

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

Juan Ramiro PACHECO AGUILAR^{1*}, María MALDONADO VEGA² y Juan José PEÑA CABRIALES¹

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

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

*Autor responsable; juanramiro29@yahoo.com.mx

(Recibido marzo 2011, aceptado abril 2012)

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

RESUMEN

Los humedales artificiales constituyen una alternativa para el tratamiento de efluentes, donde los procesos biológicos de oxidación originados por la rizósfera de las plantas y los microorganismos presentes *in situ*, contribuyen para la remoción de contaminantes. En el presente trabajo se caracterizó el metabolismo del azufre (S) de diez bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas*, las cuales fueron aisladas de un humedal construido para el tratamiento de efluentes con alto contenido de materia orgánica (demanda bioquímica de oxígeno: DBO₅ 1320 mg/L) y sulfuros (54 mg/L) provenientes de la industria del curtido de piel. Los ensayos bioquímicos indican que todos los aislados pueden emplear alguna especie de S como azufre elemental (S^0), tiosulfato ($S_2O_6^{2-}$) o sulfuro (S^{2-}) como única fuente de S. También se encontró que las cepas del género *Pseudomonas* fueron las más versátiles, ya que oxidan el S^{2-} (2 mM) y $S_2O_6^{2-}$ (4 mM) transformándolos a S^0 y tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$), respectivamente, mientras que las cepas de *Acinetobacter* sólo oxidan el S^0 a $S_2O_6^{2-}$. También se observó que las cepas de los géneros *Alcaligenes* y *Ochrobactrum* oxidan el $S_2O_6^{2-}$ (4 mM) a $S_4O_6^{2-}$. La actividad de estos microorganismos a través del sistema de tratamiento y la integración de sus metabolismos podrían participar activamente en la remoción de sulfuros.

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

ABSTRACT

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

Alcaligenes, *Ochrobactrum* and *Pseudomonas*, which were isolated from a wetland constructed for the treatment of effluents with high organic matter content (biochemical oxygen demand: BOD_5 1320 mg/L) and sulfides (54 mg/L) from the leather tanning industry. Biochemical assays indicate that all the isolates can use some sulfur species such as elemental sulfur (S^0), thiosulfate ($S_2O_6^{2-}$) or sulfide (S^{2-}) as the sole source of S. We also found that strains of *Pseudomonas* genus were the most versatile base on the fact that they oxidize S^{2-} (2 mM) and $S_2O_6^{2-}$ (4 mM) transforming them to S^0 and tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$), respectively, whereas *Acinetobacter* strains only oxidize S^0 to $S_2O_6^{2-}$. We also found that the strains of the genera *Alcaligenes* and *Ochrobactrum* oxidize $S_2O_6^{2-}$ (4 mM) to $S_4O_6^{2-}$. The activity of these microorganisms through the treatment system and the integration of their metabolism might actively participate in the removal of sulfur compounds.

INTRODUCCIÓN

Los humedales artificiales son sistemas construidos con base en el principio de los humedales naturales, donde el agua y el suelo proveen las características principales para el desarrollo de las plantas y microorganismos, actuando como biofiltros, removiendo sedimentos y contaminantes de los efluentes a través de esta tecnología (Stottmeister *et al.* 2003). Estos sistemas biológicos son considerados versátiles debido a su alta eficiencia para tratar efluentes de la industria eléctrica y minera contaminados con metales como el selenio (Se), arsénico (As), boro (B), zinc (Zn), plomo (Pb) y fierro (Fe) (O'sullivan *et al.* 1999, Ye *et al.* 2003). También se ha reportado su empleo para la degradación de contaminantes orgánicos provenientes de efluentes domésticos, de la industria química y de los alimentos (Rivera *et al.* 1997, Philippi *et al.* 1999, Da Motta *et al.* 2001, Kao *et al.* 2001, Larsen *et al.* 2001, Haberl *et al.* 2003). Pacheco *et al.* (2008) reportan la construcción de un sistema de humedales para tratar los efluentes generados por la industria del curtido, observando que la demanda química de oxígeno (DQO: 17520 mg/L), demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅: 1320 mg/L), cromo total (Cr: 31 mg/L), nitrógeno total (NTK: 267 mg/L), sulfatos (SO_4^{2-} : 2518 mg/L) y sulfuros (HS⁻: 54 mg/L), fueron reducidos en un 98, 95, 99, 94, 92 y 99 %, respectivamente, en el efluente final.

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

contenido de sulfuros de hasta 54 mg/L, los cuales resultan tóxicos para la vida acuática (Bagarinao y Vetter 1989). Sin embargo, dentro de la ecología microbiana también han sido identificadas poblaciones bacterianas sulfoxidantes (BSO), las cuales reoxidan el sulfuro formado. Algunas reacciones de oxidación del S identificadas en microorganismos, indican la transición de las siguientes especies químicas: S^{2-} (sulfuro) $\rightarrow S^0$ (S elemental) $\rightarrow SO_3^{2-}$ (sulfito) $\rightarrow SO_4^{2-}$ (sulfato), aunque los intermedios pueden interaccionar químicamente, haciendo la ruta más compleja, tal es el caso de la formación del tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), el cual se forma por la combinación química del S^0 y el SO_3^{2-} , este compuesto también puede ser oxidado por microorganismos a tetrathionato ($S_4O_6^{2-}$) a través de la siguiente reacción general: $S^0 + SO_3^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-}$ (Suzuki 1999).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados bacterianos

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

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

Oxidación de compuestos reducidos de S

Para la caracterización bioquímica de oxidación de fuentes reducidas de S, se empleó el medio líquido de cultivo modificado *Thiobacillus* B reportado por Leduc (1999), el cual contiene (g/L): 2.9 citrato de sodio, 3.0 KH₂PO₄, 2.0 KNO₃, 0.1 NH₄Cl, 0.1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 0.2 Fe(NH₄)(SO₄)₂·6H₂O y 0.05 MgSO₄·7H₂O, ajustado a pH 7.0. Como fuente reducida de S se utilizó tiosulfato de sodio 20 mM, S elemental 1 % o sulfuro de sodio 2 mM. Todos los ensayos fueron inoculados a una densidad de 1×10⁶ células/mL (densidad óptica 0.01) e incubados en agitación a 150 rpm por 72 h, a 28 °C. Al término de la incubación, la densidad óptica fue medida y el S⁰, SO₃²⁻, S₂O₃²⁻ y S₄O₆²⁻ fueron analizados. El ensayo de oxidación de S²⁻ fue llevado a cabo bajo condiciones anaerobias, cuantificando en el medio, la disminución del S²⁻ y la reducción de nitratos (NO₃⁻) a nitritos (NO₂⁻).

Fuentes reducidas de S

Para determinar la capacidad de los aislados para utilizar S⁰ o S₂O₃²⁻ como única fuente de S, se empleó el medio modificado *Thiobacillus* B, sustituyendo el MgSO₄ por MgCl₂, y utilizando S elemental (1 %) o tiosulfato de sodio (20 mM) (Rossetti *et al.* 2003).

TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Sulfuros

La cuantificación de S²⁻ se llevó a cabo mediante la formación del complejo de azul de metileno con sulfato de N', N dimetil -p-fenilendiamina, en

presencia de FeCl₃, el cual fue medido a 665 nm (Rodier 1981).

Tiosulfato y tetrionato

El S₂O₃²⁻ y S₄O₆²⁻ fueron cuantificados como tiocianato (SCN⁻) por medio de la reacción de cianólisis con KCN en presencia de CuCl₂, el producto formado fue medido a 460 nm. Para discriminar el SCN⁻ formado a partir del S₄O₆²⁻, la muestra fue incubada por 30 minutos con KCN y NH₄OH previo a la adición de CuCl₂ (Masau 1999).

Azufre elemental

El S⁰ fue extraído del medio de cultivo con éter de petróleo y posteriormente llevado a cianólisis con NaCN en acetona, el producto final fue medido a 460 nm (Masau 1999).

Sulfito

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

RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de oxidación se presentan en el **cuadro I**. La mayoría de los aislados mostraron crecimiento en el medio *Thiobacillus* B con S⁰. Sólo en el medio donde crecieron los aislados pertenecientes al género de *Acinetobacter* (E11 y E12) se encontró S₂O₃²⁻ como especie oxidada. La formación de SO₃²⁻ y la combinación con S⁰ probablemente formaron S₂O₃²⁻, el cual no fue oxidado, acumulándose en el medio de cultivo como ha sido reportado por Suzuki (1999). De la misma manera, todos los aislados crecieron en medio *Thiobacillus* B con tiosulfato de sodio (20 mM), detectándose en los medios de cultivo S₄O₆²⁻ como producto de oxidación, con excepción donde crecieron los aislados del género *Acinetobacter*. En ninguno de los ensayos de oxidación de especies reducidas de S se encontró SO₄²⁻, ni hubo acidificación del medio. El pH final

CUADRO I. OXIDACIÓN DE S⁰ Y S₂O₃²⁻

Fuentes de S	Aislado									
	A11	A12	A14	B12	C11	C14	C15	D11	E11	E12
S ⁰ →S ₂ O ₃ ²⁻ (mM)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.13	1.90
S ₂ O ₃ ²⁻ →S ₄ O ₆ ²⁻ (mM)	1.9	1.65	1.5	1.4	1.85	0.14	1.8	2.15	ND	ND

S⁰: S elemental, S₂O₃²⁻: tiosulfato, S₄O₆²⁻: tetrionato. ND: No detectado

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

En relación a la oxidación de S^{2-} , sólo fue detectada la disminución en la concentración en el medio de cultivo donde se inocularon los aislados A11, A12, A14 y B12 pertenecientes al género *Pseudomonas* (**Cuadro II**). No se detectó alguna especie oxidada del S, por lo que pudieron haber utilizado el S^{2-} como fuente de S (Okada *et al.* 1982) o haberlo oxidado a S^0 intracelular (Chung *et al.* 1997). Este ensayo fue llevado en condiciones anaerobias por lo que se empleó NO_3^- como acceptor alterno de electrones durante el consumo de S^{2-} . La cinética de la disminución en la concentración de S^{2-} y NO_3^- , así como la producción de NO_2^- se muestra en la **figura 1**. Los resultados muestran que alrededor de las 70 h el sulfuro había sido completamente metabolizado por los aislados A11, A12 y A14.

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

Aislado	A11	A12	A14	B12
ΔS^{2-} (mM)	-2.0	-2.0	-2.0	-0.7

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

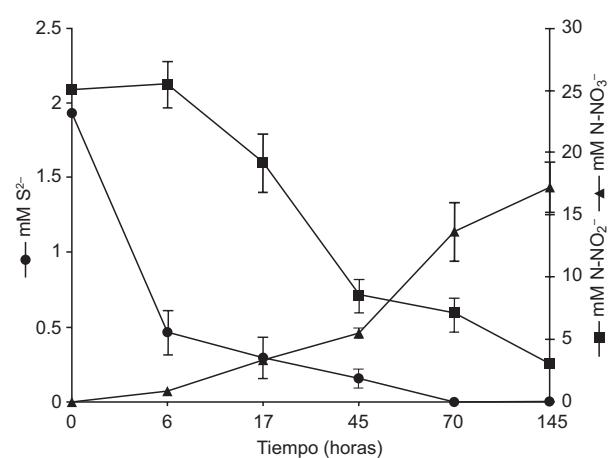


Fig 1. Consumo de sulfuros (S^{2-}) por el aislado A12 del género *Pseudomonas*

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

también pudo detectarse la acumulación de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ como especie oxidada del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (**Cuadro III**). La diferencia en la producción de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ entre los aislados pudo deberse a la presencia de SO_3^{2-} , producto de la acción enzimática de la rodanasa sobre el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, el SO_3^{2-} actúa como inhibidor del sistema enzimático (S-oxidante dependiente del citocromo *c*) que lleva a cabo la oxidación de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ a $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ (Suzuki 1999, Sekowska *et al.* 2000). En los ensayos realizados con *Acinetobacter* (E11 y E12) creciendo en tiosulfato de sodio, no se detectó $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, el crecimiento mínimo observado en el aislado E12 probablemente se debió por el consumo de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ en cantidades no detectables por el método analítico.

DISCUSIÓN

La presencia de plantas en humedales construidos promueve procesos químicos y biológicos en la zona de la rizósfera que participan en la mejora de la calidad de los efluentes, mediante la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos (Stubner *et al.* 1998, Baptista *et al.* 2003). La actividad microbiana aerobia sulfoxidante es dependiente de la rizósfera o de aceptores alternos de electrones como NO_3^- , Fe^{3+} o Mn^{4+} cuando ocurre en sedimentos bajo condiciones anaerobias (Stubner *et al.* 1998, Eckord *et al.* 2002, Leduc 1999).

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

La degradación de compuestos organosulfurados como los bencensulfonatos, ha sido ampliamente estudiada en bacterias del género *Alcaligenes*, debido a que pueden emplearlos como fuente de C y S (Cook *et al.* 1999). *Ochrobactrum* es un género que se ha encontrado presente en la ecología microbiana de lodos activados de reactores anaerobios sulfoxidantes, con capacidades de oxidación de S^{2-} a S^0 o a SO_4^{2-} (Mahmood *et al.* 2009).

Todos los aislados de este estudio pueden utilizar S^{2-} , S^0 o $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ como fuente de S y como producto de la oxidación de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, acumulan $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ sin la producción de SO_4^{2-} . Las poblaciones sulfoxidantes formadoras de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ están presentes en diversos

CUADRO III. USO DE S⁰ Y S₂O₃²⁻ COMO ÚNICA FUENTE DE S POR LOS AISLADOS DE ESTUDIO

Ensayo	Aislado									
	A11	A12	A14	B12	C11	C14	C15	D11	E11	E12
D.O. 600 S ⁰	0.08	0.20	0.18	0.16	0.47	0.31	0.42	0.25	0.21	0.10
D.O. 600 S ₂ O ₃ ²⁻	0.13	0.25	0.17	0.13	0.52	0.22	0.47	0.11	0.26	0.11
Δ S ₂ O ₃ ²⁻ (mM)	-5.7	-8.1	-9.5	-9.7	-7.1	-2.4	-6.2	-6.4	-0.3	ND
Δ S ₄ O ₆ ²⁻ (mM)	2.05	1.85	1.45	1.45	2.05	0.01	1.85	2.15	ND	ND

S⁰ S elemental, S₂O₃²⁻ tiosulfato, S₄O₆²⁻ tetrionate, -Δ = consumo, Δ = producción, ND No detectable.

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

El papel del S₄O₆²⁻ dentro del ciclo del S ha sido descrito por Sorokin *et al.* (1996) en la cepa *Catenococcus thiocyclus* LMD 92.12. Ensayos en medios de cultivo muestran que el S₄O₆²⁻ producido por la oxidación biológica del S₂O₃²⁻, promueve la oxidación química de S²⁻ hacia S⁰ cuando se adiciona S²⁻ al medio. La cepa reoxida el S₂O₃²⁻ a S₄O₆²⁻, y de esta manera se oxida más S²⁻. Este mecanismo acopla reacciones químicas y biológicas que pudieran ocurrir también en el humedal en estudio. De esta manera, los géneros de *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Ochrobactrum* pudieran estar llevando a cabo la oxidación indirecta de S²⁻ de la misma manera que *Catenococcus thiocyclus*, mientras que el S⁰ producido pudiera ser oxidado a S₂O₃²⁻ por *Acinetobacter* (Podgorsek *et al.* 2004). La figura 2 muestra el ciclo del S propuesto por Sorokin *et al.* (1996) adaptado con los aislados microbianos del presente estudio.

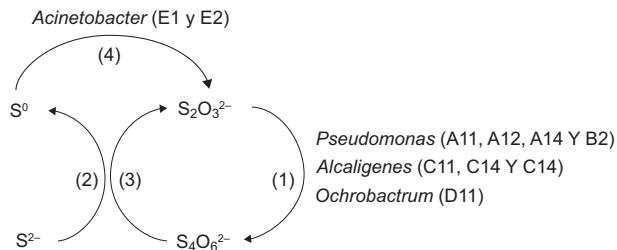


Fig. 2. Posible acoplamiento de reacciones del ciclo del S en el humedal de estudio. (1) Oxidación biológica de S₂O₃²⁻ a S₄O₆²⁻ por los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Ochrobactrum*, (2) y (3) oxido-reducción química del S²⁻ y S₄O₆²⁻ para producir S⁰ y S₂O₃²⁻, (4) Oxidación biológica del S⁰ por *Acinetobacter* para producir S₂O₃²⁻

CONCLUSIONES

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

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

REFERENCIAS

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

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

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

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