



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

Análisis Cuantitativo de Bacterias Heterótrofas Existentes en Estanques Dedicados al Cultivo de Trucha Arco-iris (*Salmo gairdneri*)

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 :
MARIA ELENA GALLARDO MAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS:

Sirvan estas lineas para hacer patente mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Leonardo Lizarraga Partida por la planeación y dirección de esta tesis.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar el trabajo de laboratorio.

A mi asesor de tesis M. en C. Agustín Ruiz Cabrera por su asesoramiento e incondicional apoyo, para la redacción y culminación de este trabajo.

A la Sria. de Pesca por permitirnos trabajar en sus instalaciones del Zarco.

A los Sres. Callejas por permitirnos trabajar en su piscifactoría del Valle del Potrero.

A los departamentos de Planeación e Informática de la ENEP Iztacala por las facilidades prestadas para la impresión de este trabajo.

A mis amigas: Angeles, Claudia, Laura y Margarita por su cariño y su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: Francisco, Abel, Ma. Teresa y Roque.

I N D I C E

	pag.
RESUMEN	I
CAPITULO	
I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	6
III MATERIAL Y METODOS	
III.1 ZONA DE MUESTREO	7
III.2 TOMA DE MUESTRA	9
III.3 TRABAJO DE LABORATORIO	10
III.3.1 BACTERIAS HETEROTROFAS	
III.3.1.1 Cuantificacion	
III.3.1.2 Analisis morfologico de las cepas bacterianas	
III.3.1.3 Determinacion de las cepas bacterianas	
III.3.2 CONTEO DIRECTO	
IV RESULTADOS	
IV.1 PARAMETROS FISICOQUIMICOS	14
IV.2 CUANTIFICACION BACTERIANA	17
IV.3 ANALISIS MORFOLOGICO	19
IV.4 DETERMINACION DE FAMILIAS BACTERIANAS	22
V DISCUSION Y CONCLUSIONES	23
VI APENDICES	29
VII BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN:

Se realizó una evaluación cuantitativa y cualitativa de la población bacteriana existente en diferentes estanques dedicados al cultivo de trucha arcoíris (*Salmo gairdneri*), en la piscifactoría El Valle del Potrero propiedad de ejidatarios y en la piscifactoría El Zarco dependiente de la Secretaría de Pesca.

Se realizaron 23 muestreos semanales abarcando las épocas de secas y lluvias para la cuantificación de bacterias por los métodos de conteo en placa (bacterias heterótrofas) y conteo directo (bacterias autótrofas), registrándose temperatura, pH, nitritos y nitratos.

En el conteo directo se obtuvieron valores cuantitativamente mayores a los del conteo en placa. Se registraron concentraciones mas altas en los estanques que poseían organismos.

El análisis morfológicos mostro predominio de los bacilos Gram negativos en pares o aislados.

No se observó diferencia entre las dos épocas climáticas ni en los parámetros fisicoquímicos del agua, ni en la cuantificación bacteriana, ni en la pigmentación de las colonias.

La determinación bacteriana a nivel de familia se realizó con base en un muestreo puntual, donde la familia predominante fue *Pseudomonadaceae*, la cual ha sido aislada del tracto digestivo de la trucha (*Salmo gairdneri*) y se reporta como habitante de agua de manantiales

No se presentó epizootias en ninguno de los estanques durante el tiempo de muestreo ni posteriormente.

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

La necesidad de resolver los problemas actuales de desnutrición y escasez de alimento y la preocupación por lo que representan estos problemas en el futuro, si se considera la velocidad con que está creciendo la población día tras día, han provocado que el hombre considere a la acuicultura como una biotécnica por medio de la cual puedan cubrirse los requerimientos nutricionales para la población por tratarse de un recurso renovable, de alto contenido proteico de bajo costo, que no ha sido muy explotado, y del cual pueden obtenerse grandes beneficios.

La acuicultura (Acua-agua y cultura-cultivo), ha sido definida por Chakroff (1983) como "La ciencia que trata de los métodos para el desarrollo o cultivo de la vida animal o vegetal en el agua".

Dentro de la Acuicultura, la Piscicultura es una de las actividades de mayor importancia, que ha contribuido a resolver problemas relacionados con el déficit alimentario, además de ayudar a las pesquerías marinas que son cada vez más inaccesibles y costosas, así como la repoblación de cuerpos de agua devastados por la pesca excesiva y la contaminación, a más de contribuir al mejoramiento de las especies y obtención de proteínas para consumo animal, y finalmente el aprovechamiento de tierras abundantes en agua, que no son aptas para la agricultura (Chazari, 1983; Sevilla, 1981; Arrignon, 1984).

La Piscicultura y en general la acuicultura, ha sufrido una evolución lenta, no fué sino hasta hace algunas décadas cuando surgió el interés del hombre por conocer los organismos que cultivaba, comenzando a realizar estudios detallados acerca de su anatomía, fisiología, alimentación, reproducción y hábitat lo que había venido desarrollándose empíricamente, vió también la

posibilidad de introducir otras especies, de ésta manera deja de ser la piscicultura una simple siembra y cosecha de peces para convertirse en una verdadera técnica de reproducción (Huet, 1973).

Entre las especies más cultivadas en el mundo se encuentra la trucha arcoíris (*Salmo gairdneri*). El cultivo de ésta especie se inicia en 1842 con la implantación de la técnica de fecundación artificial, aunado a esto se fomenta la creación de centros dedicados a la reproducción y engorda de estos organismos (Pérez, 1985). Este avance en la técnica de reproducción, la continua investigación acerca de sus necesidades y hábitos, así como la aceptación que ha tenido dado su sabor, el reducido número de espinas y el potencial alimenticio que posee, aunado a la capacidad de adaptación y la rapidez con que alcanza la talla comercial ha convertido a la trucha en la especie más estudiada y expandida del mundo.

La Taxonomía de la trucha arcoíris es:

Reino:	Animal
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclase:	Gnathostomata
Clase:	Osteichthyes
Subclase:	Actinopterygii
Grupo:	Teleostei
Orden:	Salmoniformes
Suborden:	Salmonidei
Familia:	Salmonidae
Género:	Salmo
Especie:	<i>S. gairdneri</i> (Richardson, 1836).

Actualmente este cultivo se realiza en gran parte de Europa, Asia y América, y su importancia se refleja en los altos valores de producción alcanzados en algunos países. México cuenta actualmente con piscifactorías en los estados de Baja California Norte, Coahuila, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Guerrero, Morelos, Hidalgo, Puebla, Estado de México y D.F. (Sria. de Pesca, 1982).

Estos organismos son habitantes de aguas corrientes, frías y transparentes, dado que requieren para su óptimo desarrollo altas concentraciones de oxígeno (más de 7 ppm), temperaturas que van de 8 a 18°C, pudiendo soportar hasta 4°C como mínimo y 22°C como máximo, y valores de pH de 6.2 a 8.5, aunque sobrevive a pH de 4.7 hasta 9.6 . Estas condiciones pueden observarse en aguas de manantiales en zonas boscosas de grandes alturas. (Rosas, 1987; Orbe y Cepeda, 1984).

Se dice que un ecosistema permanece estable cuando todos los elementos que lo conforman funcionan correctamente y no existen fuerzas perturbadoras que alteren su composición cuantitativa y/o cualitativa. La pérdida de estabilidad de los estanques es, en la mayoría de los casos, provocada por alteraciones del medio ambiente, las cuales se ha observado aumentan la incidencia de brotes de algunas enfermedades (Skinner y Carr, 1976). Entre las que se encuentran principalmente las enfermedades bacterianas, esto debido a que en el medio acuático la mayoría de las bacterias patógenas son integrantes del ecosistema, pero sólo cuando el organismo se debilita o se incrementa en demasía el número de éstas, puede provocar problemas (Direc. Gral. de Acuicultura, 1981; Roberts, 1981; Barnes y Mann, 1980; Colinvaux, 1973).

Las enfermedades bacterianas son consideradas como la causa más importante de la pérdida de organismos en los centros acuícolas y por lo tanto de gran importancia económica (Robert y Shaperd, 1975; Ward, 1982; Weaton, 1982). Se trata de enfermedades que provocan muertes masivas y repentinas, además presenta el inconveniente de que son detectadas hasta que se ha presentado mortandad , de tal manera que en éste momento los tratamientos a seguir son más costosos, requieren de mayor cuidado y atención con gastos considerables por el uso de medicamentos, y la pérdida de organismos (Dir. Gral. de Acuicultura, 1981).

La necesidad de resolver estos problemas ha dado lugar a una búsqueda de medidas preventivas y de soluciones por varios ámbitos. Bullock, 1961; Bootsma y Dierx, 1976 y Colwell y col., 1973, comienzan por aislar e identificar las bacterias patógenas. Snieszko (1954), Arrignon (1984) proponen la utilización de métodos profilácticos como el añadir antibióticos a la dieta de una manera constante, otros investigadores proponen la creación de vacunas (Antipa y Armen, 1977; Evelyn y Ketchenson, 1980; Hockney, 1985), además de los métodos sanitarios de rutina como el lavado y encalado periódico de los estanques y por métodos antisépticos, ya sea por medio de antibióticos (Bauvel, 1959; Conroy, 1963; Pearse y col. 1974) o añadiendo sustancias químicas al agua en los estanques o sometiendo a los organismos a "baños" con sustancias químicas (Amlacher, 1964; Huet, 1972; Arrignon, 1984).

Sin embargo estos métodos presentan algunos inconvenientes; en el caso del uso de los antibióticos, las dosis prolongadas y/o repetidas pueden producir una presión de selección en la cual se ven favorecidos aquellos microorganismos que presentan resistencia a cierto antibiótico, originando su incremento en número, de tal manera que la acción de éste sea nula para tales organismos además de que esta resistencia se transmite a sus descendientes. El uso de estos se restringe aún más, ya que cuando los organismos están enfermos comen muy poco o no comen, razón por la cual los antibióticos en la dieta no son un método muy confiable (Garassini, 1956; Roberts, 1981). Por otra parte las sustancias químicas son en su mayoría tóxicas y como la diferencia entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica es en realidad muy pequeña, el mal uso puede provocar más que un beneficio un daño. Las vacunas presentan el inconveniente de que debe manejarse a los peces individual y manualmente, lo que en cultivos intensivos requiere de largo tiempo, que es vital en estos casos, además de causar daños por manipuleo y estrés, los cuales son factores que favorecen a la aparición de este tipo de enfermedades (Roberts, 1981; Kars, 1982).

Algunas medidas como el encañado y el lavado de los estanques implica el transporte de los organismos provocando también el estrés y los daños por el manejo, con las consecuencias antes mencionadas. Algunos de estos tratamientos son post-infección lo cual indica que ya se han producido muertes y que hay que combatir una epizootia, lo cual sería más difícil entre más avanzada esté ésta. Huet (1972) estableció que era mejor prevenir las enfermedades, ya que cuando los organismos se enferman, sólo un pequeño número se recupera, de aquí la importancia de encontrar una metodología que nos permita detectar alguna alteración en el sistema para poder evitar el que se sucedan enfermedades.

Como todos los organismos sujetos a cultivo masivo, la trucha arcoiris se ha visto afectada por el aumento en la incidencia de enfermedades bacterianas entre las que se encuentran principalmente la Furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida*, Ulceras causadas por *Haemophilus psychrophila*, Lesiones necróticas de la piel causadas por *Aeromonas hydrophila*, hemorragias causadas por *Pseudomonas fluorescens*, Enfermedades de las branquias por *Cytophaga sp.*, "Red mouth" hemorragias profundas en los tejidos de la cabeza causadas por *Vibrio anguillarum* y Tuberculosis causada por *Mycobacterium sp.* (Roberts y col., 1981; Skinner, F. A. y Carr, J.G., 1976).

Tomando en cuenta que además de ser los principales agentes causales de estos problemas, las bacterias habitan cualquier tipo de agua conformando una flora típica según la procedencia y condiciones ambientales que imperen en el agua (Rheinheimer, 1974) además de su extremada sensibilidad a los cambios que se presentan en el medio, ellas mismas podrían ser quienes dieran un indicio de alguna alteración en el sistema; para poder hacer esta aseveración es necesario conocer de antemano el comportamiento poblacional de las bacterias en condiciones donde no existen perturbaciones.

O B J E T I V O S

- A) Determinar las concentraciones bacterianas en diferentes estanques dedicados al cultivo de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*).
- B) Caracterizar a nivel de familia las poblaciones bacterianas aisladas.
- C) Determinar los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, NO_2 , NO_3) con dos diferentes metodologías.
- D) Relacionar las oscilaciones bacterianas en el agua de los estanques con los parámetros fisicoquímicos.

MATERIAL Y METODOS

I.1 ZONA DE MUESTREO

El presente estudio se realizó en dos piscifactorías dedicadas al cultivo de trucha arco-iris (*Salmo gairdneri*), una de las cuales, la granja piscícola del Valle del Potrero, se encuentra localizada en el municipio de San Pedro Atlapulco, en el kilómetro 9 de la carretera México-Ajusco, Estado de México, (Fig.1a) es propiedad de particulares y consta de una sala de incubación con 4 canaletas elaboradas en troncos, una sección de 7 estanques tipo rústico, que hacen una superficie total de 82 m² con una profundidad media de 0.80 m, y otra sección también rústica de 10 estanques con una profundidad media de 1 m y una superficie total de 742 m². El agua que surte a la granja proviene de un manantial y corre a través de todos los estanques por gravedad (Fig.1b).

La otra zona de estudio fué la piscifactoría del Zarco, dependiente de la Sria. de Pesca, que se encuentra ubicada en la carretera México-Toluca en el kilómetro 32.5, en el municipio de Cuajimalpa, D.F. (FIDEFA, 1976: Fig.1a). Este centro cuenta con una superficie de 6 hectáreas y su infraestructura consiste de una sala de incubación, 16 estanques de concreto que albergan crías con 70 m de superficie total, 23 estanques circulares de concreto que hacen una superficie de 20 m con 0.60 m de profundidad cada uno, que junto con 40 estanques semirústicos de profundidades variables y una superficie de 1600 m², albergan reproductores, contando además con una presa de 4500 m³ (FIDEFA, 1976). Esta piscifactoría se abastece de agua de un manantial localizado del otro lado de la carretera. (Fig.1c)

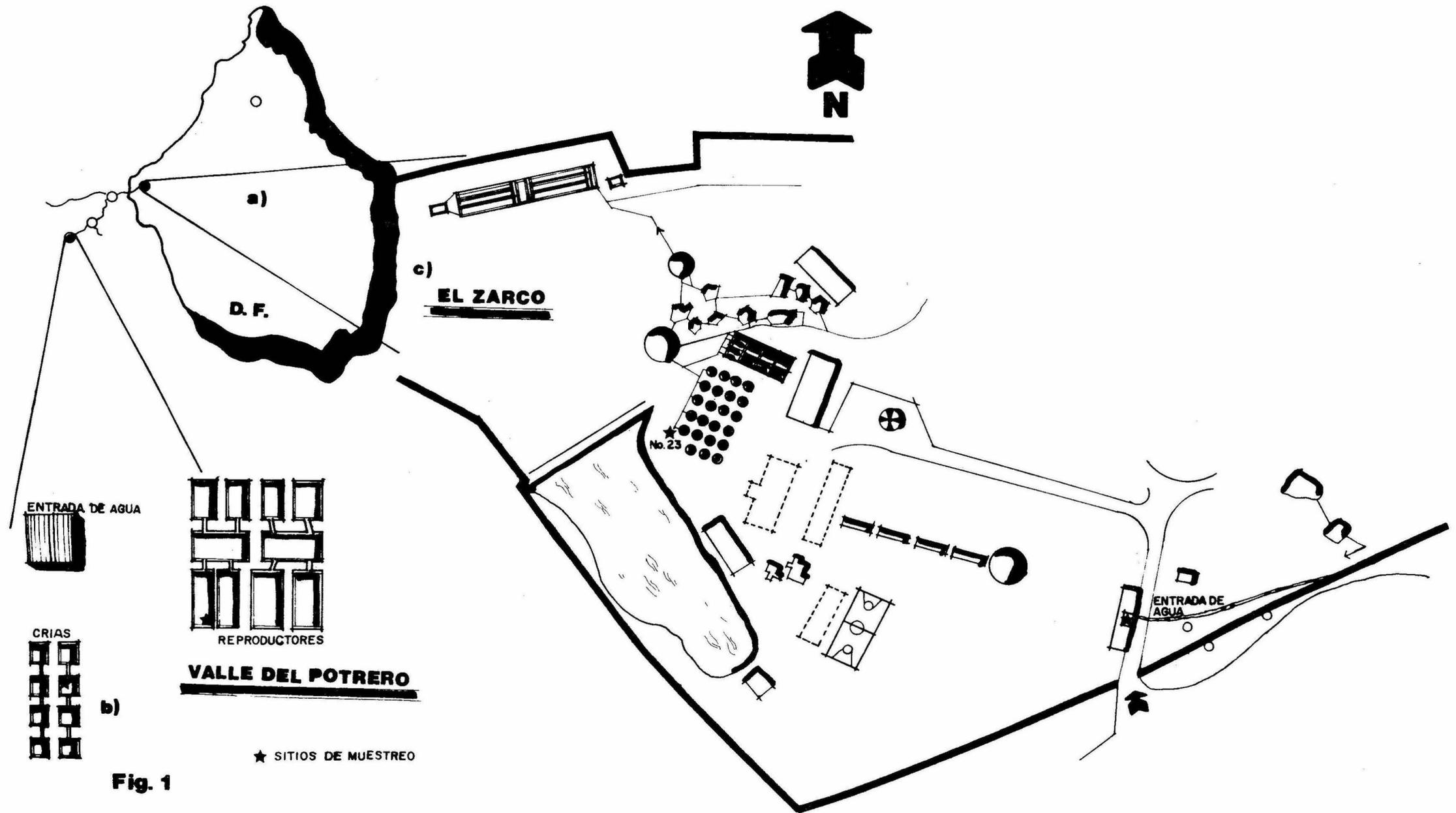


Fig. 1

Ambos centros se encuentran comprendidos dentro del clima templado húmedo con lluvias que abarcan los meses de julio a septiembre, con una precipitación pluvial media de 1520 mm, y una temperatura promedio anual de 9°C (FIDEFA, 1976).

I.2 TOMA DE MUESTRA

Los muestreos de agua para la cuantificación de bacterias por los métodos de conteo total viable (conteo en placa) y conteo directo, se realizaron semanalmente del 11 de Febrero al 15 de julio de 1985 y 2 mas, uno el 3 de septiembre y otro el 30 de octubre del mismo año.

Los sitios de muestreo para el Valle del Potrero fueron: la entrada de agua a la sala de incubación en el canal de distribución, en un estanque de crías de 8.4 m² y un estanque de reproductores de 58.50 m² (Fig.1b).

Para el Zarco fueron la entrada de agua en un estanque de 30.9 m², y en un estanque circular de 7.54 m², el cual corresponde al número 23 de acuerdo a la numeración de la piscifactoría (Fig.1c).

La recolección de agua para el conteo en placa se realizó en frascos estériles de 250 mL de capacidad y para el conteo directo se utilizaron frascos estériles de color ambar de 110 mL, con 10 mL de formol esterilizado por filtración (2% concentración final) a los que se añadió 90 mL de la muestra. Ambas se tomaron simultáneamente a la profundidad media del estanque en la parte donde se localiza la salida de agua (Gilmour y col., 1976).

Los parámetros fisicoquímicos se registraron *in situ*. Para la temperatura se utilizó un termómetro manual de -10°C a 110°C , el pH se registró con papel indicador Universlinkidator Merck, los nitritos y los nitratos con papel indicador Mercoquant Nitri-test y Nitra-test, las muestras para la determinación de nitritos y nitratos por medio del Autoanalyzer de Technicon, correspondieron a los muestreos del 11 y 18 de febrero, el 4 y 11 de marzo y 15 de julio, y se obtuvieron filtrando las muestras de agua a través de una membrana millipore de $0.45\mu\text{m}$ de tamaño de poro, el filtrado se colectó en envases de plástico previamente lavados con HCl 1N se transportaron en refrigeración y se mantuvieron en congelación hasta su procesamiento.

I.3 TRABAJO DE LABORATORIO

Las muestras fueron transportadas en refrigeración aproximadamente a 4°C y procesadas antes de 6 horas de su colecta (A.P.H.A., 1971), en el laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

I.3.1 Bacterias Heterótrofas

I.3.1.1 Cuantificación:

A partir de las muestras de agua originales, se realizaron diluciones decimales seriadas, en una solución buffer de fosfatos previamente esterilizada (apendice 1). Las muestras originales y las diluciones 1:10 y 1:100, se sembraron por duplicado en cajas Petri que contenían medio "Plate count" Merck (apendice 2), colocando 0.1 mL de la muestra en cada caja y esparciéndola homogéneamente. Se dejaron incubar durante 48 hrs. a temperatura ambiente, posterior a esto se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), obteniéndose de ésta forma la cuantificación de bacterias heterótrofas por el método de cuantificación indirecta (Bianchi y Bianchi, 1971; Young, 1979).

1.3.1.2 Análisis morfológico de las cepas bacterianas.

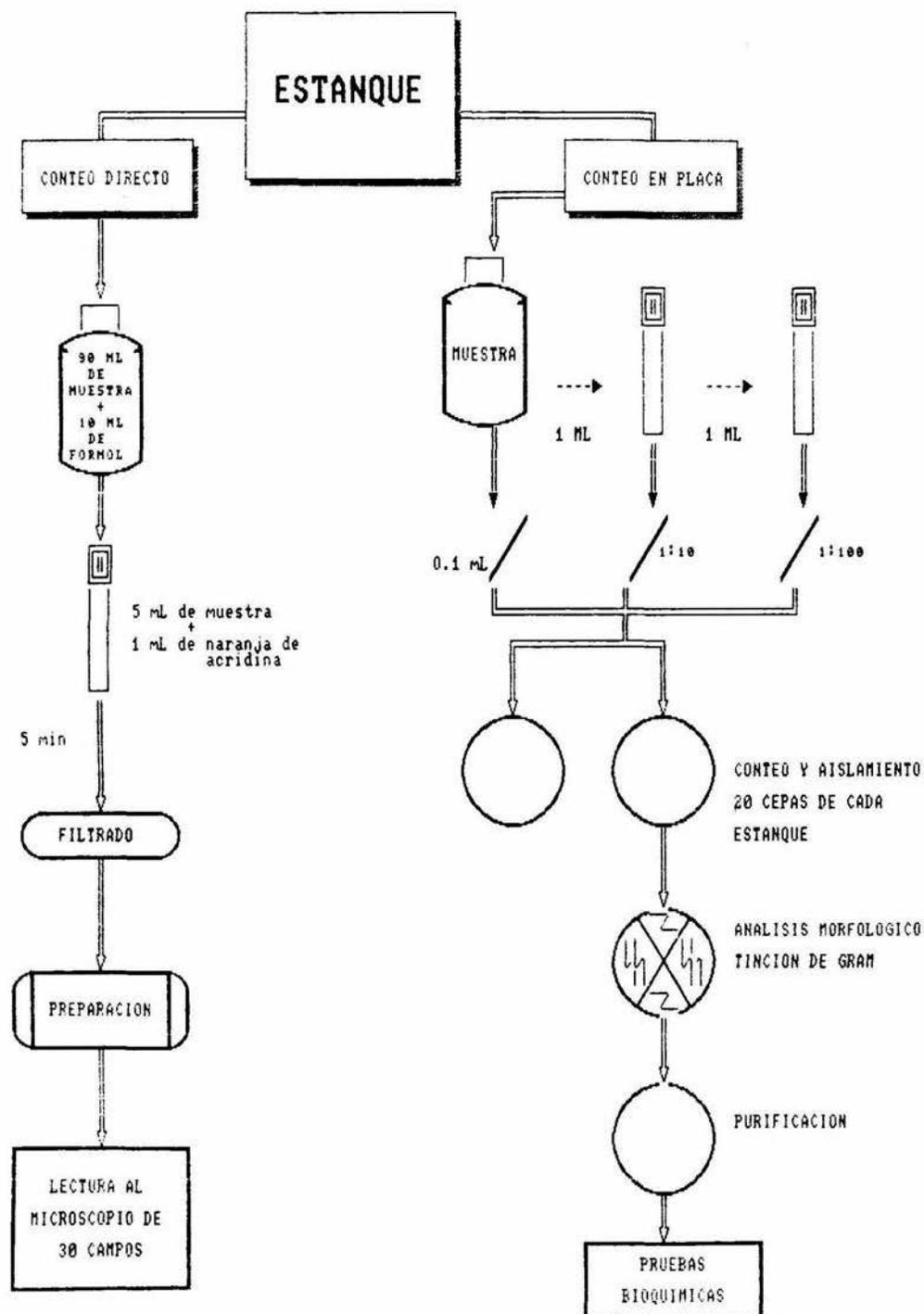
Este análisis se realizó con base en 4 muestreos: 2 correspondientes a la época de estiaje (11 de marzo y 1 de abril) y 2 correspondientes a la época de lluvias (20 de mayo y 15 de julio) para lo cual fué necesario seleccionar de cada muestreo aquellas cajas que mostraran crecimiento entre 50 y 150 colonias, de estas cajas se aislaron aleatoriamente 20 colonias de cada estanque utilizando una plantilla de aislamiento (Lennette, 1980); (Fig. 12b) se purificaron por el método de subcultivo de colonias por estria (Carpenter, 1979). Se realizaron observaciones directas de la colonia como tamaño, forma, borde, consistencia, además del análisis de preparaciones en fresco de las células, con ayuda de un microscopio de contraste de fases 100X marca Zeiss, donde se observó la forma y arreglo celular, presencia y tipo de esporas, así como la movilidad. Posteriormente se realizó la prueba de tinción de Gram (apendice 3).

1.3.1.3 Aislamiento, Purificación y Conservación.

El aislamiento y purificación de las cepas bacterianas para la determinación, se realizó con base en el muestreo del 30 de octubre, se aislaron al azar 20 colonias de cada uno de los estanques, obteniéndose finalmente 100 cepas. La purificación de estas se obtuvo por medio de subcultivos de colonias por estrias (Carpenter, 1979), la cual se verificó mediante la observación de preparaciones en fresco con la ayuda de un microscopio de contraste de fase 100X realizándose simultáneamente el análisis morfológico.

La conservación de las cepas se realizó sembrando por duplicado en frascos con 7 mL de medio Plate count e incubándolas a temperatura ambiente durante 48 hrs. Posteriormente se mantuvieron en refrigeración hasta su determinación (Fig. 12a).

FIG. 12a Metodología seguida en el laboratorio.



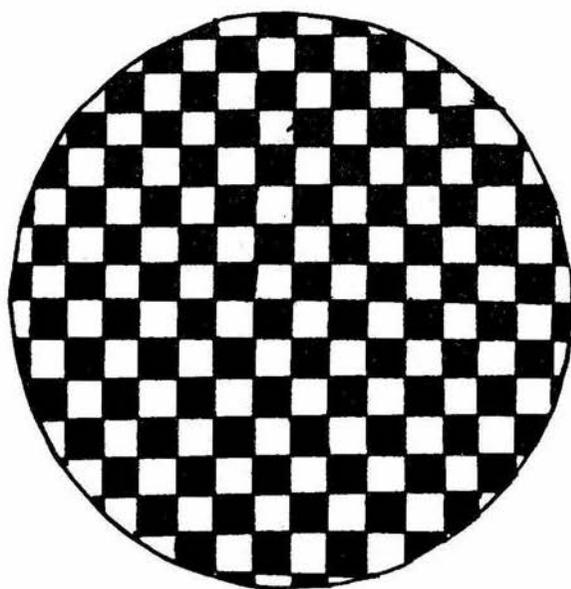


Fig. 3. Plantilla de aislamiento (Lennette, 1980)

I.3.1.4 Determinación de las cepas bacterianas

La determinación de las familias bacterianas existentes en los estanques se realizó con base en el Manual Bergey (Buchanan, 1974). Se seleccionaron las pruebas bioquímicas necesarias que en este caso fueron O-F Hugh y Leifson y el medio de Agar-hierro-kliger, determinación de reducción de nitratos, prueba de citocromo oxidasa por el método de Kovacs y la prueba de catalasa según Mac Fadding, (1976), además de la prueba de tinción de Gram.

I.3.2 Conteo Directo.

La técnica de conteo directo para la cuantificación de bacterias se realizó por el método de tinción de naranja de acridina y microscopía de epifluorescencia (Jones, 1974; Hobbie y col., 1971), con la ayuda del microscopio Microstar American Optical. Se observaron 30 campos por muestra y se aplicó la fórmula siguiente:

$$N = \frac{sc}{sv} (n) (d) \frac{1}{v}$$

Donde:

N = número de bacterias

sc = superficie de campo

sf = superficie de filtración

n = la media de los datos

d = factor de dilución

$\frac{1}{v}$ = el inverso del volumen filtrado

La técnica seguida se explica en el apéndice 5.

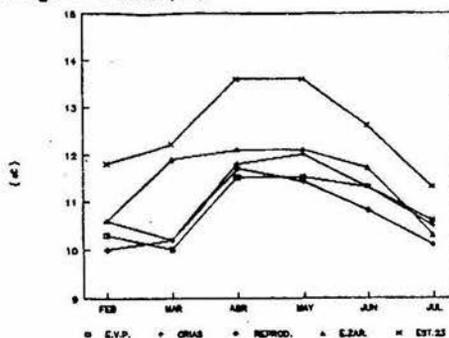
RESULTADOS

PARAMETROS FISICOQUIMICOS:

De los promedios mensuales de los parámetros fisicoquímicos registrados en el agua, la temperatura para la entrada de agua del Valle del Potrero registró una mínima de 10 °C en marzo y una máxima de 11.5 °C de abril a mayo, en el estanque de crías la mínima fue de 10.2 °C en el mes de marzo y 12 °C la máxima en el mes de mayo, en el estanque de reproductores la temperatura mínima fue de 10 °C en febrero y 11.7 °C en abril la máxima en los estanques del Zarco, la mínima en la entrada de agua fue de 10.3 °C en julio y la máxima 12.1 °C en abril y mayo, en el estanque número 23 la mínima se registró en el mes de julio con 11.3 °C y la máxima en abril y mayo con 13.6 °C. La temperatura ambiental disminuyó de 21.6 °C promedio de febrero a abril a 15 °C de mayo a julio.

TABLA No. 1
Temperaturas promedio mensuales en los estanques a lo largo del estudio (°C)

FECHA	ESTANQUE				
	E.V.P.	CRIAS	REPR.	E.ZAR.	EST.23
FEB	10.3	10.6	10	10.6	11.8
MAR	10	10.2	10.2	11.9	12.2
ABR	11.5	11.8	11.7	12.1	13.6
MAY	11.5	12	11.4	12.1	13.6
JUN	11.3	11.3	10.8	11.7	12.6
JUL	10.6	10.5	10.1	10.3	11.3
X	10.9	11	10.7	11.4	12.5
S	0.596	0.677	0.658	0.725	0.861

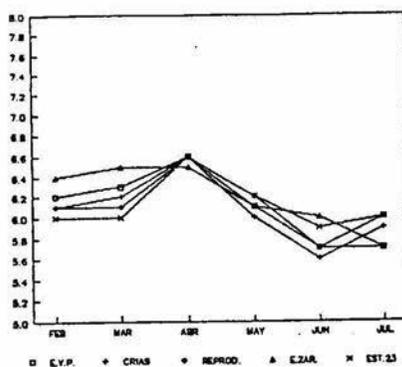


El método utilizado para registrar los valores de pH en el campo (papel indicador Universlinkidator) fue apoyado en el laboratorio con el potenciómetro , observándose una unidad más en este último con respecto al papel indicador.

El pH en los estanques del Valle del Potrero tuvieron como mínimos 5.7 en la entrada de agua en junio y julio, 5.6 en junio en el estanque de crías y 5.7 en junio en el estanque de reproductores, el valor máximo para estos estanques fue de 6.6 en el mes de abril. Para los estanques del Zarco, el valor mínimo en la entrada de agua fue de 5.7 en julio y el máximo de 6.5 en marzo y abril, para el estanque 23 el mínimo fue de 5.9 y la máxima 6.6 en los meses de junio y abril respectivamente (Tabla 2). Los valores promedio a lo largo del estudio para todos los estanques fue 6.1 registrando su concentración mayor en abril y la menor en junio y julio.

TABLA No. 2
pH promedio mensual en los estanques a lo largo del estudio.

FECHA	ESTANQUE				
	E.V.P.	CRIAS	REPR.	E.ZAR.	EST.23
FEB	6.2	6.1	6.1	6.4	6
MAR	6.3	6.2	6.1	6.5	6
ABR	6.6	6.6	6.6	6.5	6.6
MAY	6.1	6	6.2	6.1	6.2
JUN	5.7	5.6	5.7	6	5.9
JUL	5.7	5.9	6	5.7	6
X	6.1	6.1	6.1	6.2	6.1
S	0.321	0.304	0.267	0.294	0.234

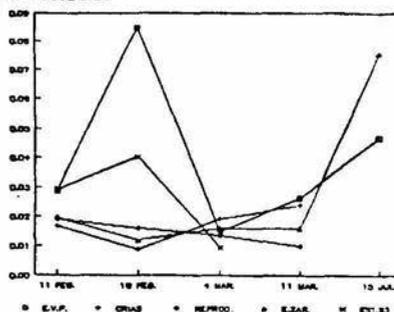


Las concentraciones de nitritos (ppm) obtenidos por medio del Autoanalyzer de Technicon en cada uno de los sitios de muestreo fueron; la entrada del Valle del Potrero tuvo su máxima concentración en el mes de febrero con 8.5×10^{-2} y la mínima 1.49

$X 10^{-2}$ en el mes de marzo, en el estanque de crías la máxima registrada fue de 2.39×10^{-2} en marzo y la mínima 0.89×10^{-2} en febrero, en el estanque de reproductores la mínima se registró en marzo con 1.01×10^{-2} y la máxima de 1.91×10^{-2} en febrero. En la entrada del Zarco como valor máximo se reportó 7.54×10^{-2} en julio y 1.19×10^{-2} en febrero, en el estanque 23 la concentración máxima fue 4.01×10^{-2} en febrero y 0.95×10^{-2} en marzo la mínima.

TABLA No. 3
Concentraciones de NO₂ en p.p.m. de los estanques a lo largo del estudio.

FECHA	ESTANQUE				
	E.V.P.	CRIAS	REPR.	E.ZAR.	EST.23
11 FEB.	0.0287	0.0167	0.0191	0.0197	0.0293
18 FEB.	0.085	0.0089	0.016	0.0119	0.0401
4 MAR.	0.0149	0.0191	0.0137	0.0161	0.0095
11 MAR.	0.0263	0.0239	0.0101	0.0161	n.r.
15 JUL.	0.0466	n.r.	n.r.	0.0754	n.r.
X	0.0403	0.0171	0.0143	0.0278	0.0263
S	0.0245	0.0084	0.0066	0.0239	0.0162

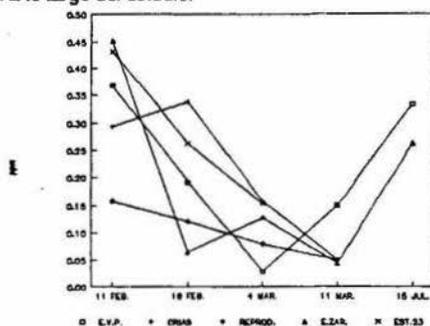


Las concentraciones de nitratos para todos los estanques tanto del Valle del Potrero como para el Zarco registraron la máxima en febrero y la mínima en marzo, siendo estas respectivamente para la entrada del Valle del Potrero 36.8×10^{-2} y 2.87×10^{-2} , para el estanque de crías 33.89×10^{-2} y 5.08×10^{-2} y para el estanque de reproductores 15.65×10^{-2} y 5.07×10^{-2} , para los estanques del Zarco la entrada de agua registró 45.22×10^{-2} y 4.36×10^{-2} , en el estanque 23 43.77×10^{-2} y 15.30×10^{-2} . De acuerdo a los valor promedio de las concentraciones de nitritos fueron en orden decreciente, la entrada al Valle del Potrero (4.03×10^{-2}), la entrada de agua al Zarco (2.78×10^{-2}),

el estanque 23 (2.63×10^{-2}), el estanque de crías del Potrero (1.71×10^{-2}) y el estanque de reproductores (1.43×10^{-2}). En el mismo orden, los valores promedio de nitratos fueron: el estanque 23 (28.4×10^{-2}), la entrada al Potrero (21.38×10^{-2}), crías (20.95×10^{-2}), la entrada al zarco (19.0×10^{-2}) y el estanque de reproductores (9.33×10^{-2}).

TABLA No. 4
Concentraciones de NO₃ en p.p.m. de los estanques del a lo largo del estudio.

FECHA	ESTANQUE				
	E.V.P.	CRÍAS	REPR.	E.ZAR.	EST.23
11 FEB.	0.368	0.2919	0.1565	0.4522	0.4311
18 FEB.	0.1911	0.3389	0.12	0.0651	0.2615
4 MAR.	0.0287	0.1565	0.0797	0.1273	0.153
11 MAR.	0.1484	0.0508	0.0501	0.0436	n.r.
15 JUL.	0.3331	n.r.	n.r.	0.2622	n.r.
X	0.2138	0.2095	0.0933	0.19	0.284
S	0.1241	0.1316	0.0543	0.1516	0.1641

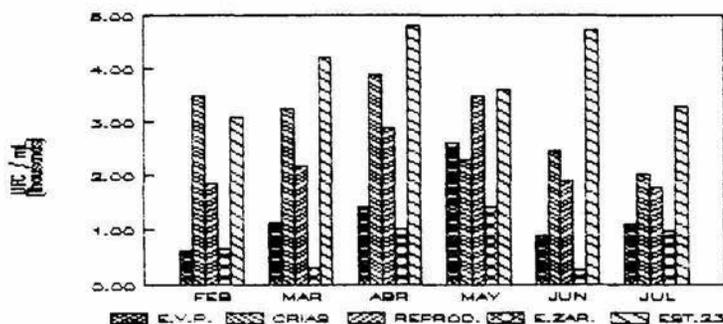


CONCENTRACIONES BACTERIANAS:

La tabla 5 muestra las concentraciones bacterianas promedio obtenidas por el método de conteo en placa para los estanques del Valle del Potrero y los del Zarco a lo largo del estudio. Puede observarse que para la entrada del Valle del Potrero el valor máximo fue de 2.6×10^8 en mayo y 6.3×10^2 en febrero el mínimo, en el estanque de crías la concentración máxima fue 3.9×10^8 en febrero y la mínima 2.0×10^8 en julio, en el estanque de reproductores el máximo fue de 3.5×10^8 en mayo y el mínimo de 1.7×10^8 en julio, en los estanques del Zarco, la entrada de agua reportó un valor máximo de 1.4×10^8 en mayo y un mínimo de 2.7×10^2 en junio, en el estanque 23 la máxima fue de 4.8×10^8 en abril y una mínima de 3.1×10^8 en julio.

TABLA 5. Concentraciones bacterianas promedio mensual por el método de Conteo en Placa en los estanques a lo largo del estudio.

FECHA	E.V.P.	CRIAS	REPR.	E. ZAR.	EST 23
FEB	630	3500	1860	680	3100
MAR	1155	3250	2170	315	4200
ABR	1400	3900	2900	1030	4800
MAY	2600	2300	3500	1400	3600
JUN	910	2460	1900	270	4700
JUL	1100	2000	1760	990	3300
X	1299	2902	2348	781	3950
S	627	689	639	404	660

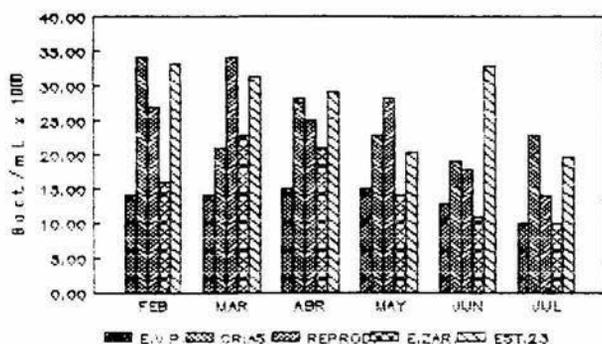


Los valores promedio mensuales del conteo directo para la entrada de agua del Potrero fueron 1.5×10^4 la máxima en abril y mayo, la mínima 1×10^4 en julio, para el estanque de crías la máxima se registró en el mes de febrero con 3.4×10^4 y la mínima en junio con 1.9×10^4 , para el estanque de reproductores la máxima fue el mes de marzo con 3.4×10^4 y la mínima 1.4×10^4 en julio, para los estanques del Zarco las concentraciones máximas se registraron en marzo para la entrada de agua con 2.3×10^4 y en febrero 3.3×10^4 para el estanque 23, los valores mínimos fueron 1.0×10^4 para la entrada y 1.9×10^4 para el estanque 23 ambos en el mes de julio

TABLA 6.

Concentraciones bacterianas promedio mensual por el método de Conteo directo en los estanques a lo largo del estudio.

FECHA	ESTANQUE				
	E.V.P.	CRIAS	REPR.	E.ZAR.	EST.23
FEB	14000	34000	27000	16000	33000
MAR	14000	21000	34000	23000	31250
ABR	15000	28000	25000	21000	29000
MAY	15000	23000	28000	14000	20300
JUN	13000	19000	18000	11000	32750
JUL	10000	23000	14000	10000	19700
X	13500	24667	24333	15833	27667
S	1708	4989	6600	4810	5577



ANALISIS MORFOLOGICO:

Los porcentajes de morfologías celulares a lo largo del estudio mostraron un comportamiento homogéneo, siendo los bacilos Gram negativos en pares o aislados al grupo predominante tanto para los estanques del Valle del Potrero con 69.1% como para los del Zarco con 67.4% en ambas épocas climáticas, Los bacilos Gram negativos en cadena ocuparon el segundo lugar en abundancia para los dos sitios de muestreo con 24% durante la época de secas y 18.7% en la época de lluvias, los otros dos grupos que se aislaron durante la época de secas fueron los bacilos Gram positivos en pares o aislados con 6.3% y los cocos con apenas 0.6% los cuales aparecieron solamente en los estanques de crías. Mientras que para la época de lluvias el tercer sitio estuvo representado por los pleomórficos con 9.9%, seguido de los bacilos Gram positivos en pares o aislados con 3% y por último los cocos con 1% encontrados en los estanques del Zarco.

TABLA 7.

Porcentaje promedio de morfología celulares en época de secas y época de lluvias

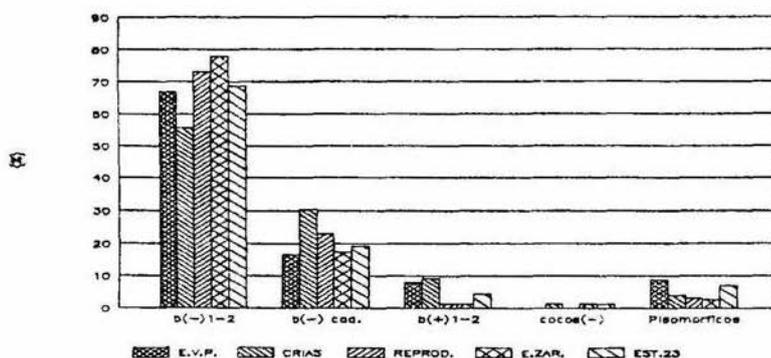
SECAS	ESTANQUE					X
	ENT.V.P.	CRIAS	REPROD.	ENT.ZAR.	EST. 23	
b(-)1-2	66.5	61	74.5	75	68.5	69.1
b(-) cad.	18	31	23	25	23	24
b(+)1-2	15.5	5	2.5	0	8.5	6.3
cocos	0	3	0	0	0	0.6
LLUVIAS	ENT.V.P.	CRIAS	REPROD.	ENT.ZAR.	EST. 23	X
b(-)1-2	67.5	50	71.1	80	68.6	67.4
b(-) cad.	15	30	23	10	15.5	18.7
b(+)1-2	0	12.5	0	2.5	0	3
Pleomórficos	17.5	7.5	5.9	5	13.4	9.9
cocos(-)	0	0	0	2.5	2.5	1

b=bacilo, (-) Gram negativo, (+) Gram positivo, 1-2 = en pares o aislados, cad. = agrupados en cadenas.

En cuanto al análisis de los grupos morfológicos encontrados con base en los valores promedio de todos los sitios de muestreo se observa que en los estanques en el valle del Potrero predominaron los bacilos Gram negativos aislados ó en pares con 65.1% seguido del grupo de los bacilos Gram negativos en cadena, conformando el 23.3%, el grupo de bacilos Gram positivos en pares o aislados ocuparon el 5.9%, mientras que los pleomórficos el 5.2% y los cocos únicamente el 0.5%. Para los estanques del Zarco, nuevamente el grupo predominante fue el de los bacilos Gram negativos, aislados o en pares, con 73.1%, 18.3% de bacilos Gram negativos en cadena, 4.6% de pleomórficos, 2.8% de bacilos Gram negativos en pares o aislados y 1.2% de cocos.

TABLA No 8
Porcentajes promedio de morfologías celulares obtenidos a lo largo del estudio.

MORFOLOGIA	ESTANQUE						
	E.V.P.	CRIAS	REPROD.	X	E.ZAR.	EST.23	X
b(-)1-2	67	55	73	65.1	77.5	68.5	73.1
b(-) cad.	16.5	30	23	23.3	17.5	19.3	18.4
cocos(-)	0	1.5	0	0.5	1.2	1.2	1.2
b(+)1-2	7.7	9	1	5.9	1.3	4.3	2.8
Pleomorficos	8.8	4	3	5.2	2.5	6.7	4.6



b=bacilos, (-)=Gram negativos, (+)=Gram positivos, 1-2=en pares o aislados, cad =agrupados en cadena

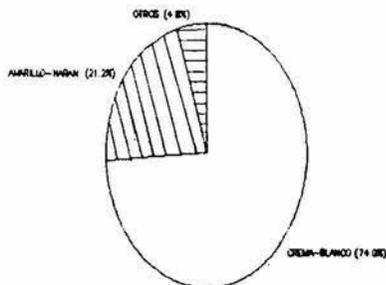
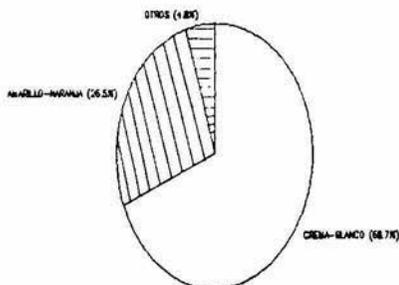
El análisis de los pigmentos que presentaron las colonias indica un predominio del pigmento crema-blanco a lo largo del estudio para todos los estanques de ambas zonas, obteniéndose un promedio total en el valle del Potrero de 68.7% y 74% para los estanques del Zarco, el pigmento amarillo-naranja ocupó el segundo lugar con porcentaje promedio durante todo el estudio de 26.5% para los estanques del Potrero y 21.2% para los del Zarco, se presentaron también pigmentos de diversos colores como café, rojo, rosa, morado, verde y amarillo verdoso, los cuales no representaron valores significativos, tanto en Potrero como en el Zarco sólo conformaron el 4.8% del total de la población analizada.

TABLA No. 9 Porcentaje de colonias pigmentadas en los estanques a lo largo del estudio

FECHA	VALLE DEL POTRERO			ZARCO		
	CREMA BLANCO	AMARILLO NARANJA	OTRO	CREMA BLANCO	AMARILLO NARANJA	OTRO
SEPT.	85	10	5	85	10	5
MARZO	65.4	34.6	0	66.7	30.5	2.8
ABRIL	96	4	0	98	2	0
MAYO	55.6	38.9	5.9	66.5	27.5	6
JUNIO	50	40	10	82	18	0
JULIO	58	34	8	61	25	14
SEPT.	65	25	10	69.2	20.5	10.3
OCT.	74.5	25.5	0	63.8	36.2	0
X	68.7	26.5	4.8	74	21.2	4.8
S	14.60	12.45	4.10	12.08	10.43	4.87

ESTANQUES DEL VALLE DEL POTRERO

ESTANQUES DEL ZARCO



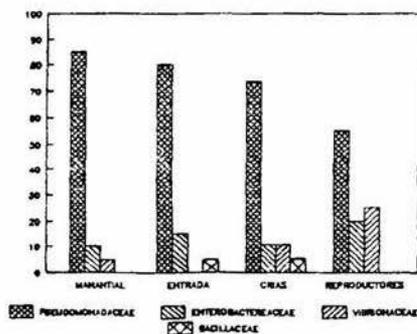
DETERMINACION DE FAMILIAS BACTERIANAS:

De acuerdo al muestreo realizado para la determinación de las familias existentes, la *Pseudomonadaceae* presentó para el Potrero el 73.4% y para el Zarco el 72.8%, en abundancia se encuentra la Familia *Enterobacteriaceae* con 13.9% en el Potrero y 16.9% en el Zarco, la Familia *Vibrionaceae* en el Potrero registró 10.1% mientras que en el Zarco fue de 6.9%, la familia con menos representantes fue *Bacillaceae* con 2.6% y 3.4% en el Potrero y el Zarco, respectivamente.

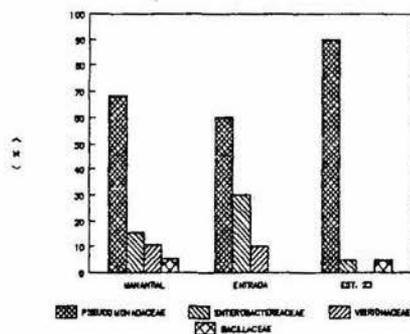
TABLA 10.
Porcentaje de familias bacterianas encontradas en base al muestreo del 30 de octubre.

FAMILIA	VALLE DEL POTRERO					ZARCO			
	MANAN.	ENT.	CRIAS	REPR.	X	MANAN.	ENT.	EST.23	X
Pseudomonadaceae	85	80	73.7	55	73.4	68.4	60	90	72.8
Enterobacteriaceae	10	15	10.5	20	13.9	15.8	30	5	16.9
Vibrionaceae	5	0	10.5	25	10.1	10.6	10	0	6.9
Bacillaceae	0	5	5.3	0	2.6	5.2	0	5	3.4

VALLE DEL POTRERO



EL ZARCO



DISCUSION Y CONCLUSION

En lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura y pH) no mostraron variaciones estacionales, a pesar de que sí existió decremento en la temperatura ambiental de 21.6°C promedio de febrero a abril a 15°C de mayo a julio. Ambos parámetros presentaron una tendencia a disminuir a partir de junio coincidiendo con el aumento en la precipitación pluvial. pero estos valores no se consideran significativos. Los parámetros fisicoquímicos registrados nunca sobrepasaron los límites de tolerancia que requiere la trucha para su cultivo.

Los valores de NO_2 y NO_3 obtenidos no se encontraron dentro, ni aún cerca de los límites de toxicidad para la trucha. Smith y Williams (1974), observaron una mortalidad del 55% en 24 h. con 0.55 mg/l de NO_2 , y un 50% en 24 h. con 1.60 mg/l de NO_2 . Por lo que respecta al NO_3 , Westin (1974), determinó que los salmónidos toleraban concentraciones hasta de 400 mg/l . Dada la escala de detección del papel indicador utilizado para determinación en el campo (0 a 10 a 20 a 30 a 40 y 50 ppm), estos no pudieron ser registrados por este método.

Los valores obtenidos de concentraciones bacterianas por los métodos de Conteo en Placa y Conteo Directo para ambas zonas mostraron constancia con mínimas fluctuaciones.

De acuerdo a los valores de concentraciones bacterianas heterótrofas en el Valle del Potrero, de los 3 sitios de muestreo, puede observarse que los valores más bajos se registraron en la entrada de agua; esta diferencia puede

explicarse debido a que los otros dos estanques contienen organismos. Varios autores entre ellos Collins, y col., (1975), Gilmour y cols., (1976) y Sugita, y cols., (1985) establecen que los estanques sin peces presentan concentraciones menores a las que muestran estos mismos con organismos, debido a la influencia que tienen a través de sus excretas y del alimento que se les proporciona los cuales poseen una cierta cantidad de bacterias. El estanque de crías presentó las concentraciones más altas del Valle del Potrero, este valor parece estar influido por la mortandad natural de crías; dada la edad que presentan, podemos observar que conforme transcurre el tiempo las concentraciones bacterianas tienden a disminuir. Por lo que respecta a los valores del estanque de reproductores existió en ellos muy poca variabilidad.

Para los estanques del Zarco también existe diferencia entre la entrada de agua y el estanque con organismos. Pero cabe mencionar que la diferencia entre estos es mayor que la que guardan los estanques en el Valle del Potrero, por lo que además de la presencia de organismos, hay que tener en cuenta que el agua en el estanque 23 permanece mas tiempo en el, favoreciendo el incremento de la población bacteriana.

Un análisis global comparativo de ambas zonas nos indica que la entrada de agua del Zarco presentó concentraciones ligeramente menores a los de la entrada de agua del Valle del Potrero, esto puede explicarse dado que el agua del Valle del Potrero corre al aire libre y sobre la tierra desde el manantial hasta la entrada de la piscifactoría, de manera que está expuesta a la influencia de las bacterias del aire y el suelo;

mientras que el agua del Zarco realiza su trayectoria sobre un canal de cemento y la mitad de este se encuentra cubierto, lo que disminuye la influencia de bacterias del medio que le rodea; por otra parte, el flujo de agua que llega al Zarco es mucho mayor al de Valle del Potrero.

El estanque 23 registró los valores más altos aun cuando su tamaño es comparable con el de crías del Valle del Potrero; esto como se menciona anteriormente debido a la forma cilíndrica que presenta, con mayor profundidad en el centro, facilitando la acumulación de materia orgánica lo que evita la penetración de los rayos ultravioleta del sol disminuyendo su acción bactericida (Bell, y cols., 1982), así como del flujo de agua que es circular y contribuye a una mayor permanencia del agua en el estanque.

Al comparar los resultados obtenidos en estos dos centros con los que se reportaron para dos muestreos puntuales realizados en una piscifactoría de Pucuateo, Mich. el 13 de julio y otro en una piscifactoría de San Miguel Regla, Hgo. el 15 de julio, ambas dedicadas al cultivo de trucha cuyos valores fueron de 2.5×10^3 UFC/ml y de 9.0×10^2 UFC/ml respectivamente, se observa que estos resultados son similares. De igual manera se observa una similitud con los datos reportados por Gilmour y col., (1976) quienes obtuvieron valores comprendidos entre 4×10^2 a 1×10^3 UFC/ml en agua parcialmente descloradas, que poseían organismos a los que no se alimentó desde una semana antes ni durante el experimento. Aunque las condiciones son diferentes, en ambos casos se nos da una visión de estanques con concentraciones bajas de bacterias.

Los valores obtenidos por medio de la técnica de conteo directo en la mayoría de los casos presenta poca variabilidad

entre ellos, incluso los valores promedio para todos los estanques se encuentran dentro de la misma potencia (10:10000 UFC/ml).

Se obtuvo un valor bajo de correlación al comparar las técnicas empleadas para la cuantificación bacteriana, esto debido a la variabilidad de los grupos bacterianos detectados por cada una de ellas como a errores en la aplicación de las técnicas. Al igual que el obtenido por Kaneko y cols., (1978) en aguas del Golfo de Alaska. Sin embargo Atlas y Bartha (1981), reportan una alta correlación positiva entre ambos métodos. No se observó estacionalidad en los valores de concentraciones bacterianas a lo largo del estudio por ninguno de los métodos.

La abundancia de los bacilos Gram negativos coincide con lo reportado por Gilmour y cols., (1976) y Austin (1983) para estanques de peces en los cuales la mayoría de las bacterias aisladas fueron Gram negativas no esporuladas. Los bacilos Gram positivos presentaron mayor incidencia en el Valle del Potrero, donde las condiciones eran favorables para el arrastre del medio terrestre que rodea a los estanques, (Austin, 1983), no así en los del Zarco donde sobresalen del nivel del suelo.

El observó la presencia de ciertas colonias pigmentadas a partir del mes de mayo, (aproximadamente 5%) que no se habían presentado antes, las que posiblemente hayan llegado hasta los estanques ya sea del aire o del terreno circundante por efecto de las lluvias (Collins y cols., 1975). Estos valores nunca se acercaron a los de los pigmentos crema-blanco y amarillo-naranja.

En este estudio no se presentó una marcada diferencia en los pigmentos en las épocas de secas y de lluvias.

Los miembros de la familia *Pseudomonadaceae* parecen ser los habitantes mayoritarios de los cuerpos de agua dulce, ya que tanto para este estudio como en los realizados por Gilmour y cols., (1976), y Sugita y cols. (1985) este fue el grupo predominante.

La considerable presencia de bacterias amarillo-naranja nos hacen suponer que cierta cantidad de estas se tratan de *Flavobacterium*, dato que coincide con lo reportado por Roald (1977) en su estudio en el tracto digestivo de la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) donde menciona como grupo predominante a *Flavobacterium*, seguido de *Pseudomonas* y *Bacillus* y lo reportado por Rheinheimer (1974) cuando establece que *Flavobacterium* y *Achromobacter* son habitantes de aguas de manantiales. Esta comparación entre el tracto digestivo y la flora acuática es válida si consideramos lo demostrado por Colwell (1962), Murchelano (1975) y Roberts (1981), quienes establecen que la flora bacteriana acuática es un reflejo directo de la flora bacteriana de los peces y viceversa. La presencia de *Bacillus* posiblemente sea la influencia del medio terrestre, o el que este grupo bacteriano se encuentre en el alimento de los peces. Las enterobacterias parecen tener relación con la presencia de peces debido a sus excretas, (Gilmour y col., 1976), además de que se han aislado enterobacterias de algunos tipos de alimentos y la influencia de materia fecal de mamíferos (roedores, caballos y borregos) cercanos a los estanques.

Una de las familias de mayor importancia patológica para la trucha es la *Vibrionaceae* de la cual se obtuvieron valores bajos al igual que lo reportado por Roald (1977) para esta misma especie.

Los estanques del Zarco son lavados, encalados y en caso necesario se añaden sustancias químicas directamente al agua, para prevenir problemas sanitarios. Sin embargo los estanques del Valle del Potrero no reciben ningún tratamiento. Considerando que las concentraciones bacterianas de las fuentes de agua son similarmente bajas, que el organismo bajo cultivo es el mismo y la forma de calcular la cantidad de peces por estanque es la misma, podría pensarse que los estanques rústicos resultan mas eficientes que los de concreto. Pero por otra parte la falta de conocimiento y experiencia por parte de los encargados de las pequeñas piscifactorías para determinar la causa repentina de la muerte masiva de los organismos y la falta de control en cuanto a la productividad real obtenida, estan dando una idea erronea de la efectividad de los estanques.

APENDICE

1.- PREPARACION DE AGUA DE DILUCION.

Solución buffer de fosfatos:

a) stock solución buffer de fosfatos; 34 g de potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada, ajustar al pH a 7.2 con NaOH 1N, y diluir a un litro con agua destilada.

b) 50 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua

Añadir 1.25 mL de la solución (a) más 5 mL de la solución (b), y aforar a un litro de agua destilada. Se colocan 9 mL en cada tubo de ensaye con tapón de rosca y se esterilizan a 121 libras durante 15 min (A. P. H. A., 1971).

2.- PREPARACION DE MEDIO PLATE COUNT. Merck^r

	gramos por litro
peptona de caseina	5.0
extracto de levadura	2.5
D (+) glucosa	1.0
Agar-agar	14.0

Se suspenden 22.5 g en un litro de agua destilada, se dejan remojar 15 min, se calienta hasta que esté disuelto, y se esteriliza durante 15 min a 121 libras.

Una vez estéril, se vacía a las cajas petri y se dejan solidificar durante 48 h. Ya solidificado el medio se guardan las cajas en refrigeración hasta su uso.

3.- TINCION DE GRAM (Modificada por Hucker, 1957)

Reactivo de Cristal violeta-oxalato de amonio

Solución A

Solución B

crystal violeta	0.2 g	oxalato de amonio	0.8 g
alcohol etílico 96%	200 mL	agua destilada	80.0 mL

Se combinan las soluciones, se filtra y se deja reposar durante 24 h.

Lugol

Solución A

Iodo (cristales) 1 g
Ioduro de potasio 2 g
agua destilada 240 mL

Solución B

NaHCO₃ al 5% 60 mL

Combinar las dos soluciones, filtrar y dejar reposar durante 24 h.

Alcohol etílico al 96% y safranina para tinción de Gram (presentación comercial Sigma)

TECNICA;

- 1.- Hacer un frotis de la cepa y dejarla secar
- 2.- cubrir la preparación con la solución de cristal violeta - oxalato de amonio por espacio de 1 minuto
- 3.- lavar con agua
- 4.- cubrir la preparación con la solución de lugol, 1 minuto
- 5.- lavar con agua
- 6.- Decolorar con alcohol etílico durante 45 segundos
- 7.- lavar con agua
- 8.- cubrir la preparación con safranina 30 segundos (colorante de contraste)
- 9.- lavar con agua
- 10.- dejar escurrir y observar al microscopio de campo claro con el objetivo de inmersión.

Las bacterias que retengan el cristal violeta aparecerán de color azul (Gram positivas) las que retengan la safranina serán rojas (Gram negativas).

4.- PREPARACION DE MEDIOS Y REACTIVOS.

A) Agar Hierro Kliger:

Este medio esta diseñado para detectar la producción de ácido y gas que son producto de la fermentación, así como H₂S a partir del sulfato ferroso. La producción de ácidos mixtos relativamente fuertes hacen virar el color rojo del indicador (rojo fenol) a amarillo, cuando el pH es menor a 6.8.

Gramos por litro	gramos por litro
Extracto de carne3.0	amonio hierro(III)
extracto de levadura ..3.0	citrato0.5
peptona de caseina ...15.0	cloruro de sodio5.0
peptona de carne5.0	tiosulfato de sodio .0.5
lactosa10.0	rojo de fenol0.024
glucosa1.0	agar-agar12.0
pH del medio 7.4	

Preparación:

Añadirlos a un litro de agua destilada, dejar remojar durante 15 min, después se hierve hasta completar disolución. Se vacía en tubos de ensaye con tapón de rosca y se deja esterilizar durante 15 min a 121 libras, se dejan solidificar los tubos inclinados de tal manera que el medio quede en "pico de flauta".

Para la inoculación se utiliza una asa de siembra recta, se toca la colonia pura y se atraviesa el medio hasta 3 ó 5 mm antes del fondo para evitar la entrada de aire, se retira el asa y se estría el pico. Se deja incubar durante 24 a 48 h a 37°C.

Interpretación:

Pico alcalino y fondo alcalino (rojo) (rojo)	= no hay fermentación de azúcar (bacterias no fermentadoras)
Pico alcalino y fondo ácido (rojo) (amarillo)	= fermentación de glucosa, pero no de lactosa.
Pico ácido y fondo ácido (amarillo) (amarillo)	= fermentación de glucosa y lacto- sa (bacterias fermentadoras)

B) Medio de Oxido-fermentación de Hugh y Leifson

Medio sensible para la detección de ácidos formados por la oxidación de glucosa.

peptona 2.0 g	azul de bromotimol 0.003 g
glucosa 10.0 g	cloruro de sodio 5.0 g
agar 2.5 g	fosfá o dipotásico 0.3 g

Todos los reactivos se mezclan en un litro de agua destilada, el pH final es de 7.1. El medio se vacía en ampollitas y se esteriliza a 121 libras de presión durante 15 min, vigilando que éstas queden bien tapadas.

La inoculación se hace con asa de siembra recta, tocando la cepa pura y sumergiéndola dentro del medio sin tocar el fondo, se siembran dos ampolletas por cepa, una se mantiene en condiciones aerobias y la otra en condiciones anaerobias, esto último se consigue utilizando ampolletas con medio hervidas durante algunos minutos para que salga cualquier residuo de oxígeno y colocando una capa de parafina sobre el medio después de que ha sido sembrada la cepa. Se dejan incubar durante 24-48 h.

Interpretación:

Aerobio	Anaerobio	Metabolismo
Acido (amarillo)	alcalino(verde)	Oxidativo
ácido	ácido	Fermentativo
alcalino	alcalino	No sacarolítico

C) Reducción de Nitratos:

La característica de las Enterobacterias, de obtener oxígeno a partir de los nitratos, le confieren la capacidad de reducir éstos a nitritos.

Caldo nutritivo	8 g
KNO ₃	1 g
Agua destilada	1000 mL

Se ajusta el pH a 7.5, se vierte en tubos de ensaye con tapón de rosca, se esteriliza a 121 libras durante 20 minutos.

D) Reactivo de Griess

Solución A		Solución B	
Acido sulfanílico	0.8 g	alfa naftilamina	0.5 g
ácido acético 5N	100 mL	ácido acético 5N	100 mL

Interpretación:

para la lectura de los tubos se añaden 3 gotas de ácido sulfanílico y 3 gotas de alfa naftilamina. El vire a un color rojo indica que hubo reducción de nitratos (prueba positiva). Si la

muestra queda incolora puede deberse a: que no hubo reducción de nitratos ó que la reducción fué más allá de nitritos (amonio, óxido nítrico, etc.), para lo cual se añade una "pizca" de zinc (dada su capacidad para reducir los nitratos), si la muestra cambia a color es que aún estaban ahí (prueba negativa), si no cambia de color es que la reducción fué más allá de los nitratos (prueba positiva).

E) Citocromo Oxidasa (Kovacs, 1956)

El sistema citocromo oxidasa se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, por lo tanto esta prueba es importante para diferenciar Enterobacterias (que carecen de la enzima) de las Pseudomonas (que la poseen).

N,N-dimetil-monohidroclorato-p-fenildiaminae	100 mg
agua destilada	10 mL

Esta sustancia debe prepararse al momento de usarse en frascos ambar y envolverlo con papel aluminio, se conserva en refrigeración 10 h., después de las cuales debe desecharse.

Procedimiento:

Dentro de una caja Petri se coloca un papel filtro que se baña con la solución, con el asa se toma una pequeña muestra de la colonia y se hace un frotis sobre el papel; una coloración rosa después de 2 a 30 segundos indica una prueba positiva.

F) Catalasa (Koneman, 1983)

A pesar de ser uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los azúcares, el peróxido de hidrógeno puede ser letal para las bacterias, la catalasa es una enzima que se encarga de descomponerlo en agua y oxígeno. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad de catalasa y es comunmente utilizada para diferenciar bacilos gam positivos.

Peróxido de hidrógeno al 30%, conservado en frasco color ambar.

Procedimiento:

Tomar una muestra del cultivo puro y colocarlo sobre un portaobjetos, añadir una gota de peróxido de hidrógeno. La producción de burbujas debido al desdoblamiento del peróxido de hidrógeno indican una prueba positiva.

5.- TECNICA DE CONTEO DIRECTO POR MEDIO DE LA TINCION DE NARANJA DE ACRIDINA Y MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.

Esta técnica consiste en retener todas las bacterias por medio de un filtro en cuya superficie deben ser visibles las bacterias, y la tinción y las condiciones ópticas deben producir un alto contraste entre las bacterias y el fondo (Hobbie, et,al. 1977). Esto se consigue tiñendo membranas nucleopore de 0.22 de tamaño de poro (25 mm de diámetro) con una solución de Irgalan black (2g de irgalan black en un litro de ácido acético al 2%) por un espacio de 2 a 24 h, después de las cuales se enjuagan uno por uno por inmersión en agua destilada varias veces, pudiendo ser utilizados inmediatamente.

Procedimiento:

Flamear la columna millipore de 15 mL y dejarla enfriar, con una pipeta estéril se toman 5 mL de muestra, se colocan en el tubo de ensaye con tapón de rosca, se añaden 0.5 mL de naranja de acridina (0.2 g de naranja de acridina en 20 mL de agua destilada), se agita vigorosamente con la ayuda de un agitador vortex y se deja reposar 5 min . Se coloca el filtro millipore teñido sobre el prefiltro y sobre éste la columna, que se fija con pinzas millipore (Fig. 3). Se vierte el contenido del tubo en la columna y se filtra provocando vacío con una bomba de 1/4 de HP. Una vez que la muestra se ha filtrado, retirando la columna, se toma el filtro con unas pinzas millipore y se coloca sobre un portaobjetos en el cual se ha colocado una gota de aceite de inmersión tipo A (sigma) con una resolución de 100 X, colocando hacia arriba la cara del filtro que tuvo contacto con la muestra,

se añade otra gota de aceite, se tapa con el cubreobjetos y se observa al microscopio.

En caso de ser necesario, cuando los campos estén muy saturados de bacterias, se harán diluciones utilizando agua destilada y repitiendo el proceso.

Precauciones:

Para mejores resultados deben tomarse las siguientes precauciones; tanto la acridina como el agua destilada que se utiliza para las diluciones debe ser filtrada con un filtro millipore de 0.22 cada vez que se utilizan.

Deben ser corridos "blancos" de la acridina y del agua destilada todos los días.

LITERATURA CITADA

- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. (1971). Standar Methods for the examination of Water and Wastewater 13th ed. Washington, D. C., 874 pp.
- Amlacher, E. (1964) Manual de Enfermedades de Peces. Edit. Acribias, España, pp 66-69, 71-77.
- Antipa, R. y Amend, D.F. (1977). Immunization of Pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins. J. Fish. Res. Board. Can. 34:203-208.
- Arrignon, J. (1984) Ecología y Piscicultura de Aguas Dulces. 2da. edición. Editorial Mundi-prensa. pp. 90, 148, 211-215.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. (1981) Microbial Ecology, fundaments and applications. Addison-Wesley Publishing, Co. Phillippines. 560 pp.
- Austin, B. (1983) Bacterial Microflora Associated with a coastal, Marine fish-rearing unit. J. Mar. Biol. Ass. 63:584-592.
- Barnes, R. K. y Mann, K. M. (1980) Fundaments of acuatic ecosystems. Edit. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña pp. 3
- Bauver, O. N. (1959) New curative methods in the control of fish diseases. Proc. count. on fish diseases, 19- 25.
- Bell, C. R., Holder-Franklin, M. A. y Franklin, M. (1982) Correlations between predominant heterotrophic bacteria and physicoquimical water quality parameters en two Canadian rivers. Appl. Env. Microbiol. 269-283.

- Bianchi, A. J. y Bianchi, N. (1971). La Numeration des populations bacteriennes du milieu marin. *Tethys*. 3: 687-704.
- Bootsma, R. y Clerx, J. P. (1976). Columnaris disease of culture carp *Cyprinus carpio* L. characterization of the causative agent. *Acuaculture*, 7: 371-384.
- Bollock, G.L. (1961). The identification and separation of *Aeromona liquafaciens* from *Pseudomonas fluorescens* and relative organism occurring in diseases fish. *Appl. Microbiol.* 587.
- Buchanan, R.E. y N.E. Gibbons (Eds.), (1974) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8th. ed. The wiliams and Wilkins Co., Baltimore, 1268 pp.
- Carpenter, P. L. (1979). *Microbiología*. 4A. ed. Interamericana México.
- Chakroff, M. (1983) *Piscicultura, cultivo de peces en estanques de agua dulce*. Edit. Concepto, S.A., México. pag. 7
- Cházari, E. (1884) *Piscicultura en agua dulce*. Ofic. Tip. de la Sría. de Fomento. México, pp.195.
- Colinvaux, P. (1973). *Introduction to Ecology*. Edith John wiley & Sons. Inc. New York. pag. 237.
- Colwell, R.R. (1962). The bacterial flora of Puget Sound fish. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 147-158
- Colwell, R. R., T. E.Lovelace, L. Wan, T. Kaneko, P. K. Chen and H. Tubiash (1973). *Vibrio parahaemolyticus* isolation, identification, dosification and ecology. *J. Milk food Technol* 36: 202-123.

- Collins, M.T., Gratzek, J.B. (1975). Nitrification in aquatic recirculating systems. *J. Fish. Res. Board. Can.* 32:2025-2031.
- Conroy, D.A. (1963) Studies on the application of Kariamycin on the control and treatment of some bacterial diseases of fish. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 182-192.
- Dirección General de Acuicultura (1981). Requerimientos sanitarios para una piscifactoría de Trucha. Serie de Cuaderno Sanidad Piscícola. No. 10, Direc. Gral. de Publicaciones pp 2-4.
- Dirección General de Acuicultura (1982) Acuicultura 2000, Memorias y perspectivas, Edit. Ricardo Direc. Gral. de Publicaciones. pp 2-4.
- Evelyn, T. P. y Ketchenson, J. P. (1980) Laboratory and field observations on Antivibriosis vaccines, in Fish Diseases 3th COPRAQ Session. Ed. W Ahre Ed. Springer-Verlag. N. Y. pp. 45-52.
- FIDEFA (1976).El Zarco. *Piscis Año 1 No. 3*
- Garassini. Luis A (1958). Microbiología. 1a, Edición. Organización del bienestar Estudiantil. Univ. Central de Venezuela. Ed. Sucre. pp. 70, 214-225.
- Gilmour, A., McCallum, M.F. and Allan, M.C. (1976).A study of the bacterial types occurring on the skin and the intestines of farmed plaice (*Pleuronectes platessa* L.) *Aquaculture*, 7: 161-172.
- Gilmour, A., McCallum, M.F. and Allan, M.C., (1976). The bacteriology of power station effluent used to farm marine Fish. *Aquaculture*, 7:357-362.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. y Jasper, S. (1977). Use nucleopore for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Env. Microbiol.*,33:1225-1228.

- Huet, Marcell (1972). Textbook of fish culture. Fishing News (books) LTD, England pp. 1-2, 364-367.
- Huet, Marcell (1973). Tratado de Piscicultura. 3a. Edicion Ed. Mundi Prensa pp. 1-2.
- Hockney, M. J. (1985). An investigation of skin rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. for antigen up take mechanisms following spray vaccination. *Fish Immunology*. 195-204.
- Huckey, G. J. y Conn, H. J. (1923). Methods of Gram staining. *Tech. Bull. N. Y. Sta. Agric. Exp. Sta.* 93.
- Hugh, R. y Leifson, E. (1953) The Taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bact.* 66:24-26
- Jones, J.G. y Simon B. (1975), An investigation of errors in direct count of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bacteriol.* 39:1-13.
- Lennette, E. (1980). Manual of clinical microbiology. Edit. American Society for microbiology, 3th ed. Washington, D.C.
- Mac Faddin Jean F. (1976). Biochemical Test for identification of medical bacteria. Baltimore Ed. Williams y Wilkins, 312 p.
- Murchelano, R.A., Brown C. y Bishop J. (1975). Quantitative and Qualitative studies of bacterial isolated from sea water in the laboratory culture of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board. Can.* 32:739-745.
- Orbe, M.A. y Cepeda, G. (1984). Guia Práctica para el cultivo de Trucha (*Salmo gairdneri*). Sría. de Pesca. México pp.5-9,31.

- Paterson, W. D., Desoutels, D. y Weber, J.M. (1981). The immune response of Atlantic salmon *Salmo salar* to the causative agent of bacterial kidney disease *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish. Diseases*. 4:99-100.
- Pearse, L., R.S.V. Pullin, D.A. Conroy and D. Mc.Gregor (1974). Observations on the use of furunace for the control of *Vibrio* diseases in marine flat fish. *Acuaculture* 3:295-302.
- Peréz Salmeron Luis A. (1985). Higiene y control de los productos de la Pesca. CECSA, México pp.13.
- Roald, S. O. (1977). Effects of sublethal concentration of lignosulfato on grow, intestinal flora and some digestive enzymes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Aquaculture* 12: 327-335.
- Roberts, R. J. (1981). Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 209-233.
- Roberts, R. J. y Sheperd (1975). A handbook of salmonid and trout diseases. London Fishing News. (Books LTD). In Skinner y Carr, ed. Microbiology in Agriculture fisheries and food. London Academic Press pp. 148-180.
- Russo, R., Smith, C, C. y Thurston, R. (1974). Acute toxicity of Nitrate to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *J. Fish. Res. Board. Can.* 31:1653-1655.
- Rosas Moreno M. (1976). Peces dulceacuícolas que se exportan en México. Inst. Nal. de Pesca, 1a. Edición Ed. 3er Mundo, México. pp. 15-16, 90.
- Rheinheimer, G. (1974). Aquatic Microbiology. Wiley and Sons Co. New York. pp. 80-82.

- Secretaría de Pesca (1982). Manual Técnico para el cultivo de trucha. Dir. Gral. de Acuicultura. Dir. Gral. de Planeación pp. 55-61
- Sevilla, M. L. (1981). Introducción a la Acuicultura. CECSA, México. pp. 9-20
- Skinner, F.A. y Carr, J.R. (1976) Microbiology in Agriculture Fisheries and food. London Academic Press. pp. 55-61
- Smith, C. E. y Williams W. (1974). Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and Chinook salmon. *Trans. Am Fish. Soc.* 103: 384-390.
- Snieszko, S.F. (1954). Therapy of bacterial fish diseases. *Trans. Am. Fish. Soc.* 83:313-330.
- Sugita, H., Ushioka, S., Kihara, D. y Deguchi, Y. (1985). Changes in the bacterial composition of water in a carp rearing tank. *Acuaculture* 44:243-247.
- Ward, P. D: (1982). The development of bacterial vaccines for fish in microbial diseases of fish in Roberts 1982 pp. 47-57.
- Weaton, F.W. (1982). *Acuicultura*. 1a. Ed. A.G.T. México, pp-412.
- Westin, D. T. (1974). Nitrate and Nitrite toxicity to salmonid fishes. *Prog. Fish. Cult.* 36:86-89.
- Young, M. (1979). A modified spread plate technique for the determinations of concentrations of viable heterotrophic bacteria, pp.40-51. In Litchfield, C.D. and P.L.Seyfried (Eds.) *Methodology por biomass determinations and Microbial Activities in sediments*. ASTM, SPT 673. American Society for testing and materials.