

23A
1ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DEL GÉNERO
FLAVOBACTERIUM EN LA LAGUNA DE ESTABILIZA-
CIÓN EN SANTO TOMÁS ATZINGO, ESTADO DE
MÉXICO. DURANTE LAS ESTACIONES DE
VERANO A INVIERNO.

DONADO POR D. G. B. - B. C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L Ó G O

P R E S E N T A :

SANDRA RITA SORIANO VELASQUEZ

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	2
OBJETIVOS.	4
a. Importancia del agua.	5
b. Definición de Lagunas de Estabilización	6
c. Descripción del género <u>Flavobacterium</u>	8
DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.	11
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS.	26
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	44
SUGERENCIAS	46
ANEXO I (abreviatura y Símbolos)	47
ANEXO II (Medios de Cultivo)	48
ANEXO III (Colorantes, Soluciones y Reactivos)	55
REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS	60

R E S U M E N

El presente estudio se realizó en las lagunas de Estabilización del poblado de Santo Tomás de Atzingo, Edo. de México de Junio a Diciembre de 1981

Se realizaron 12 muestreos con un total de 66 muestras analizadas. En este trabajo se describen métodos de aislamiento, de purificación e identificación del género Flavobacterium utilizando medios de preenriquecimiento, enriquecimiento, selectivos y diferenciales. La identificación se logró al observar la morfología macroscópica y microscópica, así como al realizar -- pruebas bioquímicas. Al mismo tiempo se llevó a cabo el análisis de parámetros fisicoquímicos.

Se estableció la relación existente entre los parámetros fisicoquímicos con la frecuencia de aparición de Flavobacterium encontrándose que está era más afectada por factores biológicos (competencia de nutrientes, depredación, etc.), que por factores físicos.

La frecuencia de aparición de dicho género resultó ser baja en las diferentes estaciones de muestreo, siendo la mayor en las zonas medias de las lagunas, la menor en el afluente y nula en el efluente.

I N T R O D U C C I O N

El uso de las lagunas de oxidación o estabilización como forma de tratamiento de las aguas de desecho es reciente en nuestro país y se puede decir que está en su fase experimental para probar su efectividad como método secundario de las aguas negras. Su operación es simple, no requiere de equipo costoso, su mantenimiento es bajo, su construcción es económica y por que se dispone de suficiente terreno en la mayoría de los casos.

Una laguna de oxidación es un estanque que contiene aguas residuales crudas o parcialmente tratadas en el que la actividad biológica oxida los desechos del afluente, por lo que el efluente contendrá bajas concentraciones de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) soluble y cantidades variables de sólidos suspendidos (algas y otros microorganismos).

Es importante mencionar que hasta ahora la atención prestada a este tipo de lagunas en México ha sido enfocada principalmente a través de la ingeniería sanitaria, en segunda instancia hacia los parámetros físicos y químicos y superficialmente los parámetros biológicos; por lo que es necesario poner un mayor interés en el conocimiento de los parámetros bióticos y abióticos de las lagunas.

En cuanto a las lagunas anaerobias facultativas que son las que se estudiaron, es interesante enfatizar que se establece una interacción constante entre los diversos tipos de microorganismos existentes, sobre todo los foto-

sintetizadores (algas fundamentalmente) y los que no lo son como las bacterias, hongos, protozoarios principalmente. Entre las bacterias que participan más activamente en las Lagunas de Estabilización se encuentran los microorganismos de los géneros Pseudomonas, Flavobacterium y Alcaligenes.

El género Flavobacterium predomina en las aguas residuales siempre y cuando el contenido proteínico sea relativamente alto, como ocurre en las aguas residuales domésticas o bien en aguas residuales que contengan restos celulares de bacterias muertas.

Lleva a cabo una actividad degradativa de las proteínas, la cual puede ser en condiciones aerobias o anaerobias.

Por todo lo anterior expuesto, se le considera de gran importancia el estudio del género Flavobacterium como un organismo que presenta una actividad funcional dentro de las Lagunas de Estabilización.

OBJETIVOS :

Los objetivos del presente estudio son :

- A. Aislar e identificar al género Flavobacterium en la laguna - de Estabilización en Santo Tomás Atzingo, Edo. de México.
- B. Establecer la relación existente entre los parámetros físico químicos con la frecuencia de aparición del género Flavobacterium.
- C. Determinar la actividad funcional del género Flavobacterium en este tipo de sistemas.

IMPORTANCIA DEL AGUA:

El agua es el recurso renovable más abundante de la tierra y constituye un requisito para la vida en todos sus aspectos ya sea que se utilice en procesos metabólicos, como disolventes de minerales o para eliminación de desechos. Es difícil citar un fenómeno natural en que el agua no participe en una u otra forma.

La naturaleza ha provisto medios para la conservación de este líquido abundante y valioso, dotándolo de una capacidad considerable para eliminar, por sí mismo, sustancias que lo contaminan. Esto es importante, ya que la calidad del mismo ambiente se ha visto en las últimas décadas seriamente afectado por el manejo y disposición inadecuados de considerables cantidades de desechos, generados en los grandes núcleos de población y centros industriales.

El deterioro en la calidad de los diferentes cuerpos de agua, se debe principalmente a cuatro fuentes de contaminación: desechos municipales, agrícolas, industriales y naturales, que contiene grandes cantidades de sustancias contaminantes. La naturaleza de éstos y sus efectos sobre los cuerpos de agua varían dependiendo del origen de las aguas residuales, de las concentraciones de las sustancias contaminantes, los volúmenes descargados y de las características de los propios cuerpos de agua.

Las concentraciones urbanas de población, constituyen una de las mayores fuentes de contaminación, debido a los grandes volúmenes de aguas residuales domésticas producidas, las cuales, en su mayor parte, son colectados por los sistemas de alcantarillado. Cabe mencionar que actualmente las zonas de cultivo son de suma importancia en los estudios de contaminación, pues el lavado de las tierras, debido al riego o a la lixiviación, provoca que se localicen a distancia compuestos o sustancias provenientes de los plaguicidas o herbicidas. (APHA, AWWA, WPCF, 1981)

Durante un tiempo se buscó algún medio o medios para el mejor tratamiento de los desechos líquidos de las localidades y comunidades, de tal manera que cuando estos desechos fueran dispuestos en las corrientes de agua, no disminuyeran la calidad de éstas, es decir, que permitan que esa agua sea utilizada.

(Geldreich, 1973; 1975)

Definición de Lagunas de Estabilización: Uno de los procesos más eficientes y económicos para el tratamiento de estos desechos líquidos, lo constituye la construcción de Lagunas de Estabilización. Este sistema consiste en un estanque de baja profundidad que recibe aguas residuales. Presenta una entrada que se denomina afluente y una salida, efluente. (Hillebor, 1976)

El tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales - - - - -

por el sistema de Lagunas de Estabilización se usa extensamente en muchos países del mundo. En México, ésto tiene gran significancia por el crecimiento industrial y demográfico que presenta nuestro país, lo cual hace necesario suministrar a las corrientes naturales; además, requieren poco mantenimiento y el costo es bajo.

Así, el tratamiento biológico es la forma más económica para tratar de purificar las aguas residuales domésticas y la mayoría de las aguas industriales. Este sistema de laguna se puede utilizar para reducir la mayor parte de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), así para reducir la concentración de agentes patógenos.

Las Lagunas de Estabilización son el hábitat de una enorme variedad de seres vivos. Todos los animales, plantas y hongos que se encuentran en la laguna se reproducen en la medida en que disponen de alimentos, constituyendo una población heterogénea cuyos elementos compiten por un mismo alimento o viven parasitándose unos a otros. El resultado neto es que las materias aportadas por el agua residual quedan convertidas parcialmente en material celular. Para esta conversión es necesario energía, la cual se obtiene de los procesos bioquímicos que descomponen una cantidad de sustrato alimenticio mayor que la requerida para la reproducción celular.

De esta forma, los microorganismos consumen materias altamente energéticas (productos residuales domésticos parcialmente digeridos) y dan lugar a un producto final de bajo contenido energético como el anhídrido carbónico. (Gloyna, 1973; Fair et al, 1979)

El tipo de Laguna de Estabilización donde se llevó a cabo el estudio es de tipo facultativo, es decir, presenta una zona aerobia superior (mantenida por las algas) y una zona anaerobia inferior. Por esta razón, pueden encontrarse organismos aerobios, facultativos y anaerobios. (Gloyna, 1973; - Guinea, 1978)

Las bacterias son los organismos más pequeños que intervienen en el tratamiento biológico de las aguas residuales; en consecuencia, sus tasas de metabolismo son elevadas y, en condiciones ambientales óptimas acaban inviablemente por predominar sobre los hongos y los protozoos. Su principal ventaja competitiva reside en su capacidad metabólica .

Descripción de Flavobacterium : Entre las bacterias que participan más activamente en las Lagunas de Estabilización se encuentran los microorganismos de los géneros Pseudomonas, Flavobacterium y Alcalígenes.

Flavobacterium predomina en las aguas residuales siempre y cuando el contenido proteínico sea relativamente alto, como ocurre en las aguas residuales domésticas o bien en aguas residuales que contengan restos celulares de bacterias muertas. Esto implica que Flavobacterium es una bacteria proteolítica

tica, por lo que degrada compuestos proteínicos.

Esta característica es muy importante, ya que la degradación de las proteínas se puede llevar a cabo en condiciones aeróbicas o en condiciones anaeróbicas. El primer caso da como consecuencia que los productos de la putrefacción se oxiden por completo a compuestos estables no hediondos, considerándose una aplicación práctica en el aprovechamiento de las aguas residuales. El segundo caso trae como consecuencia la putrefacción, esto significa una descomposición anaeróbica de proteínas, productos de su desdoblamiento y compuestos nitrogenados de naturaleza análoga de sustancias de olor fétido, parcialmente oxidados. (Salle, 1965; Burrows, 1970; Gloyna, 1973)

El género Flavobacterium además de presentar la característica de ser una bacteria proteolítica, puede ser aeróbica o anaeróbica en cuanto a su requerimiento de oxígeno, se le clasifica dentro de las bacterias psicrotolerantes facultativas por ser un organismo que puede multiplicarse a relativa velocidad por bajo de 10°C (Demeter, 1969), su crecimiento óptimo se encuentra a la temperatura ambiente, su temperatura máxima es de 37°C aproximadamente, presenta pigmentos amarillo-naranja no fotosintéticos, de tipo carotenoides. (Bergey's Manual, 1974; Brock, 1978). Algunas especies presentan movilidad, efectuándose por medio de flagelos peritriticos. Su fuente -

de energía la toman del carbono. Son bacterias Gram negativas. Una especie de este género de importancia sanitaria es Flavobacterium meningosepticum, que es patógena para el hombre, llega a causar la muerte a lactantes y algunas veces a los adultos. A esta especie se le aísla principalmente de la sangre (líquido ventricular) y gargantas de niños, cuando nacen prematuramente. (Lynch, 1972; Bailey, 1974)

Este género se encuentra en el agua y en el suelo principalmente, aunque también se le aísla en algunos productos lácteos. (Bergey's Manual, 1974; Droop, et al., 1978; Mc Meekin, 1978)

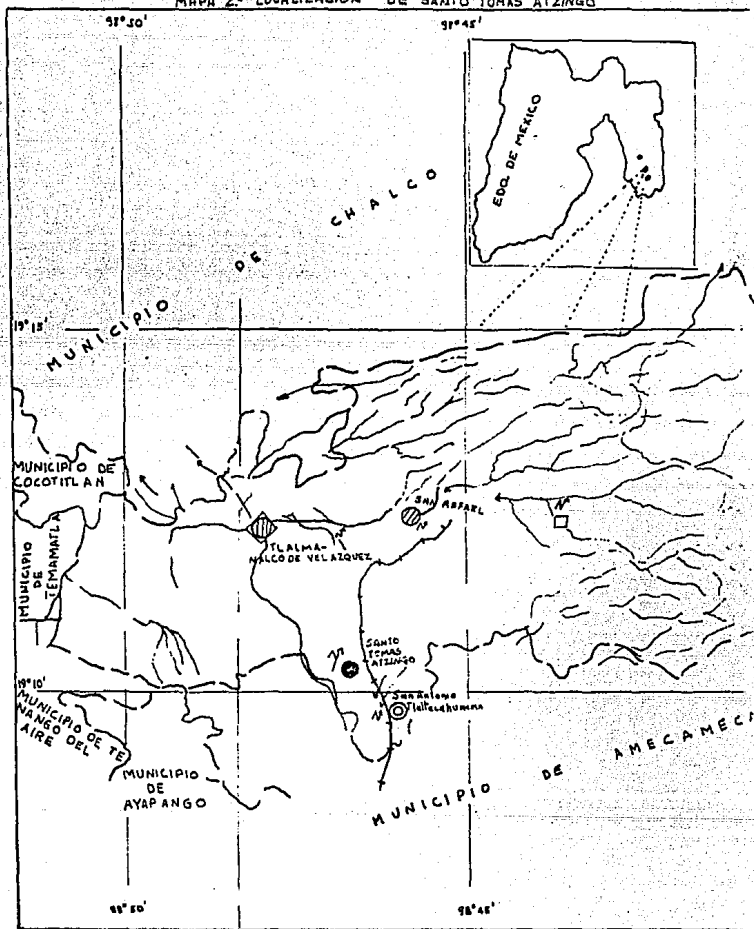
DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

AREA DE ESTUDIO.- La laguna de Estabilización fué construida en 1980 para el tratamiento de los desechos domésticos del poblado, se encuentran en el Ejido de Santo Tomás Atzingo, perteneciente al Municipio de Tlalmanalco, Edo. de México. Geográficamente el ejido se localiza entre las coordenadas $19^{\circ} 10'$ y $19^{\circ} 15'$ de latitud y $98^{\circ} 45'$ y $98^{\circ} 50'$ de longitud; presenta una altitud media de 2475 metros sobre el nivel del mar. (Ver Mapa 1 y Mapa 2)

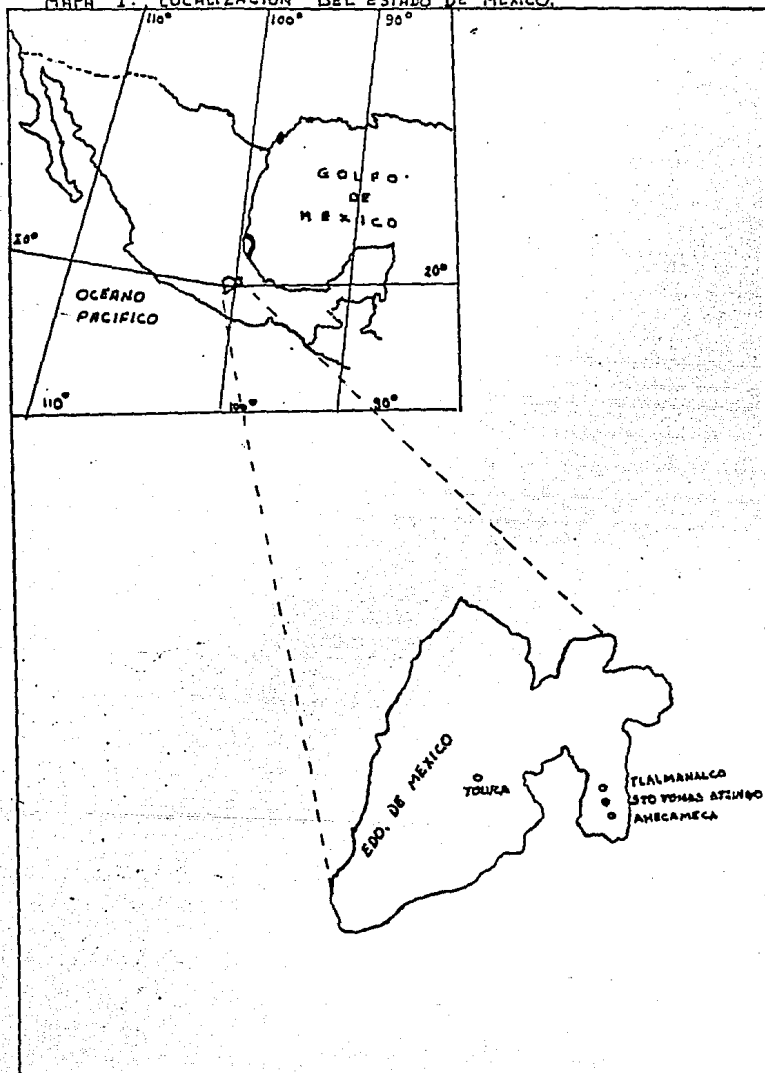
CLIMATOLOGIA.- El clima que presenta la zona de estudio según la clasificación de Koopen modificado por Enriqueta García (1964), es un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, el verano es fresco con temperatura media del mes más caliente menor de 22°C y marcha de temperatura tipo gárges o gangético (el mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano), se le presenta de la siguiente manera: C (w_2) (w) (b)g; la precipitación total es de 960.7 mm anual la máxima en 24 hrs es de 84.5 mm (10-Junio-66).

La temperatura media es de 14.1°C , la temperatura máxima exterior es de 29°C y la temperatura mínima exterior es de 3.0°C .

MAPA 2.- LOCALIZACION DE SANTO TOMAS ATZINGO



MAPA 1.- LOCALIZACION DEL ESTADO DE MEXICO.



El número de días con lluvia es de 127, despejados 150 y nublados 51; la evaporación es de 1268.9 mm Hg.

A lo largo del año predominan dos tipos de vientos; vientos moderados variables y vientos débiles variables, dominando principalmente los segundos. El número de días con helada es de 23, el mes de la primera helada es en octubre y el mes de la última helada es en enero.

El número de días con granizo es de 1, el número de días con tempestad eléctrica es 43, el número de días con niebla es de 17 y el de días con rocío es de 10.

El poblado cuenta con 123 ejidos, tiene un total de 440 hectáreas de las cuales 65 son de agostaderos y 375 de monte.

SERVICIOS.- En servicios y comercios es de 17.9%, de industrias es el 27.2% principalmente.

Cuenta con agua potable desde 1970, su fuente de abastecimiento del Sistema de Morelos. No hay almacenamiento de agua. Existen tomas domiciliarias: hay alcantarillado desde 1970. La energía eléctrica la tiene el 80.2% de la población.

COMUNICACIONES Y TRANSPORTES.- El poblado cuenta con correo, televisión - -
(27.4 %), radio (68.9 %), autotransportes de primera y segunda clase.

No cuenta con teléfono.

La población en 1970 era de 726 habitantes y en 1975* de 858 habitantes,
actualmente no se tienen datos del número de habitantes del poblado.

LOCALIZACION DE LAS LAGUNAS.- Se encuentran ubicadas a las afueras del po -
blado y sus dimensiones son las siguientes:

14 m de ancho, 40 m de largo y 1.50 de profundidad aproximadamente. Están -
interconectadas ambas lagunas (ver fig 1), por cinco conexiones de las cua -
les sólo una se encuentra en pleno funcionamiento; ambas lagunas se encuen -
tran protegidas por una cerca de alambre con una entrada.

*NOTA: Todos los datos anteriores corresponden al año de 1970, excepto
el de población de 1975.

MATERIAL Y METODOS

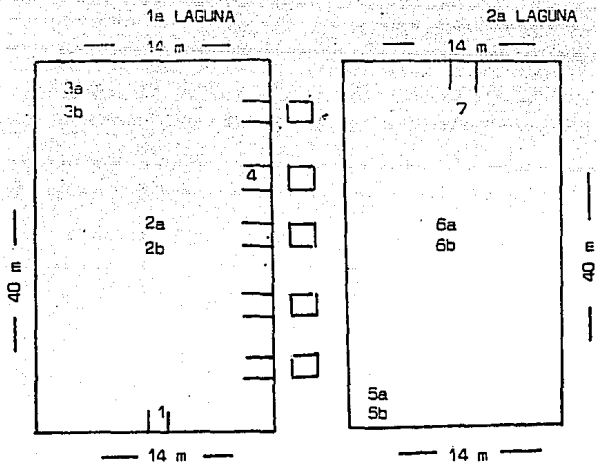
MUESTREO.- Se realizaron dos muestreos cada mes, desde junio hasta diciembre de 1981, a fin de abarcar las estaciones de Verano y principios de Invierno.

La ubicación de las 7 estaciones de muestreo que se eligieron por estratificación no azarosa, se refiere en la fig 1.

TRABAJO DE CAMPO

RECOLECCION.- Las muestras bacteriológicas se toman con botellas de tapón esmerilado de 125 ml, introduciendo éstas en el agua a contracorriente a dos distintas profundidades, 3.5 cm y 50 cm respectivamente, excepto afluente y efluente y conexión. Dichas botellas se esterilizan previamente a 15 lbs de presión y 121°C, durante 15 minutos. Una vez colectadas las muestras se mantienen en hielo hasta su análisis. El intervalo que transcurre entre la recolección y el análisis de laboratorio no debe exceder de 4 hrs. - - (Rodina, 1972; Norris, 1974)

PARAMETROS FISICOQUIMICOS.- Las muestras para la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos se toman con frascos de 40 ml, siguiendo la misma metodología de recolección utilizada para las muestras bacteriológicas.



1.- Afluente

2a.- Nivel de profundidad a 3.5 cm aproximadamente.

2b.- Nivel de profundidad a 50.0 cm aproximadamente.

3a.- Zona de estancamiento a 3.5 cm de profundidad.aprox.

3b.- Zona de estancamiento a 50.0 cm de profundidad aprox.

4.- Conexión entre la 1a y 2 a laguna.

5a.-Zona de estancamiento a 3.5 cm de profundidad aprox.

5b.- Zona de estancamiento a 50.0 cm de profundidad aprox.

6a.- Nivel de profundidad a 3.5 cm aproximadamente .

6b.- Nivel de profundidad a 50.0 cm aproximadamente.

7.- Efluente.

FIG 1: Ubicación de las zonas de muestreo.
(primera y segunda laguna)

Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron el bioxido de carbono, - oxígeno disuelto, potencial de hidrógeno (pH), temperatura del agua y de - manda bioquímica de oxígeno, los cuales se determinaron de la siguiente - - manera:

Para el bioxido de carbono se utilizó el método volumétrico el pH con el potenciómetro portátil y la temperatura del agua se midió con el termómetro de mercurio, con un ámbito aproximado de -10-100 °C.

En el caso de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno las muestras se toman con botellas de DBO, utilizando el método Winkler modificado, el muestreador usado fue la botella Van Dorn.

La determinación de OD se realiza insuto y las de DBO se mantienen en - hielo hasta su análisis en laboratorio. Estos métodos se encuentran descri- tos en el Manual de Métodos Estándares para el Estudio del Agua y Agua de - Desecho de la APHA, AWWA, WPCF, 1981.

TRABAJO DE LABORATORIO

DETERMINACION DE DBO₅. - Se realizó utilizando el método de titulación . - - (Manual de Métodos Estándares para el Estudio del Agua y Agua de Desecho de la APHA, AWWA, WPCF, 1981).

AISLAMIENTO.- De las botellas de tapón esmerilado de 125 ml se inoculan en condiciones asépticas, 100 ml de la muestra en matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de Caldo Bilis Verde Brillante Glucosado (medio de preenriquecimiento). Ver anexo II.

Los matraces se incuban a 37°C, durante 48 hrs.

Después de la incubación se toman 5 ml del medio de preenriquecimiento y se siembran en tubos conteniendo Caldo Nutritivo enriquecido con NaCl al 10% (medio de enriquecimiento). Ver anexo II. (Teltsh et al, 1960)

Los tubos se incuban a 20°C, durante 48 hrs. De estos tubos, se toman inóculos y se siembran por el método de estria cruzada (Bailey, 1974), en cajas de Petri conteniendo medios de cultivo selectivos y diferenciales:-- Agar Sangre y Agar Leche. Ver anexo II.

Las cajas de Petri se incuban a 20°C, durante 48 hrs.

IDENTIFICACION.- La identificación de las bacterias aisladas se lleva a cabo al observar la morfología microscópica (frotis Gram) y macroscópica, al describir las características de las colonias que crecen sobre los medios selectivos y diferenciales, y al realizar pruebas bioquímicas. Ver fig 2.

1. Frotis Gram. (Bailey, 1974; Pelczar et al, 1981)

- a. Colocar con el asa un inóculo del microorganismo sobre el portaobjetos y dejar secar.

- b. Fijar con calor.
- c. Cubrir la preparación con solución cristal violeta (ver anexo II), -
durante 1 min.
- d. Lavar con agua de la llave.
- e. Aplicar la solución de lugol (ver anexo II), por 1 min.
- f. Lavar con agua de la llave.
- g. Decolorar por 10 seg alcohol-cetona. Ver anexo II.
- h. Contrastar con safranina (ver anexo II), durante 30 seg.
- i. Lavar con agua de la llave y dejar secar.
- j. Observar al microscopio.

2. Características morfológicas macroscópicas. (Rodina, 1972)

La identificación de las colonias se lleva a cabo al tomar en cuenta las siguientes características:

Tamaño: en milímetros.

Forma de la colonia: puntiforme, circular, rizoides, etc.

Elevación de la colonia: plana, elevada, convexa, etc.

Borde de la colonia: entero, ondulado, lobulado, etc.

Superficie: lisa, brillante, rugosa, etc.

Textura: seca o viscosa.

Color de la colonia: depende del medio de cultivo.

Paso de la luz: translúcida u opaca.

Las características morfológicas en medio líquido son:

Superficie de crecimiento: floculencia, anillada, peliculada y membranosa.

3. Pruebas Bioquímicas. (Carpenter, 1979; Mac Faddin, 1980)

Las pruebas bioquímicas se realizan sembrando inóculos de las bacterias aisladas y puras de tubos con medio BHI (ver anexo II), a medios -
específicos:

a. Azúcares

Desdoblamiento bacteriano de carbohidratos: glucosa, sacarosa, -
lactosa, manitol y maltosa.

Inocular por suspensión los tubos con los carbohidratos de prueba;
incubar a 20°C durante 48 hrs.

La prueba es positiva cuando se observa un viraje del indicador -
(rojo de metilo) a color amarillo, por la producción de ácido y si -
hay formación de burbujas en el tubo Durham, lo que indica la produc-
ción de gas. (Carpenter, 1979)

b. Catalasa

Para detectar la presencia de la enzima catalasa, añadir unas go -
tas de peróxido de hidrógeno al 30% (H_2O_2), a colonias puras del mi -
croorganismo de prueba, sobre cajas de Agar Nutritivo y Agar Soya - -
Trypticaseína.

La prueba se considera positiva con la producción de gas (burbujeo
sobre la colonia).

c. Citrato

Inocular tubos con medio Citrato de Simmons (ver anexo II) por estría y punción hasta el fondo e incubar a 20 °C, durante 48 hrs.

La prueba es positiva cuando se observa un viraje de colores del medio de verde a azul, o cuando hay crecimiento sobre éste hasta el fondo.

d. Gelatina.

Inocular por punción tubos con medio de Gelatina (ver anexo II), e incubar a 20 °C, durante 7 días aproximadamente. La prueba es positiva si se observa licuefacción de la gelatina o cuando hay crecimiento. Observar la morfología colonial, crateriforme, etc.

e. Producción de Acido Sulfhídrico (H_2S)

Inocular por punción hasta el fondo tubos con medio de SIM (ver anexo II), e incubar a 20 °C, durante 48 hrs.

La prueba es positiva cuando se observa formación de sulfuro de fierro (negro) en el medio, lo que indica producción de H_2S .

f. Producción de Indol

Inocular por punción hasta el fondo tubos con medio SIM (ver anexo II), e incubar a 20 °C durante 48 hrs.

La prueba es positiva si al agregar 2 gotas del reactivo de Kovac (ver anexo II), se observa un viraje del indicador a color rojo cereza.

g. Movilidad

La prueba de movilidad se observa directamente en los tubos con medio SIM (observar antes de realizar la prueba de indol). La prueba es positiva cuando los microorganismos móviles crecen rápidamente y se difunden en todo el medio.

h. Reducción de Nitratos

Inocular por suspensión tubos con medio para nitratos (ver anexo II), e incubar a 20 °C, durante 48 hrs.

La prueba es positiva cuando se observa producción de gas (nitrógeno-molecular) en los tubos Durham, o bien, al tomar un inóculo del tubo y al agregar 2 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de alfa naftilamina (ver anexo II) se observa un viraje de color rosa a rojo intenso, lo que indica la reducción de nitratos a nitritos.

i. Rojo de Metilo

Inocular por suspensión tubos con medio Rojo de Metilo Voges Proskauer (ver anexo II), e incubar a 20 °C, durante 48 hrs. Después de la incubación, se divide en dos partes el medio: una para la prueba de Rojo de Metilo y la otra para la prueba de Voges Proskauer.

La prueba es positiva si al agregar 2 ml de la solución rojo de metilo (ver anexo II), se observa un viraje del indicador (Rojo de Metilo) de amarillo a rojo.

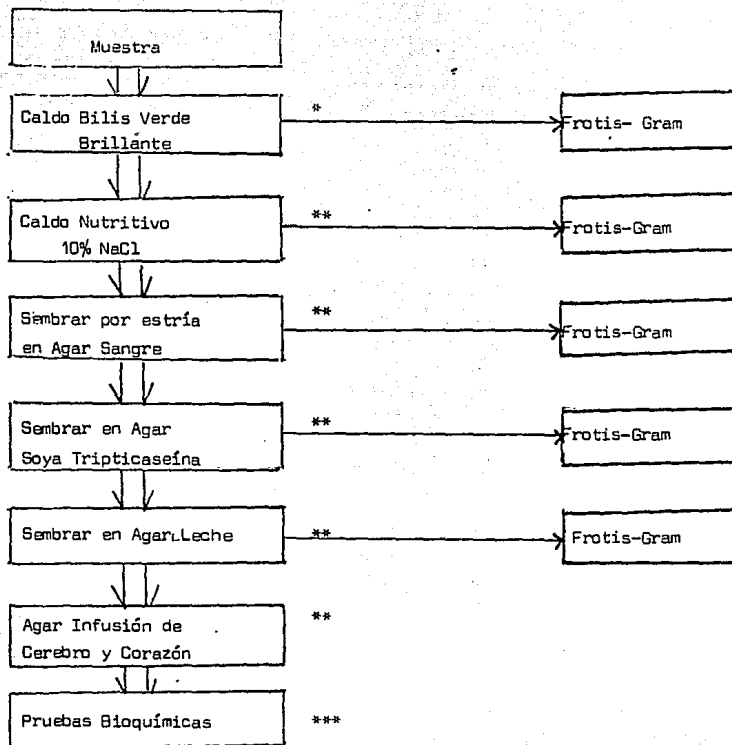
j. Urea

Inocular por suspensión tubos con Caldo Urea (ver anexo II), e incubar a 20 °C, durante 48 hrs. La prueba es positiva cuando se observa el viraje a rosa.

k. Voges Proskauer

La metodología para llevar a cabo esta prueba es igual a la de Rojo de Metilo (ver inciso i). La prueba es positiva si al agregar 4 gotas de - KOH al 40% y 0.5 ml de alfa-naftol (ver anexo II), se observa un viraje - de color a rojo vino.

FIG. 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE



* Incubar a 37 ° C, durante 48 hrs.

** Incubar a 20 ° C, durante 48 hrs.

*** Movilidad, Producción de H₂S, Prueba de Indol, Reducción de Nitratos, Prueba de Carbohidratos, Catalasa, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, - Urea y Licuefacción de Gelatina.

RESULTADOS

El número de muestras que se analizaron durante los 12 muestreos fueron 66 para el aislamiento e identificación del género Flavobacterium y determinación de los parámetros fisicoquímicos. Lo cual se llevó a cabo en 2 fases. (ver fig 3 y fig 4)

Los resultados de la determinación de algunas características meteorológicas en las zonas de muestreo se puede observar en la tabla I. Encontrándose que, los valores obtenidos de la temperatura ambiental a lo largo del estudio, no presentan cambios drásticos, fluctúan entre 16 °C y 19 °C. Lo mismo sucede con las demás características meteorológicas; visibilidad, viento (vientos débiles en su mayoría), tormenta y lluvia no se registró y niebla solo una vez en el quinto muestreo.

La tabla II nos muestra los resultados de algunos parámetros fisicoquímicos en la zona de estudio, en donde se observan los promedios obtenidos a lo largo de los doce muestreos en las diferentes estaciones. Los valores de pH se encuentran entre 7.32 y 7.52, lo cual nos dice que no hay cambios bruscos, la transparencia se hace más evidente en la 2a laguna con respecto a la primera, la cantidad de CO₂ dis aumenta considerablemente en la 2a laguna (ver fig 1) y la temperatura del agua tampoco sufre cambios bruscos de una estación a otra.

Durante los primeros cinco muestreos las estaciones de estudio fueron ubicadas dentro de la primera Laguna, en tanto que los siete muestreos finales, las estaciones se ubicaron en la segunda laguna, excepto el afluente y la conexión entre la primera y segunda laguna que se analizaron a lo largo de todo el estudio. (Ver fig 1)

En la tabla III, fig 3 y fig 4, se puede observar los resultados de la frecuencia de aparición de Flavobacterium en las diferentes estaciones de muestreo.

De las 66 muestras analizadas, se observó que la frecuencia de aparición de Flavobacterium es baja en relación con otros microorganismos, Pseudomonas principalmente.

De un total de 22 veces aislado el microorganismo en las diferentes estaciones de muestreo se encontró lo siguiente:

ESTACION	1a Laguna		2a Laguna	
	No. de VECES AISLADO		No. de VECES AISLADO	
1	1	(20.0%)	2	(28.57%)
2a	3	(60.0%)	X	
2b	3	(60.0%)	X	
3a	1	(20.0%)	X	
3b	2	(40.0%)	X	
4	0		3	(42.85%)
5a	X		5	(71.42%)
5b	X		0	
6a	X		0	
6b	X		1	(14.28%)
7	X		0	

X.- NO SE MUESTRO EN ESA ESTACION.

Por lo que se observa que la mayor frecuencia de aparición corresponde a la estación 5a con un número de veces de 5 (71.42%) y la menor a las estaciones 3a y 6b con una sola vez (20.0% y 14.28% respectivamente).

En las estaciones 5b, 6a y 7 no se aisló Flavobacterium.

En la tabla IV se puede observar las características coloniales del microorganismo aislado en los diferentes medios selectivos y diferenciales que se utilizaron para su aislamiento e identificación. Notándose que la morfología colonial de Flavobacterium es semejante en los 3 medios de cultivo (agar sangre, agar leche y agar soya tripticaseína), excepto que en el medio Agar Leche lleva a cabo una actividad proteolítica.

En la tabla V, se presentan los resultados de las 12 diferentes pruebas bioquímicas esenciales que se realizaron para la identificación de Flavo bacterium.

IMPORTANTE: Los porcentajes se obtuvieron en base a la relación: número de muestras que se realizaron (100%) por fase con el número de veces con que apareció el microorganismo.

T A B L A I

CARACTERISTICAS METEREOLÓGICAS EN LA ZONA DE ESTUDIO EN SANTO TOMAS ATZINGO, EDO DE MEXICO EN LOS DIFERENTES MUESTREOS. (JULIO - DICIEMBRE)												
CARACTERISTICAS	M U E S T R E O											
AMBIENTALES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TEMPERATURA AMBIENTAL °C	18	19	19	18	19	19	16	18,5	16	14	8	10
VISIBILIDAD												
TORRENTA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LLUVIA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
VIENTO												
BAJA TEMPERATURA	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
CONDENSACION	X	X	X	X	X	X				X	X	X

X.- Ausencia
E.- Niebla
A.- Rocío

○.- Cielo despejado
◐.- Cielo medio nublado
●.- Cielo nublado

.- Vientos débiles
.- Vientos moderados
.- Vientos fuertes

VALORES PROMEDIO DE ALGUNOS PARAMETRO FISICOQUIMICOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO, A LO LARGO DEL ESTUDIO.

ESTACION DE MUESTREO	PARAMETROS				
	pH	TRANSPARENCIA (cm)	CO ₂ DIS. (ppm)	OD. (ppm)	TEMPERATURA DEL AGUA °C
1	7.90	4.91	36.079	---	15.86
2a	7.32	3.90	32.18	---	17.60
2b	7.14	--	26.14	---	17.60
3a	7.21	3.62		---	18.37
3b	7.32	--	29.91	---	18.37
4	7.49	4.75	58.50	---	14.40
5a	7.36	5.78	71.16	---	15.50
5b	7.34	--	72.02	---	14.60
6a	7.35	4.50	79.88	---	17.60
6b	7.35	--	57.91	---	16.00
7	7.52	5.38	75.75	---	15.70

NOTA: ---. No se obtuvo resultado

T A B L A III

FRECUENCIA DE APARICION DE Flavobacterium
A LO LARGO DEL MUESTREO EN LAS DISTINTAS
ESTACIONES (JUNIO - DICIEMBRE)

ESTACIONES DE MUESTREO	M U E S T R E O											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
2a	+	+	-	-	+	X	X	X	X	X	X	X
2b	+	-	+	-	-	X	X	X	X	X	X	X
3a	+	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X
3b	-	-	-	+	X	X	X	X	X	X	X	X
4:	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
5a	X	X	X	X	X	+	-	+	+	+	-	+
5b	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
6a	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
6b	X	X	X	X	X	-	+	-	-	-	-	-
7	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-

+ .- PRESENCIA DE Flavobacterium- .- AUSENCIA DE FlavobacteriumX .- NO SE REALIZO EL MUESTREO EN ESTA
ZONA.

T A B L A IV

MORFOLOGIA MACROSCOPICA COLONIAL DE
Flavobacterium OBSERVADA EN LOS DIFERENTES
 MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

CARACTERISTICAS COLONIALES	AGAR SANGRE	AGAR LECHE	AGAR SOYA TRIPTICASEINA
BORDE	ENTERO	ENTERO	ENTERO
COLOR	AMARILLO HUEVO	CAFE Y AMARILLA	AMARILLO HUEVO
CONSISTENCIA	BLANDA	BLANDA	BLANDA
ELEVACION	CONVEXA CASI PLANA	CONVEXA CASI PLANA	CONVEXA CASI PLANA
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
LUZ	OPACA BRILLANTE	OPACA BRILLANTE	OPACA BRILLANTE
SUPERFICIE	LISA	LISA	LISA
TAMAÑO	PEQUEÑAS Y GRANDES	PEQUEÑAS Y GRANDES	PEQUEÑAS Y GRANDES

* PROTEDIISIS : FORMACION DEL COAGULO COLOR CAFE.

PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS
PARA LA IDENTIFICACION DE
Flavobacterium

PRUEBAS BIOQUIMICAS *	GENERO <u>Flavobacterium</u>
GLUCOSA	+ ³
SACAROSA	-
LACTOSA	+
MALTOSA	+
MANITOL	+
CATALASA	+
CITRATO DE SIMMONS	+/-
GELATINA 22 °C	+
PRODUCCION DE H ₂ S (SIM)	-
PRODUCCION DE INDOOL (SIM)	-
MOVILIDAD	+/-
REDUCCION DE NO ₃ ⁻ A NO ₂ ⁻	+ ³
REDUCCION DE NITRATOS A NITROGENO ATMOSFERICO	-
ROJO DE METILO	-
UREA	-
VOGUES PROSKAUER	-
NOTACION: * Ver anexo II + Pruebas positivas - Pruebas negativas +/- Variable en un 50%	
1. Presencia de gas en gran cantidad 2. Presencia de gas en cantidad regular, 3. Presencia de gas en mínima cantidad	

FIG 3.- FRECUENCIA DE APARICION DE Flavobacterium
 EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO
 EN LA 1a FASE DEL ESTUDIO. (PRIMEROS 5 MUESTREOS)

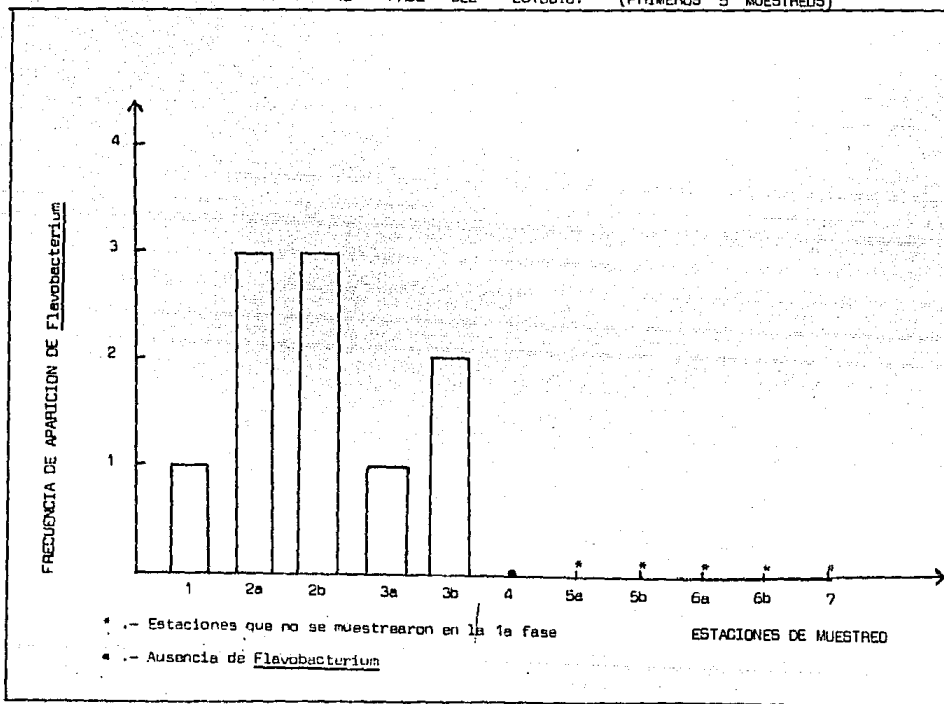
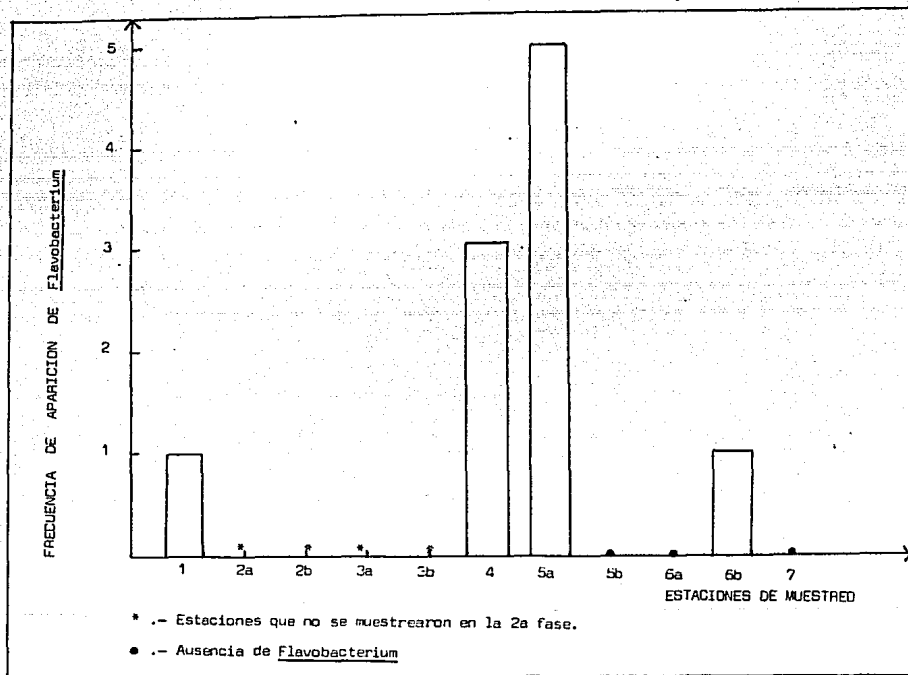


FIG 4.- FRECUENCIA DE APARICION DE Flavobacterium
EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO
EN LA 2a FASE DEL ESTUDIO. (7 muestreos finales)



D I S C U S I O N

Como se observó, los valores obtenidos de la DBO_5 son muy altos, es decir, la carga orgánica es elevada. Esto es debido principalmente a diversos factores como son la gran actividad que se realiza en el poblado (queserías, rastros, etc.), a fuentes externas de contaminación como la presencia de animales muertos (ratas) en la laguna, y a heces fecales provenientes del ganado que entra a beber agua y a pastar en la laguna.

Ahora bien, esta carga orgánica que no es otra que la cantidad de materia orgánica que entra por hectárea por día, trae como consecuencia una demanda inmediata de oxígeno disuelto disponible para llevar a cabo todas las reacciones de degradación. La materia orgánica que no se llega a degradar permanece como sólidos disueltos y sólidos suspendidos, impidiendo la entrada de luz a la laguna y como consecuencia hay menos actividad algal; por lo tanto, la concentración de CO_2 aumenta (ver tabla II). El hecho de no haber una degradación completa de la materia orgánica implica que el tiempo de retención para el cual fue diseñada la laguna no es suficiente.

(Fair et al, 1979; Rherheimer, 1980)

Todo esto trae como consecuencia que en la primera laguna esté: trabajan do anaeróbicamente y la segunda laguna como anaeróbica facultativa, lo cual se basa en las características que presenta como la presencia de algas, color del agua y el olor es menor en ésta que en la primera laguna, donde las bacterias heterótrofas producen H_2S el cual al combinarse con el CO_2 se — elimina el mal olor de la laguna.

La presencia o ausencia de Flavobacterium depende de factores físicos , químicos y biológicos de la laguna.

Este género de microorganismos heterótrofos está considerado como uno de los que participan más activamente en las lagunas de estabilización junto — con los géneros Pseudomonas y Alcaligenes (Gloyna, 1975). Sin embargo, no — se encontró tan frecuentemente en las estaciones de muestreo a lo largo del estudio. Esto se debe más a factores biológicos que a factores físicos. Ya — que como se observa en la tabla II, entre los valores obtenidos en las dife — rentes estaciones de muestreo y los óptimos para el desarrollo de Flavobac — terium (7.2 - 7.4 de pH y 15 °C - 25 °C de temperatura) no hay una gran — variación. Así como la del oxígeno, el cual no constituye un factor limitan — te para el desarrollo y actividad metabólica de este microorganismo, debido a que es anaeróbico facultativo.

(Bergey's Manual, 1974; Fair et al, 1979; Rhernheimer, 1980)

" La disponibilidad de alimento se ve afectada principalmente por la competencia de nutrientes (materia orgánica); la rapidez con que se incorporan estos nutrientes o bien por un antagonismo bacteriano (inhibición)". (Gloyna, 1975)

Esto significa, que estos factores son importantes tomarlos en cuenta para determinar la presencia de Flavobacterium. Es decir, la fuente de energía esencial para este microorganismo es el carbono que lo utiliza a partir de compuestos orgánicos (Bergey's Manual, 1974); el cual se ve reducido al hecho de que otras bacterias como el género Pseudomonas, que se encuentran en mayor cantidad, hacen uso de esta fuente. Por lo que este microorganismo tiende a utilizar otras fuentes de energía como compuestos nitrogenados (proteínas) o en forma de nitratos, NO_3^- , (sólo en algunas especies), siendo no tan esencial para su reproducción y crecimiento. Así mismo, esta fuente también le resulta poco accesible o disponible para utilizarla, debido a que se encuentran otras bacterias como Pseudomonas y Chromobacterium que hacen uso de esta forma de compuestos para su alimento en gran cantidad. Junto a esto, también va a depender de la presencia o ausencia de los sustratos adecuados (proteínas y nitratos) así como a la tensión de oxígeno.

Otro aspecto que es importante tener en cuenta es que este género es -
proteolítico, por lo que su presencia se favorece en los primeros pasos del
proceso de degradación de materia orgánica, en donde la materia nitrogenada
(proteínas) aún no está mineralizada y conforme ésta se va degradando, la -
presencia de este género disminuye, siendo ésta una de las razones por las
que no se encontró en el efluente. (Salle, 1969; Bergey's Manual, 1974)

La degradación de proteínas la puede llevar a cabo en condiciones aeró-
bicas o en condiciones anaeróbicas por ser un organismo facultativo, dando-
lugar a la formación de compuestos nitrogenados con formación de sustancias
de olor fétido en condiciones anaerobias y los compuestos de la putrefacción
los oxida por completo a compuestos estables no hediondos en condiciones -
aerobias, todo esto se lleva a cabo siempre y cuando el contenido proteico
sea alto. (Salle, 1969; Gloyna, 1975)

Por otra parte, debemos considerar otros fenómenos como deprecación, - -
distribución de la especie (si se encuentra en mínima cantidad), etc. - - -
Explicándose de esta manera el hecho de que Flavobacterium no se encontrara
en el afluente en el 75% de los muestreos a pesar de la gran cantidad de -
materia orgánica, y en otros pasos del proceso sí, donde la carga orgánica-
aumenta, principalmente en las estaciones intermedias como 2a, 2b, 3b, 4 y-
5a.

La frecuencia con que se presentó Flavobacterium a lo largo del estudio se le considera relativamente en cuanto a los porcentajes obtenidos, ya que se llevó a cabo el estudio en la laguna en dos fases. En algunos puntos - sólo se muestreó cinco o siete veces (ver tabla II), para observar la variación que existía entre unos y otros puntos; además cuando se inició este estudio, solo se encontraba llena la primera laguna y la segunda laguna todavía no. Lo cual se le considera otra razón más para la mínima incidencia que presentó este género ya que éste, unido a la gran competencia que presenta con otros microorganismos (Pseudomonas presenta una gran difusión debido a que puede adaptarse a condiciones ambientales y sustratos orgánicos muy variados), le resta posibilidades de encontrarse con mayor frecuencia, a pesar de ser una de las bacterias más activas dentro de los procesos de bi oxidación de la materia carbonosa (quimioorganótrofo) y como se sabe, la acción bacteriana se realiza en la superficie de la célula con absorción enzimática de sustancias nutritivas procedentes de las aguas negras, así como la liberación de residuos y subproductos a medida que el alimento es utilizado para la energía y la síntesis de nuevas células. (Mc Kinney, 1962)

ACCION BACTERIANA-	- - - - -Materias primas-	- - - - - Aminas
	(proteínas)	o
		Amoníacos

El método modificado utilizado para el aislamiento de Flavobacterium fue el medio de enriquecimiento Caldo Nutritivo con NaCl al 10% (ver anexo II), reportó resultados favorables en cuanto al desarrollo de colonias de este género con las siguientes características: color amarillas, convexas casi planas, borde entero, consistencia blanda, tamaño regular y forma circular; que concuerdan con las citas reportadas. (Shawan, 1969; Kushner, 1968; Bergey's Manual, 1974; Mc Meekin, 1978; Mac Faddin, 1980)

Se escogió el medio de enriquecimiento con NaCl porque el microorganismo Flavobacterium es halotolerante resistiendo una concentración de NaCl de 6% al 20%, además de que en los primeros ensayos no se aislaba dicho organismo.

Las colonias aisladas en el medio se sembraron en agar leche a 20 °C y 37 °C para observar la temperatura a la que se favorece la proteólisis, observándose mejores resultados a 20 °C. Por otra parte, a 37 °C no se favorece la formación del pigmento, mientras que a la temperatura de 20 °C los resultados obtenidos fueron favorables.

Por otro lado, la temperatura de 37 °C se descartó para la incubación dado que este microorganismo es psicrófilo, es decir, crece en un rango de 10°C - 25°C, siendo óptimo su crecimiento a temperatura ambiente. (Bergey's Manual, 1974; Mc Meekin, 1978)

El crecimiento de este microorganismo en Agar Leche constituye una prueba importante, ya que la leche es un medio microbiológico muy completo en cuanto a nutrientes; en éste, es posible observar una amplia gama de actividades bioquímicas; es por eso, que se escogió para la realización de la prueba de proteólisis para Flavobacterium. Como se puede observar en la tabla IV, el tipo de reacción que se lleva a cabo es la formación del coágulo. Este se produce debido a la acción de ácidos o bases que forman un complejo insoluble de calcio-caseína, el cual puede contraerse y producir un líquido gris o suero. Este género no puede desdoblarse la lactosa, pero puede utilizar las proteínas de la leche como una fuente de energía (de carbono y nitrógeno), produciéndose una reacción alcalina.

Al sembrar el microorganismo en Base Agar Sangre, utilizando sangre de conejo, se desarrollaron colonias circulares de color amarillo intenso, características que no se manifestaron tan claramente cuando se utilizó sangre de caballo. Esto es muy importante, ya que la pigmentación de las colonias y el grado de hemólisis se favoreció con sangre de conejo. (Ver anexo II)

La luz es otro factor importante que interviene durante la incubación, ya que cuando el cultivo se expone al contacto de éste, el color se acentúa más. Esto se observó en los medios de Agar Soya Trypticaseína y Agar Sangre. (Bergey's Manual, 1974)

Además las pruebas bioquímicas aplicadas; de Simmons con la producción de H_2S , Producción de Indol, Movilidad, Reducción de Nitratos, Azúcares, Gelatina, Catalasa, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Urea, apoyan las observaciones macroscópicas y microscópicas del microorganismo. (Bergey's Manual, 1974; Lynch, 1976; Skinner et al, 1977)

CONCLUSIONES

1. La alta carga orgánica en la Laguna de Estabilización se debe a factores tales como:
 - a) Existen fuentes de contaminación externa tales como heces fecales provenientes del ganado que pasta en la laguna y animales (ratas principalmente).
 - b) A la actividad desarrollada en el poblado con productos de origen animal (rastras, etc.).
 - c) No hay una degradación completa de la carga orgánica debido a que el oxígeno disuelto disponible es insuficiente para que los microorganismos lleven a cabo las reacciones de degradación.
 - d) El tiempo de retención para el cual fue diseñada la laguna no es suficiente para permitir una mineralización completa de la materia orgánica.
2. El que la primera laguna haya trabajado anaeróbicamente no afecta la presencia de Flavobacterium ya que éste es un organismo anaeróbico facultativo.
3. La presencia de Flavobacterium en la Laguna de Estabilización se favorece por la presencia de materia orgánica en ese sitio.

4. La presencia de Flavobacterium se ve limitada por la competencia de nutrientes con otros microorganismos como Pseudomonas, lo cual se corroboró durante el aislamiento, ya que éste último predominaba notablemente sobre Flavobacterium.
5. Las técnicas de aislamiento modificadas que se aplicaron permiten obtener mejores resultados al aislar e identificar a Flavobacterium.
- a) La luz es otro factor importante durante la incubación ya que al exponer al cultivo a ésta se acentúa más el color de las colonias.
- b) La temperatura óptima de crecimiento utilizando las técnicas de aislamiento (modificadas) es de 20 °C para Flavobacterium.

SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS FUTUROS

- Deben realizarse las correcciones de diseño adecuadas, construcción en - - paralelo, para que las dos lagunas soporten una carga orgánica elevada y permitan la mineralización de ésta.
- Se recomienda tener un continuo mantenimiento de las lagunas para eliminar la acumulación de maleza y evitar la entrada de ganado en las mismas.
- Conservar todas las estaciones de muestreo a lo largo del estudio y trabajo experimental con la finalidad de poder efectuar un análisis comparativo más real.
- Realizar estudios de análisis de proteínas, es importante debido a que el microorganismo en estudio es proteolítico.
- Sembrar un mayor número de muestras en Caldo Bilis Verde Brillante, se sugiere unas cuatro por estación.
- Para realizar un estudio más completo se recomienda utilizar medios que contengan papa, ya que en este tipo de medio su pigmentación se favorece, pruebas bioquímicas tales como: Oxidasa, y Tinción de flagelos.

A N E X O I

A B R E V I A T U R A Y S I M B O L O S

DBO Demanda Bioquímica de Oxígeno al quinto día

lbs Libras

OD Oxígeno Disuelto

Q.P Químicamente pura

1. MEDIOS DE CULTIVO. (BBL, 1974)

a. Agar Caseína (Peptona de caseína purificada).

Nitrógeno total	12.70 g
N amínico/ N total	30.90 g
Sodio	4.60 g
Cloruros	1.20 g
Calcio	0.65 g
Hierro	20.00 ppm

pH final 7.1 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

b. Agar Citrato de Simmons

Fosfato dihidrogenado de amonio	1.00 g
Fosfato dipotásico	1.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Citrato de sodio	2.00 g
Sulfato de magnesio	0.20 g
Agar	15.00 g
Azul Bromotimol	0.08 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 6.9 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

c. Agar granulado.

Agar	2.00 g
Agua destilada	100.00 ml

pH final 6.9 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

d. Agar Infusión de Cerebro y Corazón.

Infusión de cerebro de ternera	200.00 g
Infusión de corazón de res	250.00 g
Mezcla de peptonas	10.00 g
Fosfato dipotásico	2.50 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Dextrosa	2.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.4 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

e. Agar Leche.

Leche descremada en polvo (Nesbrun)	10.00 g
Agar granulado	2.00 g
Agar destilado	1000.00 ml

pH final $7.0 \pm$

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

El agar granulado (enfriar a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$), se mezcla con la leche descremada.

f. Agar Nutritivo.

Peptona de gelatina	5.00 g
Extracto de carne de res	3.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 6.8 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

g. Agar de Soya Trypticaseína.

Peptona de caseína	15.00 g
Peptona de soya	5.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.3 ± 0.1

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

h. Base Agar Sangre

Infusión de músculo cardíaco	375.00 g
Peptona de carne	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.3 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

Agregar al medio estéril (45°C), 50 ml de sangre de conejo, estéril y defibrinada por litro de medio.

i. Base de Caldo Rojo de Ferol.

Peptona de caseína	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Rojo Ferol	0.018 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.4 ± 0.2

Agregar a ésta, 10 g de glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manitol o cualquier otro carbohidrato de prueba. Esterilizar a 10 lbs de presión, durante 10 min.

j. Caldo Nutritivo

Peptona de gelatina	5.00 g
Extracto de carne de res	3.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 6.9 ± 0.1

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

k. Caldo Nutritivo al 10% NaCl.

Caldo Nutritivo	0.80 g
NaCl (Q.P)	10.00 g
Agua destilada	100.00 ml

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

ñ. Gelatina al 7%

Líquido Tioglicolato.	1.32 g
Gelatina para microbiología	3.15 g
Agua destilada	1000.00 ml

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

o. Leche descremada en polvo. Composición media.

Graza de leche	1.00 g
Proteínas	36.00 g
Lactosa	52.00 g
Sales minerales	8.00 g

pH final 7.0 ±

p. Medio B King

Proteasa paptona	1.00 g
Glicerina	0.50 g
Sulfato magnésico	0.75 g
Fosfato monobásico potásico	0.075 g
Agar Nutritivo	0.920 g
Agua destilada	40.00 ml

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

d. Fenol	
Fenol	5.00 g
Agua destilada	95.00 ml
e. Hidróxido de potasio. (Reactivo para Voges-Proskauer)	
KOH	40.00 g
Creatinina	0.30 g
Agua destilada	100.00 ml
f. Reactivo de Kovac. (Prueba de Indol)	
Alcohol isoamílico	150.00 ml
p-dimetilamino benzaldehído	10.00 g
HCL concentrado	50.00 ml
g. Peróxido de Hidrógeno	50.00 ml
h. Rojo de Metilo	
Rojo de Metilo	1.00 g
Alcohol 96%	300.00 ml
Agua destilada	200.00 ml

q. Medio líquido tioglicolato.

Trypticasa peptona	15.00 g
Cistina	0.50 g
Dextrosa	5.00 g
Extracto de carne	2.50 g
Cloruro de Sodio	0.50 g
Tioglicolato de sodio	0.001 g
Agar	0.75 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.1 ± 0.1

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

r. Medio SIM (Para la producción de H_2S , formación de Indol y Movilidad)

Peptona de caseína	20.00 g
Peptona de carne	6.10 g
Sulfato de hierro y amonio	0.20 g
Tiosulfato de sodio	0.20 g
Agar	3.50 g
Agua destilada	1000.00 ml

pH final 7.3 ± 0.2

Esterilizar a 15 lbs de presión, durante 15 min.

A N E X O I I I

2. Colorantes. (Bailey, 1974)

TINCION GRAM

a. Cristal Violeta

Cristal Violeta (90% de contenido seco)	2.00 g
Alcohol etílico al 95%	20.00 ml
Oxalato de amonio monohidratado	0.80 g

b. Solución Iugol

Cristales de yodo	1.00 g
Yoduro de potasio	2.00 g
Agua destilada	300.00 ml

c. Alcohol-Cetona (Solución decolorante)

Alcohol etílico al 95%	10.00 ml
Acetona	10.00 ml

d. Colorante Safranina

Safranina	2.50 g
Alcohol etílico	100.00 ml
Agua destilada	1000.00 ml

3. SOLUCIONES

Reactivos para la prueba de DBO_5 y OD. (APHA, AWWA, WPCF. Standar methods for the examination of water and wastewater; 1981)

a. Acido Sulfúrico concentrado 36 N =

b. Alkali-ioduro

Hidróxido de sodio (NaOH)	500.00 g
Ioduro de sodio (NaI)	135.00 g
Nitruro de Nitrógeno ($\text{N}_2 \text{ N}_3$)	10.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

c. Buffer de fosfatos (Amortiguadora para DBO_5)

KH_2PO_4	8.50 g
KH_2PO_4	21.75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$	33.40 g
NH_4Cl	1.70 g
Agua destilada	500.00 ml

d. Cloruro de Calcio

CaCl_2	27.50 g
Agua destilada	1000.00 ml

e. Cloruro Férrico

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Agua destilada	1000.00 ml

f. Hidróxido de sodio (para la determinación de CO_2).

Normalidad = 0.027

NaOH	40.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

g. Determinación de Nitratos (NO_3)

Madre de nitratos

KNO_3	74.60 g
Agua destilada	1000.00 ml

Patrón de Nitratos

Madre de Nitratos	10.00 ml
Agua destilada	1000.00 ml

Arseniato de sodio

NaAsO_2	5.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

Brucina-ác. sulfanílico

Sulfato de Brucina	1.00 g
Ac. Sulfanílico	0.10 g

Solución de ác. sulfúrico

H_2SO_4 concentrado	500.00 ml
Agua destilada	125.00 ml

Cloruro de sodio	
NaCl	300.00 ml
Agua destilada	1000.00 ml

h. Determinación de Nitritos (NO_2)

Reactivo de sulfanilamida	
Sulfanilamida	5.00 g
HCL	50.00 ml
Agua destilada	300.00 ml
Diluir con agua destilada	500.00 ml

Clorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina

Clorhidrato	500.00 mg
Agua destilada	500.00 ml
HCl	1 + 3

Solución madre de nitritos

NaNO_2	1.232 g
Agua destilada	1000.00 ml

Patrón de KMnO_4 0.05 N

KMnO_4	1.60 g
Agua destilada	1000.00 ml

i. Sulfato Manganoso. (para determinar OD)

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	480.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

j. Tiosulfato de Sodio 0.025 N. (para determinar OD)

$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	6.205 g
Agua destilada	1000.00 ml

Reactivos para las PRUEBAS BIOQUIMICAS. (Bailey, 1974)

a. Acido Sulfenilico (reactivo I para reducci3n de NO_3^-)

Acido Sulganilico	0.50 g
Acido ac3tico al 30%	50.00 ml

b. Alfa naftil amina (reactivo II para la reducci3n de NO_3^-).

Naftil-amina	0.50 g
Acido ac3tico	150.00 ml
Agua destilada	50.00 ml

c. Alfa naftol (Pruebas de Voges-Prokauer)

Alfa naftol	5.00 g
Alcohol etilico absoluto	100.00 ml

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- APHA, AWWA, WPCF. 1981. Standard Methods for the examination of water wastewater. 15 Th Ed., : U.S.A. pp 1 y ss.
- Bailey, W.R., y Scott, E.G. 1974. Diagnostic Microbiology. A test book for the isolation and identification of pathogenic microorganisms. 4Th. Ed., the C.V. Mosby Company : U.S.A. pp. 83-83, 87 y ss.
- Brock, T.D. 1978. Biología de los microorganismos. 2a. Ed., - Omega.: Barcelona. pp. 624-630.
- Buchanan, R, (Editor). 1974 Bergey 's Manual of determinative bacteriology. 8Th. Ed., The William et Wilkins.: Balti - more. pp. 357 - 364.
- Burrows, W. 1970. Tratado de microbiología. 20a Ed., Interamericana : México. pp. 508 - 513.
- Carpenter, L.P. 1979. Microbiología. 4a Ed., Interamericana. : - México. pp. 1 y ss.
- Davis, E.D., Dubelcco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., y Wood, W.B. 1978. Tratado de microbiología. 2a Ed., Salvat S.A. : Barcelona. pp. 52 y ss.

- Guinea, J. 1978. Análisis microbiológicos de aguas. Aspectos aplicados. 1a Ed., Omega. : Barcelona. pp. 52-60
- Hillebor, H.E. 1976. Manual de tratamientos de aguas negras. - - 5a Ed., Limusa.: México. pp. 99-100
- Kushner, D.J. 1968. Halophilic Bacteria. Adv. in appl. Micro -- biol. 10: 73-96
- Lynch M.J. 1972. Métodos de laboratorio. 2a Ed., Interamericana.: México. pp. 911-917.
- Mac Faddin, J.F. 1960. Biochemical test for identification of - medical bacteria. 2nd Ed., William et Wilkins Company. - Baltimore. : London. pp. 52 y ss.
- Manual de procedimientos de laboratorio y de productos. BB1 . - 1974. 5a Ed., Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. : México.
- Mc Meekin, T.A., y Shewan, J.M. 1978. Taxonomic strategies for - Flavobacterium and related genera. Journal of appl. - - Bacteriol. 45 (3). : 321-332.

- Demeter, K.J. 1969. Lactobacteriología. 1a Ed., Acribia. : - -
Zaragoza. pp. 128-138.
- Droop, MR. y Ferguson Wood, E.J. 1978. Advances in microbiology of the sea. 1a Ed., Academic Press.: London y New York.
pp. 79-151.
- Fair, G.M., Geyer, J.CH., y Okun, D.A. 1979. Purificación de aguas y tratamientos y remoción de aguas residuales. 3a -
Ed., Limusa.: México. pp. 53-56, 449-451 y 604-609.
- Geldreich, E.E. 1973. Microbiology of water. J. of Wat. Pollut. Cont. Fed. 15 (6) : 1252-1254
- Geldreich, E.E. 1975. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2nd Ed., Municipal Environmental - -
Research Laboratory Office of Research and Development. :
Cincinnati. pp. 135-138.
- Gloyna, E.F. 1973. Waste stabilization ponds. 1st. Ed., World -
Health Organization Geneva. : Swtzerland. pp. 1 y ss.

- Norris, J.R. y Ribbons, D.W. 1974. Methods in microbiology. - -
2nd Ed., Academic Press London and New York. : Great - -
Britain. pp. 3-9, 40-41, 104-105, 204-215 y 331-349.
- Pelczar, M.J., Reid, P.D. y Chan, E.C.S. 1981. Microbiología. 4a
Ed., Mac Graw Hill. : España. pp. 7 y ss.
- Rodina, A.G. 1972. Methods aquatic microbiology. University Park
Press. : Baltimore. pp. 54-82 y ss.
- Rhernheimer, G. 1980. Aquatic Microbiology. 2nd Ed., John Wiley
& Sons. : New York. pp. 26 y ss.
- Salle, A.J. 1965. Bacteriología. 2a Ed., Gustavo Gili, S.A. :
Barcelona. pp. 378 y ss.
- Shawan, J.M., Hobbs, G., y Hodakiss, W. 1960. A determinative
shema for the identification of certain genera of Gram
negative bacteria, with special reference to the Pseu -
domonadace. Journal appl. Bacteriol. 23 (3) : 137-149.

- Skinner, F.A. y Shewan, J.M. 1977. Aquatic microbiology. 1st -
Ed., Academic Press. : London. pp. 135-173.
- Teltsh, Kedmi, S., Bonnet, L., Barenzotain-Potem, Y., y - -
Katznelson, E. 1980. Isolation and identification of -
pathogenic microorganisms at waste water irrigated fiel-
ds : Ratios in air and waste water. Appl. and Environ.
Microbiol. 39 (6) : 1183-1189.