

Se han identificado bacterias denitrificantes aerobias heterótrofas las cuales utilizan la nitrato reductasa periplásmica para desnitrificar bajo condiciones oxigénicas (Zhu *et al.*, 2012), pero la tasa de desnitrificación en condiciones anóxicas se maximiza comparada bajo condiciones aerobias (Casasús *et al.*, 2005).

4.3.3.4 Hierro

El hierro es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre pero es muy poco el que se encuentra de forma disponible (Atlas & Bartha, 2002). Algunos microorganismos han desarrollado estrategias para obtener hierro de formas minerales, una de las mejores estrategias es el uso de quelantes de hierro conocidos como sideróforos (Maier *et al.*, 2009). El ion de hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro, por ende no puede ser utilizado por los microorganismos, el uso de sideróforos permite disolver estos iones a complejos de Fe^{2+} que puedan ser asimilados (Maier *et al.*, 2009).

Durante mucho tiempo se consideró que la oxidación del hierro era un proceso netamente físico, fue hace relativamente pocos años que se identificaron a las bacterias como importantes participantes del ciclo de hierro (Gutknecht *et al.*, 2013). El hierro puede presentar dos estados de valencia (+2 o +3), el Fe (+2) funciona como fuente de electrones para los microorganismos oxidadores de hierro bajo condiciones aerobias o anaerobias, mientras que el Fe(+3) funciona como aceptor final de electrones para los reductores bajo condiciones anaerobias (Weber *et al* 2006). En los drenajes de mina al oxidarse la pirita, el hierro queda disuelto y en grandes concentraciones resulta tóxico (Hallberg & Johnson, 2005), Una de las bacterias oxidadoras de hierro más estudiadas y reportadas es *Thiobacillus ferrooxidans*, la cual tiene su sitio de transferencia de electrones

en la membrana celular y la enzima respectivamente reportada es la citocromo c-Fe⁺² oxidoreductosa (Corrales *et al.*, 2006).

Las bacterias reductoras de hierro se ha identificado que puede ser anaerobias facultativas litotróficas, las cuales son comunes en sedimentos, presentan tasas de crecimiento lento y es difícil su cultivo. Y las bacterias quimioorganotróficas que reducen el Fe⁺³ de forma acelerada (Lovley & Phillips, 1986). En algunas bacterias la enzima nitrato reductosa interviene en esta reducción en suelos, mientras que otras bacterias poseen enzimas Fe⁺³-reductasas específicas (Jones *et al.*, 1984).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó en un humedal construido para el tratamiento del drenaje de la mina el Roble (4°13'30" latitud norte y 79°0'20" longitud oeste), propiedad de la empresa Uniminas. El humedal está ubicado en el municipio de Guacheta al norte del departamento de Cundinamarca (**Fig. 1**). Es una zona montañosa con pendientes abruptas y zonas onduladas, con elevaciones que van de 2600 m hasta 3000 m (Fajardo *et al.*, 1997).



Figura 1. Mapa ubicación sitio de estudio, Municipio de Guacheta, Cundinamarca.

Tomado de http://www.guacheta-cundinamarca.gov.co/mapas_municipio.shtl?apc=bcxx-1-&x=2330701.

El humedal fue construido en el 2009 por lo cual lleva en funcionamiento 5 años, de los cuales estuvo 34 semanas bajo monitoreo y control de la Universidad Central como parte del proyecto de su mismo diseño y construcción, financiado por Colciencias y el gremio Uniminas Ltda. El humedal esta dividido en tres unidades en paralelo interconectadas, cada una trata 5 L/m de drenaje y presentan dimensiones de 10.1 m de largo x 2.5 m de ancho y 1 m de profundidad. Cada unidad se encuentra aislada por medio de una geomembrana de polietileno de alta densidad que sobresale un metro en cada lado.

Las tres unidades presentan una capa de materia orgánica conformada por compost de ganado vacuno con una altura de 0.15 m aproximadamente sobre una capa de gravilla de 0.2 m. Inicialmente fueron construidos para presentar tiempos de retención de 1.54 días, en cada unidad se sembraron 40 plantas con una densidad promedio de 1.6 ejemplares/m². La unidad ubicada en el centro fue la seleccionada para el presente estudio, el criterio de selección fue la alta densidad microbiana y presentó los mayores porcentajes de remoción de Fe, Mn y Zn (30-50% remoción) comparada con las otras unidades en los análisis preliminares.

El día del muestreo se evidenció que el humedal no estaba recibiendo el drenaje oscuro que se había presenciado en visitas anteriores, y el olor a sulfuro característico en este tipo de sistemas se concentró en la zona media.

El mes de febrero fue seleccionado para realizar el muestreo por presentar una pluviosidad promedio (51.4mm); ya que de esta forma no presentaría una alta precipitación como en los meses de abril (108.9mm), mayo (111.2mm) y octubre (146.6mm) y los menos lluviosos diciembre a marzo donde enero (27.3mm) (car, 2006; mavdt, 2008).

Metodología

En la figura 2, se evidencian las cinco fases del estudio que serán descritas a continuación.

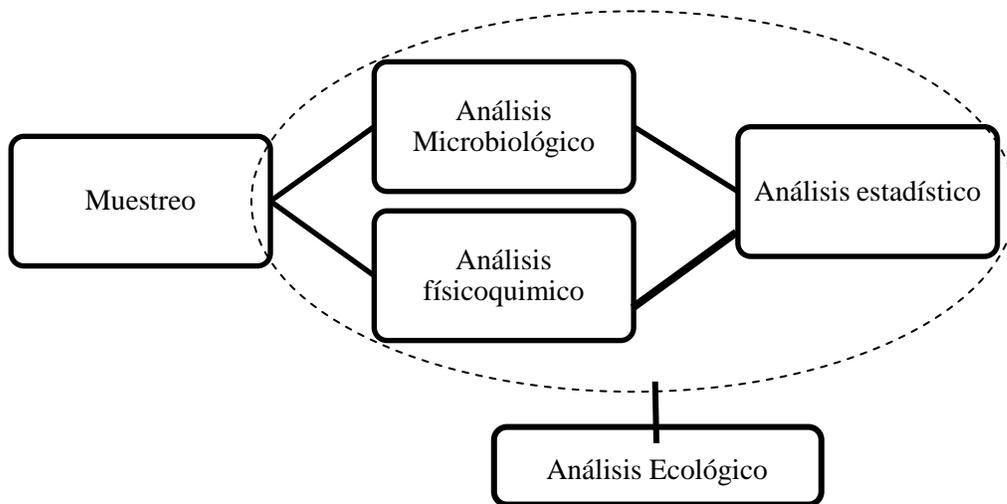


Figura 2. Diagrama de procedimiento metodológico.

5.2.1 Muestreo

Se realizó un único muestreo para el cual se definieron tres zonas en el humedal que corresponden a la entrada del humedal (E), media (M) y salida (S) definidas como un 1/6, 2/3, 1/6 del humedal respectivamente (**Figura 3**). En cada zona se tomaron tres muestras compuestas, cada una conformada por 10 sub-muestras de sedimento colectado a partir de un muestreo aleatorio simple a lo largo de la zona.

Cada muestra presentó aproximadamente 500 gramos de sedimento, las muestras fueron almacenadas, se mantuvieron refrigeradas (4-6°C) y se transportaron al laboratorio para su posterior análisis.

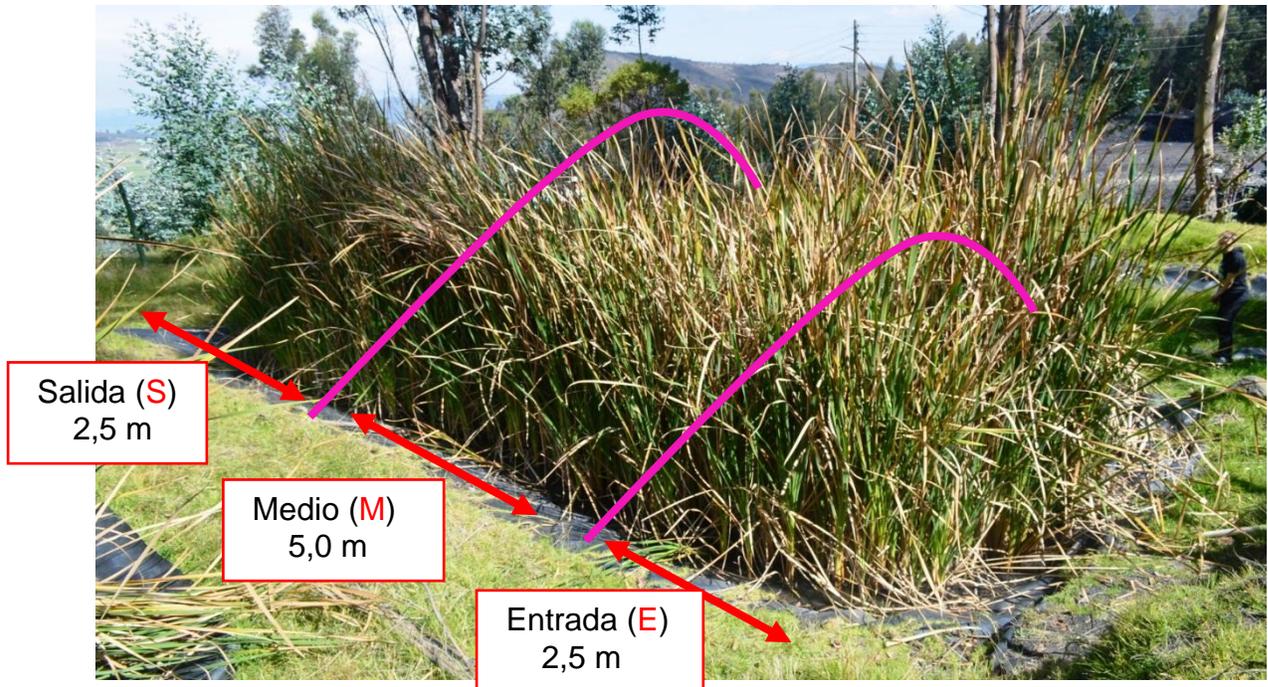


Figura 3. Esquema de muestreo.

5.2.2 Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

El procedimiento inicial fue la extracción de microorganismos del sedimento, la cual se dividió en dos tipos; una bajo condiciones aerobias y otra bajo condiciones anaerobias. Para las extracciones aerobias se colocaron 5 g de sedimento en 45 ml de solución salina (0.85%p/v) a 160 rpm por 15 minutos (Latorre, 2007) y posteriormente se realizó un lavado celular (2x) empleando solución salina, con el fin de retirar toda las fuentes orgánicas de carbono que pudiera afectar los análisis. Para la extracción anaerobia, en una atmosfera de nitrógeno se depositaron 5 g de sedimento en frascos con tapón, a los cuales se les adicionaron 45 mL de solución salina preparada en anaerobiosis y con rezarsurina como indicador, el sistema se colocó en agitación a 160 rpm durante 15 minutos.

Los grupos funcionales analizados fueron bacterias sulfato reductoras, heterótrofos, nitrificantes, denitrificantes, reductoras de hierro y oxidadoras del hierro, se realizó

cuantificación por NMP o recuento en placa respectivamente, en medios específicos (Anexo 2).

Para el análisis de número más probable (NMP) la combinación de tubos o pozos positivos/ negativos se analizaron en el programa US Environmental Protection Agency (EPA) Most Probable Number (MNP) Calculator, versión 2.0 (2009). Resultados que se expresaron y corrigieron como NMP de microorganismos por g de peso seco.

5.2.2.1 Heterótrofas

Para el recuento de bacterias heterótrofas bajo condiciones de esterilidad se realizaron diluciones seriadas con base 10 hasta 10^{-7} en solución salina (0.85%), agitando con vortex antes de tomar una alícuota de cada dilución. Se colocaron 0.1ml de las diluciones de la muestra, sobre las cajas de petri con el medio de cultivo respectivo, el procedimiento se realizó por duplicado en cada dilución por cada medio de cultivo. Para el cultivo en el medio R2A se realizó únicamente siembra hasta la dilución 10^{-5} . Finalmente las cajas de petri se incubaron aproximadamente entre 22 a 25 °C por 5 días, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias de heterótrofos y los datos se convirtieron a gramos de peso seco (UFC/gps) (Latorre, 2007).

5.2.2.2 Nitrificantes

Para cuantificar las bacterias nitrificantes se analizaron dos grupos funcionales; oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito. La técnica utilizada para determinar su densidad en los sedimentos fue el método desarrollado por Gómez, (2008) en USBA, se realizó la técnica de número más probable (NMP) en placas de elisa de 96 pozos.

Las placas fueron previamente esterilizadas con luz UV por 1 hora, en cada pozo se adicionaron 100 µl del medio respectivo para oxidadores de amonio y oxidadores de nitrito (Anexo 2). Posteriormente se agregó 50 µl de cada dilución realizada previamente (10^{-1} a 10^{-4}) en solución salina, se utilizaron 5 pozos por dilución, se incubaron a 25°C en oscuridad durante 4 semanas aproximadamente.

Al momento de la lectura de los resultados se agregó el reactivo difenilamina como indicador de la oxidación de amonio y reactivo de Griess para evaluar la oxidación del

nitrito. El crecimiento de los microorganismos oxidadores de amonio se evidenció por el cambio de color del medio de cultivo, el cual inicialmente presenta un color rosado y debido a un proceso de acidificación por producción de nitritos toma una coloración amarilla. Como mencionaba anteriormente la presencia de nitrito se evaluó con la adición de 50 µl de difenilamina por pozo, el cual es un indicador de oxido-reducción que vira a azul cuando es oxidado en este caso por la presencia de nitritos; por tal razón los pozos que presentaban color azul se tomaron como resultados positivos (Gómez, 2008).

En el caso de los microorganismos oxidadores de nitrito se consideraron positivos los pozos que no presentaban coloración rojiza con la adición de 50 µl de reactivo de Griess. Ya que si hay presencia de nitritos, estos reaccionan con la sulfanilamida presente en el reactivo y produce un diazocompuesto que posteriormente reacciona con una amina aromática (cloruro de N-etildiamonio) formando un compuesto rojizo (Gómez, 2008).

5.2.2.3 Denitrificantes

En la cuantificación de bacterias denitrificantes se empleó el método desarrollado por Gómez (2008) en USBA, en el cual se realizó NMP siguiendo la metodología anaerobia descrita por Hungate, 1969. Se realizaron diluciones en serie (10^{-2} a 10^{-4}), con solución salina anaerobia de las extracciones microbianas de sedimento mencionadas anteriormente. Se tomó con una jeringa estéril 1 ml de las diluciones (10^{-2} a 10^{-4}) y se adicionaron a cada tubo Hungate que contenía 9ml de medio respectivo (Anexo 2). Se realizaron 5 repeticiones por dilución, se incubaron a 28°C aproximadamente durante 15 días.

El crecimiento se evaluó por turbidez y por consumo de nitrito, el cual se evidenció con la adición de 50 µl del indicador difenilamina a 1 ml de cada dilución de NMP. Se tomaron como positivos los tubos que no presentaran coloración azul (Gómez, 2008), lo cual evidenciaba consumo del nitrato. Se preparó un control abiótico que consistió en la incubación de un tubo con medio sin adición de dilución.

5.2.2.4 Sulfato reductoras

Para la estimación de bacterias sulfato reductoras se siguió el protocolo de la ASTM D4412, (1984), en el cual se utiliza la técnica de número más probable (NMP) en medio Starkey's (Anexo 2) bajo condiciones anaerobias.

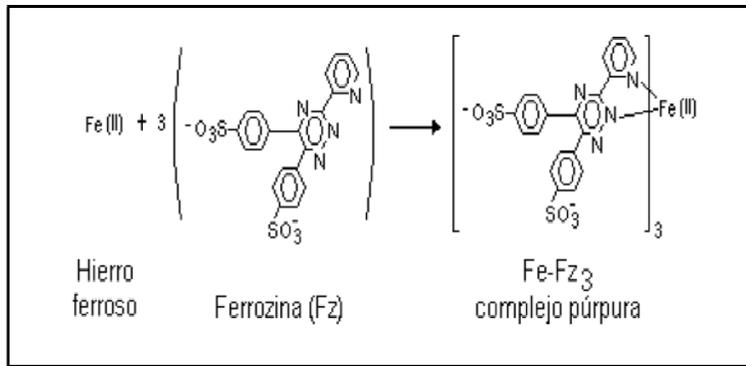
Se tomó con jeringa estéril 1ml de las diluciones (10^{-2} a 10^{-4}) realizadas previamente en solución salina anaerobia, se adicionó 1ml a cada tubo Hungate con 9ml de medio, se llevó a incubar por 21 días a 30°C aproximadamente. Adicionalmente se incubó un tubo con medio como control abiótico.

Pasado el tiempo de incubación, se evaluó turbidez y la formación de un precipitado negro que indica la producción de sulfuro de hierro. Adicionalmente se utilizó el método de Cord Ruwisch (1985) para corroborar la producción de sulfuro, método que busca evidenciar la producción de sulfuro por la formación de un precipitado de cobre (CuS), color café claro a rojizo.

5.2.2.5 Reductoras de hierro

Finalmente para la evaluación de reductoras de hierro se empleó la técnica del número más probable (NMP) en un medio específico con fuente de Fe^{+3} (Anexo 2) bajo la metodología de Hungate, 1969. Para el ensayo se tomó con jeringa estéril 1ml de las diluciones (10^{-2} a 10^{-4}) y se adicionó a cada tubo Hungate que contenía 9ml del medio, se llevó a incubar por 4 semanas a 30°C aproximadamente todo ellos en condiciones anaerobias, adicionalmente se incubó un control abiótico.

La actividad reductora se evidenció por medio de la técnica de ferrozina (Lovley & Phillips, 1986) utilizada en USBA . Se tomó 0.1 ml de la muestra se mezcló con 5ml de HCl 0.5 N por un período de 15 minutos a temperatura ambiente, luego se tomó 0.06 ml de la mezcla anterior y se adicionaron 3ml del reactivo ferrozina y se agitó por 15 segundos, se tomaron como positivos los tubos que presentaron color rosado.



Tomada de Harris, 1992.

Figura 4. Reacción obtenida por la adición del indicador ferrozina en presencia de ión Fe+2.

5.2.2.6 Oxidadoras de hierro

Para el recuento de bacterias oxidadoras se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-3} con solución salina 0.85% concentración 1/10 (pH = 7.0), a partir de la extracción aerobia de microorganismos. Cada dilución se agitó durante 15 segundos, se tomaron 0.1ml de cada dilución y se sembró masivamente en cajas de petri con el medio de cultivo IST (Anexo1 y 2), se emplearan dos cajas por dilución. Posterior a ello se incubaron a 25° C durante 5 días aproximadamente y posteriormente se realizara el recuento UFC/g.

5.2.2.7 Actividad deshidrogenasa

Adicional se realizó una medición de actividad deshidrogenasa, la cual resulta un buen indicador para determinar actividad microbiana, ya que refleja el trabajo de un grupo de enzimas intracelulares que están presentes en la microbiota del sedimento, y hacen parte de las reacciones metabólicas involucradas en la transferencia oxidativa de energía (Cerón *et al.*, 2011). La actividad deshidrogenasa está relacionada con la medición del trifenil formazan (TPF) producto de la reducción de 2,3,4-trifeniltetrazolio (TTC) (Chaperon & Sauvé, 2007).

Se empleo una muestra de sedimento seco a temperatura ambiente, en primer lugar se homogenizo la muestra en un mortero y se paso por tamiz No 10 (2mm), se pesó aproximadamente 1.00 g por muestra las cuales se añadieron a tubos falcon de 15ml, se añadió 2 ml de sustrato solución a los tubos y 2 ml de solución tampón Tris en lugar de la

solución de sustrato en tubos blanco, se taparon los tubos, se agitaron de y se incubaron a 25 ± 1 ° C en oscuridad durante 24 h (Kumar *et al.*, 2013).

5.2.3. Análisis físico-químico

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en el laboratorio de química de la Universidad Central y en el laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.2.3.1 Humedad

Se determinó el porcentaje de humedad por el método D 2216 – 98 (ASTM, 1995). El primer paso que se realizó fue determinar el porcentaje de humedad, para el cual se pesó el recipiente seco y se tomó 20g de sedimento, luego se llevó a 100°C durante 20 horas y luego se pesó nuevamente para realizar la resta respectiva.

5.2.3.2 pH

La medición de pH a las muestras se realizó según el método 4972-01 (ASTM, 1995), se calibró el pH-metro con soluciones buffer (pH 4.0 y 7.0). Se pesaron 20 gramos de muestra en un Beaker y se adicionaron 20ml de agua destilada, se mezclaron durante 5 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora. Pasado el tiempo se colocó el electrodo de pH en la suspensión y se anotó el dato cuando la medida fue estable.

5.2.3.3 Sulfato soluble

Se empleó en método Sobek *et al.*, (1978) de extracción de azufre en ácido clorhídrico (HCl) al 40% (Anexo 3), en las muestras secas. Previo al análisis de las muestras se construyó una curva de calibración con concentraciones definidas de sulfato (5, 10, 15, 20, 30, 35 y 40 mg/L) para obtener la recta de mejor ajuste ($r^2=0,998$)

5.2.3.4 Nitrógeno total

Para la determinación de nitrógeno total se realizó la prueba de nitrógeno de Kjeldal (TKN) método 955.04-C (AOAC, 2000) (Anexo 4) en 1 gramo de muestra seca y se utilizó como control albúmina de suero bovino que presenta una concentración conocida de nitrógeno.

5.2.3.5 Carbono orgánico

El método de Walkley y Black (1934) se basa en oxidación de carbono orgánico con dicromato como patrón en medio ácido, se leyó por se leyó por espectrofotometría a 585nm. Se tomó 1 g aproximadamente de cada muestra de sedimento, luego se añadió 5ml de solución de dicromato de potasio (1N), se mezcló bien, y se agregó 10 ml de ácido sulfúrico concentrado 96% a 98% p/p y se agitó suavemente durante 5 a 10 segundos. Se dejó enfriar y se aforo con agua destilada a un volumen final de 50ml. Se dejó actuar toda la noche y finalmente se leyó por espectrofotometría, se construyó una curva patrón con concentraciones conocidas de carbono orgánico, sacarosa grado RA (mg/ml): 0.705; 5.648; 7.078; 8.469; 9.880; 2.821, finalmente se obtuvo la ecuación de mejor ajuste ($r^2=0.959$).

5.2.3.6 Metales

En la determinación de metales se utilizó el solo se utilizo el último paso de la extracción secuencial, modificado por Neculita, 2008. Finalmente se realizó la determinación de hierro, manganeso y zinc (7000 EPA, 2007) (Anexo 5) por espectrofotometría de absorción atómica de llama en el equipo Equipo varian AA 280 en curvas de calibración previamente desarrolladas con límites de detección para, Mn, Fe y Zn de, 0.05, 0.02, 0.03, mg/L respectivamente de la Universidad Central.

5.2.4. Análisis estadístico

Inicialmente se evaluó si los datos obtenidos tanto en los análisis microbiológicos y los fisicoquímicos presentaban distribución normal mediante el test de Shapiro Wilk, utilizando el programa JMP versión 9.0 (2010). Las variables microbiológicas UFC/ g_{ps} y NMP/g_{ps} no presenta normalidad ($p \geq 0.05$) por lo cual se normalizaron con logaritmo base 10 (Vallejo *et al.*, 2011).

Con el fin de determinar si la zona del humedal (entrada, medio y salida) tiene algún efecto sobre la densidad de los grupos funcionales microbianos y los parámetros fisicoquímicos se realizó una prueba de varianza (Anova) y la prueba de Turkey-Kramer con un nivel de confianza del 95% (Vallejo *et al.*, 2011).

Para establecer si las variables fisicoquímicas presentaban alguna correlación entre ellas y con la actividad deshidrogenasa se realizó en análisis no paramétrico de Spearman, PAST (Hamer & Harper, 1999-2013).

Para determinar si las variables fisicoquímicas podían explicar las abundancias de los grupos funcionales microbianos evaluados y la actividad microbiana en las diferentes regiones del humedal se utilizó un análisis de correlación canónica en el programa CANOCO 4,5 (Cajo y Smilauer, 1997-2003), en el cual se evalúa la significancia de la correlación por el test de Monte Carlo ($p < 0.05$). Las variables fisicoquímicas evaluadas presentaban unidades y escalas diferentes, por lo cual se estandarizaron primero antes de hacer el análisis de correlación canónica (Ramette, 2007).

5.2.5. Análisis de Comunidades

Con el fin de tener una aproximación y caracterización ecológica de las comunidades asociadas al sedimento se calcularon índices que permitieron evidenciar cambios en la estructura de la comunidad presente en cada zona del humedal con base a los grupos funcionales evaluados.

Para calcular la diversidad alfa de la zona de entrada, media y salida se utilizó el índice de Shannon-Weaver, él cual es uno de los más utilizados en análisis de comunidades microbianas (Atlas & Bartha, 2002) (Ecuación 2). En el índice de Shannon se determinaron las abundancias relativas (p_i) para cada zona muestreada por medio de la división de las abundancias obtenidas para cada grupo funcional ($\text{Log NMP}/g_{ps}$) sobre la sumatoria de las abundancias por zona.

$$H' = -\sum p_i \ln(p_i) \quad \text{Ecuación 2.}$$

Se construyó una curva de abundancia de grupos funcionales en orden descendente de abundancia, con el fin de determinar con cuál de los modelos teóricos de abundancias (Serie geométrica, serie Log, Log normal, y vara partida) se explican las abundancias observadas de los grupos funcionales evaluados en cada zona del humedal.

6. RESULTADOS

Es importante mencionar que al momento de realizar el muestreo (14 Febrero de 2014), el humedal no se encontraba en buenas condiciones posiblemente por falta de uso y mantenimiento. Durante el muestreo se observó que el color del afluente que estaba ingresando era totalmente transparente y diferente al afluente oscuro observado en las anteriores visitas, este color y el poco olor a sulfuro no era tan evidente como anteriormente, lo que lleva a pensar que hacía bastante tiempo no recibe drenaje de la mina. Consideramos que este factor es importante tenerlo en cuenta durante la discusión de los resultados obtenidos.

6.1 Ensayos y cuantificación de grupos funcionales microbianos

Los recuento obtenidos de los grupos funcionales empleando métodos de recuento en placa y número más probable (UFC/g_{ps} y NMP/g_{ps} respectivamente), no presentaron

distribución normal ni homogeneidad de varianzas, generalmente los recuentos presentan este tipo de distribución por esa razón se transformaron con el Log_{10} . Los datos transformados presentaron distribución normal (Shapiro-Wilk; $p \geq 0.05$) y por esta razón se emplearon pruebas paramétricas para su análisis (Anova, Turkey-kramer).

Los heterótrofos aerobios presentaron los mayores recuentos a lo largo del humedal (1×10^5 UFC/g_{ps}), seguidos por las bacterias denitrificantes (1×10^4 NMP/g_{ps}), mientras que las bacterias reductoras de hierro (BRFe) presentaron los menores recuentos (1×10^1 NMP/g_{ps}) (**Figura 5**). Los promedios obtenidos para las bacterias sulfato reductoras (BSR) y oxidadores de amonio presentaron las desviaciones más altas, lo que evidencia la heterogeneidad en sus resultados. Los recuentos de BSR, oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito estuvieron alrededor de 1×10^3 UFC/g_{ps}.

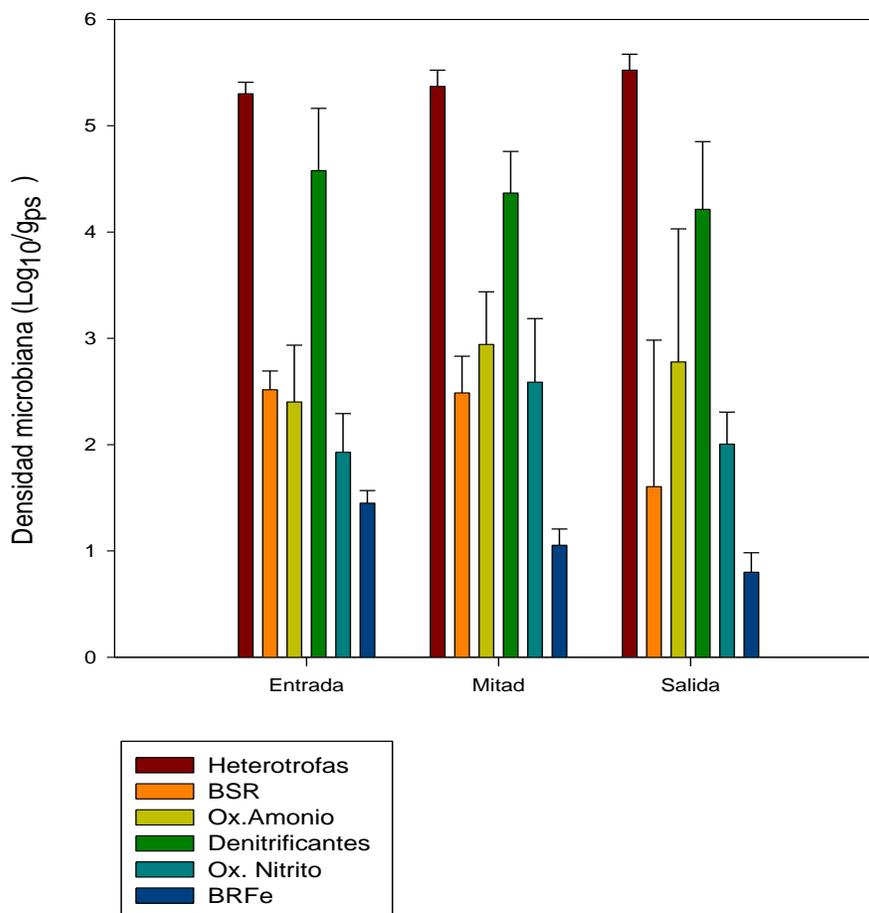


Figura 5. Densidad de grupos funcionales microbianos asociados con procesos de nitrificación, desnitrificación, sulfato reducción y reducción del hierro. Se presenta el promedio (n=3).

6.1.1 Heterótrofos

Para el recuento de heterótrofos se emplearon los medios de cultivos: R2A y agar infusión suelo (AIS). La baja concentración de nutrientes del medio R2A permitió una mayor recuperación y cuantificación de los microorganismos heterótrofos en las muestras del humedal (**Figura 6A**). Para el caso del medio AIS se presentó crecimiento abundante de algunos morfotipos lo que dificultó el recuento, ya que es un medio rico en nutrientes en el cual se evidenció dominancia de ciertos morfotipos, dada por diferencias en las tasas de crecimiento (**Figura 6B**).

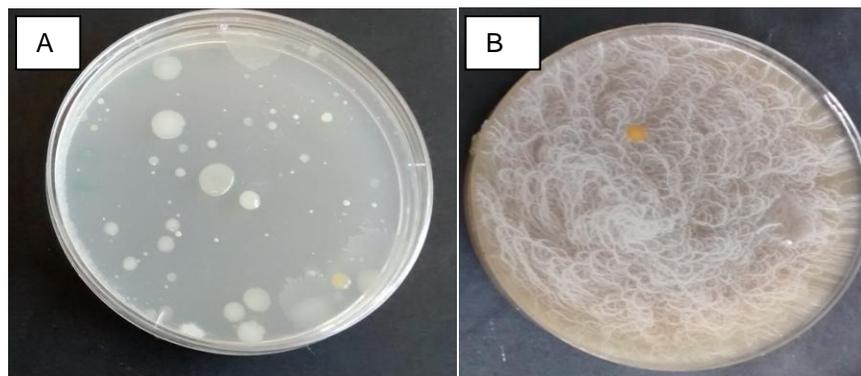


Figura 6. Recuentos de heterótrofos en el sedimento del humedal A) medio comercial R2A, muestra correspondiente a la zona de entrada, dilución $10^{(-3)}$. B) medio agar infusión suelo muestra correspondiente a la entrada dilución $1 \times 10^{(-7)}$.

Los recuentos de heterótrofos en el sedimento presentaron distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.56$) ($n=9$), por otro lado no presentaron diferencias significativas en las tres zonas evaluadas (Anova; $p=0.95$) ($n=9$), los recuentos (Anexo 6) de la sección de entrada, medio y salida fueron $2.2 \times 10^5 \pm 5.9 \times 10^5$; $3.1 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$; $3.4 \times 10^5 \pm 2.3 \times 10^5$ (UFC/ g_{ps}) respectivamente (Anexo 6).

5.1.2 Nitrificantes

Durante la determinación del número más probable (NMP) de las nitrificantes oxidadoras de amonio se evidenció el cambio de color del medio de rosado a amarillo en los pozos

con crecimiento, por la acidificación causada por la formación de nitritos (**Figura 7A**). Para verificar la producción de nitrito se utilizó el indicador difenilamina, (agente de oxidoreducción) que permite evidenciar la oxidación del amonio, por la formación de un compuesto azul (**Figura 7B**). Por otra parte durante la lectura se evidenció diferentes tonalidades de azul que complicaron la decisión del resultado, En los controles abióticos no se presentó cambio de coloración dando validez a los resultados obtenidos y confirmando que el cambio de color era originado por el crecimiento y producción de nitrito.

Respecto al resultado de los ensayos para oxidadores de nitrito no fue fácil evidenciar el crecimiento, por lo cual fue necesario la adición del reactivo de Griess, el cual permitió evidenciar el crecimiento y consumo de nitrito (**Figura 7C y D**). Los pozos que presentaron ausencia de color rosado se tomaron como positivos, el control abiótico no mostró pérdida del nitrito presente en el medio por procesos fisicoquímicos. Los recuentos para los dos grupos presentaron distribución normal para los oxidadores de amonio (Shapiro-Wilk; $p=0.768$ $n=9$) y para los oxidadores de nitrito (Shapiro-Wilk; $p=0.63$ $n=9$). No se observaron diferencias significativas en los recuentos de los dos grupos de nitrificantes a lo largo del humedal (Anova: $p=0.73$ y $p=0.21$ respectivamente) ($n=9$) (Anexo 6); se observó que a lo largo del humedal el grupo de oxidadoras de amonio presentó recuentos mayores comparados con las oxidadoras de nitrito pero estas diferencias no fueron significativas (Anova $p \geq 0,05$).

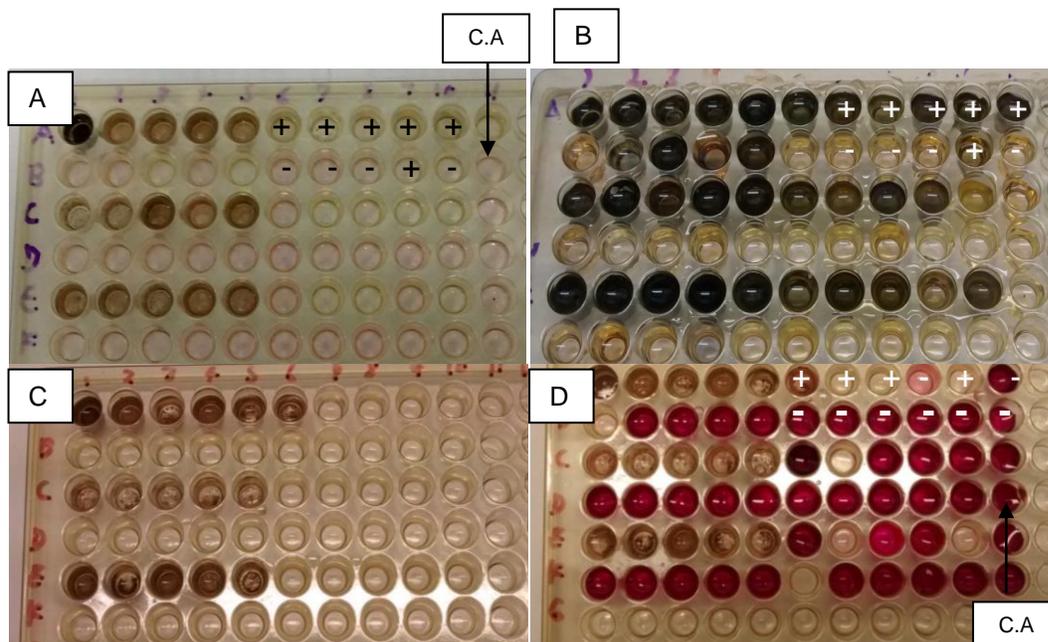


Figura 7. Recuentos de microorganismos nitrificantes A) NMP de oxidadores de amonio luego de 4 semanas de incubación, pozos amarillos evidencian crecimiento, B) NMP de oxidadores de amonio luego de agregar el indicador difenilamina, pozos azules positivos. C) NMP de oxidadores de nitrito luego de 4 semanas de incubación y D) NMP de oxidadores de amonio luego de agregar reactivo de Griess, pozos rosados negativos.

6.1.4 Denitrificantes

Las denitrificantes presentaron los segundos recuentos más altos. En los tubos donde se presentó crecimiento, luego de la adición del indicador no presentaron un cambio de color por la reducción del nitrato, y la presencia de este compuesto oxida la difenilamina produciendo el color azul observado en el control abiótico (**Figura 8**). Los recuento presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; 0.0736) (n=9) y no se presentaron diferencia significativa en las tres zonas evaluadas a lo largo del humedal (Anova: p=0.6346) (n=9) (Anexo 6).

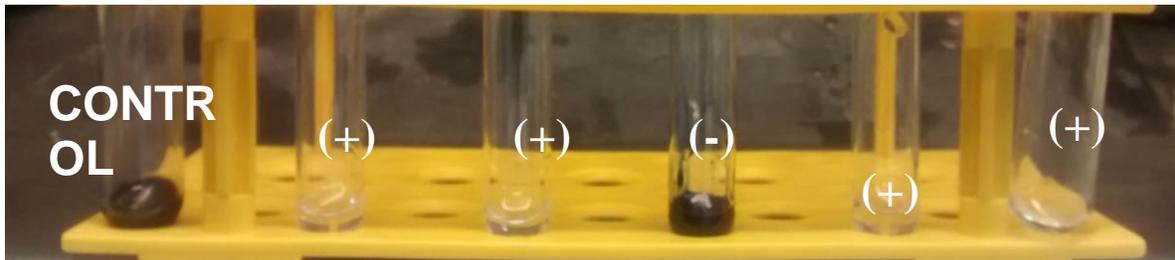


Figura 8. Lectura de número más probable para denitrificantes y control abiótico, correspondiente a una muestra de la zona de salida, dilución 10^{-2} .

6.1.3 Sulfato Reductoras

La cuantificación de BSR se realizó con la técnica NMP en medio Starkeys (Hwang *et al.*, 2003). Al terminar el período de incubación se observó la formación de un precipitado negro producto de la presencia de FeS (**Figura 9A**), sulfuro metálico producto de la reducción del sulfato y precipitación del hierro presente en el medio. Adicionalmente se corroboró la producción de H_2S con la técnica de Cord Ruwish, (1985) (**Figura 9B**), donde se tomaron como tubos positivos los que evidenciaron un color marrón luego de la adición del reactivo. Los controles abióticos tanto del medio como del reactivo indicaron una reducción dada por las BSR.

Los resultados de NMP de bacterias sulfato reductoras no presentaron diferencia significativa (Anova; $p=0.1474$) (Anexo 6) a lo largo del humedal pero es importante mencionar que en la zona de salida no se evidenció crecimiento en dos de las tres muestras analizadas.

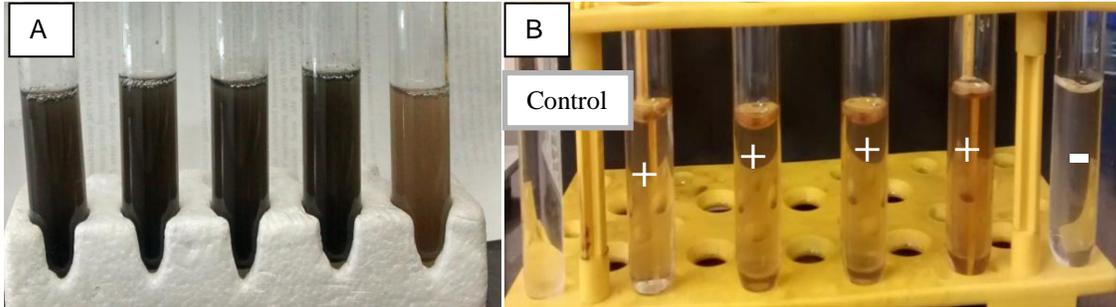


Figura 9. Técnica número más probable de sulfato reductoras A) Tubos de una muestra de la zona correspondiente a la entrada dilución 10^{-2} B) Lectura con la técnica de Cord Ruwsh.

6.1.4 Bacterias oxidadoras y reductoras del hierro

Con relación al hierro se evaluaron las bacterias reductoras y oxidadoras de este compuesto, para el recuento de oxidadoras de hierro se utilizó el medio de cultivo ISP empleado por Manning (1975); en el cual se utilizó agarosa como agente gelificante. Se ha reportado que el agar específicamente la galactosa presente, inhibe el crecimiento de bacterias oxidadoras como es el caso de *A. ferroxidans*, ya que la mayoría de organismos quimioautótrofos presentan alta sensibilidad a compuestos orgánicos como los polisacáridos presentes en el agar (Manning, 1975; Zhang *et al.*, 2013).

El medio ISP no contiene una fuente de carbono orgánica por lo cual se buscó aislar bacterias autótrofas capaces de utilizar el CO_2 presente en la atmosfera como única fuente de carbono. En los medios de cultivo no se observó una clara distinción de colonias, lo cual no permitió determinar crecimiento (**Figura 10A**). Adicionalmente se realizaron coloraciones de Gram de las cajas pero no se evidenció crecimiento bacteriano. En el control abiótico se observó cambio de color del medio de transparente a amarillo-naranja (**Figura 10B**), lo que se presenta por la oxidación química de ión ferroso lo cual

se presentó en algunas muestras. Adicionalmente se realizaron coloraciones de Gram de las cajas pero no se evidenció crecimiento bacteriano.

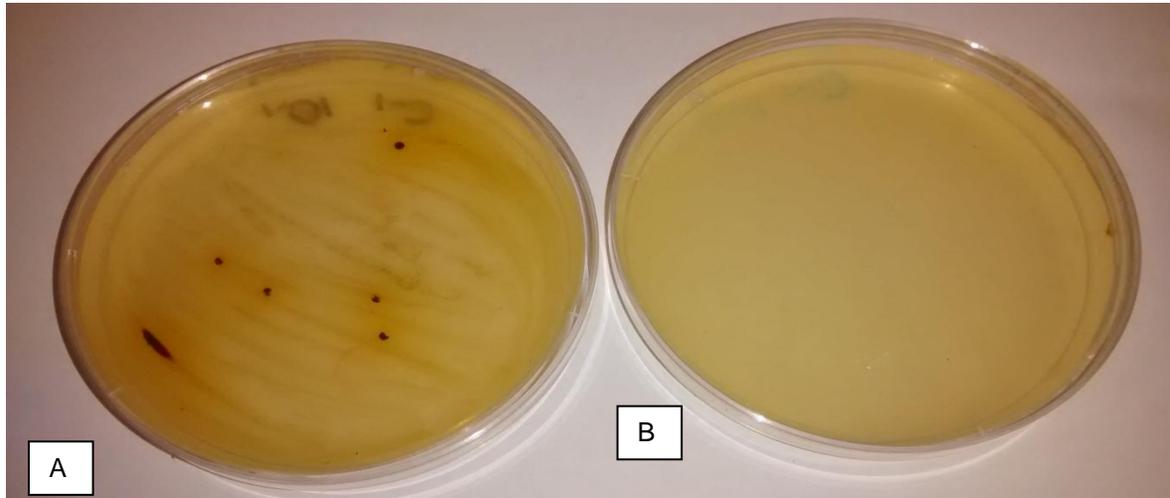


Figura 10. Medio ISP para recuento de bacterias oxidadoras de Fe^{+2} , A) Muestra correspondiente a la zona de entrada del humedal dilución 10^{-1} . B) Control abiótico luego de incubación.

La lectura de NMP para bacterias reductoras de hierro es compleja debido a la coloración fuerte del medio (**Figura 11A**), lo cual dificultó evidenciar la actividad oxidativa por cambio en la coloración del medio; se seleccionó el protocolo de ferrozina que utilizan en USBA el grupo de anaerobios. Los recuento presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.71$ ($n=9$), las desviaciones entre sus datos fueron bajas y fue el único grupo que presentó diferencia significativa a lo largo del humedal (Anova; $p=0.0060$) ($n=9$) (Anexo 6). Finalmente se observó que los recuentos de bacterias reductoras de hierro disminuyen a lo largo del humedal 1.4 ± 0.1 ; 1.0 ± 0.1 ; $0,8\pm 0,2$ ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$) respectivamente (**Figura 11 y 12**).

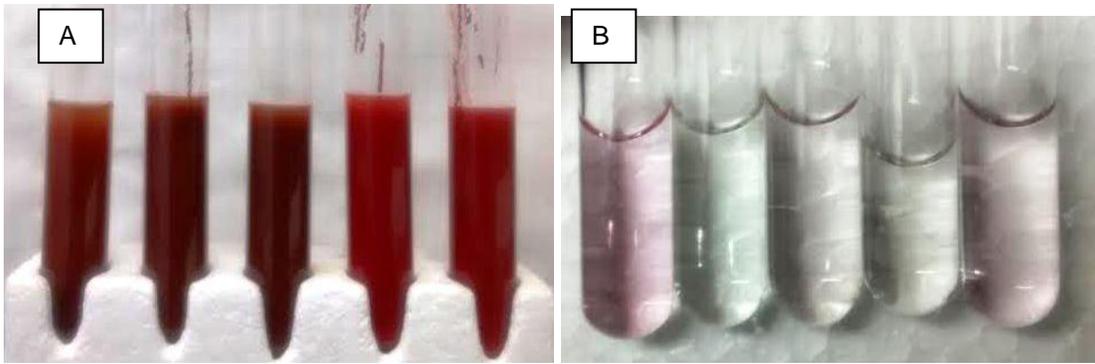


Figura 11. NMP de reductoras de hierro A) Tubos correspondientes a una muestra de la zona de la entrada dilución 10^{-1} B) Lectura final con la técnica de ferrozina de una muestra de la zona medio, dilución 10^{-2} .

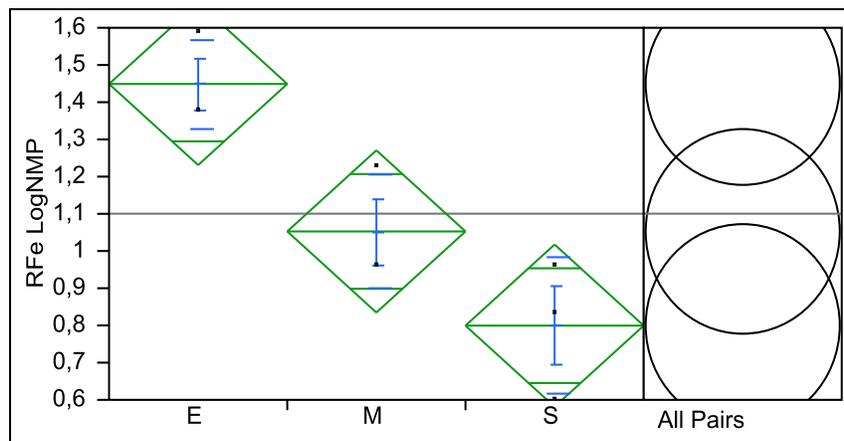


Figura 12. Recuento de las bacterias reductoras de hierro y presentación de la prueba de Turkey-kramer. Donde se observan las diferencias significativas entre las distintas zonas E= 4 ± 0.1 , M= 1.0 ± 0.1 y S= 0.8 ± 0.2 .

6.2 Actividad deshidrogenasa

Los resultados de actividad deshidrogenasa presentaron distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.57$) ($n=9$). Sin embargo los datos presentaron una alta variabilidad de la actividad microbiana dentro de cada zona. No se presentaron diferencias significativas en la actividad de las diferentes zonas evaluadas en el humedal (Anova $p=0.2682$) (Anexo 7), pese a que no fue significativa la diferencia si se pudo evidenciar una leve aumentó en la

actividad a lo largo del humedal, presentando la mayor actividad en la zona de salida **(Figura 13)**.

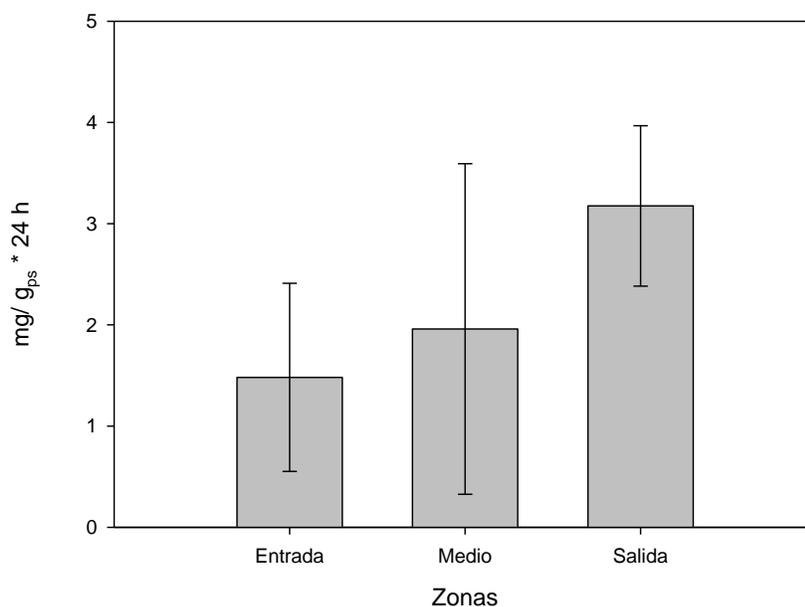


Figura 13. Actividad deshidrogenasa en los sedimentos a lo largo el humedal, (n=3)

6.3 Evaluación de los parámetros fisicoquímico del sedimento a lo largo del humedal.

6.3.1 Determinación de pH y humedad

Los parámetros de pH y humedad fueron tomados inmediatamente las muestras llegaron al laboratorio, con el fin de evitar alteraciones de las muestras. Los valores de pH presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.7197$) ($n=9$), se identificaron dos puntos extremos correspondientes a una muestra de la zona media y de la salida. No se observaron diferencias significativas en los valores de pH a lo largo el humedal (Anova $p=0.4407$) ($n=9$) (Anexo 8). El pH determinado fue 7.2 ± 0.04 ; 7.3 ± 0.15 y 7.4 ± 0.11 para las zonas de entrada, media y salida respectivamente **(Figura 8)**.

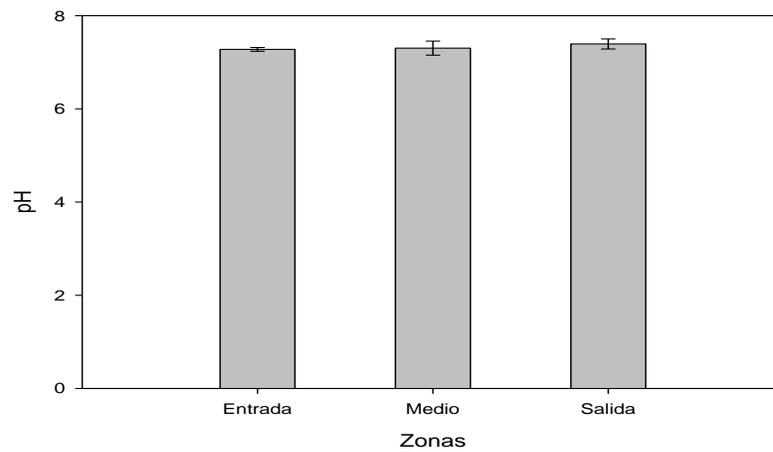


Figura 14. Valores de pH en los sedimentos en el humedal, (n=3).

Los valores de humedad presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.9881$) (n=9) (**Figura 15**). Aunque no se presentó diferencia significativa en los datos a lo largo del humedal (Anova; $p=0.1336$) (Anexo 8), si se observó una tendencia de la salida a un mayor porcentaje de humedad comparado con el resto del humedal.

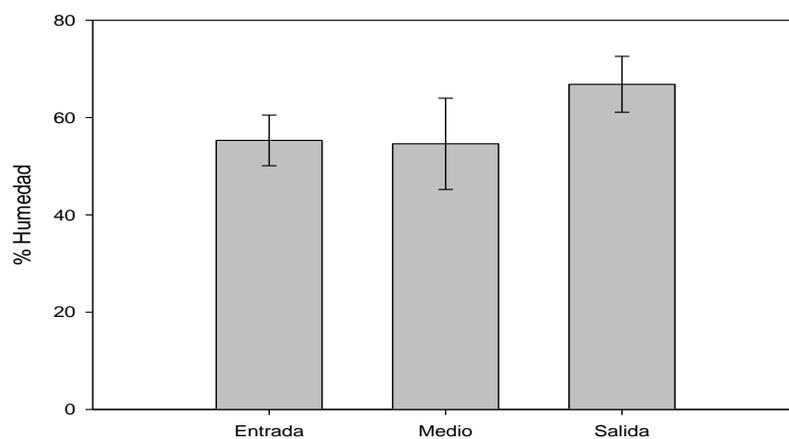


Figura 15. Porcentaje de humedad del sedimento en cada zona del humedal, (n=3).

6.3.2 Concentración de sulfato soluble

Durante el análisis de sulfato se presentó un dato extremo, el cual fue eliminado para el análisis, por tal razón el promedio de salida solo cuenta con dos datos. Se determinó una distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk; $p=0.56$) ($n=8$). Se observó una concentración significativamente mayor de sulfato en la zona de entrada del humedal (1306 ± 85.9 mg/Kg_{ps}), la cual se redujo significativamente en la zona media (255.5 ± 43.2 mg/Kg_{ps}) y luego volvió a aumentar en la zona de salida (511.6 ± 249.3 mg/Kg_{ps}) lo que presentó diferencia significativa en los datos a lo largo del humedal (Anova; $p=0.0004$) (**Figura 16**) (Anexo 8).

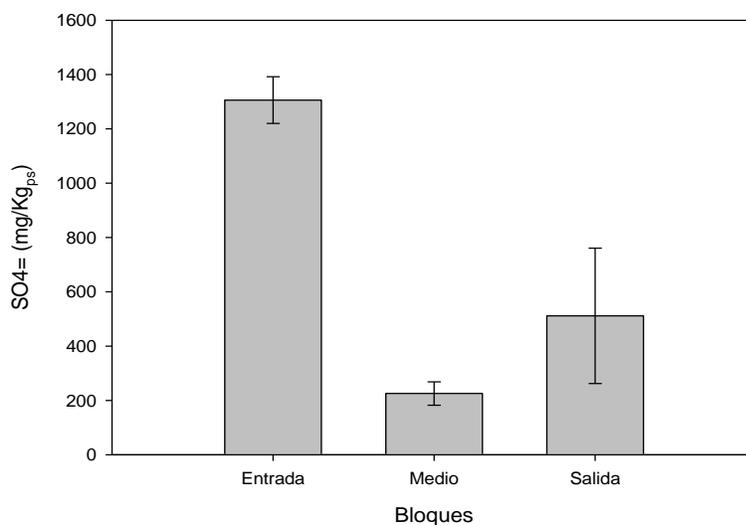


Figura 16. Concentración de sulfato en los sedimentos a lo largo del humedal.

6.3.2 Concentración de metales (Fe, Mn y Zn)

Para el caso de los metales se determinó hierro, zinc y manganeso los cuales según estudios previos de la Universidad Central (2011) son los más abundantes y tóxicos presentes en el drenaje que recibe el humedal de la mina la Ventura. Para el caso

específico de hierro se identificó un valor extremo correspondiente a una muestra de la zona media y el cual no fue tenido en cuenta para el análisis de los datos. Los datos no presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.0120$) ($n=8$) (Anexo 8). Se identificó una concentración significativamente mayor de hierro total en la zona media comparado con el resto del humedal (**Figura 17**).

En la evaluación de manganeso y zinc los datos presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.9292$ y $p=0.5472$, respectivamente ($n=9$) y para ningún de los dos metales se presentó diferencia significativa entre las concentraciones en las zonas evaluadas (Anova; $p=0.95$ $p=0.16$ respectivamente) ($n=9$) (Anexo 8) (**Figura 18**).

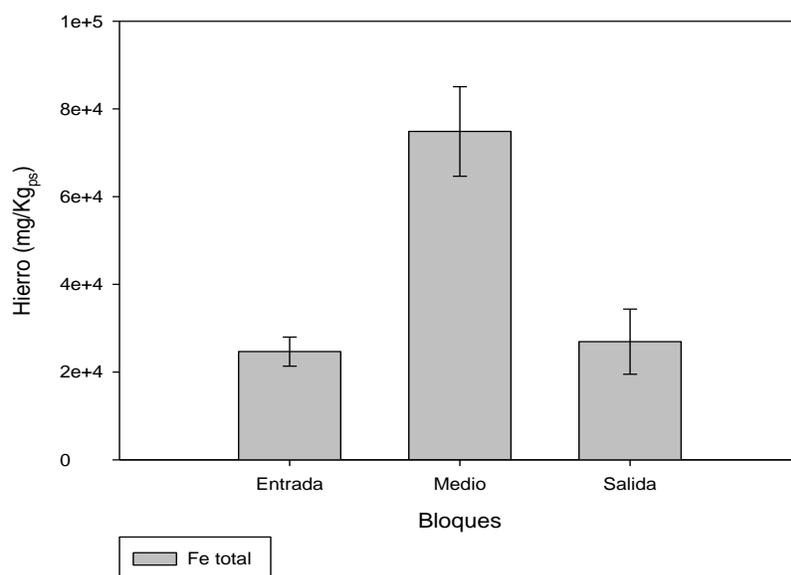


Figura 17. Concentración de hierro total en las zonas de entrada, medio y salida del humedal, ($n=3$).

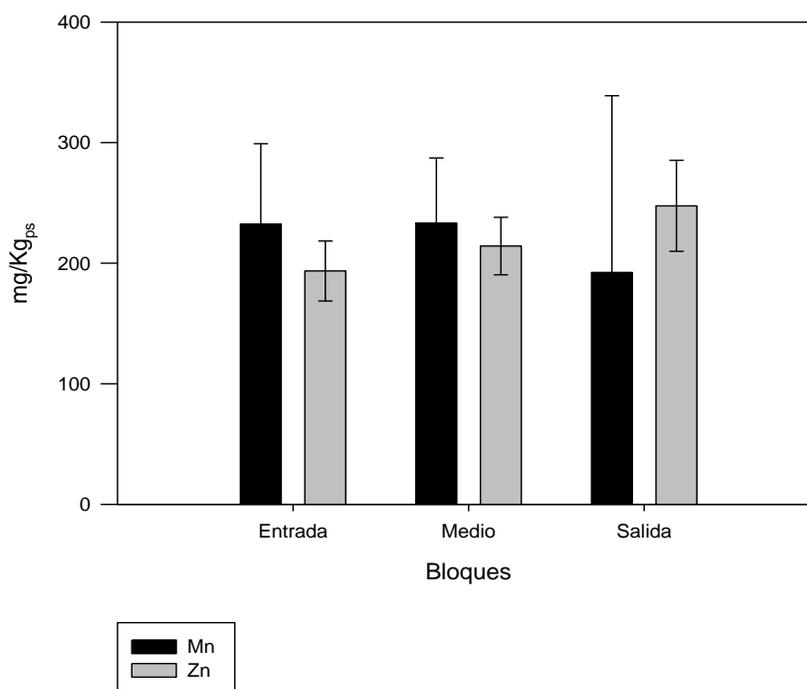


Figura 18. Concentración de Manganeso y Zinc en los sedimentos a lo largo del humedal, (n=3).

6.3.3 Carbono orgánico en los sedimentos del humedal

Los datos de carbono orgánico presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.5968$) ($n=9$) no se presentó diferencia significativa entre las concentraciones promedio de las zonas (Anova; $p=0.6483$) ($n=9$) (**Figura 19**) (Anexo 8).

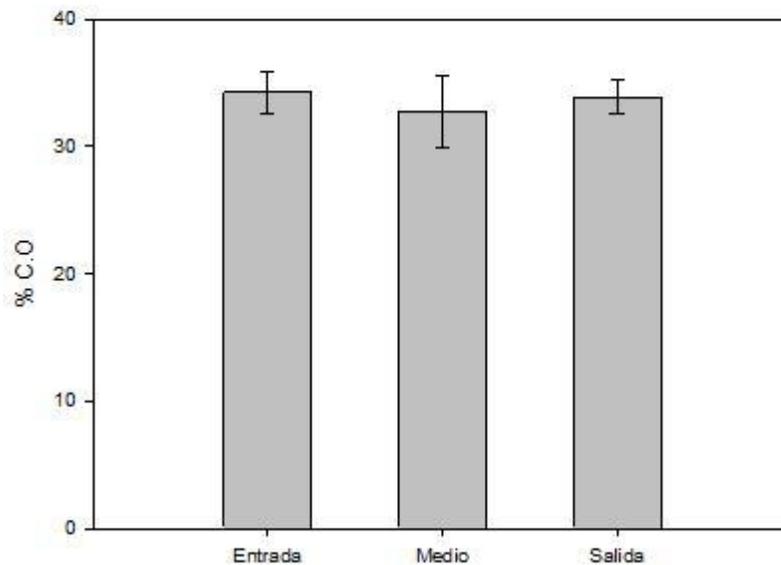


Figura 19. Porcentaje de carbono orgánico en el sedimento a lo largo el humedal, se presenta el promedio (n=3).

6.3.4 Concentración de nitrógeno total

El análisis de nitrógeno total se determinó con la técnica de Kjeldahl para el cual se utilizó una muestra control de albúmina con una concentración conocida de nitrógeno, pero el resultado del control obtenido en el análisis no corresponde al esperado, la técnica fue repetida varias veces y en todas se presentó el mismo problema con la muestra control.

Los datos obtenidos no presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk; $p=0.0147$) (n=9) no se presentó diferencia significativa entre las concentraciones promedio de las zonas (Anova; $p=0.6483$ n=9) (**Figura 20**) (Anexo 8).

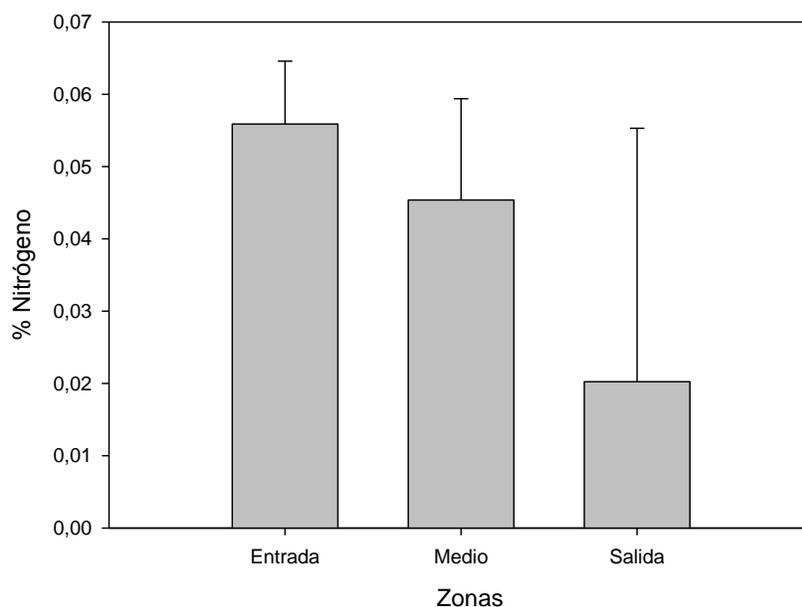


Figura 20. Porcentaje de nitrógeno presente en el sedimento a lo largo del humedal, se presenta el promedio (n=3).

6.4 Correlación entre los parámetros evaluados.

Como se mencionaba anteriormente el humedal es un ecosistema en el cual se presenta un conjunto de relaciones entre parámetros ambientales, fisicoquímicos y biológicos por lo cual algunos parámetros fisicoquímicos pueden estar relaciones entre sí, lo cual le concede propiedades particulares a los sedimentos,

6.4.1 Correlación entre los parámetros fisicoquímicos

Con el fin de determinar la posible correlación entre los parámetros fisicoquímicos evaluados se realizó el test de Spearman (Tabla 2), se identificó correlaciones significativas del pH con el hierro (0.05), pH con manganeso (-0.05), humedad con sulfato (-0.02) y Zinc con pH (0.04).

6.4.2 Efecto de los parámetros fisicoquímicos evaluados sobre la actividad deshidrogenasa.

Para evaluar el efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la actividad deshidrogenasa, se realizó el test de Spearman (Tabla 2), el cual indico que las variable que está presentando influencia significativa sobre la actividad microbiana son de forma positiva el manganeso ($p = 0.02$) y el sulfato una correlación negativa ($p = -0.01$) (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis no paramétrico de Spearman, correlación de variables entre variables fisicoquímicas con la actividad microbiana (DHs).

	pH	Humedad	CO	FeT	Mn	Zn	SO4	Nitrogeno	Ac_DHs
pH		0,17409	0,208	0,93717	0,90145	0,043917	0,78077	0,96808	0,28596
Humedad	0,49638		0,2023	0,76149	0,8911	0,25866	0,96229	0,13721	0,40961
CO	0,4643	0,46947		0,85939	0,52092	0,64415	0,19198	0,51893	0,63233
FeT	0,030867	-0,11846	-0,069299		0,46071	0,78874	0,095352	0,77405	0,27677
Mn	-0,048468	0,053582	-0,24745	0,28292		0,82992	0,2149	0,47836	0,96427
Zn	0,67988	0,42138	-0,17942	-0,10465	0,083979		0,38495	0,14587	0,11048
SO4	0,10868	-0,018514	0,47906	-0,58872	-0,45815	-0,33055		0,21286	0,97515
Nitrogeno	0,015673	-0,53563	0,24859	0,11208	-0,27234	-0,52591	0,45995		0,39806
Ac_DHs	0,40011	0,31462	-0,18574	-0,40714	0,017544	0,56817	-0,012198	-0,32202	

(Valor menor a 0.05 indica correlación entre las variables, el signo (-) o (+) define el carácter de la correlación)

6.4.3 Efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la densidad de los grupos funcionales microbianos

Relacionar un patrón con procesos ecológicos no es una tarea sencilla ya que la abundancia y distribución en este caso de los grupos funcionales son variables dependientes que son determinadas por dos conjuntos de variables independientes: el ambiente físico y otras especies (Diamond 1986). Para el modelo de análisis canónico se ingresaron los datos de abundancias (LogNMP o LogUFC/ g_{ps}) con todos los resultados

obtenidos para los parámetros fisicoquímicos utilizado para correlacionar dichos parámetros no se ajustó con los datos empleados, el test de significancia para todos los ejes canónicos arrojó $f = 2.42$ y

$p = 0.16$, lo que evidencia que los parámetros fisicoquímicos no pueden describir la distribución y abundancia de los grupos funcionales evaluados, para dicho análisis se eliminó los valores de Zinc ya que era una variable que inflaba el modelo. Pero pese a eliminar las concentraciones de Zinc, el resto de variables no presentaron una correlación significativa ($p = 0.051$) (**Figura 21**).

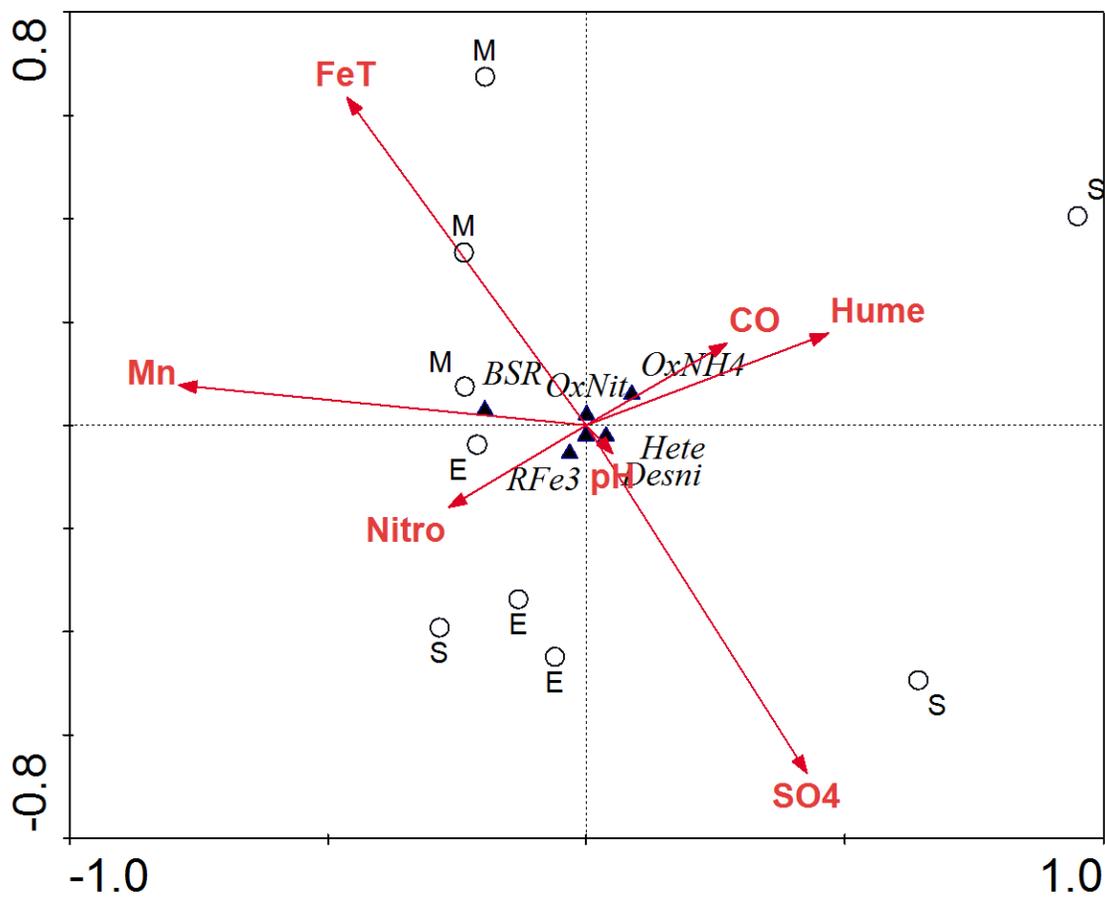


Figura 21. Análisis canónico, CANOCO 4.5

6.5 Análisis de las comunidades microbianas asociadas al sedimento del humedal.

Se identificó que la comunidad de la zona media del humedal presentó la mayor abundancia respecto a la zona de entrada y salida. El único grupo funcional que presentó una diferencia significativa a lo largo del humedal y además presentó la menor abundancia de los grupos funcionales evaluados, corresponde a las bacterias reductoras de hierro. Frente a los resultados obtenidos se identificó que la riqueza de la comunidad microbiana asociada a los sedimentos de cada zona fue la misma. La diversidad funcional en este estudio se estableció respecto a las capacidades metabólicas y efectos en los ciclos biogeoquímicos, en los cuales se observaron índices muy similares en las tres zonas evaluadas lo que evidenciaría la homogeneidad de la comunidad a lo largo del humedal (Tabla 5).

La composición de la comunidad de los grupos funcionales evaluados no presentó diferencia en el patrón de abundancia y riqueza observado a lo largo del humedal (**Figura 22**) (Tabla 3 y 4). Posiblemente, la aproximación empleada en este estudio no permitió evidenciar un gradiente biológico que ha sido descrito en otro tipo de humedales. Y respecto a los tipos de abundancia se identificaron tres clases los grupos comunes (Heterótrofos y Denitrificantes) que corresponden a los grupos funcionales dominantes, la clase intermedia (Oxidadoras de amonio, Sulfato reductoras y Oxidadoras de nitrito) y la clase referente a las especies raras (Reductoras de hierro). Abundancias que se acomodan al modelo Log Normal el cual es el modelo que más se acomoda a las abundancias obtenidas (**Figura 22**), modelo que resulta intermedio en la presencia de dominancia y equitatividad, resulta el modelo más común en la mayoría de las comunidades.

Tabla 3. Abundancias de los grupos funcionales para cada zona evaluada en el humedal.

Grupo Funcional	Abundancias (Log/g_{ps})			F	P
	Entrada	Mitad	Salida		
Heterótrofos	5.30	5.37	5.52	0.05	0.9475
BSR	2.52	2.49	1.60	3.21	0.1474
Oxidadoras de Amonio	2.40	2.94	2.78	0.33	0.7316
Denitrificantes	4.58	4.37	4.21	0.49	0.6346
Oxidadoras de Nitrito	1.93	2.59	2.00	2.02	0.2128
Reductoras de hierro	1.45	1.05	0.80	13.50	0.0060*
Abundancia total	18.17	18.80	16.92		

Tabla 4. Riqueza funcional del humedal respecto a 7 grupos funcionales evaluados en los sedimentos de las tres zonas evaluados en el humedal.

Zona del humedal	Riqueza Funcional
Entrada	6
Medio	6
Salida	6

Tabla 5. Índices de diversidad funcional del sedimento del humedal.

	Entrada	Media	Salida
Shannon-Weaver	1.69	1.69	1.63

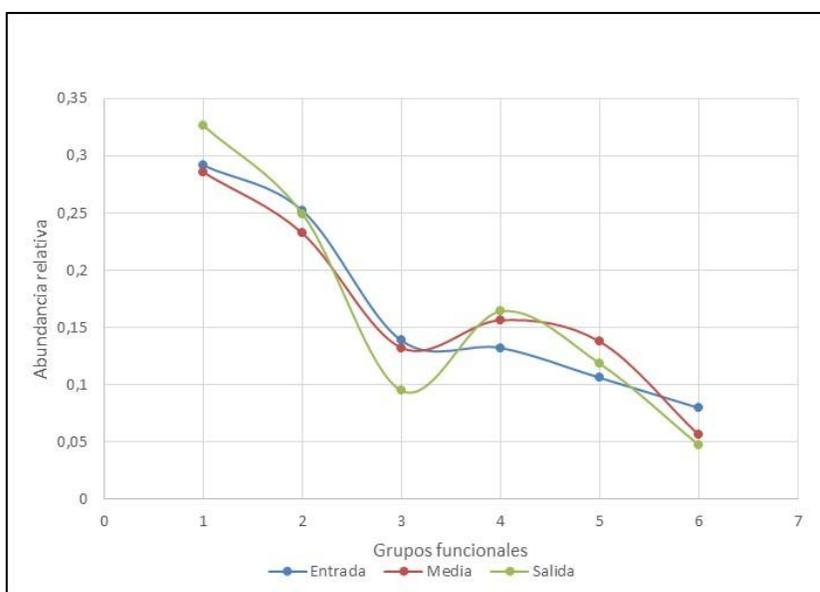


Figura 22. Curvas de abundancia de los grupos funcionales identificados en cada zona de muestreo del humedal.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la construcción de humedales se busca imitar todas las características (físicas, químicas y biológicas) propias de los humedales naturales, con el fin de obtener un funcionamiento similar y lograr que este ecosistema artificial se comporten como filtro biogeoquímico de contaminantes (Kosolapov *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2007). En el caso del humedal de este estudio se busca principalmente la remoción de sulfatos y metales (Fe^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2}) a través de procesos químicos y biológicos realizados principalmente por las plantas (*Typha sp*) y microorganismos presentes en los sedimentos.

Diferentes estudios han identificado que gran parte de los procesos que ocurren en los humedales se presentan en los sedimentos, los cuales funcionan como sumideros de metales y nutrientes. Generalmente, los sedimentos son anaerobios y se caracterizan por presentar una amplia diversidad de donadores y aceptores de electrones que controlan el metabolismo presente (Hallberg & Johnson, 2005).

Durante el presente estudio se analizaron variables fisicoquímicas y microbiológicas en tres zonas del humedal para describir algunos de los principales procesos relacionados con los ciclos del nitrógeno, hierro y azufre presentes en los sedimentos de un humedal construido para el tratamiento del drenaje de una mina de carbón.

Se identificó la presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR) en los sedimentos y una reducción del sulfato a lo largo del humedal concentrada en la zona media evidenciada por la acumulación de hierro en la zona media, dada por la precipitación con el sulfuro producido. Estos resultados confirman la viabilidad del uso de estos sedimentos como inóculo en los reactores pasivos para el tratamiento de drenajes ácidos de minería en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA).

Inicialmente en esta sección se discutirán los resultados de los parámetros fisicoquímicos obtenidos para una mejor comprensión de las condiciones a las que se encuentran las comunidades microbianas. Posteriormente, se estableció la relación entre estos parámetros y las abundancias y distribución de los grupos funcionales evaluados. Finalmente, se realizó una descripción ecológica enlazando los resultados obtenidos con los conceptos ecológicos.

7.1 Parámetros físico-químicos de los sedimentos.

El estudio de los parámetros fisicoquímicos en las 3 zonas del humedal buscó evidenciar la presencia de un gradiente. El hierro total presentó concentraciones significativamente mayores en la zona media ($74,852.7 \pm 10,210.0$ mg/Kg_{ps}) que en las zonas inicial y final ($24,676.2 \pm 3,311.0$ y $26,938.2 \pm 7,425.0$ mg/Kg_{ps}, respectivamente). En el monitoreo realizado por la universidad Central al humedal durante las 34 semanas posteriores a su construcción (2009) se determinó que la concentración de Fe (+2) en el afluente fue entre 2,1 a 31.9 mg/Kg_{ps} y en el efluente de 1,1 a 29,7 mg/Kg_{ps} (Riaño, 2011). Estos resultados indican que el humedal estaba cumpliendo su función removiendo hierro y acumulándolo en los sedimentos. Lo cual concuerda con estudios previos que han descrito que el aceptor de electrones con mayor concentración en los sedimentos es generalmente el Fe (+3) en comparación con otros aceptores de electrones como el oxígeno, nitrato o sulfato (Lovley & Phillips, 1986).

Los sedimentos en el humedal juegan un papel importante en la acumulación de metales por procesos físicos como es el caso de la sedimentación y procesos biológicos como es la inmovilización de sulfuros metálicos por acción de las bacterias sulfato reductoras y precipitación de metales (Hallberg & Johnson, 2005). Estos procesos de acumulación pueden explicar las elevadas concentraciones de Fe observadas en los sedimentos. Otro punto de gran importancia en la remoción de metales está relacionado con las plantas como en el caso de *Typha* spp, por su alta capacidad de absorber hierro y manganeso en los humedales artificiales para tratar DAM. Reportes como el de Smith (1997) mostraron remociones de hierro de 20-25 mg/L a 1 mg/L y de manganeso de 30-40 mg/L a 2 mg/L en un humedal con presencia *Typha*.

La mayor acumulación de hierro en la zona media pudo ser causada por un lado por la acción de las bacterias sulfato reductoras que presentaron la mayor densidad en la zona media del humedal y por otro lado por las características físicas y químicas de los sedimentos en esta zona. En esta sección del humedal se observó una capa más gruesa de sedimentos con una mayor concentración de materia orgánica que facilitaría la presencia de condiciones anaerobias mayores y una disminución en el potencial redox del sedimento favoreciendo la precipitación de hierro y su acumulación (Hernández, 2010). Por otro lado, la mayor concentración de hierro en esta zona puede estar correlacionada con la mayor densidad de plantas evidenciada en dicha zona comparada con el resto del humedal, la posible liberación de este metal después de su muerte. Por esta razón, es importante el mantenimiento de los humedales removiendo las plantas antes de su degradación (Lahora, 2013).

Las altas concentraciones de manganeso encontradas en los sedimentos (232.5 ± 66.6 , 233.3 ± 54.0 , y 192.4 ± 146.5 mg/kg_{ps} en las zonas de entrada, media y salida, respectivamente) evidencian las altas concentraciones de este metal en el afluente (0.8 ± 1.3 mg/L) (Riaño (2011) y la alta capacidad de acumulación en los sedimentos del humedal. Estas concentraciones observadas son significativamente mayores a las reportadas por Riefler y col. (2008) donde determinaron concentraciones de 4.15 ± 5.62 mg/Kg en un humedal empleado para el tratamiento de DAM.

Se sabe que el zinc actúa como un cofactor enzimático en más de 200 enzimas, pero en altas concentraciones puede reducir la proteína y contenido de ATP, por lo cual se vuelve tóxico para muchos organismos (Vega *et al*, 2007). En la mayoría de humedales el Zn no resulta un compuesto tóxico para la actividad microbiana ya que se ha reportado bacterias que toleran hasta 100 mg/L de Zinc (Ozbelge et al., 2007); sin embargo, las concentraciones en los sedimentos en nuestro estudio superan los 200 mg/Kg_{ps} que pueden estar afectando la actividad microbiana. La poca densidad de BSR puede estar contribuyendo a esa disminución de actividad ya que se ha identificado que el sulfito controla las altas concentraciones de metales pesados y su toxicidad (Zayed & Winter, 2000). Por otra parte Vega y col. (2007) han reportado que la concentración máxima de Zn tolerable para los microorganismos en los sedimentos es del 711.1 mg/Kg.

El siguiente parámetro que presentó diferencia significativa en las 3 zonas evaluadas fue el sulfato. Este compuesto fue significativamente mayor en la entrada del humedal ($1,306.0 \pm 86.0$ mg/Kg_{ps}) como consecuencia de los sulfatos presentes en el drenaje. La

Universidad Central reportó una concentración promedio de 262.1 ± 1 mg/L en el afluente del humedal y después de 5 años acumulándose por mecanismos físicos y químicos en los sedimento es normal encontrar estas altas concentraciones en los sedimentos. En la zona media se presentó una concentración significativamente menor de sulfatos (225.5 ± 43.2 mg/Kg_{ps}), lo cual puede estar asociada la mayor actividad de BSR, por lo cual se puede presentar acumulación de sulfuro en la zona media, el cual precipita junto al hierro acumulándose en la zona media. Hacia la zona de salida del humedal se observó un ligero aumento de los sulfatos el cual no fue significativo pero podría indicar una oxidación de los productos de la reducción en los ciclos de azufre y de hierro causado por el oxígeno liberado de las raíces de las plantas y actividad de bacterias oxidadoras de azufre (Faulwetter *et al.*, 2009).

El pH es un parámetro de gran importancia en la microbiología de los humedales empleados en el tratamiento de drenajes de mina (Hallberg & Johnson, 2005) especialmente para el tratamiento de drenajes ácidos. Sin embargo, en el presente estudio se determinó que debido al carácter neutro del drenaje los valores de pH en las diferentes zonas no presentaron cambios significativos y siempre se mantuvo en un rango neutro (7.3 ± 0.06). El pH no presentó una correlación directa con las abundancias de los grupos funcionales microbianos evaluados. Estos resultados contrastan con lo observado por Rioux y Fortin (2003) donde determinaron que el pH de los sistemas que contienen residuos alcalinos era relativamente estable pero se veía afectado por la presencia de bacterias reductoras de hierro y BSR.

El carbono orgánico es un parámetro que presenta una relación importante con el crecimiento y desarrollo de la población de heterótrofos, interviene de forma directa o indirecta en la dinámica de los grupos funcionales evaluados. En el caso de las bacterias heterótrofas (aerobias, denitrificantes y BSR) utilizan fuentes de carbono orgánicas de fácil degradación, y en algunos casos los utilizan como donadores de electrones necesarios para la obtención de energía (Casasus *et al.*, 2005; Faulwetter *et al.*, 2009). Las altas concentraciones de carbono orgánico, presentes en los sedimentos, provienen en parte de la degradación de la capa de materia orgánica inicialmente adicionada al humedal compost, estiércol, material vegetal y los exudados liberados de las raíces de plantas (Chen *et al.*, 2014) lo que justificaría que a pesar de la actividad microbiana la concentración de carbono permanece estable a lo largo del humedal.

7.2 Cuantificación grupos funcionales microbianos estudiados en los sedimentos del humedal en relación con los parámetros fisicoquímicos analizados.

El grupo de heterótrofos presentó los recuentos más altos frente a los otros grupos funcionales estudiados, presentando promedios: $2.0 \times 10^5 \pm 1.28$, $2.3 \times 10^5 \pm 1.4$, $3.3 \times 10^5 \pm 1$ (UFC/g_{ps}) en la entrada, zona media y la salida, respectivamente. Resultados semejantes a los reportados por Samsó y García (2014) quienes obtuvieron los recuentos más altos para este grupo funcional por su amplia diversidad metabólica que permite una amplia distribución, así como ser excelentes competidores por sus elevadas tasas de crecimiento.

En el humedal se cuantificaron las bacterias heterótrofas bajo condiciones aerobias, por lo cual presentaron una competencia con las bacterias oxidadoras de hierro y nitrificantes por utilizar el oxígeno presente en los sedimentos como aceptor final de electrones. Siendo las heterótrofas, las bacterias reportadas con tasas de crecimiento mayor comparadas a las nitrificantes y oxidadoras de hierro (Gómez, 2007; Latorre, 2007; Samsó & García, 2014; Weber *et al.*, 2006).

Por otra parte los recuentos de heterótrofos (16×10^5 UFC/g) obtenido por Pérez y colaboradores (2011), en un humedal empleado en el tratamiento de agua residual doméstica, resultado distante de los reportados en el estudio, lo que resulta similar a lo encontrado por Ellis y col. (2003), donde establece que la densidad de bacterias cultivables presenta una relación inversa con la concentración de metales pesados, evidencia que permite plantear que las altas concentraciones de hierro, zinc y manganeso presentes y la falta de materia orgánica en los drenajes explica los bajos recuentos de heterótrofos respecto a los humedales que tratan aguas residuales.

Como se mencionó anteriormente es posible que las lentas tasas de crecimiento de las bacterias nitrificantes no les permitió ser buenas competidoras por oxígeno disponible frente a las heterótrofas, para el caso de oxidadoras de amonio los recuentos en las zonas de entrada, medio y salida fueron; 377.9 ± 339.4 ; $1.3 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$ y $4.3 \times 10^3 \pm 7.0 \times 10^3$ (NMP/g_{ps}) respectivamente. Para las oxidadoras de nitrito se obtuvieron recuentos 104.0 ± 7.4 ; 639.5 ± 638.5 ; 117.7 ± 76.6 (NMP/g_{ps}) respectivamente. Relación semejante a los reportes promedio presentados por Truu y colaboradores en el 2009 ($3.2 \times 10^7 - 1.2 \times 10^9$; $5.6 \times 10^3 - 2.4 \times 10^5$) respectivamente para oxidadoras de amonio y oxidadoras de nitrito, quienes establecen como la presencia de oxidadores de nitrito está ligada a la presencia

de oxidadores de amonio, debido a que el nitrito utilizado es producto de la oxidación del amonio. Faulwetter y colaboradores, 2009 reportaron la importancia de las plantas en la dinámica de las bacterias nitrificantes en humedales, en el presente estudio *Typha sp* les proporciona una zona aerobia alrededor de sus raíces que permite su crecimiento, pero no es una actividad representativa bajo inundación como en los sedimento de la profundidad del humedal. Los sedimentos presentaron el pH óptimo para la nitrificación, procesos que presenta gran especificidad de pH entre 7.0 y 8.0 (Truu *et al.*, 2009). Otro punto limitante en la abundancia de nitrificantes autótrofas en el sedimento pudo ser la concentración de carbono inorgánico presente en el sistema (Truu *et al.*, 2009).

Respecto a los resultados obtenidos de las bacterias oxidadoras de hierro, es importante mencionar que la dificultad en la cuantificación no permite asegurar la ausencia de bacterias oxidadoras del ión ferroso en el humedal, ya que no fue posible realizar un control biótico de una cepa oxidadora de hierro que permitiera evidenciar la calidad del medio para el recuento de dicho grupo funcional, por lo cual la ausencia de crecimiento puede explicarse en parte con la selección del medio. Si por el contrario se plantea que efectivamente la actividad oxidadora de hierro en los sedimentos es baja, algunas razones para explicarlo serian; 1) bajo condiciones neutras la tasa de oxidación abiótica es mayor respecto a la biológica (Weber *et al.*, 2008). 2) por otro lado a la fecha se han identificado pocos género bacterianos que oxiden el hierro bajo condiciones neutras y aerobias, tal es el caso de Gallionella, Leptothrix y Marinobacter (Petrie *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2008).

Las bacterias denitrificantes presentaron los mayores recuentos después de las heterótrofas y no se observaron diferencias significativas a lo largo del humedal. La presencia y actividad de estas bacterias está asociada a las concentraciones de nitrato como aceptor de electrones, y carbono orgánico disponible como donador de electrones, aunque las bacterias sean aerobias facultativas la tasa de denitrificación se incrementa aceleradamente bajo condiciones anaerobias (Florinsk *et al.*, 2004). Según Vallejo y col. (2011) la disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente degradables estimula la denitrificación, lo que puede estarse presentando por los productos de la abundante actividad vegetal presente en el humedal. Lo que está relacionado con los resultados de Lin y col. (2002) quienes concluyen como la remoción de nitrato aumentó significativamente en un humedal con comunidades vegetales comparado con un

humedal sin plantas. Infortunadamente, durante el presente estudio no se determinó la especiación del nitrógeno por limitaciones presupuestales pero esta información podría ser muy útil, ya que determinar la concentración de nitrato y amonio permitiría comprender mejor las dinámicas asociadas a los grupos funcionales tanto de los denitrificantes como los resultados y diferencias entre los grupos nitrificantes.

Otros factores a tener en cuenta en la actividad denitrificante son el pH y la temperatura, se ha reportado que su rango óptimo de pH está entre 6-8, cercano a 5 se reduce y a pH inferior a 4 se inhibe la actividad (Faulwetter *et al.*, 2009). Por lo cual la neutralidad del drenaje permite que la denitrificación resulte un proceso dominante. Respecto a la temperatura éste proceso se acelera con el aumento en la temperatura por lo cual Faulwetter y colaboradores reportan en los sedimentos de la temperatura se es elevada comparada con los suelos por lo cual la actividad reductora se intensifica.

El grupo funcional que presentó la menor abundancia en el humedal corresponde a las bacterias reductoras de hierro (NMP/g_{ps} 28.9± 8.4; 11.8±4.5; 6.7±2.6) a pesar de las altas concentraciones de hierro determinadas en el sedimento del humedal (Anexo 8) (promedio total de los sedimentos del humedal 42155,7±28339 mg/Kg_{ps} hierro total. El Fe tiene baja solubilidad a pH neutro, por lo que precipita fácilmente en forma de Fe⁺³ en hidróxidos, esto lo hace más abundante en los sedimentos (Weber *et al.*, 2008), la baja concentración de bacterias reductoras de Fe (+3) se pudo presentar debido a la baja solubilidad que presenta el hierro a pH neutro, el cual corresponde al pH (≈7) de los sedimentos a lo largo del humedal. Otra hipótesis está relacionada con la idea que compuestos como la glucosa, malato, y etanol estimulan dicha reducción pero productos de fermentación como acetato, propionato, y butirato hayan podido inhibirla (Jones *et al.*, 1984). Estudios de Lovley & Phillips, 1986 presentan que no hay evidencia microbiológica para la oxidación significativa de la materia orgánica con Fe (+3) como aceptor de electrones y son principalmente las bacterias sulfato reductoras y metanogénicas las que bajo condiciones anaerobias presentan las mejores tasas de degradación.

En los humedales asociados al tratamiento de drenajes de mina uno de los grupos funcionales microbianos de mayor interés son las bacterias sulfato reductoras (BSR), ya que se ha reportado como la reducción del SO₄⁼ por parte de las BSR contribuye con la remoción de metales y sulfatos, principales componentes de los drenajes de mina. Y por

otra parte los sedimentos del humedal se conocen como un hábitat óptimo para dicho grupo bacteriano, en parte por sus condiciones anaerobias (Sheoran *et al.*, 2010).

Los recuentos promedio en las zonas de entrada, medio y salida de BSR fueron (255.4±140.8; 1013.2±252.8; 81.28±50.7 respectivamente, donde se puede evidenciar que pese a que no se presenta una diferencia significativa entre los tres zonas del humedal al utilizar las unidades en Log₁₀, en la sección de salida se obtuvo una menor densidad y una gran variabilidad en los recuentos dentro de las mismas zonas. Estos recuentos son menores respecto a la densidad promedio 850 UFC/ml de BSR reportada anteriormente para el sedimento de dicho humedal (Riaño, 2011). Las concentraciones de BSR en sedimentos de humedales naturales y construidos para el tratamiento de drenajes de mina determinados en estudios previos fueron; 22 x 10⁶ NMP/g (Riefler *et al.*, 2008); 10⁵-10⁷ UFC/g (Fortin *et al.*, 2000), 1,5 x 10⁷ NMP/ ml (Vester & Ingvorsen, 1998), densidades mucho mayores a las encontradas en el presente estudio. Resultan densidades cercanas a las reportadas por Johnson y Hallberg (2005), quienes reportan 4,1 x 10³ UFC/ml en los efluentes de los humedales.

Por otra los datos los recuentos obtenidos no se relacionan con los observados en la determinación de sulfato, la menor concentración se observó en la zona media respecto a la sección de entrada, la concentración de sulfato fue alta y presentó una diferencia significativa (1300mg/Kg_{ps}), por lo cual se esperaba una mayor densidad de BSR. Lo observado se puede explicar en parte por la competencia que presentaron las BSR con las bacterias denitrificantes y metanogénicas frente a las fuentes de carbono orgánicas de fácil asimilación. Estudios previos han identificado como se inhibe la actividad de las bacterias sulfato reductoras en presencia de nitrato, interferencia asociada a competencia por donadores de electrones. Es probable que el carbono orgánico sea preferiblemente consumido por las bacterias denitrificantes ya que su actividad reductora presenta mayor rendimiento energético comparado con la reducción de sulfato (Chen *et al.*, 2014).

Finalmente determinar la actividad deshidrogenasa permitió tener una idea sobre la actividad microbiana total, la cual no presenta diferencia significativa entre las zonas de entrada, medio y salida del humedal pero presenta un leve aumento a lo largo del humedal, la mayor concentración promedio se presentó en la zona de salida con 3,17±0.79mg/g*24horas. La deshidrogenasa es una enzima asociada con células vivas, vinculada con procesos oxido-reducción y juega un papel esencial en la degradación de

materia orgánica en suelos (Kumar *et al.*, 2013). Se identificó que la concentración de sulfato y manganeso tiene una correlación significativa con la actividad microbiana en este caso específico sobre la actividad deshidrogenasa,

7.3 Descripción ecológica de los sedimentos teniendo en cuenta las variables fisicoquímicas y microbiológicas analizadas.

Es importante tener en cuenta que muchos de los términos y conceptos de la ecología de los macroorganismos no son equiparables en la ecología microbiana, por lo cual ha sido una rama poco explorada por la ecología pese a su notable importancia dentro de la evolución y funcionamiento de la Tierra (Ovreas & Curtis, 2011).

Los métodos utilizados en este trabajo permiten la cuantificación de microorganismos cultivables en las muestras analizadas, los cuales solo alcanzan a representar entre el 1 al 10% de los microorganismos presentes, ya que la gran mayoría no son cultivables bajo condiciones de laboratorio (Schelegel & Jannasch, 2006; Truu *et al.*, 2009).

Al momento de estudiar la estructura bajo el análisis de la composición funcional de la comunidad es importante tener en cuenta la heterogeneidad de este tipo de ecosistemas (Truu *et al.*, 2009; Samsó & García, 2013) dado por el gran número de variables biológicas, ambientales y fisicoquímicas que afectan los procesos que allí ocurren (Gutknecht *et al.*, 2006). Una de estas variables es la presencia de plantas, las cuales tienen incidencia en las dinámicas de oxígeno, carbono y nitrógeno y por otro lado están relacionadas con toda una comunidad microbiana principalmente asociada a su rizósfera (Zhang *et al.*, 2010).

Heterogeneidad que según autores como Truu, Samsó, Chen (2009, 2013) entre otros describen los humedales como cajas negras, por lo cual el presente estudio por medio de una exploración permitió analizar algunas de las relaciones que allí se presentan y tener una aproximación de las dinámicas y composición de los sedimentos en un humedal que recibe el drenaje de una mina de carbón. La metodología empleada en el presente estudio presentó un sesgo en los resultados, ya que por una parte un único muestreo no permite construir una caracterización ecológica consistente de los sedimentos, sino que permite tener una idea de la dinámica en un momento dado y por otro lado la cantidad de

muestras fue reducida lo que tuvo incidencia en la alta variabilidad obtenida en los resultados.

Respecto a los resultados obtenidos se identificó que los sedimentos del humedal son un ecosistema adecuado para la coexistencia de los 6 grupos funcionales microbianos identificados, coexistencia posiblemente dada por diferenciación de nicho. Al momento de estudiar la coexistencia de los grupos funcionales microbianos como unidad de estudio, es más sencillo evidenciarla dado que cada uno está asociado a un proceso biogeoquímico diferente, por lo cual cada uno requiere un set de condiciones distintas para su crecimiento y desarrollo de igual forma es posible evidenciar competencia entre ellos por ciertos recursos limitantes. Un recurso limitante en los sedimentos puede ser el oxígeno por lo cual grupos como los heterótrofos aerobios, nitrificantes y oxidadores de hierro van competir por ese mismo recurso, y en ese caso la dominancia de uno de los grupos funcionales está directamente relacionada con el sobre-crecimiento, ya que los heterótrofos aerobios presentan aceleradas tasas de crecimiento comparados con sus competidores, razón por lo cual presenta la mayor abundancia (Gómez, 2007; Latorre, 2007; Samsó & García, 2014; Weber *et al.*, 2006). Dentro del grupo de heterótrofos podemos encontrar varios de los grupos analizados como es el caso de los heterótrofos aerobios, denitrificantes y sulfato reductores por lo cual se podrían considerar que están compitiendo por fuentes de carbono orgánico de fácil degradación, donde el grupo mejor competido resulta el grupo que utilice el recurso de forma más eficiente, en este caso se podría hablar de eficiencia energética donde el rendimiento energético asociado a los diferentes aceptores de electrones define gran parte de las dinámicas que allí se presentan. El oxígeno resulta el aceptor de electrones que produce la mayor cantidad de energía y por ello en su presencia domina el metabolismo aerobio, el nitrato es el segundo aceptor en la escala energética después del oxígeno y finalmente el sulfato; lo que puede estar relacionado con el orden de abundancias encontradas (Faulwetter *et al.*, 2009).

Adicionalmente se utilizaron algún índices ecológicos para tener una aproximación de la ecología de los sedimentos con base a las grupos funcionales estudiados, en el caso de la diversidad se identificó valores muy semejantes entre las tres zonas evaluadas, valores que evidencian pocas diferencias de la comunidad presente en las tres zonas evaluadas, lo que puede estar dado por la homogeneidad de los resultados de la mayoría de parámetros fisicoquímicos evaluados. Truu y col. (2009) estudian la diversidad de los sedimentos de humedales y determinan que son sistemas con baja diversidad, y teniendo

en cuenta la teorías que relacionan diversidad con estabilidad y productividad nos llevarían a la idea que los sedimentos de estudio son sistemas con baja estabilidad y productividad pero mantiene la diversidad funcional suficiente para la regulación de los principales ciclos biogeoquímicos. Y se identificó que Log Normal es el modelo que más se ajusta a para explicar la abundancia de los grupos funcionales, en el cual se diferencia tres tipos de abundancias las raras, las intermedias y las comunes. Y permite establecer como la participación secuencial de nichos permite la coexistencia.

8. CONCLUSIONES

- Las mayores abundancias se presentaron para las bacterias heterótrofas aerobias y denitrificantes.
 - Las abundancias de BSR fue baja comparadas con las reportadas por la literatura.
 - Las bajas concentraciones de oxígeno y altas concentraciones de carbono limitaron el crecimiento de las bacterias nitrificantes en los sedimentos.
 - Las bacterias reductoras de hierro presentaron la menor abundancia, dado por la baja concentración de $Fe(+3)$ disponible a pH neutro.
-
- Los parámetros físico-químicos analizados no presentaron una correlación significativa con la abundancia y distribución de los grupos funcionales microbianos.
 - La actividad deshidrogenasa presentó correlación negativa significativa con la sulfato y positiva con la concentración de manganeso.
-
- El sedimento a lo largo del humedal presentó el mismo patrón de abundancias y riqueza.
 - La coexistencia de los seis grupos funcionales se presentó posiblemente por la diferenciación de nicho entre cada uno de ellos.

9. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación se realizan las siguientes recomendaciones:

- Es necesario tener en cuenta más parámetros fisicoquímicos de los analizados, como potencial Redox, DQO, DBO, concentración sulfuros, nitratos, amonio, hierro (+2), entre otros que permitan tener una mayor comprensión de los procesos que se llevan a cabo.
- Realizar una caracterización tanto físico-química como microbiológica del drenaje que está ingresando al humedal.
- Se podría hacer el mismo análisis teniendo en cuenta una variable temporal.
- Para tener un estudio completo de las comunidades presentes en los sedimentos se podría hacer un análisis utilizando técnicas moleculares que permitan tener en cuenta las comunidades no cultivables y cultivables.
- Otra variable a tener en cuenta en el estudio son las plantas allí presentes por lo cual analizar concentración de metales en ellas sería de gran importancia.

10. BLIBIOGRAFÍA

APHA, (American Public Health Association). (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* in: Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.), Washington, DC, pp. 1–12.

ASTM, (American Society for Testing and Materials).(1995). *Standard test method for pH of soils*, D4412 in: Annual book of ASTM standards Vol. 04.08, Section D 2216–98 Washington, DC, pp.27-34.

Atlas, R, Bartha,R.(2005). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*, Pearson Educacion SA (Addison Wesley), Madrid, 3-16, 183-208, 383-422, 491.

Bahamóndez, C. (2012). Importancia de la actividad microbiológica en la predicción del drenaje ácido de minas. Tesis. *Universidad de Chile*. Santiago, Chile.

Bhattacharya, J, Islam M, Wook, Y. (2006) Microbial Growth and Action: Implications for Passive Bioremediation of Acid Mine Drainage. Technical Communication. *Water and the Environment* 25; 233–240

Bodelier, P, Frenzel, P, Drake, H, Hurek, T, Küsel, K, Lovell, C, Sorrell, B. (2006). 10 Ecological Aspects of Microbes and Microbial Communities Inhabiting the Rhizosphere of Wetland Plants. *Wetlands and Natural Resource Management* (190): 205-238.

Boer, W, Kowalchuk, G. (2001). Nitrification in acid soils : micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* (33), 853–866.

Burns, A, Pugh, C, Segid, Y, Behum, P, Lefticariu, L, Bender, K. (2012). Performance and microbial community dynamics of a sulfate-reducing bioreactor treating coal generated acid mine drainage. *Biodegradation*, 23(3), 415–429.

Casasús, A, Hamilton, R, Svoronos, S, Koopman, B. (2005). A simple model for diauxic growth of denitrifying bacteria. *Water research*, 39(9), 1914–20.

Chang, I, Shin, P, Kim, B. (2000). Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate, 34(4).

Chaperon, S, Sauvé, S. (2007). Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(9), 2329–2338.

Chen, Y, Wen, Y, Zhou, J, Tang, Z, Li, L, Zhou, Q, Vymazal, J. (2014). Effects of cattail biomass on sulfate removal and carbon sources competition in subsurface-flow constructed wetlands treating secondary effluent. *Water research*, 59C, 1–10.

Corrales, L, Sánchez, L, Cortes, P, León, A, Sánchez, V. (2006). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación , en las zonas mineras del Departamento de Boyacá, 57–63.

Ellis, R, Morgan, P, Weightman, A y Fry, J.(2003) Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* ; 69: 3223-3230

Fajardo, I, Fuentes, C, Mariño, J, Monroy, O, Montoya, M, Pareja, E. (1997) *Programa de normalización de recursos y reservas de carbón en algunas áreas del departamento de Cundinamarca*. Ecocarbón Regional 2 de Ubaté, Ingeominas, Bogotá Colombia.

Fakruddin, M, Mannan, K. (2013). Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 42(1), 19–33.

Faulwetter, J, Gagnon, V, Sundberg, C, Chazarenc, F, Burr, M, Brisson, J, Stein, O. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 35(6), 987–1004.

Fortin D, Goulet R, Roy M. Seasonal cycling of Fe and S in a constructed wetland: the role of sulfate reducing bacteria. *Geomicrobiol J* 2000;17:221–35.

Garcia C, Moreno DA, Ballester A, Blazquez ML, Gonzalez F. Bioremediation of an industrial acid mine water by metal tolerant sulphate-reducing bacteria. *Miner Eng* 2001;14(9): 997–1008.

Gomes, M, de Souza, R, Teles, V, Araújo Mendes, É. (2014). Phytoremediation of water contaminated with mercury using *Typha domingensis* in constructed wetland. *Chemosphere*, 103, 228–33.

Gómez, M.(2005) Efecto de usos de suelo en ecorregion cafetera sobre la densidad de bacterias nitrificantes y desnitrificantes. *Pontificia Universidad Javeriana*. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Bogotá, Colombia.

Gutknecht, J, Goodman, R, Balsler, T. (2006). Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant and Soil*, 289(1-2), 17–34.

Hallberg, K,Johnson, D. (2005). Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *The Science of the total environment*, 338(1-2), 53–66.

Hao, C, Wang, L, Gao, Y, Zhang, L, Dong, H. (2010). Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 14(5), 465–74.

He, Z, Nostrand, J, Deng, Y, Zhou, J. (2011). Development and applications of functional gene microarrays in the analysis of the functional diversity, composition, and structure of microbial communities. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 5(1), 1–20.

Hé Hernández, M. (2010). Suelos de humedales como sumideros de carbono y fuentes de metano. *TERRA Latinoamericana*, 28 (2), 139-147.

Horz, H, Barbrook, A, Field, C, Bohannon, B. (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15136–41.

Ibekwe, A, Grieve, C, Lyon, S. (2003). Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent, 69(9), 5060–5069.

Jonas, G, Gardener, S, Simon, B. (1984). Reduction of Ferric Iron by Heterotrophic Bacteria in Lake Sediments. *Journal of General Microbiology*, 130, 45–51.

Kosolapov, B, Kuschik, P, Vainshtein, M, Vatsourina, A, Wieûner, A, Kästner, M, Müller, R. (2004). Review Microbial Processes of Heavy Metal Removal from Carbon-Deficient Effluents in Constructed Wetlands, (5), 403–411.

Kumar, S, Chaudhuri, S, Maiti, S. (2013). Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review Department of Environmental Science & Engineering / Centre for Mining Environment , Department of Mining Engineering , Indian School of Mines ; Dhanbad -826004 India, 13(7), 898–906.

Lahora, A. (2003). Depuración de aguas residuales mediante humedales artificiales: la Edar de los gallardos (Almería). *Ecología, manejo y conservación de los humedales*, 49 99-112. Instituto de estudios almerienses. Tomado el 5 de abril de 2014 de http://www.almediam.org/articulos/articulos_120.htm

Latorre, N. (2007). *Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes*. Pontificia Universidad Javeriana.

Lin, Y, Jing, S, Wang, T, Lee, D. (2002). Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands. *Environ. Pollut.* 119, 420–423

Lise, O, Curtis, T. (2011). Microbial Diversity and ecology. In: Magurran Anne, McGill B. (2011). *Biological Diversity*, Ed Oxford, 221-294.

López, E, Aduvire O, Baretino, D. (2002) Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y Minero* 113 (1); 3-21

Lottermoser, B. (2007). *Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts*.

Lovley, D, Phillips, E. (1986). Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and environmental microbiology*, 51(4), 683–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=238947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. 2001 *Biología de los microorganismos*. Octava edición. Ed. Prentice Hall. Madrid , España. Pág: 15-16, 25-26, 110, 112, 116-117, 113-114, 561-563, 872-75.

- Magurran, A. (2004). *Measuring biological diversity*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 9-125.
- Magurran, A, McGill, B. (2011). *Biological Diversity*, Ed Oxford, 221-294.
- Maier, R, Pepper, I, Gerba, C. (2009). *Environmental Microbiología* (Second Edi., p. 598). Elsevier.
- Manning, H. (1975). New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. *Applied microbiology*, 30(6), 1010–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=376583&ool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marín, J, López, A, Behling, E, Rincón, N, Díaz, A. (2007). Humedales construidos para el tratamiento de drenajes de una mina carbonífera. *Scientific Journal of the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad del Zulia*, 15 (1)(March), 21–34.
- Martínez, M. (2008). Grupos funcionales. In *Conocimiento actual de la biodiversidad*. (Vol. I, pp. 365–412).
- Ozbelge, T. a, Ozbelge, H. O., & Altinten, P. (2007). Effect of acclimatization of microorganisms to heavy metals on the performance of activated sludge process. *Journal of hazardous materials*, 142(1-2), 332–9.
- Pérez-Peláez, N, Peña-Varón, M, Sanabria, J. (2011). Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos Bacterial communities involved in the nitrogen cycle in constructed wetlands, 92(2), 83–92.
- Petrie, L, North, N, Dollhopf, S, Balkwill, D, Kostka, J. (2003). Enumeration and Characterization of Iron (III) -Reducing Microbial Communities from Acidic Subsurface Sediments Contaminated with Uranium (VI), 69(12), 7467–7479.
- Ramsar. (2007). Convención sobre humedales. Documento informativo Ramsar N°1.
- Riaño, G. (2011). Determinación de la eficiencia de un humedal aerobio para tratamiento de drenajes de mina de carbón. Tesis de ingeniería. Fundación Universidad Central. Bogotá, Colombia.
- Riefler, R. G., Krohn, J., Stuart, B., & Socotch, C. (2008). Role of sulfur-reducing bacteria in a wetland system treating acid mine drainage. *The Science of the total environment*, 394(2-3), 222–9.
- Rioux, J, Fortin, D. (2008). Microbial activity of iron-reducing bacteria and sulfate reducing bacteria isolated from mine tailings in the presence of various electron donors. *Microbiol Ecol*, (64), 329-342.
- Roddo, C. (2010). Ministro de Minas y Energía. Feria Internacional Minera. <http://www.minminas.gov.co/minminas/downloads/archivosEventos/6556.pdf> Consultado 15 de Octubre de 2013.

Samsó, R, García, J. (2013). Bacteria distribution and dynamics in constructed wetlands based on modelling results. *The Science of the total environment*, 461-462, 430–40.

Schlegel, H, Jannasch, H. (2006). *The Prokaryotes*. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.) (pp. 137–184). New York, NY: Springer New York.

Sims, A, Gajaraj, S, Hu, Z. (2012). Seasonal population changes of ammonia-oxidizing organisms and their relationship to water quality in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 40, 100–107.

Sophia, A, Michael, H, Eric, A, Winona, L. (2006). Metal Distribution and Stability in Constructed Wetland Sediment.

Subrahmanyam, G, Khonde, N, Maurya, D, Chamyal, L, Archana, G. (2014). Microbial Activity and Culturable Bacterial Diversity in Sediments of the Great Rann of Kachchh, Western India. *Pedosphere*, 24(1), 45–55.

Travers, D. (2007). Microbiología aplicada a las ciencias ambientales : reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales, Tesis Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Trevors, J. 1998: Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 101:45-67.

Truu, M, Juhanson, J, Truu, J. (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, The, 407(13), 3958–3971.

Vallejo, V, Gómez, M, Cubillos, A, Roldán, F. 2011 Effect of land use on the density of nitrifying and denitrifying bacteria in the Colombian Coffee Region Efecto del uso de suelo sobre la densidad de bacterias nitrificantes y desnitrificantes en la Ecorregión Cafetera Colombiana, 29, 455–463.

Vasquez, O, Vasquez, F, Prieto, F, Hernandez, L, Sierra, V. (2011) "Implementation of a pilot system of passive treatment for coal mine drainage." En: Chile. 2011. *Evento: 9 th International conference on Clean technologies for the mining industry Ponencia: Implementation of a pilot system of passive treatment for coal mine drainage. Libro: Proceedings del 9ª conferencia internacional sobre tecnologías limpias para la industria minera*. 1(1), 14 - 23 .

Vega, A., Amora, E., López, E., Terrón, O., Proal, J. (2007). Toxic effects of zinc on anaerobic microbiota from Zimapán Reservoir (Mexico). *Anaerobe*, 13(2), 65–73.

Weber, K, Achenbach, L, Coates, J. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature reviews. Microbiology*, 4(10), 752–64.

Wise, K. (1998). Water Quality, Fate Of Metals, And Predictive Model Validation Of A Constructed Wetland, 32(6), 1888–1900.

Wu, S, Kuschk, P, Wiessner, A, Müller, J, Saad, R, Dong, R. (2013). Sulphur transformations in constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Ecological Engineering*, 52, 278–289.

Yanine, H.(2010). Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otun y la Vieja. M.Sc. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Zamora, A. (2012). Revisión análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria Microbial Functional Analysis: A estimator of community structure and diversity, 32(1), 57–86.

Zayed, G., & Winter, J. (2000). Inhibition of methane production from whey by heavy metals--protective effect of sulfide. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(6), 726–31.

Zhang, Y, Yang, Y, Liu, J, Qiu, G. (2013). Isolation and characterization of Acidithiobacillus ferrooxidans strain QXS-1 capable of unusual ferrous iron and sulfur utilization. *Hydrometallurgy*, 136, 51–57.

Zhou, Q, He, F, Liping, Z, Wang, Y, Wu, Z. (2009). Characteristics of the microbial communities in the integrated vertical-flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*, 21(9), 1261–1267.

Zhu, L, Ding, W, Feng, L, Kong, Y, Xu, J, Xu, X. (2012). Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem. *Bioresource technology*, 108, 1–7.

11. ANEXOS

Anexo 1. Grupos funcionales a evaluar y sus respectivos medios de cultivo.

Grupo funcional	Medio	Referencia
Heterótrofos	Medio R2A	(Latorre, 2007 Cleves y Sandoval, 2003)
	Medio Infusión Suelo	(ASM, 1999; Cleves y Sandoval, 2003; Maldonado, 2004; Vallejo, 2004, Latorre, 2007)
Denitrificantes	Medio estandarizado para bacterias denitrificantes	(Casasus et al.,2008)
Nitrificantes	Medio estandarizado para oxidadores de amonio. Medio estandarizado para oxidadores de nitritos.	(Gómez, 2008)
Oxidadoras del Hierro	Medio ISR	(Manning,1975)
Bacteria sulfato reductoras	Starkeys	(Hwang et al., 2003)
Bacterias reductoras de hierro	Medio estandarizado para NMP bacterias reductoras de hierro.	(Slobodkin,1999).

Anexo 2 . Descripción de medios utilizados.

Medio R2A_(Latorre, 2007 Cleves y Sandoval, 2003)

Componente	Concentración g/L
Glucosa	0.5
Peptona de Proteasa	0.5
Almidón soluble	0.5
Piruvato de sodio	0.3
KHPO ₄	0.3
MgSO ₄	0.05
Casaminoácidos	0.5

Medio Agar Infusión suelo (ASM, 1999; Cleves y Sandoval, 2003; Maldonado, 2004; Vallejo, 2004, Latorre, 2007).

Componente	Concentración
Agar Nutritivo	20g/L
*Infusión suelo	200ml/L
Agua destiladesta	800ml/L

Mezclar y esterilizar en autoclave a 121° por 20 minutos

*Infusión suelo:

Suelo 500g
Agua destilada 1L

Mezclar el suelo y agua destilada, calentar durante 15 minutos y luego se pasa la mezcla a través de una gasa.

Medio estandarizado para bacterias denitrificantes (Casasús et al., 2005)

Componente	Concentración g/L
NaCl	1.0
NH ₄ Cl	1.0
MgSO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	1.5
Acetato de Sodio	1.0
KNO ₃	2.0
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0.4
Solución Oligoelementos	1,0ml

Ajustar pH 7,1-7,2 con NaOH 1 N, previo a la inoculación de las diluciones del sedimento se adicionará a cada tubo NaHCO₃ al 10% 0.1ml, N₂S al 2% 0.1ml y Etanol 1g/L 0.03ml

Medio estandarizado para oxidadoras de amonio (Gómez, 2008)

Componente	Concentración g/L
------------	-------------------

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
KH_2PO_4	0.2
NaHCO_3	0.125
Rojo de fenol	0.01
Solución de oligoelementos	1ml

Llevar a 1 litro de agua desionizada, ajustar pH a 7,6- 7,8 con NaOH 1, 0N. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. NaHCO_3 se adiciona después de la esterilización.

Medio estandarizado para microorganismos oxidadores de nitritos (Gómez, 2008)

Componente	Concentración g/L
------------	-------------------

NaNO_2	0.035
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.035
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
KH_2PO_4	0.1
K_2HPO_4	0.2
NaHCO_3	0.125
NaCl	0.5
Solución de oligoelementos	1ml

Llevar a 1 litro de agua desionizada, ajustar pH a 7.6- 7.8 con NaOH 1N. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. NaHCO_3 se adiciona después de la esterilización.

Preparación de la solución e oligoelementos

Componente	Concentración g/L
------------	-------------------

FeSO_4	2.46
EDTA di sódica	3.31
MnCl_2	0.2
CoCl_2	0.002
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

Medio empleado para aislamiento de bacterias oxidadoras de hierro (Manning, 1975;

Silverman & Lundgren, 1958; Zhang et al., 2013)

Se generaron tres soluciones, la solución A de sales:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3g/L
K_2HPO_4	0.5g/L
KCl	0.1g

MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5g
Ca(NO ₃) ₂	0.01g/L

Ajustada a pH 2,0 con H₂SO₄ 10 N, esterilizada por autoclave a 121 libras de presión por 15 minutos, de dicha solución se toman 500ml.

Solución B, de hierro

44,7/L g de FeSO₄ *7H₂O al 8%, se ajusta a un pH 2.5 con H₂SO₄, dicha solución se filtra 0.22μ no se autoclava para evitar su oxidación.

Solución C

Solución de agarosa al 5% la cual no se esteriliza para evitar precipitación de compuestos y desnaturalización de la agarosa.

Luego de esperar que se enfríen un poco se adiciona la solución A a la solución C se mezclan y posterior a ellos se agrega la solución B a esa combinación y se mezcla.

Starkeys empleado para evaluar bacterias sulfato reductoras por NMP (Hwang et al., 2003)

Componente	Concentración g/L
Lactato de Sodio	4.58ml
MgSO ₄ *7H ₂ O	2.03
NH ₄ Cl	1.0
K ₂ HPO ₄	0.5
Na ₂ SO ₄	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Ácido Tioglicólico	77.3μL
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ * 6H ₂ O	0.01

Medio empleado para la técnica de NMP en al determinación de bacterias reductoras de hierro (Slobodkin,1999).

Componente	Concentración g/L
MgCl ₂ *2H ₂ O	0.33
NH ₄ Cl	0.33
KH ₂ PO ₄	0.33
KCl	0.33
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.33
NaHCO ₃	2.0
Extracto de levadura	0.2
Solución vitaminas	10ml
Solución elementos traza	1ml

El medio se ajusta a ph 6,5- 6,8 y se le adiciona cloruro férrico que fue previamente ajustado a pH de 9 con NaOH bajo condiciones de anaerobiosis.

Anexo 3. Sulfato soluble

Se empleó el método de extracción de azufre en HCl al 40% (Sobek et al.,1978)

- Preparación de las muestras:
Tomar 5 gramos de la muestra seca pasarla por un tamiz de 0.25mm, empacarla en bolsa ziploc y guardarla en refrigeración antes de su análisis.

- Análisis
 - Pesar 1,0 gramos de muestra y se colocó en un Erlenmeyer (100ml)
 - Añadir 20ml de HCl (40%)
 - Agitar durante una hora a temperatura ambiente.
 - Filtrar (0.45mm) al vacío.
 - Luego se prepare una solución para cada muestra en balones de 10ml, en el cual se adicionó 3ml de agua destilada inicialmente, 0.5ml NaCl, 1ml de glicerina, 0.6ml de cloruro de bario, 2,5 de muestra para cada uno de los casos y finalmente se aforo con agua destilada.
 - Dichas soluciones presentaron color amarillo por lo cual se preparó un control sin cloruro de bario que presentara un color amarillo.
 - Y finalmente se analizó el sulfato soluble por espectrofotometría.

Anexo 4. Nitrógeno total (Kjeldal)

Método 955.04-C (AOAC, 2000)

Consta de tres etapas: digestión, destilación y titulación.

1. Digestión: se busca la descomposición de la materia orgánica y obtención del nitrógeno presente en las muestras utilizando una solución de ácido concentrado, buscando obtener una solución de sulfato de amonio.
 - Tomar 1.0 g de muestra seca adicionarla en balones empleados en la digestión.
 - Adicionar 5.0 g K_2SO_4 , 0.5 g $CuSO_4$ y 25 ml H_2SO_4 .
 - Mezclar cuidadosamente y colocarlas en el digestor.
 - Ajustar la temperatura moderada ($180^\circ C$) para la ebullición para la digestión de la muestra durante 30 minutos.
 - Aumentar la temperatura (menos de $338^\circ C$) a un hervor rápido hasta que la digestión completa de la muestra, de aproximadamente 1 h.
 - Deje que la mezcla se enfríe a temperatura ambiente.
 - Añadir (con cuidado) 20 ml de agua desionizada en un matraz, agitar para disolver los cristales.

2. Destilación: se libera amoníaco, el cual es retenido en una solución con una cantidad conocida de ácido.
 - Añadir 20 ml de NaOH (30%) en el frasco y agitar.
 - Colocar el matraz en el estante de la destilación con tapón de seguridad.
 - Agregue en un Erlenmeyer de 20 ml de H_3BO_3 con el 4% con 1,5ml del indicador Tashiro.
 - Colocar los matraces Erlenmeyer en Kjeldahl estante destilación.
 - Inicie la destilación con ebullición moderada (menos de $100^\circ C$) hasta obtener 50 ml del destilado (color debe ser verde o azul oscuro).
 - Deje que se enfríe destilado.

3. Titulación: en la cual se busca valorar finalmente la cantidad de amonio presente en la muestra destilada.
 - Valorar con HCl 0.1075M hasta que la solución se vuelve se vuelve rosa.

Anexo 5. Método secuencia para extracción y determinación de Metales.

(Tessier et al., 1979; Zagury et al., 1997)

Preparación de la muestra

- Transferir la muestra seca en tubos de centrifuga (50 ml), y añadir 8 ml 1 M de $MgCl_2$ y ajustar el pH 7,0 con HCl.
- Dejar la mezcla a temperatura ambiente (21 ± 2 ° C) durante 1
- Centrifugar la mezcla (10.000 g) durante 30 min.
- Transferir el sobrenadante en un vial (50 ml) y retener el residuo.
- Añadir en tubos de centrifuga de 8 ml de agua desionizada
- Centrifugar (10 g) durante 30 min y luego transferir el sobrenadante en el vial con la primera extracción.

La fracción 2

- Agregue el residuo 8 ml de 1 M NaOAc, ajustar el pH 5,0 con HOAc.
- Agitar durante 5 horas a temperatura ambiente (21 ± 2 ° C) .
- Centrifugar, lavar el residuo y conservar el sobrenadante como la fracción 1.

La fracción 3

- Agregue el residuo (ii) 20 ml de 0.04 M $NH_2OH - HCl$ en 25 % (v / v) HOAc .Mantener a 96 ± 3 ° C y agitar ocasionalmente durante 6 h.
- Centrifugar, lavar el residuo y conservar el sobrenadante como la fracción 1.

La fracción 4

- Añadir el residuo (3) 3 ml de 0.02 M HN_3 y 5 ml de 30 % (v / v) de H_2O_2 . Ajustar a pH 2,0 con HN_3 .
- Se calienta a 85 ± 3 ° C durante 2 h con agitación ocasional.
- Añadir de nuevo 30 ml de 30 % (v / v) de H_2O_2 .
- Ajustar a pH 2,0 con HOAc.
- Se calienta a 85 ± 3 ° C durante 3 h con agitación ocasional y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 5 ml de 3,2 M NH_4OAc en 20 % (v / v) de HN_3 y 20 ml agua desionizada.
- Se centrifuga, se lava el residuo y conservar el sobrenadante como la fracción 1 .

Fracción 5

- Agregue el residuo (4) 15 ml de HN_3 y se calienta a 75 ± 3 ° C durante 50 min, añadir 20 ml de $HClO_4$ y 1 ml de HF. Se calienta a 75 ± 3 ° C durante 2,5 horas. Enfriar y diluir el sobrenadante a 100 ml

Análisis de las fracciones

- Filtrar (0.45 m) de los sobrenadantes de la cada fracción y ajustar pH 2,0 con 1 ml de HN_3 .Preservar las muestras que no puedan analizarse de inmediato por su conservación a 4 ° C.
- Analizar Fe, Zn y Mn por espectrofotometría de absorción atómica de llama .

Anexo 6. Análisis estadística grupos funcionales

Grupo Funcional	Shapiro. Wilk (W)	Shapiro. Wilk (p)	Anova (F)	Anova (p)
Heterótrofos	0.94	0.5594	0.05	0.9475
Oxidadoras de amonio	0.96	0.7680	0.3294	0.7316
Oxidadoras de nitrito	0.94	0.6266	2.0247	0.2128
Denitrificantes	0.85	0.0736	0.4909	0.6346
Sulfato reductoras	0.90	0.3560	3.2086	0.1447
Reductoras de hierro	0.95	0.7129	13.5049	0.0060*

Anexo 7. Estadística deshidrogenasa

Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,938471	0,5659

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Transecto	2	4,578669	2,28933	1,6518	0,2682
Error	6	8,315577	1,38593		
C. Total	8	12,894246			

Anexo 8. Estadística parámetros fisicoquímicos

Parámetro	Shapiro. Wilk (W)	Shapiro. Wilk (p)	Anova (F)	Anova (p)
pH	0.9527	0.7197	0.9421	0.4407
Humedad	0.9861	0.9881	2.8683	0.1336
Carbono orgánico	0.9414	0.5968	0.4662	0.6483
Sulfato	0.8775	0.1478	57.2934	0.0004*
Hierro total	0.7653	0.0120	38.2337	0.0009*
Manganeso	0.9743	0.9292	0.0545	0.9475
Zinc	0.9367	0.5472	2.5602	0.1571