



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**“ESTUDIO BACTERIOLOGICO DEL GENE-
RO *Chromobacterium* BERGONZINI, 1881,
EN UNA LAGUNA DE ESTABILIZACION EN
SANTO TOMAS ATZINGO, ESTADO DE ME-
XICO, DE JUNIO A DICIEMBRE DE 1981”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PATRICIA BONILLA LEMUS

México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

INDICE

CÁPITULO	PAGINA
I	RESUMEN 1
II	INTRODUCCION 3
III	REVISION BIBLIOGRAFICA 5
	1. Lagunas de estabilización 5
	2. Importancia de los estudios bacteriológicos en las lagunas de estabilización. 11
	3. Características del género <u>Chromobacterium</u> Bergonzini, 1881 13
	4. Características de la zona de estudio 16
IV	OBJETIVOS 21
V	METODOS 22
	1. Trabajo de campo 22
	1.1. Muestreo para análisis bacteriológicos. 22
	1.2. Muestreo para análisis fisicoquímicos. 23
	2. Trabajo de laboratorio 23
	2.1. Parámetros fisicoquímicos 23
	2.2. Bacteriológico 24
VI	RESULTADOS 34
VII	DISCUSION DE RESULTADOS 45
VIII	CONCLUSIONES 53
IX	SUGERENCIAS 54
	ANEXO I: Abreviaturas y Símbolos 55

INDICE

CAPITULO

PAGINA

ANEXO II: Medios de cultivo, colorantes y soluciones	57
BIBLIOGRAFIA	68

I. RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar el papel del género Chromobacterium en los procesos de recirculación y mineralización de la materia orgánica e inorgánica en una laguna de estabilización, así como para conocer su relación con algunos parámetros fisicoquímicos.

El estudio se efectuó en una serie de dos lagunas conectadas paralelamente por un canal, de junio a diciembre de 1981, meses durante los cuales se analizaron 64 muestras.

El funcionamiento de las lagunas se evaluó con base en determinaciones de la demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO_5) y algunos parámetros fisicoquímicos (potencial de hidrógeno, temperatura, oxígeno disuelto, bióxido de carbono, nitratos y nitritos).

Los resultados de estos análisis mostraron que las lagunas trabajaban anaerobiamente, debido a que la carga orgánica era sumamente alta y el oxígeno disuelto (OD) no fue suficiente para degradarla totalmente, razón por la cual en ninguno de los muestreos se detectó este elemento. Esto no fue un factor limitante para el crecimiento y desarrollo del género en estudio ya que es una bacteria anaerobia facultativa que utiliza a los nitratos como aceptores

de electrones y además participa activamente en la degradación de materia orgánica por lo que la mayor frecuencia -- del microorganismo se encontró en las zonas donde había ma yor acumulación de materia orgánica.

En este trabajo se presentan los métodos que se -- utilizaron para el aislamiento e identificación del género en estudio, así como su importancia en sistemas de trata-- miento de aguas residuales.

II. INTRODUCCION

El desequilibrio ecológico es uno de los graves - problemas que ha creado el hombre en su continuo avance - tecnológico provocando la contaminación de los diferentes medios biológicos. Estos medios pueden ser recuperables - si cuentan con el tiempo suficiente para efectuar sus ciclos de regeneración sin embargo, estos cada vez son menos posibles debido a que la población ha ido agotando la superficie de los medios como son la tierra y el agua.

El hombre en su afán de progreso ha descuidado el recurso hidráulico por confiar en su abundancia, porque - si bien es cierto que las tres cuartas partes de la tierra están cubiertas por agua, el 95% de ésta, es salada y sólo el 5% dulce, de la cual solamente la quinta parte es aprovechable por el hombre (Kaime, 1982).

No obstante el conocimiento de este problema, la excesiva explotación y el desperdicio de agua son alarmantes no sólo en México sino en todo el mundo, situación aún más grave si se considera su contaminación, por el vertido incontrolado de aguas residuales a los cuerpos receptores (ríos, lagos, etc.), lo que provoca una disminución en la calidad del agua que, al mezclarse o filtrarse con las fuentes de agua pura que abastecen poblaciones, causan graves problemas de salud al hombre.

Debido a los problemas antes mencionados, se han desarrollado varios sistemas de tratamiento de aguas residuales y se reconoce en general que el tratamiento biológico en cualquiera de sus formas es la solución más económica en el caso de aguas domésticas y en la mayoría de las aguas industriales. Uno de estos sistemas es el de lagunas de estabilización, ya que son la solución más adecuada para lugares donde el suelo no es caro, las cargas orgánicas fluctúan, existen restricciones económicas y hay escasez de personal preparado (Gloyna, 1971).

El proceso de estabilización depende en gran parte de las acciones recíprocas entre algas y bacterias. De estas últimas destacan las de los géneros Pseudomonas, Flavobacterium y Chromobacterium (Rheinhermer, 1980; Dodakundi, 1976).

El establecimiento de las lagunas de estabilización en nuestro país, aún es muy reciente y se ha prestado más atención a su construcción, operación y mantenimiento. Por esto y por el avance continuo de la contaminación del agua es necesario ahondar en el conocimiento de otros parámetros bióticos, como es el caso del género Chromobacterium ya antes mencionado y que juega un papel importante en procesos básicos como la desnitrificación.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. LAGUNAS DE ESTABILIZACION

Se han desarrollado varios sistemas de tratamiento de aguas residuales, químicos, físicos y biológicos así como combinaciones de éstos, los cuales pueden resumirse como sigue:

Primarios: Permite la separación por medios físicos de los sólidos en suspensión no retenidos en el tratamiento previo. En este método se aprovechan los fenómenos de sedimentación, floculación, flotación y filtración. --- (Sundstom, 1979):

Secundario: Generalmente involucra un proceso biológico para remover materia orgánica a través de la oxidación bioquímica. Este sistema también es llamado biológico, pues los procesos de oxidación biológica se realizan en -- cualquiera de los siguientes sistemas:

- Lagunas de estabilización
- Lagunas aereadas
- Filtros percoladores
- Lodos activados
- Digestores anaerobios

Terciario: Muchos efluentes requieren tratamiento -- más avanzado para remover contaminantes particulares o para preparar el agua para su uso posterior.

Algunas operaciones terciarias comunes son la remoción de componentes del fósforo por coagulación, remoción de componentes del nitrógeno con aire o por nitrificación desnitrificación con reactores biológicos. (Sundstom, 1979).

Desinfección: Este tratamiento tiene como objetivo eliminar a los organismos patógenos. Se lleva a cabo por elevación de la temperatura, exposición a rayos ultravioleta, etc., o por la adición de algunos de algunos productos químicos como el cloro, bromo, yodo, ozono, etc.

Diversos. Estos sistemas son aquéllos en los que se necesita eliminar un contaminante específico como los cianuros, el plomo, el mercurio, etc., para lo cual se recurre a mecanismos tales como neutralización, precipitación u óxido reducción, llevándose estos mecanismos a cabo en cualquier fase del tratamiento.

De los diferentes sistemas brevemente descritos -- arriba, las lagunas de estabilización son uno de los procesos más eficientes y económicos para el tratamiento de aguas residuales y dadas las características, necesidades y recursos de los diferentes países del mundo, es un método -- muy usado tanto por países desarrollados como por subdesarrollados. México, hasta 1978 contaba con 26 lagunas de estabilización distribuidas con todo el país principalmente en la zona norte, de las cuales hasta esa fecha sólo dos habían sido abandonadas. (Cuéllar, 1978).

Las lagunas de estabilización son grandes estanques inundados intencionalmente con aguas residuales crudas o parcialmente tratadas en flujo continuo y construidas de manera que quede expuesta al aire la mayor extensión posible de superficie. Su profundidad no es mayor de 1.80 m (Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 1976).

Son funcionales especialmente en comunidades pequeñas no mayores de 50,000 personas con grandes áreas de terreno económico y con suficiente luz solar.

De las principales ventajas que presentan, están las siguientes:

- a) Su costo de construcción y mantenimiento es mínimo.
- b) Su operación es sencilla.
- c) No se requiere personal de operación especializado.
- d) El sistema de tratamiento es igual o mejor que algunos procesos tradicionales.
- e) Es adaptable a fluctuaciones de carga.

Existen varias formas de clasificar a las lagunas de estabilización; entre las más conocidas están las siguientes:

- a) De acuerdo a la cantidad de oxígeno disuelto.

- Aerobias

- Anaerobias
 - Facultativas
- b) De acuerdo al lugar que ocupan en relación a otros mecanismos en (Dodakundi, 1976):
- Primarias o de aguas residuales crudas.
 - Secundarias si reciben el efluente de otros procesos de tratamiento.
 - De maduración para reducir al máximo el número de organismos patógenos; y algunas veces se utiliza en piscicultura.
- c) Por su construcción y modo de operación en (Doda kundi, 1976):
- Lagunas en serie
 - Lagunas en paralelo

En general, los términos lagunas de estabilización, lagunas de estabilización facultativa, lagunas de agua de desecho y estanques de estabilización son usados indistintamente.

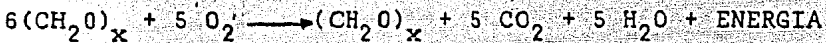
La remoción de materia orgánica de aguas residuales es resultado de dos procesos operativos en lagunas de estabilización.

El primer proceso es de sedimentación y precipitación de sólidos sedimentables, sólidos suspendidos y partículas coloidales.

El segundo proceso involucra una combinación de las transformaciones biológicas causantes de la oxidación y reducción de material de desecho orgánico que entra a la laguna.

Las principales reacciones biológicas que tienen lugar en una laguna de estabilización han sido reportadas por Oswald (1968) y Gloyna (1969) como:

a) La oxidación aerobia de carbono orgánico en lodo, bióxido de carbono y agua:



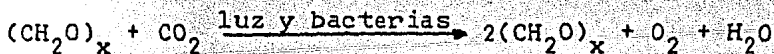
b) La formación de ácidos orgánicos de la conversión anaerobia de carbohidratos en células bacterianas y componentes relacionados:



c) La fermentación de ácidos orgánicos en metano y bióxido de carbono:



d) Y la conversión fotosintética de bióxido de carbono en componentes orgánicos y oxígeno libre por la luz solar:

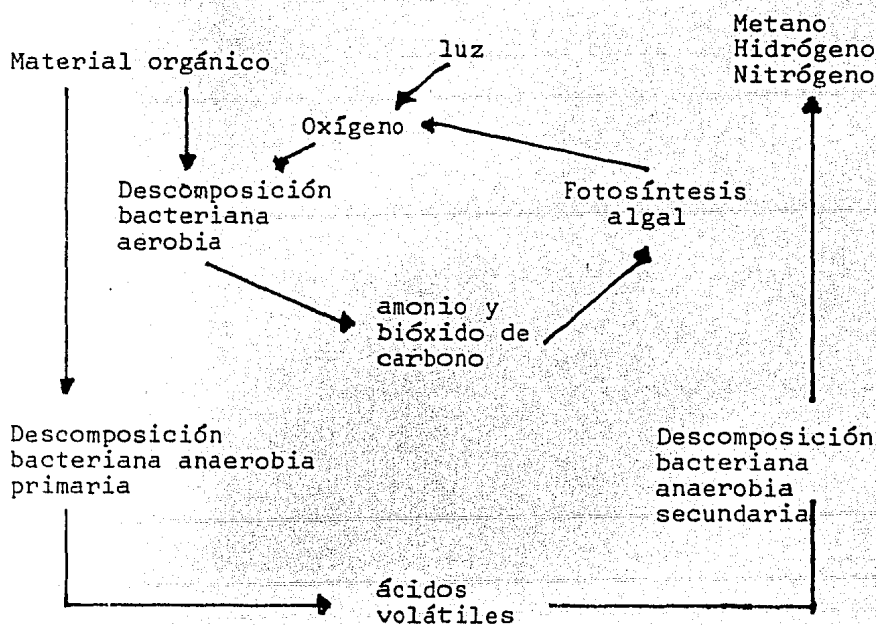


Estas transformaciones biológicas representan las reacciones fundamentales que tienen lugar en la mayoría de

los procesos de tratamiento biológico empleado en la estabilización de aguas contaminadas.

En las lagunas de estabilización facultativas, la estratificación causa una predominancia de las reacciones anaerobias en las zonas más bajas y oxidaciones aerobias junto con la fotosíntesis en las zonas superiores.

La acción simultánea de tres principales grupos - de organismos forma una relación útil: algas productoras de oxígeno, bacterias anaerobias, aerobias y bacterias - del metano. Aguirre y Gloyna (1970), representan esquemáticamente la ecología de una laguna de estabilización facultativa como sigue:



En México, estas lagunas se utilizan como métodos de tratamiento secundario, ya que su operación es sencilla. Los costos de operación y mantenimiento son bajos y se dispone de terreno suficiente. Sin embargo, su establecimiento en el territorio nacional aún es muy reciente y se ha prestado más atención a su construcción, operación y mantenimiento y en menor instancia a los aspectos físicos, químicos y biológicos (Gordon, 1979).

De estos últimos, se ha estudiado principalmente al grupo de microorganismos enteropatógenos y a los protozoarios parásitos.

2. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS BACTERIOLOGICOS EN LAGUNAS DE ESTABILIZACION.

Las bacterias juegan un papel importante en el reciclaje de los nutrientes en los ecosistemas acuáticos y a pesar de los excelentes resultados conseguidos por la genética y fisiología bacterianas, la información disponible sobre las poblaciones en sus ambientes naturales, o sobre las comunidades bacterianas es muy reducida. Esto se debe principalmente a la gran dificultad de la identificación taxonómica bacteriana y a la gran variación asociada con cualquier estima in situ de la concentración de bacterias.

En estos sistemas de tratamiento, las bacterias - que más se han estudiado son los coliformes totales, las cuales son consideradas como organismos indicadores de - contaminación

Algunas investigaciones también han reportado --- otros organismos tales como: Escherichia coli y Streptococcus faecalis. Rheinhermer (1980) señala la presencia invariable del género Chromobacterium en aguas impuras.

Por ello, es necesario ahondar en el conocimiento de otros parámetros bióticos como es el caso del género Chromobacterium, ya antes mencionado, que juega un papel importante en los procesos básicos como la desnitrificación o reducción desasimiladora de nitratos a nitritos y nitrógeno molecular.

Si ocurre un gran desarrollo de bacterias desnitrificantes como Chromobacterium, con gran actividad en un cuerpo de agua, las sales disueltas y vitales para el desarrollo del fitoplancton pueden ser totalmente degradadas y convertidas a nitrógeno molecular el cual es --- inaccesible para la mayoría de las algas y a una reducción de la actividad fotosintética en cualquier cuerpo de agua.

Por otra parte, dada la importancia de este género y el reciente establecimiento de estos sistemas de --

tratamiento de aguas de desecho en nuestro país, es necesario estudiar el desarrollo y comportamiento de las condiciones microbiológicas, específicamente el papel del género Chromobacterium.

3. CARACTERISTICAS DEL GENERO Chromobacterium Bergonzini, 1881.

Este género fue incluido hasta la séptima edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, en la familia Achromobacteraceas que contenía 5 géneros: Alcalifgenes, Achromobacter, Flavobacterium, Agarbacterium y Be-neckea, sin embargo a pesar del nombre de la familia, algunos de ellos producen pigmento rojo, amarillo, violeta o naranja. Por esta razón y otras, el género Achromobacter ha sido eliminado de la octava edición del Manual de Bergey y ahora es conocido como Chromobacterium (Frobi---sher, 1974). Sin embargo, continúan refiriéndose al género con el nombre de Achromobacter.

Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con extremos redondeados, algunas veces ligeramente curvados, generalmente se encuentran solos, ocasionalmente en pares o en cadenas cortas. Sin cápsula definida. No forman esporas. Sus dimensiones son de 0.6 - 1.2 μm por 1.5 - 6 μm . Móviles, con un flagelo polar o con uno o cua

tro flagelos subpolares o laterales (Buchanan, 1974).

Producen colonias violetas, redondas, poco convexas y en caldo nutritivo se puede observar un anillo violeta en la unión de la superficie líquida y la pared que lo contiene.

Son microorganismos quimiorganótrofos: metabolismo respiratorio oxidativo o fermentativo produciendo ácidos orgánicos de glucosa, pero sin producción de gas visible. La utilización de otros azúcares es muy variable (Buchanan, 1974).

Generalmente son oxidasa positivos por el método de Kovac (1956), aunque el pigmento puede interferir en su lectura. Son catalasa positivos, indol negativos, Voges-Proskauer positivos, reducen nitratos y nitritos, y algunas veces con producción de gas visible. Son fosfatasa positivos. El pH óptimo para el género es de 7 a 8 y por abajo de 5 no hay crecimiento. Tampoco crece en medios que contengan 6% o más de cloruro de sodio (Buchanan, 1974; Mc Faddin, 1980).

Utilizan citrato de Simmons como fuente de carbono y nitrógeno (Mc Faddin, 1980).

El pigmento violeta (violaceína) sólo se produce libremente en un medio que contenga triptofano y puede ser -

suprimido por ciertos tipos de peptona. El pigmento es soluble en etanol pero no en agua o cloroformo. Puede ser identificado espectrofotométricamente mostrando una absorción máxima en solución etanólica a 549 nm y un mínimo a 430 nm. Las dos especies del género pueden dar origen a variantes no pigmentadas (Buchanan, 1974).

Los microorganismos del género crecen a 25°C pero las especies difieren en temperatura máxima y mínima. Hay dos especies bien definidas, Chromobacterium violaceum -- crece a 37°C pero no a 4°C (mesofílica) y Chromobacterium lividum que crece a 4°C pero no a 37°C (psicrófila).

Chromobacterium violaceum predomina en las regiones tropicales y Chromobacterium lividum en regiones templadas (Buchanan, 1974).

La licuefacción de gelatina sólo la presenta la especie Chromobacterium violaceum a 22°C. Generalmente es hemolítica en sangre de caballo, no así el género Chromobacterium lividum que es débilmente positiva. La prueba de urea es generalmente negativa o débilmente positiva en ambas especies. La producción de ácido sulfhídrico es negativa o muy débil.

Entre las bacterias lipolíticas comunes se encuentran las del género en estudio, que son al mismo tiempo proteolíticas. En la leche y la crema, la rancidez debida

a las bacterias se produce a temperaturas bastante bajas (de 5 a 10°C) y generalmente va precedida por un olor etéreo (Alais, 1971).

Nickerson (1972) reporta que los microorganismos del género Chromobacterium crecen en carne a bajas temperaturas (-3°C). Son capaces de descomponer otros compuestos orgánicos que en la forma como se encuentran en los cuerpos de agua, no son fácilmente aprovechables por otros microorganismos, tal es el caso de los hidrocarburos aromáticos, cuyos productos inmediatos de la oxidación son anillos aromáticos, los cuales llevan casi exclusivamente grupos hidroxilo. Estos anillos son descompuestos en ácidos alifáticos por el género Chromobacterium. Estos últimos son más sencillos y más fácilmente degradados y aprovechables por otros microorganismos (Rheinhermer, 1980; Fonken, 1972).

4. CARACTERISTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO.

Los estanques de estabilización en estudio, se construyeron en 1980 para el tratamiento de las aguas residuales del ejido de Santo Tomás Atzingo, que pertenece al municipio de Tlalmanalco de Velázquez, Estado de México.

Geográficamente, el ejido se localiza entre las coordenadas $19^{\circ}10'$ y $19^{\circ}15'$ de latitud norte y $98^{\circ}50'$ de longitud oeste. A una altitud media de 2475 metros sobre el nivel del mar.

En 1975, la Secretaría de Programación y Presupuesto realizó la caracterización de la zona a través del Departamento de Estudios del Territorio Nacional reportando los siguientes datos:

La superficie total es de 440 hectáreas, de las cuales 65 son de agostadero y 375 de monte.

El clima predominante de la zona, de acuerdo a la clasificación de Köppen modificado por García (1974), es el siguiente: Templado subhúmedo con lluvias de verano, con temperaturas tipo ganges o gangética, el verano es fresco con temperatura media del mes más caliente menor a 22°C ($C(w_2)$) (w) (g); la precipitación total anual es de 960.7 mm.

La temperatura media anual es de 14.1°C . La temperatura máxima a la intemperie a lo largo del año fue de 29°C y la mínima de -3°C .

A lo largo del año se registraron 122 días con lluvias y 150 días despejados, 23 días con heladas, la primera en el mes de octubre y la última en el mes de enero.

La evaporación fue de 1278.9 mm., y un día con grani

zo y 43 con tempestad eléctrica, 17 días con niebla y 10 con rocío.

Durante el año predominaron dos tipos de viento; - vientos débiles variables y vientos moderados variables, registrándose principalmente los primeros.

Desde 1970, el poblado tiene agua potable, teniendo como fuente de abastecimiento el Sistema Morelos. Tienen tomas domiciliarias y sistema de alcantarillado. En 1980, el número de habitantes fue de 1200.

Los estanques de estabilización se encuentran ubicados en las afueras del poblado y sus dimensiones son las siguientes:

Largo - 41.80 m

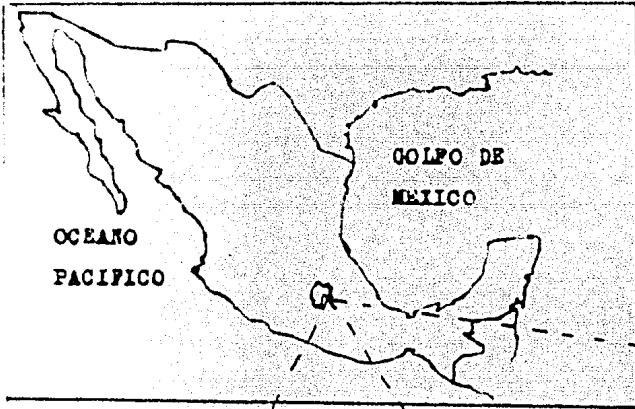
Ancho - 14.60 m

Profundidad - 1.50 m

Es un sistema de dos estanques (Ver fig. 1) interconectados por 5 canales de aproximadamente 10 cm de diámetro, de estos sólo uno se encontraba en funcionamiento durante el presente estudio. Ambos estanques están rodeados por una cerca de alambre con una entrada que normalmente está cerrada.

Las aguas residuales del poblado llegan a los estanques a través del sistema de alcantarillado. No hay indus-

trias en el lugar, por lo cual, los desechos son únicamente domésticos.



MAPA 1. Localización del ejido Sto. Tomás Atzingo.

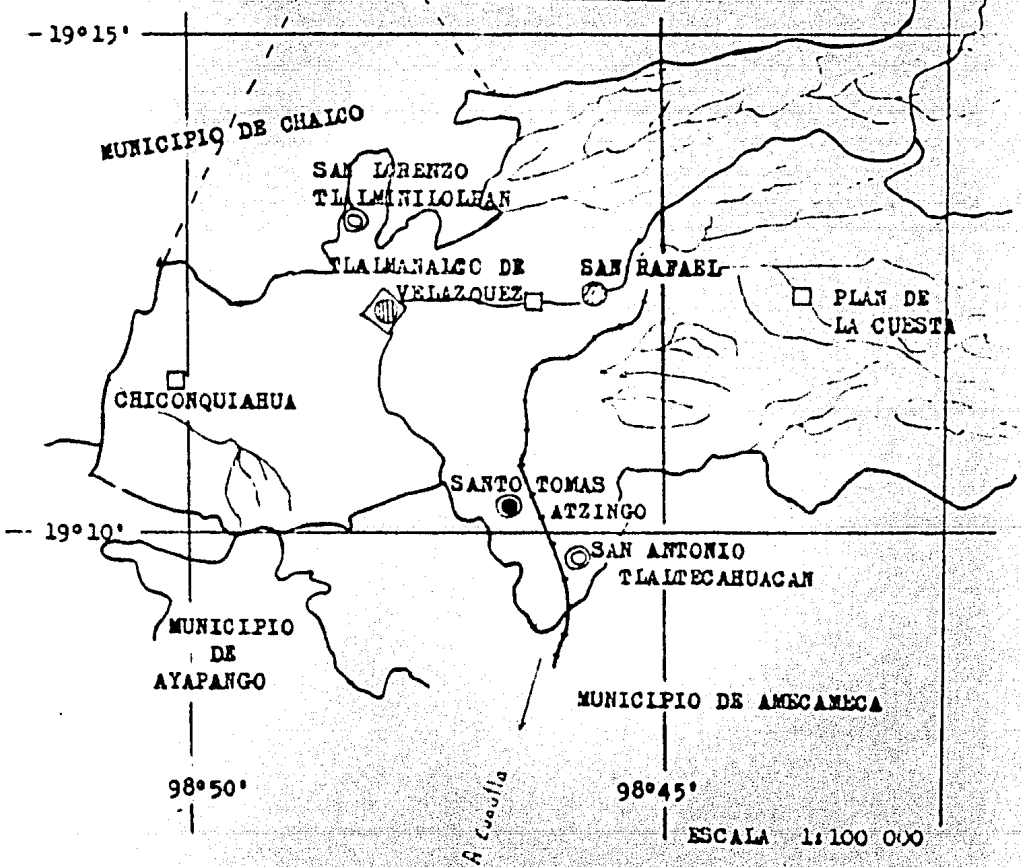
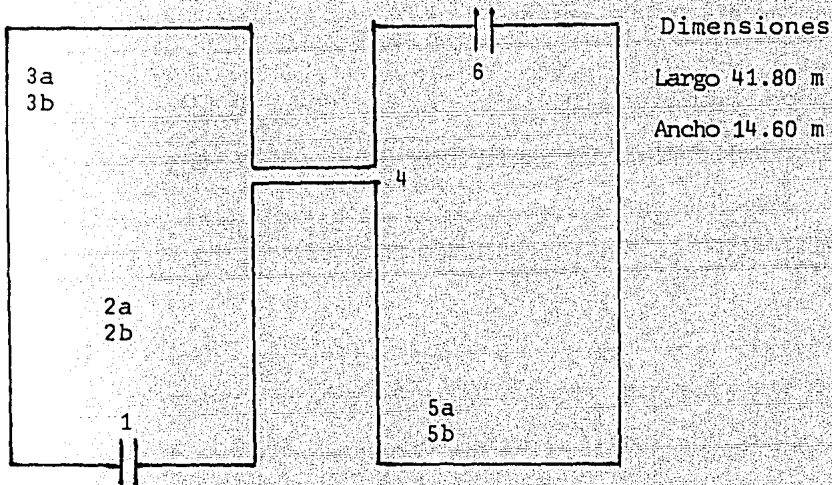


Figura 1

Ubicación de las estructuras de muestreo en las lagunas de esta bilización.



1. Afluente
- 2a. Centro, superficie, primera laguna.
- 2b. Centro a 50 cm (-), primera laguna.
- 3a. Esquina superficie, primera laguna.
- 3b. Esquina a 50 cm (-), primera laguna.
4. Conexión de la primera laguna con la segunda.
- 5a. Esquina superficie, segunda laguna.
- 5b. Esquina a 50 cm (-), segunda laguna.
6. Efluente.

IV. OBJETIVOS

- a) Aislar e identificar microorganismos del género Chromobacterium Bergonzini, 1881, en una laguna de estabilización facultativa.
- b) Relacionar algunos parámetros fisicoquímicos con la incidencia de los microorganismos del género Chromobacterium, en una laguna de estabilización facultativa.
- c) Analizar el papel de los microorganismos del género --- Chromobacterium en el proceso de degradación y recirculación de los compuestos orgánicos e inorgánicos en una laguna de estabilización facultativa.

V. MÉTODOS

Se realizaron dos muestreos cada mes, de junio a diciembre de 1981, a fin de abarcar las estaciones de verano y otoño. Los muestreos se realizaron siempre entre 9:00 y 11:00 A.M.

La ubicación de las 9 estaciones de muestreo que se eligieron por el método estratificado no azaroso, se refieren en la figura 1.

1. TRABAJO DE CAMPO.

1.1. Muestreo para análisis bacteriológicos.

Las muestras se tomaron en frascos de vidrio transparente de boca ancha con tapón esmerilado de 125 ml (cubierto con un capuchón de papel aluminio,) que se esterilizaron previamente a 15 lb de presión (121°C), durante 15 minutos.

El procedimiento para el muestreo es el siguiente: Se toma la botella cerca de su base y se afloja el papel que debe estar protegiendo el tapón, se sumerge cerrada con el cuello hacia abajo, se destapa y se gira de modo que el cuello quede ligeramente más elevado que la base. La boca se dirige contra la corriente. Una vez llenadas las 3/4 partes del recipiente, se tapa y se saca (Standard Methods, 1980). En las estaciones 2b, 3b, 4b y 5b las muestras de -

tomaron a 50 cm de profundidad.

Una vez recolectadas las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis. El intervalo que transcurrió entre la recolección y el análisis no excedió de 6 horas.

1.2 Muestreo para análisis fisicoquímicos.

Las muestras se tomaron después de haber hecho el muestreo bacteriológico en frascos de boca ancha de 300 ml enjuagados previamente con agua destilada.

Las muestras para OD y DBO_5 se tomaron con botellas para "DBO" con ayuda de la botella Van Dorn utilizando el método de Winkler modificado (Standard Methods, 1980).

A las muestras para análisis de NO_3^- y NO_2^- se les agregó en el campo 40 mg de HgCl_2 /l como conservador y se transportaron en hielo para su análisis en laboratorio.

El CO_2 se determinó en el campo por el método tri-trimétrico (Standard Methods, 1980), la temperatura con un termómetro de Hg (-10 a 110°C) y el pH con un potenciómetro de campo.

2. TRABAJO DE LABORATORIO.

2.1. Parámetros fisicoquímicos.

La determinación de DBO_5 se realizó por el método de titulación de Winkler. Los nitritos se determinaron -- por el método de ácido sulfanílico y los nitratos por el método de la brucina.

Las determinaciones anteriores así como las de só lidos disueltos, sólidos suspendidos y gasto se realizaron utilizando los métodos descritos en el manual de métodos estándar para el estudio del agua de desecho (Standard Methods, 1980).

2.2. Bacteriológico.

- Aislamiento (ver figura 3).

De las muestras para análisis bacteriológicos se inocularon (en condiciones de esterilidad) 100 ml de la muestra en matraces Erlenmeyer contenido 100 ml de caldo de bilis verde brillante (medio de preenriquecimiento). (Ver anexo II).

Los matraces se incubaron a $37^{\circ}C$, durante 48 hrs. Después de la incubación se tomaron inóculos de los medios de preenriquecimiento y se sembraron por el método de estría cruzada (Bailey, 1974), en cajas de Petri, conteniendo agar leche y agar caseinato de sodio modificado. (Ver anexo II). Las cajas de Petri se incubaron a $20^{\circ}C$, durante 48 hrs.

Después de la incubación se tomaron inóculos de -- las colonias características del género Chromobacterium -- (Buchanan, 1974) de los medios de agar leche y agar caseinato de sodio modificado y se sembraron por el método de -- estría cruzada en cajas que contenían agar nutritivo o --- agar soya triotcaseína. (ver anexo II). Las cajas se incu baron a 20°C, durante 48 hrs.

De las cajas que contenían agar leche y agar casei nato de sodio modificado, se realizaron frotis por la téc nica de Gram de las colonias con características macroscó picas semejantes a los microorganismos del género Chromo-- bacterium (Buchanan, 1974). Las que presentaron las carac terísticas esperadas se resebraron en tubos inclinados -- que contenían agar infusión cerebro-corazón. (Ver anexo -- II). Los tubos se incubaron a 20°C, durante 48 hrs.

De estos últimos se tomaron los inóculos para rea lizar las pruebas bioquímicas para la identificación de -- los microorganismos.

- Identificación.

La identificación del género Chromobacterium se -- llevó a cabo al observar la morfología microscópica (tin-- ción Gram) y macroscópica de las colonias aisladas en los medios selectivos y diferenciales así como al realizar las

pruebas bioquímicas correspondientes.

Tinción Gram (Standard Methods, 1980).

. Se prepara una emulsión de las bacterias en una gota de agua destilada, tomando una pequeña cantidad de la muestra y extendiéndola bien sobre la superficie limpia y libre de grasa de un portaobjetos. Se seca al aire y una vez seca, se fija el frotis pasándolo tres veces -- cerca de la flama, en forma rápida.

. Se cubre el frotis con cristal violeta-oxalato de amonio durante un minuto.

. Se lava con agua de la llave, sin que se arrastre la preparación. Se cubre el frotis con lugol durante 1 minutos.

. Se lava con agua de la llave.

. Se decolora con alcohol-acetona durante 10 segundos, o gota a gota hasta que la última no arrastre colorante.

. Se lava con agua de la llave.

. Se cubre con safranina y se deja reaccionar 30 segundos.

. Se lava con agua de la llave y se quita el exceso de agua con un papel filtro. Se deja secar al aire.

Se observa al microscopio con el objetivo de inmersión.

Características coloniales.

La identificación de las colonias se realizó observando las siguientes características (Rodina, 1972):

- . Borde: Puede ser liso, ondulado, filamentoso, estriado, rugoso, etc.
- . Color: Es variable dependiendo del medio de cultivo y de la especie de que se trate.
- . Consistencia: Puede ser blanda, dura, circosa, butirosa, etc.
- . Dimensiones: Pueden ser grandes (más de 4-5 mm), medias (2-4 mm), pequeñas (1-2 mm) o puntiformes (no más de 1 mm).
- . Elevación: Plana, convexa, en forma de gota, en forma de cráter, etc.
- . Forma: Puede ser circular, punteada, filamentosa, rizoide, etc.
- . Luz: Pueden ser opacas o translúcidas.
- . Superficie : Lisa, radiada, estriada, rugosa, ondulada, etc.

Pruebas bioquímicas (Mc Faddin, 1980).

Las pruebas bioquímicas se realizan sembrando -- inóculos de las bacterias aisladas en tubos con medio agar infusión cerebro-corazón y transportándolos a medios específicos, (ver anexo II).

. Caldo nutritivo: Los tubos que contienen caldo nutritivo, (ver anexo II) se siembran con un inóculo y se incuban a 20°C, durante 48 hrs. La especie Chromobacterium violaceum da una coloración violeta en la superficie del caldo.

. Catalasa: A colonias aisladas en agar nutritivo (ver anexo II), se les agrega 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Si existe producción de gas la prueba es positiva.

. Citrato: En un tubo de ensaye con medio inclinado de citrato de Simmons (ver anexo II), se le hace una estría sobre la superficie y una picadura hasta el fondo. Se incuban a 20°C, durante 48 hrs. La prueba es positiva si el indicador que inicialmente es verde se torna azul, o bien si hay crecimiento sobre la superficie estriada.

. Fermentación de glucosa: Los tubos que contienen caldo rojo fenol enriquecido al 1% con glucosa (ver anexo II) y con tubos Durham (para observar la producción de gas), se siembran con un inóculo del microorganismo aislado. La,

prueba es positiva si el indicador rojo de fenol se torna amarillo después de la incubación a 20°C, durante 48 hrs. Hay producción de gas si el líquido del tubo Durham ha sido desalojado.

. Fosfatasa: Cajas de Petri con medio difosfato fenoltaleína (ver anexo II) se siembra con un inóculo del microorganismo aislado, por el método de estría cruzada y se incuba a una temperatura de 20°C, durante 48 hrs. Después de la incubación se exponen las colonias aisladas a vapor de amonio durante 30 segundos. La prueba es positiva si las colonias presentan un color rojo o rosa fuerte. Si no hay cambio de color o las colonias permanecen claras o blancas, la prueba es negativa.

. Hemólisis: En cajas de Petri, con agar sangre (ver anexo II), se siembra por estría cruzada un inóculo del microorganismo aislado y se incuba a 20°C, durante 48 hrs. La prueba es positiva si se observa una zona translúcida alrededor de las colonias.

. Indol: Los tubos con medio SIM (ver anexo II), se inoculan por picadura hasta el fondo y se incuban a una temperatura de 20°C, durante 48 hrs. Después de la incubación se agrega 0.5 ml de reactivo de Kovac (ver anexo II). Si se observa un color rojo en la superficie del medio, la prueba es positiva.

. Pigmentación (en medio B de King): En tubos con medio Flo inclinado (ver anexo II), se hace una estría sobre la superficie y se incuba a 20°C, durante 48 hrs. La prueba se realiza para diferenciar el género Chromobacterium que produce pigmento blanco (en este medio) del género Pseudomonas que produce pigmentación violeta o amarillo limón.

. Licuefacción de gelatina: Los tubos con medio de gelatina tioglicolato (ver anexo II), se incuban por punción hasta el fondo con una aguja de asa recta a 20°C hasta que se observa la licuefacción. Si no es observada la licuefacción después de 20 días de incubación, la prueba se considera negativa.

. Producción de ácido sulfhídrico: Los tubos con medio SIM (ver anexo II), se incuban por punción hasta el fondo a 20°C, durante 48 hrs. La prueba es positiva si en la línea de inoculación se observa color negro por la formación de sulfuros.

. Proteólisis de la leche: Cajas de Petri con agar leche (ver anexo II), se inoculan por el método de estría cruzada y se incuban a 20°C durante 48 hrs. La leche no digerida permanece sólida y las zonas de proteólisis aparecen alrededor de las colonias aisladas como zonas translúcidas y/o acuosas.

. Reducción de Nitratos y Nitritos: En medios lí--

quidos para reducción de nitratos (ver anexo II), se siembran dos inóculos del microorganismo aislado y se incuban en las mismas condiciones que las pruebas anteriores. Después de la inoculación se vierten unas gotas del medio en un vidrio de reloj y se agregan dos gotas del reactivo -- Greiss I y dos gotas del reactivo Greiss II (ver anexo ID. Los nitritos se valoran al agregar ácido sulfanílico y al fanaftilamina. La prueba es positiva si se observa un color rosa o rojo intenso. La formación de nitrógeno gaseoso se observa en los tubos de fermentación.

. Rojo de metilo: El microorganismo aislado se -- inocula en tubos que contienen 5 ml de caldo MR-VP (Rojo de metilo Voges-Proskauer) (ver anexo II), y se incuba a 20°C, durante 48 hrs. Después de la incubación se agregan al medio 5 gotas del indicador rojo de metilo (ver -- anexo II). Si se observa un color rojo, la reacción es po sitiva (ácida).

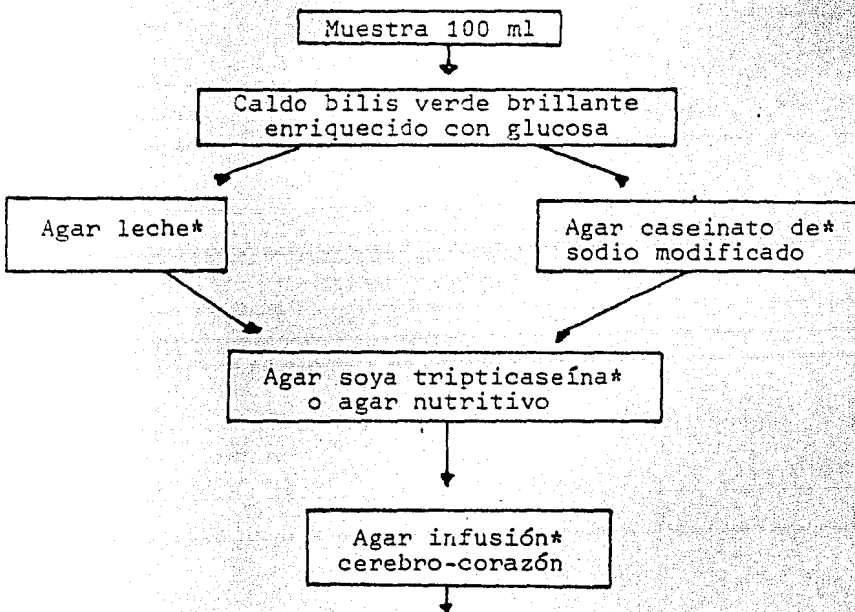
. Urea: El microorganismo se inocula en tubos que contienen 5 ml de medio caldo urea (ver anexo II), se incuban a 20°C, durante 48 hrs. Si después de la incubación se observa un viraje de color rosa pálido o color ro jo vino, la prueba es positiva y si no hay ningún cambio, la prueba es negativa.

. Voges-Proskauer: El medio utilizado es el mismo que para la prueba del rojo de metilo. Después de la incu

bación se agregan en un vidrio de reloj 5 ml del cultivo, 1 ml de solución acuosa de KOH al 10% y 0.5 ml de reactivo alfa-naftol (ver anexo II). Un color rojo vino indica que la prueba es positiva.

Figura 2

Diagrama de flujo del aislamiento e identificación del género Chromobacterium.



Pruebas bioquímicas y de identificación

- | | |
|----------------------------|---|
| . Caldo nutritivo | . Producción de H ₂ S |
| . Catalasa | . Proteólisis |
| . Citrato | . Reducción de NO ₃ ⁻ |
| . Glucosa (fermentación) | . Reducción de NO ₂ |
| . Hemólisis | . Rojo de metilo |
| . Indol | . Urea |
| . Fosfatasa | . Voges Proskauer |
| . Licuefacción de gelatina | |
| . Pigmentación (B de King) | |

* Tinción Gram

Todos los medios de cultivo ya sembrados, se incubaron a 20°C durante 48 horas.

IV. RESULTADOS

Se realizaron 12 muestreos, durante los cuales se analizaron 64 muestras. Los primeros 4 muestreos se realizaron en la primera laguna (ver fig. 1), debido a que aún no funcionaba la segunda, razón por la cual se modificaron las estaciones de muestreo iniciales y quedaron como se puede observar en la Fig. 1.

En la tabla 1, se puede observar que la mayor frecuencia del microorganismo Chromobacterium ocurrió en las estaciones 1, 4 y 5a y la menor en la estación 3a.

Para el aislamiento e identificación del género se tomaron en cuenta las características coloniales macroscópicas, las características microscópicas y las pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas que se realizaron se reportan en la tabla 2 y los resultados son los que siguen:

Estos microorganismos no producen H_2S , son catalasa negativas, utilizan citrato como fuente de carbono y nítrógeno, producen ácidos orgánicos a partir de la glucosa pero sin producción de gas visible. Son fosfatasa positivas, son hemolíticos del tipo alfa y beta en sangre de caballo, predominando el tipo alfa; no producen indol. La licuefacción de gelatina cuando se presentó fue muy lenta

(20 días aproximadamente) y débilmente positiva; en medio B de King presentaron pigmentación blanca. Son débilmente proteolíticos, reducen NO_3^- a NO_2^- y nitrógeno atmosférico; son negativos a la prueba de rojo de metilo, Voges Proskauer y ureasa.

En la tabla 3 se describen las características coloniales del microorganismo aislado en algunos de los medios selectivos y diferenciales utilizados para su aislamiento e identificación. En general muestran las mismas características en todos los medios a excepción de las dimensiones, que en agar caseinato de sodio modificado, las colonias son mayores (5 mm) que en los otros medios utilizados. En los caracteres ópticos las colonias variaron de no translúcidas a translúcidas dependiendo del medio utilizado como se puede observar en la tabla 3.

Las bacterias son bacilos gram negativos con extremos redondeados o cocobacilos, generalmente solos y raras veces se pueden observar en pares o cadenas cortas.

En ninguna de las muestras analizadas se aisló a las especies pigmentadas, ya que todas las cepas aisladas fueron colonias blancas y éstas de acuerdo a Buchanan --- (1974) corresponden a las especies variantes no pigmentadas.

Los valores de los parámetros fisicoquímicos de--

terminados durante los 12 muestreos (tabla 4) muestran que los valores de pH fueron ligeramente alcalinos más o menos uniformes en las dos lagunas. En general oscilaron entre 7 y 8.

La temperatura del agua registró variaciones estacionales, registrándose la máxima temperatura en el mes de junio (24°C) y la mínima en el mes de diciembre (10°C). -- Los valores de CO₂ son ligeramente altos con un valor máximo de 112.64 ppm en el décimoprimer muestreo y un valor mínimo de 11.44 ppm en el tercer muestreo.

Las condiciones fisicoquímicas de las lagunas en general no inhibieron al microorganismo en estudio. Se aisló a temperaturas desde 10°C hasta 24°C que fue la máxima registrada en el agua. La ausencia del OD no afectó su desarrollo ya que son anaerobias facultativas; igualmente soportaron amplias fluctuaciones en la concentración de CO₂, así como las altas concentraciones de materia orgánica (tabla 7). El único parámetro que pudo haber inhibido al microorganismo fue un pH abajo de 7.

Por otro lado, los análisis realizados mostraron que las lagunas de estabilización trabajaban en forma anaerobia durante el presente estudio.

Tabla 1

PRESENCIA-AUSENCIA DEL MICROORGANISMO Chromobacterium EN
LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO

MUESTREO ESTACION	Junio		Jul	Agosto		Sept		Oct		Nov		Dic
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2a	-	-	+	+	+							
2b	+	-	-	+	+							
3a	-	-	-	+								
3b	-	-	+	+								
4	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5a						+	+	+	+	+	+	+
5b						-	-	+	+	+	+	+
6				+		-	-	+	+	+	+	+

+ Se aisló

- No se aisló

* Ver figura 1

Tabla 2

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL GENERO Chromobacterium
 AISLADO EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DE MUESTREO

PRUEBA (Mc Faddin, 1980)	R E S U L T A D O	
	TEORICO	EXPERIMENTAL
ACIDO SULFHIDRICO	-	-
CATALASA	+	+
CITRATO	+	+
FERMENTACION DE GLUCOSA	+	+
FOSFATASA	+	+
HEMOLISIS (Alfa)	+	+
INDOL	-	-
LICUEFACCION	±	±
PIGMENTACION (En Agar Flo)	Blanca o violeta	Blanca
PROTEOLISIS	+	±
REDUCCION DE NITRATOS	+	+
REDUCCION DE NITRITOS	+	+
ROJO DE METILO	-	-
UREA	-	-
VOGES PROSKAUER	-	-

- + Prueba positiva
 - Prueba negativa
 ± Debilmente positiva

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS COLONIALES DEL GENERO Chromobacterium
 EN DIFERENTES MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

MEDIO DE CULTIVO CARAC. COLONIALES	AGAR LECHE	AGAR CASEINATO DE SODIO MODIFICADO	AGAR SANGRE	AGAR NUTRITIVO	AGAR FLO (KING B)
FORMA	CIRCULAR	IRREGULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
DIMENSIONES	1 mm	5 mm	2 mm	2 mm	-
COLOR	BLANCO	BLANCO	BLANCO	BLANCO	BLANCO
BORDE	CIRCULAR LISO	CIRCULAR LISO	CIRCULAR LISO	CIRCULAR LISO	CIRCULAR LISO
CONSISTENCIA	BUTIROSA	BUTIROSA	BUTIROSA	BUTIROSA	BUTIROSA
ELEVACION	CONVEXA	POCO CONVEXA	POCO CONVEXA	PLANO	CONVEXA
CARACTERES OPTICOS	NO TRANS. BRILLANTE	TRANS.	NO TRANS BRILLANTE	POCO TRANS. BRILLANTE	NO TRANS BRILLANTE
SUPERFICIE	LISA	LISA	LISA	LISA	LISA

TRANS - TRANSLUCIDA

Tabla 4

VALORES DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DETERMINADOS
EN EL CAMPO

TEMPERATURA AMBIENTE: *

1er. Muestreo (Junio 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	17	8.0	0	29.04	-
2a	19	7.0	0	47.35	5
2b	19	7.0	0	32.91	-
3a	19	8.0	0	-	5
3b	19	8.0	0	33.88	-
4	18	8.0	0	61.95	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 18°C. 2° Muestreo (Junio 81)

1	19	7.0	0	26.4	-
2a	19	7.0	0	30.8	5
2b	19	7.0	0	20.4	-
3a	19	7.0	0	30.8	3
3b	19	7.0	0	35.2	-
4	19	7.0	0	25.5	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 19°C 3er. Muestreo (Julio 81)

1	18	8.0	0	8.8	-
2a	18	7.0	0	15.84	3.5
2b	18	6.0	0	11.44	-
3a	19	7.0	0	17.6	3.5
3b	19	7.0	0	22.0	-
4	18	7.0	0	13.2	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 18°C 4° Muestreo (Agosto 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	17	8.0	0	11.44	-
2a	17	7.0	0	24.32	3
2b	17	7.0	0	33.44	-
3a	17	7.0	0	30.4	3
3b	17	7.0	0	29.04	-
4	17	7.0	0	27.28	-

TEMPERATURA AMBIENTE: * 5° Muestreo (Agosto 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	16	8.0	0	26.4	-
2a	16	7.0	0	24.64	3.5
2b	16	7.0	0	31.68	-
4	16	7.0	0	36.05	-
6	16	8.0	0	36.05	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 16°C 6° Muestreo (Sept 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	*	9.0	0	*	-
4	*	8.0	0	*	-
5a	*	8.0	0	31.68	4.5
5b	*	8.0	0	59.84	-
6	*	8.0	0	66.88	-

TEMPERATURA AMBIENTE 16°C 7° Muestreo (Sept 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	16	7.0	0	26.4	-
4	16	7.0	0	35.2	-
5a	17	6.0	0	44.0	3.5
5b	16	6.0	0	35.2	-
6	16	7.0	0	33.44	-

TEMPERATURA AMBIENTE 18°C 8° Muestreo (Oct 81)

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
1	16	*	0	*	-

PARAMETRO ESTACION	TEMP (°C)	pH	O.D. (ppm)	CO ₂ (ppm)	TRANSPARENCIA (cm)
-----------------------	--------------	----	---------------	--------------------------	-----------------------

4	17	*	0	72.16	-
5a	24	*	0	72.16	5
5b	19	*	0	42.24	-
6	15	*	0	35.2	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 16°C 9° Muestreo (Oct 81)

1	16	8.0	0	44.0	-
4	16	*	0	70.4	-
5a	14	*	0	48.4	5
5b	16	*	0	44.0	-
6	17	8.0	0	44.0	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 14°C 10° Muestreo (Nov 81)

1	14	8.0	0	33.44	-
4	14	8.0	0	88.0	-
5a	14	8.0	0	47.52	5
5b	14	8.0	0	49.88	-
6	16	8.0	0	79.2	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 8°C 11° Muestreo (Nov 81)

1	14	9.0	0	52.8	-
4	12	8.0	0	79.2	-
5a	12	8.0	0	88.0	5
5b	12	8.0	0	88.0	-
6	12	7.0	0	88.0	-

TEMPERATURA AMBIENTE: 10°C 12° Muestreo (Dic 81)

1	14	8.0	0	58.08	-
4	10	7.0	0	35.2	-
5a	12	8.0	0	63.36	5
5b	11	8.0	0	61.6	-
6	10	8.0	0	36.96	-

* No se determinó

Tabla 5

VALORES MINIMO, MAXIMO Y PROMEDIO
DE NO_3^- y NO_2^-

Estación de Muestreo	NITRATOS mg/1			NITRITOS mg/1		
	Valor mínimo	Valor máximo	Prom.	Valor mínimo	Valor máximo	Prom.
1	0.05	2.44	0.604	0.46	0.56	0.523
2a	0	1.0	0.307	0.33	0.73	0.497
2b	0.12	1.6	0.526	0.30	0.83	0.564
5a	0.1	1.55	0.713	0.067	0.12	0.093
5b	0.13	0.76	0.48	0.57	0.97	0.745
6	0.10	1.68	0.535	0.28	0.70	0.477

Tabla 6

VALORES PROMEDIO DE GASTO, SOLIDOS TOTALES
Y SOLIDOS SUSPENDIDOS

Estación \ Parámetro	Gasto	Sólidos Totales (mg/1)	Sólidos Suspendidos (mg/1)
1	0.85	1174.5	383.5
4	-	984.5	281.5
6	0.625	895.0	275.0

Tabla 7

VALORES PROMEDIO MINIMO Y MAXIMO DE LA DBO₅

Estación de Muestreo	Valor mínimo ppm	Valor máximo ppm	Promedio ppm
1 Afluente	245.0	583.0	397.0
6 Efluente	60.0	288.0	181.4

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

El género en estudio, hasta antes de la 8a edición del "Bergey's manual of determinative bacteriology" era conocido como género Achromobacter pero, debido a que la especie tipo de este género (Chromobacterium violaceum) produce pigmento violeta, fue incluido en la 8a edición de dicho manual, como género Chromobacterium.

Este hecho ha tenido como consecuencia que no haya una metodología de aislamiento bien definida. Por esta razón durante la primera fase del estudio se probaron los diferentes medios de cultivo que a continuación se enuncian: caldo cristal violeta, caldo bilis verde brillante, agar - leche, agar caseína, agar sangre de caballo y de conejo. - También en esta fase se probaron dos temperaturas diferentes; 20 y 37°C para su óptimo desarrollo. Finalmente se estableció la metodología de aislamiento que se describe en el diagrama de flujo de la fig. 2.

El género Chromobacterium presentó hemólisis tipo alfa (Pierce, 1978) en agar sangre de caballo, asimismo, - sus características coloniales en este medio permitieron - diferenciarla del género Flavobacterium (Buchanan, 1974) - cuyas colonias son amarillas en este medio, en tanto que - las del género Chromobacterium son blancas (Buchanan, 1974).

El género en estudio también coincide en muchas características con el género Pseudomonas, por esto se utilizó como medio diferencial el medio agar Flo (B de King) modificado (ver anexo II) en el cual este género produce una coloración azul, verde o violeta cuando el medio tiene varios días de incubación (Guinea, 1979), mientras que el género Chromobacterium produce pigmentación blanca en este medio.

De las temperaturas probadas, en la que se observó un máximo desarrollo fue a 20°C, lo que concuerda con la literatura, pues este género presenta un desarrollo óptimo en un rango de temperatura de 18 a 25°C (Sneath, 1978).

Buchanan en 1974, reporta que los microorganismos del género Chromobacterium crecen a 25°C, pero de las dos especies bien definidas Chromobacterium violaceum crece a 37°C, pero no a 4°C y Chromobacterium lividum crece a 4°C pero no a 37°C. El mismo autor menciona que el primero denomina en las regiones tropicales y el segundo en regiones templadas y seguramente ésta es una de las razones por las que no se aisló ninguna cepa de la especie Chromobacterium violaceum, que es la especie tipo y que da el nombre al género, ya que la Secretaría de Programación y Presupuesto a través del Departamento de Estudios del Territorio Nacional, reporta que en Santo Tomás Atzingo, Estado de México, lugar donde están ubicadas las lagunas de estabilización,

existe un clima templado subhúmedo con lluvias de verano, y así las condiciones climáticas no son favorables para dicha especie.

En las lagunas de estabilización la temperatura mínima del agua registrada fue de 10°C en el decimosegundo muestreo. Esta temperatura pudo haber inhibido a la especie Chr. violaceum pero no a la especie Chr. lividum, pues ésta como ya se mencionó antes, crece inclusive a 4°C.

Como se puede observar en la tabla 1, la mayor frecuencia de los microorganismos en estudio, ocurrió en el afluyente, en la conexión de ambas lagunas, en la superficie de una de las esquinas de la segunda laguna y en el efluente, estaciones 1, 4, 5a y 6 respectivamente (ver figura 1). Estas estaciones coinciden con las zonas donde hubo mayor acumulación de materia orgánica, lo cual era de esperarse ya que los microorganismos del género son quimioorganótrofos (Buchanan, 1974).

Buchanan (1974), menciona que el pH óptimo del género Chromobacterium oscila entre 7 y 8, y éste es el que predominó la mayor parte de los muestreos en todas las estaciones, únicamente en tres ocasiones se registró un pH de 6; en dos de éstas el microorganismo no se aisló. Esto confirma lo reportado por el mismo autor, quien menciona que el género no crece a pH ácido, por el contrario se pu-

do observar que crece a pH inclusive de 9 como sucedió en los muestreos 6 y 11 en la estación No. 1.

La demanda bioquímica de oxígeno al quinto día -- siempre fue muy elevada (tabla 7), es decir, la carga orgánica fue muy alta. Esto se debe a que además de las descargas del drenaje había gran cantidad de animales (vacas, caballos y borregos) que dejaban alrededor de las lagunas sus excretas y con el viento, algunas de ellas se incorporan al agua de las lagunas. Aunado a esto, se observaron en casi todos los muestreos restos de animales muertos -- (ratas), flotando en las lagunas. Esto implica también el hecho de que no se detectara oxígeno disuelto, el cual es utilizado por muchas bacterias para la oxidación de substratos orgánicos (Wetzel, 1975).

Debido a la escasez de oxígeno disuelto y a la -- carga tan alta de materia orgánica, ésta no pudo ser totalmente degradada y permaneció en forma de sólidos sedimentables y suspendidos en altas concentraciones (tabla 6). Esto produjo que la transparencia del agua fuera mínima (de 3 a 5 cm) y la luz solar no penetrara a profundidades mayores a 5 cm, limitando así el crecimiento de las algas.

Si se considera que las algas son los principales organismos que utilizan al CO_2 para realizar sus funciones, al estar limitado su crecimiento se comprende por qué la -

concentración de CO_2 en general, se mantuvo alta durante todos los muestreos sobretodo en los meses de noviembre y diciembre en los que disminuyeron los períodos de insola- ción y por consiguiente disminuyó el crecimiento de las - algas y la consecuente acumulación de CO_2 .

Con respeto al microorganismo Chromobacterium, se observó que las fluctuaciones en la concentración de CO_2 registradas en las lagunas no afectaron su crecimiento.

La ausencia de oxígeno disuelto en los estanques - de estabilización no afectó el desarrollo en los microor- ganismos del género, ya que son anaerobios facultativos y pueden utilizar a los NO_3^- como aceptores de electrones en la oxidación de substratos orgánicos (Wetzel, 1975), for- mando como productos finales NO_2^- , y N_2 compuestos accesi- bles para otros microorganismos.

La concentración promedio de NO_3^- , en general fue - ligeramente menor que la de NO_2^- a excepción de las esta- ciones 1, 5a y 6 donde se observó un ligero aumento en -- los valores promedio (tabla 5).

Lo anterior es comprensible tomando en cuenta que tales estaciones fueron las zonas donde había mayor acumu- lación de materia orgánica y por tanto de organismos qui- mioorganótrofos; (género Chromobacterium entre ellos) sin embargo, no los suficientes para utilizar a los NO_3^- como aceptores de electrones en la oxidación de materia orgáni

ca (Wetzel, 1975).

En el resto de las estaciones se llevó a cabo más activamente la desnitrificación, ya que debido a la ausencia de OD se está utilizando constantemente el oxígeno de los NO_3^- como aceptores finales de electrones, y reduciéndolos a NO_2^- , N_2O y N_2 (Wetzel, 1975).

Considerando lo anterior, es evidente que en el período que se llevó a cabo el presente estudio, predominaron las bacterias desnitrificantes sobre las nitrificantes, entre las que se encuentran los microorganismos del género Chromobacterium. (Buchanan, 1974 y Mc Faddin, 1980).

Este hecho produjo que las sales disueltas y vitales para el desarrollo del fitoplancton, fueran degradadas y convertidas no pocas veces hasta nitrógeno molecular, el cual es inaccesible para la mayoría de las algas, limitando así su crecimiento.

Por otro lado, la presencia de este microorganismo en el efluente, es importante porque el agua que sale de las lagunas se utiliza para el riego de cultivos como el maíz y la alfalfa.

En este sentido, debe tomarse en cuenta que estos microorganismos llevan a cabo el proceso de desnitrificación, convirtiéndolo los NO_3^- presentes en el suelo a nitratos y aunque éstos son compuestos intermediarios de la des

nitrificación, raramente se acumulan en el suelo; a valores de pH neutros o alcalinos el NO_2^- se convierte rápidamente en óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2) - por acción biológica y a pH ácido se descomponen espontáneamente a óxido nitroso (NO) (Pelczar, 1981).

Como estos productos de la desnitrificación son gaseosos se escapan del suelo al aire y ocasionan una reducción del contenido en nitrógeno del suelo. La desnitrificación no es deseable desde el punto de vista agrícola y las prácticas de cultivo intentan combatirlo (Pelczar, 1981).

Desde el punto de vista sanitario, no presenta problemas pues la especie aislada no es patógena a diferencia de la especie Chromobacterium violaceum que según reporta Buchanan en 1974, es ocasionalmente responsable de infecciones pirogénicas en el hombre y animales y la cual como ya se discutió antes no se encontró en la laguna en estudio.

Por otro lado, la presencia de los microorganismos del género Chromobacterium en el suelo es también importante por qué Pelczar (1981) menciona que son capaces de descomponer algunos herbicidas como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético, y los pueden utilizar como fuente de carbono y energía. Tal degradación es deseable puesto que la acumulación de es--

tos compuestos en el suelo es tóxica.

La mayoría de los autores, al referirse a organismos indicadores de contaminación, mencionan principalmente a protozoarios y bacterias como las coliformes; sin embargo, Dodakundi (1976) y Rheinhermer (1980) entre otros, señalan la presencia invariable de otras bacterias como Pseudomonas y Chromobacterium en aguas de desecho.

Aún lo anterior, no se puede afirmar que el género Chromobacterium sea un organismo indicador de contaminación, pero sí se puede decir que son organismos descomponedores de materia orgánica y por lo tanto contribuyen en el proceso de degradación y recirculación de los compuestos orgánicos e inorgánicos en una laguna de estabilización.

VII. CONCLUSIONES

1. La metodología utilizada para aislar al género Chromobacterium, de una laguna de estabilización, fue la adecuada.
2. Las altas concentraciones de materia orgánica favorecen el crecimiento y desarrollo de los microorganismos del género Chromobacterium.
3. A excepción del pH ácido, ninguno de los parámetros físicoquímicos analizados en las lagunas de estabilización limitó el desarrollo del género Chromobacterium.
4. La presencia de los microorganismos del género Chromobacterium en el efluente, es beneficiosa, porque son capaces de descomponer sustancias contaminantes para los cultivos, como algunos herbicidas o hidrocarburos aromáticos.
5. Durante el presente estudio, las lagunas de estabilización trabajaron de forma predominantemente anaerobia.

IX. SUGERENCIAS

1. Se sugiere profundizar experimentalmente acerca de la capacidad de los microorganismos del género Chromobacterium para descomponer sustancias difícilmente degradables como los herbicidas e hidrocarburos aromáticos.
2. Para que las lagunas de estabilización trabajen de forma facultativa se sugiere lo siguiente:
 - Aumentar el tiempo de retención del agua, sustituyendo al sistema de lagunas en serie por el sistema de lagunas en paralelo.
 - Aumentar si fuera posible otra laguna a las dos ya existentes para que la carga orgánica sea menor en cada una y así aumentar su eficiencia.
 - Evitar que los animales (vacas, borregos y caballos) entren en la zona de las lagunas y aumenten con sus excretas la cantidad de materia orgánica en el agua de las mismas.
 - Procurar mantenimiento constante para evitar la proliferación de hierbas no deseadas e insectos.

ANEXO 1

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

A.M.	Antes meridiano
cm ³	Centímetros cúbicos
Conc.	Concentrado
Dpto.	Departamento
Edo.	Estado
Fig.	Figura
etc.	Etcétera
°C	Grados centígrados
°	Grados
g	Gramos
hrs.	Horas
lbs.	Libras
lt.	Litro
m.	Metro
µm	Milimicras
mm	Milímetros
Méx.	México
min.	Minutos
ml.	Mililitros
modif.	Modificado
nm	Nanómetros
No.	Número

pág.	Página
Sto.	Santo
ppm	Partes por millón
mg	Miligramos
T	Temperatura
Sept.	Septiembre
Oct.	Octubre
Nov.	Noviembre
Dic.	Diciembre
H ₂ S	Acido sulfhídrico
AST	Agar soya tripticaseína
CaCO ₃	Carbonato de calcio
HgCl	Cloruro de mercurio
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno al 5° día
CO ₂	Dióxido de carbono
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico de hidrógeno
KOH	Hidróxido de potasio
Hg	Mercurio
NO ₃	Nitratos
NO ₂	Nitritos
NO	Nitrógeno molecular
OD	Oxígeno disuelto
pH	Potencial de hidrógeno
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado

ANEXO II

A. MEDIOS DE CULTIVO

1) Agar Caseína

Agar granulado	5.0 g
Peptona de caseína purificada	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

pH final $8\bar{7}$ 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

2) Agar caseinato de sodio modificado

Glucosa	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
CaCO_3	0.05g
Peptona de gelatina	0.1 g
Leche peptonizada	5.0 g
Agar granulado	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

pH final 6

Se esterilizan a 15 lb de presión, durante 15 min; la glucosa, peptona de gelatina, leche peptonizada y agar granulado, después se agregan el KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y CaCO_3 y se vuelven a esterilizar en las mismas condiciones.

3) Agar citrato de Simmons

Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Citrato de Sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul de Bromotimol	0.08g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 6.9 \pm 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

4) Agar infusión de cerebro corazón

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	2.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 7.4 \pm 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

5) Agar leche

a. Leche descremada en polvo	10.0 g
------------------------------	--------

Agua destilada	100.0 ml
b. Agar granulado	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

pH final 6.8 \pm 0.2

Las soluciones a y b se esterilizan por separado a 15 lb de presión, durante 15 min. Se dejan enfriar a 45°C y se mezclan en condiciones asépticas.

6) Agar nutritivo

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 g

pH final 6.8 \pm 0.2

Se esterilizar a 15 lb de presión, durante 15 min.

7) Agar de soya tripticaseína

Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH 7.3 \pm 0.1

Se esterilizan a 15 lb de presión, durante 15 min.

8) Base de agar sangre

Infusión de músculo cardíaco	375.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 7.3 ± 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min. Agregar al medio estéril (45°C), en condiciones asépticas, 50 ml de sangre de caballo estéril y desfibrinada.

9) Caldo bilis verde brillante enriquecido con glucosa

Bilis de buey deshidratada	20.0 g
Lactosa	10.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Glucosa	20.0 g

pH final 7.2 ± 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

10) Caseinato de sodio modificado g/l

Glucosa	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
CaCO_3	0.05g
Peptona de gelatina	0.1 g
Leche peptonizada	5.0 g

pH final 6.0 \pm 0.2

Se esteriliza en las mismas condiciones que el agar --
caseinato de sodio modificado.

11) Caldo nutritivo

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 6.9 \pm 0.1

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

12) Caldo rojo fenol con glucosa

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Glucosa	5.0 g
Rojo fenol	0.018 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 7.4 \pm 0.2

Se esteriliza a 10 lb de presión, durante 10 min.

13) Caldo urea

Urea	20.0 g
Fosfato monopotásico	9.10 g
Fosfato de sodio	9.50 g
Extracto de levadura	0.01 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 6.8 \pm 0.2

Se esteriliza a 10 lb de presión, durante 10 min.

14) Caldo para reducción de nitratos

Extracto de carne	0.3 g
Peptona de gelatina	0.5 g
Nitrato de potasio	0.1 g
Agua destilada	100.0 ml

pH final 7.0 \pm 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

15) Agar Flo (B de King) modificado

Peptona de gelatina	20.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Sulfato magnésico	1.5 g
Agar granulado	15.0 g
Glicerina	10.0 ml

pH final 7.2 \pm 0.2

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

16) Medio difosfato fenolftaleína

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Agar	15.0 g
Sal de sodio difosfato fenolftaleína	0.05g
Agua destilada	1000.0 ml

pH final 7.3

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

17) Medio rojo de metilo Voges-Proskauer

Mezcla de peptonas	7.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato de potasio	5.0 g
Agua destilada	5.0 ml

pH final 6.9 \pm 0.1

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

18) Medio de SIM

Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Agar	3.5 g
Agua destilada	1000.0 g

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

19) Medio de tioglicolato de gelatina

Casitona	15.5 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	2.0 g
Cloruro de sodio	2.5 g
L-Cistina	0.25g
Sulfito de sodio	0.1 g

Agar	0.3 g
Gelatina bacteriológica	50.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final 7.0	

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 min.

B. COLORANTES

a) Reactivos para la tinción Gram

1. Oxalato de amonio-cristal violeta

- Solución A

Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico al 95%	20.0 ml

- Solución B

Oxalato de amonio monohidratado	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar por 24 horas antes de usarse, se filtra a través de un frasco ámbar.

2. Solución de lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

3. Alcohol-acetona

Alcohol etílico al 95%	50.0 ml
Acetona	50.0 ml

4. Solución de safranina

Safranina	2.5 g
Alcohol etílico al 95%	100.0 ml

Adicionar 10 ml de la solución alcohólica de safranina a 100 ml de agua destilada.

C. SOLUCIONES

a) Acido sulfúrico concentrado

b) Alcohol 100% puro OP

c) Alkali yoduro azida

- Hidróxido de sodio	500.0 g
- Yoduro de sodio	138.0 g
- Agua destilada	1000.0 ml

d) Fenol al 5%

- Fenol	5.0 g
- Agua destilada	95.0 ml

e) Griess I

- Acido sulfanílico	0.5 g
- Acido acético al 30%	50.0 ml

f) Griess II

- Naftilamina 0.5 g
- Agua destilada 50.0 ml

Calentar y añadir 150 ml de ácido acético al 30%.

g) Hidróxido de amonio concentrado

h) Hidróxido de potasio al 40%

- Hidróxido de potasio 40.0 g
- Agua destilada 100.0 ml

i) Peróxido de hidrógeno al 3%

- Peróxido de hidrógeno 3.0 ml
- Agua destilada 97.0 ml

j) Reactivo de sulfato manganoso

- Sulfato manganoso tetrahidratado 480.0 g
- Sulfato manganoso dihidratado 400.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

k) Reactivo de tiosulfato de sodio (0.025 N)

- Tiosulfato de sodio heptahidratado 6.208 g
- Agua destilada 993.792 ml

l) Reactivo de Kovac

- Alcohol isoamílico 150.0 ml
- Paradimetilaminobenzaldehído 10.0 g
- Acido clorhídrico concentrado 50.0 ml

m) Rojo de metilo

- Indicador rojo de metilo	0.1 g
- Alcohol al 95%	300.0 ml
- Agua destilada	500.0 ml

n) Voges-Proskauer

1. Alfa-naftol (5%)

- Alfa-naftol	5.0 ml
- Alcohol etílico al 95%	95.0 ml

2. Hidróxido de potasio al 40%

- Hidróxido de potasio	40.0 g
- Agua destilada	100.0 ml

B I B L I O G R A F I A

- Aguirre, J. and Gloyna, E.F. 1970. Design guides for biological wastewater treatment process. Technical report EHE-71-3 CRWR77. The University of Texas.
- Alais, Ch. 1971. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 1a. Edición, Compañía Editorial Continental, S.A. Barcelona. pp. 232, 263.
- Bailey, W.R. and Scott, E.G. 1974. Diagnostic Microbiology. 4th Ed., The C.V. Mosby Company, Saint Louis. pp: 51-53.
- Bradshaw, J.L. 1976. Microbiología de Laboratorio. 1a. Ed., El Manual Moderno, S.A. México. pp:24-59.
- Brock, T.D. 1978. Biología de los microorganismos. 2a. Ed. Editorial Omega, S.A. Barcelona, pp: 257; 485-487.
- Buchanan, R.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, U.S.A. pp: 354-357.
- Carpenter, L.P. 1979. Microbiología. 4a Ed., Interamericana, México, pp. 62-77.
- Cuéllar, Ch. R. y Martínez, P.P. 1978. Alternativas para el control de descarga de aguas residuales municipales de México. Primer Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Guadalajara, Jal. México,
- Chigaleichik, G.A., et al. 1976. Chitinase biosynthesis by a culture of Achromobacter liquefaciens. Institute of the Biochemistry and Physiology of Microorganisms. Academy of Sciences the USSR. 45 (3): 408-413.
- Dainty, R.H. et al 1978. Studies on the production of extracellular proteinases by a non-pigmented strain of Chromobacterium lividum. J. of Appl. Bacteriol 45(1): 111-124.
- Dennis, G.B. and Rodgi, S.S. 1975. Waste stabilization --- ponds. J. WPCF. 52(6): 1177-1181.

- Dodakundi, G.B. and Rodgi, S.S. 1975. Waste stabilization ponds: a review. J. Karnatak Univ. Sci. 20:191-217.
- Dodakundi, G.B. 1980. Bacterial distribution in a sewage - stabilization pond. J. Karnatak Univ. Sci. 7(1): 21-22.
- Depto. de Sanidad del Edo. de Nueva York. 1976. Manual de tratamiento de aguas negras o de desecho. Edit. Limusa. México.
- Fonken, G.S. and Roy, A.J. 1972. Chemical oxidations with microorganisms. 1a. Ed., Marcel Dekker, New York, pp: 135. 191, 222-225.
- Frobisher, M.H. et al. 1974. Fundamentals of Microbiology. 9th Ed., W.B. Saunders Company. Philadelphia, pp:501-502.
- Gloyna, E.F. 1971. Waste Stabilization Ponds. 1st. Ed., -- World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- García, E. 1978. Apuntes de climatología. 2a. Ed., Larios, México, pp: 131-137.
- Gordon, M.F., Geyer, Ch. J. y Okun, A.D. 1979. Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. 1a. Ed., Editorial Limusa, México, pp. 232, 263; 603-609.
- Guinea, J., Sancho, y Payes, R. 1979. Análisis microbiológico de aguas. 1a Ed. Omega, Barcelona, pp: 30-34.
- Homer, P.E. 1975. Wastewater systems engineering. Prentice Hall, Inc. New York, pp: 20-30.
- Inshenetskii, A.A., et al. 1975. Descomposition of Cholesterol by Achromobacter cardicans. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, 44(1): 62-65.
- Imshenestskii, A.A., Koslova, V. Kh. and Shirshova, G.A. 1976. Influence of nitrogen sources on the growth and cholesterol-descomposing ability of cultures of Mycobacterium rubrum and Achromobacter cardicans. Institute of Microbiology -- Academy of Sciences of the USSR. 45(6): 834-838.

- Keime, P. 1982. Ozono: Solución en el tratamiento de aguas en México. CONACYT, 4(67): 24-25.
- Limón Macías, J. G. 1979. Microbiología de lagunas de estabilización. S.A.R.F. México.
- Lynch, J.M. et. al. 1972. Métodos de laboratorio. 2a. Ed., Interamericana. México, pp. 911-917.
- Manual del curso. Análisis de aguas y aguas de desecho. - Vol. II. 1964. 4a. Ed., S.A.R.H., México pp. - 313.
- Manual de Procedimientos de laboratorio y de productos. -- BBL. 1974. 5a Ed., Sector Dickson de México, S.A. de C.V. México, pp: 3-10.
- Manual de medios de cultivo. 1975. Bioxon, México.
- Mc Faddin, J.F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp:51-ss.
- Mitchell, R. 1978. Water Pollution Microbiology. Vol. 2. 1st Ed., John Wiley and Sons, U.S.A. pp: 391-413.
- Nickerson, T.J. and Sinskey, J.A. 1972. Microbiology of -- foods and food processing. 1st Ed. American Elsevier Publishing Company. New York, pp:99-ss.
- Norris, J.R. and Ribbons. 1970. Methods in Microbiology. Vol. 3A. Academic Press Inc. London, pp:28,29, 164, 213.
- Pelczar, M. and Reid, R.D. 1981. Microbiología. 4a. Ed. Mc Graw Hill Book Company, España, pp:114-120; 513-522.
- Perlman, D. 1974. Genetic and Phenetic classification of bacteria. Advances in Appl. Microbiol. Academic Press. New York. 16(1).
- Pesson, P. 1979. La contaminación de las aguas continentales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, pp: 27-43.
- Pierce, G.M.D. and Harriet, T.P.B.A. 1978. Manual of acute bacterial infections. Early diagnosis and treatment. 5th Ed. Little, Brown and Company Inc. -- Boston, U.S.A. pp:275-301.
- Rheinhermer, G. 1980. Aquatic Microbiology. 2nd Ed., John Wiley and Sons, U.S.A., pp: 26-29; 93-ss.

- Riviere, J. 1979. Métodos Generales de depuración de aguas residuales. La contaminación de las aguas residuales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, pp: 27.
- Rodina, A.G. 1972. Methods in Aquatic Microbiology. University Park Press, Baltimore, London. pp:62-ss.
- S.A.R.H. 1975. Técnica. Organó informativo de la Subsecretaría de Planeación. Dirección General de usos del agua y Prevención de la Contaminación. México.
- Shteinberg, B.I., Gebgardt, A.C. and Datsyuk, N.M. 1974. Synthesis of vitamins of the B group the bacteria Achromobacter cobalami sp. I. Franko L'vov State University. Chair of Microbiology. 43(1): 679-681.
- Standards methods for the examination of water and wastewater. 1980. 15th Ed., APHA, AWWA, WPCF, U.S.A.
- Sundstom, W.D. and Klei, E.T. 1979. Wastewater treatment. Prentice Hall Inc. U.S.A.
- Wetzel, R.G. 1975. Limnology. 1st Ed. W.B. Saunders Company Philadelphia, pp: 200-202, 225-227.