

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL PERIFITON DE RAICES DE
Eichhornia sp, *Pistia sp.* y *Azolla sp.*, EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE
LA UNIVERSIDAD EARTH**

José David Rojas Alvarado



CARTAGO, 2005

DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL PERIFITON DE RAICES DE *Eichhornia sp*, *Pistia sp.* y *Azolla sp.*, EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE LA UNIVERSIDAD EARTH

José David Rojas Alvarado*

RESUMEN

Los procesos naturales de depuración de aguas residuales mediante humedales artificiales han sido tema de estudio desde hace ya varios años, muchos autores señalan que el proceso de tratamiento del agua esta influenciado por procesos biológicos, condicionados por variables físicas y químicas, desarrollados por la fauna y flora, donde la acción de los microorganismos que habitan en las raíces de las plantas acuáticas es fundamental ya que ayudan de manera no simbiótica a la degradación de la materia orgánica.

Por estas razones en el presente estudio, el objetivo principal es caracterizar e identificar algunos de los diferentes grupos bacterianos asociados a las raíces de tres especies de plantas acuáticas (*Pistia sp*, *Eichhornia sp* y *Azolla sp*) que habitan en el humedal artificial de la Finca Pecuaría Integrada de la Universidad EARTH, esto mediante el uso de medios de cultivo diferenciales y con la ayuda de métodos bioquímicos para posibilitar la identificación.

El humedal artificial está compuesto por cuatro lagunas y de cada una de ellas se tomaron dos especies de plantas acuáticas, con excepción de la laguna cuatro donde solamente se tomó una especie. Una vez obtenidas las raíces se les cultivó para un recuento estándar aeróbico mesofílico heterótrofo y se determinó la cantidad de UFC/g, también se cultivó la muestra en medios diferenciales con el fin de seleccionar colonias diferentes y obtener cultivos puros para su posterior identificación.

Se determinó que no hay una tendencia de aumento o de disminución de UFC/g, reflejándose que todas las lagunas experimentan cambios en su composición constantemente. Entre los géneros bacterianos identificados se encuentran: *Acinetobacter sp*, *Aeromonas sp*, *Citrobacter sp*, *Chromobacterium sp*, *Enterobacter sp*, *Flavimonas sp*, *Klebsiella sp*, *Kluyvera sp*, *Pseudomonas sp*, *Morganella sp*, *Pantoea sp*, *Providencia sp*, *Serratia sp*, *Stenotrophomonas sp* y *Rahnella sp*.

Algunos de estos se les atribuye alguna relación con la depuración natural de las aguas residuales especialmente en procesos desnitrificantes y eliminación de fosfatos, mientras que para otros grupos su importancia radica en que pueden ser cepas causantes de algunas infecciones en animales y el ser humano.

Palabras clave: Humedal artificial, *Pistia sp*, *Azolla sp*, *Eichhornia sp*, raíces, bacterias, depuración.

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005

DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL PERIFITON DE RAICES DE *Eichhornia sp*, *Pistia sp*. y *Azolla sp.*, EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE LA UNIVERSIDAD EARTH

José David Rojas Alvarado*

ABSTRACT

The natural purification process of residual water has been a topic in study many years ago. Many authors have indicated that the process of water treatment is influenced by biological processes, conditioned by physical and chemical variables, developed by flora and fauna of wetlands, where the action on microorganisms that inhabit the roots of the aquatic plants is fundamental since they help in a non symbiotic manner to the degradation of organic material.

For these reasons, this study was conducted with the main objective of characterizing and identifying some of the different groups of bacteria associated with the roots of three aquatic plant species (*Pistia sp*, *Eichhornia sp* y *Azolla sp*) which inhabit the artificial wetland of the Integrated Cattle Farm of EARTH University, through the use of differential culture media and with the help of biochemical methods to facilitate the identification.

The artificial wetland is made up of four lagoons where two aquatic plant species was collected with the exception of the fourth lagoon where only one specie was collected. Once the roots were obtained, a mesofilic aerobic heterotrophy standard counting was done and the quantity of UFC/g was determined. Also, the samples were cultured in different media with the aim of selecting different bacterial colonies and to obtain pure cultures for its identification.

The results indicate no increase or decrease tendency of UFC/g. No data variations indicate that all the lagoons experience constant changes in their composition. Among the identified bacteria, the majority of the groups are: *Acinetobacter sp*, *Aeromonas sp*, *Citrobacter sp*, *Chromobacterium sp*, *Enterobacter sp*, *Flavimonas sp*, *Klebsiella sp*, *Kluyvera sp*, *Pseudomonas sp*, *Morganella sp*, *Pantoea sp*, *Providencia sp*, *Serratia sp*, *Stenotrophomonas sp* and *Rahnella sp*.

Most of these groups attribute a relationship with the natural purification of residual water specifically in the desnitrification processes and phosphate elimination while the other groups are important due to their being animal o human pathogens.

Key Words: Artificial wetland, *Pistia sp*, *Azolla sp*, *Eichhornia sp*, roots, bacteria and purification.

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL PERIFITON DE RAICES DE
Eichhornia sp, Pistia sp. y Azolla sp., EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE
LA UNIVERSIDAD EARTH**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Dr. Julio César Ramírez
Profesor Asesor- EARTH**

**Dra. Virginia Montero Campos
Asesora- ITCR**

**MSc. Maritza Guerrero Barrantes
Lectora-ITCR**

Dedicatoria

A Dios:

*Toda la felicidad y los logros que he recibido en
mi vida te los debo sin duda alguna a ti, Dios.
En los momentos difíciles me diste la serenidad
para afrontarlos.*

*A mis Padres, hermanos y sobrinos:
Por ser lo más valioso que tengo en
la vida.*

A Evelyn:

*Sé que desde el cielo me cuidas y
que siempre estás a mi lado.*

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Mi agradecimiento al MSc. Julio Tejada Ramírez y al MSc. Marlon Brevé por sus consejos y ayuda profesional brindada.

A la DraMQC. Virginia Montero Campos por su apoyo y guía en la realización del presente trabajo.

A la MSc. Maritza Guerrero Barrantes por su amistad, consejos brindados y por la colaboración en la revisión de este documento.

A Patricia Daniels y Dahiana Rodríguez por ser mi apoyo día a día y por brindarme muchos de los buenos momentos que he pasado en mi vida.

Al personal del Laboratorio de Ciencias Naturales de la Universidad EARTH por su valiosa colaboración durante mi estadía en la Institución.

Al personal del CEQIATEC, en especial a la Ing. María Porrás Acosta al Señor Carlos Ballesteros y a la Señora Lourdes Loaiza Leiva por su valiosa amistad y todo el apoyo brindado.

A todas las personas del ITCR y de EARTH que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

A todos mis amigos que son parte importante en mi vida, en especial a todos aquellos que siempre estuvieron a mi lado en los momentos más difíciles.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INDICE GENERAL	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVOS	6
3.1.Objetivo General	6
3.2.Objetivo Específico	6
4. REVISION LITERARIA	7
4.1. LOS ECOSISTEMAS DE HUMEDALES	7
4.1.1.Definición	7
4.1.1.1.Clasificación	7
4.1.2. Humedales artificiales	8
4.1.2.1.Definición	8
4.1.2.2.Tipos de Humedales artificiales	8
4.1.3. Importancia de los ecosistemas de humedales	9
4.1.4. Función de los humedales	9
4.1.5. Productos de importancia brindados por los humedales	13
4.2. EL PAPEL DE LAS PLANTAS ACUÁTICAS EN HUMEDALES	16
4.2.1. Plantas acuáticas	16
4.2.1.1.Definición	16
4.2.2.Dinámica de la vegetación en los humedales	16
4.2.3.Importancia de la vegetación acuática en humedales	17
4.2.4. Plantas acuáticas en estudio	17
4.2.4.1. <i>Eichhornia sp</i>	17
4.2.4.2. <i>Pistia sp</i>	18
4.2.4.3. <i>Azolla sp</i>	19
4.2.5. Raíces de plantas acuáticas	20
4.3. MICROBIOLOGIA DE AGUAS NATURALES	22
4.3.1.Los microorganismos en sus hábitats naturales	22
4.3.2.Estructura del ambiente acuático	22
4.3.3.Hábitats microbianos en el ambiente acuático	22

4.3.4. Microorganismos en columnas de agua dulce	22
4.3.4.1. Hábitat Neustónico	24
4.3.4.1.1. Diversidad microbiana en el Neuston	24
4.3.4.1.2. Géneros bacterianos característicos del neuston	24
4.3.4.2. Hábitat Planctónico	25
4.3.4.2.1. Diversidad microbiana en el Plancton	26
4.3.4.3. Hábitat Béntico	26
4.3.4.3.1. Diversidad microbiana en el ambiente bentónico	27
4.3.4.4. Perifiton	27
4.3.4.4.1. Definición	27
4.3.4.4.2. Microorganismos asociados al perifiton de las raíces de plantas acuáticas	27
4.3.4.4.3. Colonización superficial	28
4.3.5. Propiedades físicas y químicas del ambiente acuático	28
4.3.5.1. Luz	29
4.3.5.2. Temperatura	29
4.3.5.3. Enturbamiento	30
4.3.5.3.1. Materiales detríticos y la flora microbiana	30
4.3.5.4. Concentración de iones hidrónio y potencial redox	31
4.3.5.5. Sustancias inorgánicas	31
4.3.5.6. Sustancias orgánicas	32
4.3.5.7. Gases disueltos	32
4.4. FUNCION DEPURADORA DE HUMEDALES	33
4.4.1. Descomposición de materia orgánica	33
4.4.2. Capacidad depuradora de humedales	34
4.4.2.1. Entrada de materia orgánica en los humedales	34
4.4.2.2. Descomposición de materia orgánica en ambientes acuáticos	35
4.4.3. Papel de las plantas acuáticas en la autodepuración de las aguas	35
4.4.4. Papel de los microorganismos en la autodepuración de las aguas	35
4.4.4.1. El papel bacteriano en la autodepuración	36
4.4.4.2. Metabolismo bacteriano	39
4.4.5. Importancia de la depuración de aguas provenientes de actividades pecuarias	41
4.4.6. Desventajas del uso de humedales como depuradores de aguas	42
4.5. METODOS DE ECOLOGIA MICROBIANA	43
4.5.1. Cultivo de microorganismos	43
4.5.1.1. Crecimiento microbiano en medio sólido	43
4.5.1.2. Medios de cultivo	44

4.5.1.2.1. Agar MacConkey	44
4.5.1.2.2. Base Agar Cetrimida	44
4.5.1.2.3. Agar Baird Parker	45
4.5.2. Métodos de aislamiento	45
4.5.2.1. Contaje de viables	45
4.5.2.1.1. Siembra en superficie	46
4.5.2.1.2. Método de vertido	46
4.5.3. Diluciones seriadas	46
4.5.4. Errores en el contaje de placa	47
4.5.5. Técnicas de cultivo puro	47
4.6. Identificación de microorganismos	48
4.6.1. API®	48
4.6.1.1. API 20E	48
4.6.1.1.1. Fundamento	48
5. METODOLOGIA	49
5.1. Descripción del sitio	49
5.2. Descripción del humedal de la Finca Pecuaria Integrada	49
5.3. Lugar de muestreo	53
5.4. Muestra de plantas acuáticas	55
5.5. Análisis microbiológicos	57
5.5.1. Preparación de medios de cultivo.	57
5.5.2. Preparación de la muestra	57
5.5.3. Recuento bacteriano aeróbico mesofílico heterótrofo	58
5.5.4. Aislamiento en medios diferenciales	58
5.5.5. Técnica de cultivo puro	58
5.6. Identificación bacteriana	59
5.6.1. Identificación de colonias crecidas en Agar Baird Parker	58
5.6.2. Identificación de las colonias aisladas en medio de cultivo Agar MacConkey y Cetrimida.	59
5.7. Uso del sistema de identificación API 20 E	59
5.7.1. Preparación de la galería	59
5.7.2. Preparación del inóculo	60
5.7.3. Inoculación de la galería	60
5.7.4. Lectura e interpretación de la galería	61
6. RESULTADOS	63
7. DISCUSION	74
8. CONCLUSIONES	86
9. RECOMENDACIONES	88
10. LITERATURA CITADA	90
11. ANEXOS	97

LISTA DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Hábitats microbianos en ambientes acuáticos	23
2	Grupos bacterianos que intervienen en el tratamiento de aguas en ecosistemas de humedales.	38
3	Especies de plantas acuáticas tomadas de las diferentes lagunas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.	55
4	Pruebas y resultados al aplicar un inóculo bacteriano a una galería del API 20 E	61
5	Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el primer muestreo.	63
6	Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el segundo muestreo.	64
7	Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el tercer muestreo.	65
8	Unidades formadoras de colonia (UFC) encontradas en las raíces de las distintas plantas para los diferentes muestreos.	66
9	Presencia de <i>Staphylococcus sp</i> en la superficie de las raíces de las diferentes plantas acuáticas para los diferentes muestreos.	68
10	Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 1 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en los diferentes muestreos	69

11	Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 2 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en los diferentes muestreos.	70
12	Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 3 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en los diferentes muestreos.	71
13	Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 4 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en los diferentes muestreos.	72
14	Total de especies bacterianas identificadas en el presente estudio.	73

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Principales funciones de los ecosistemas de Humedales	10
2	Principales productos brindados por los humedales	13
3	<i>Eichhornia sp</i> presente en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH	18
4	<i>Pistia sp</i> presente en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.	19
5	<i>Azolla sp</i> presente en la laguna 3 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.	20
6	Sistemas radiculares de <i>Pistia sp</i> ; <i>Eichhornia sp</i> y <i>Azolla sp</i> .	21
7	Géneros bacterianos característicos del Neuston	25
8	Abundancia relativa de hongos y bacterias según avanza el proceso de descomposición y el tamaño de partícula de materia orgánica disminuye	37
9	Localización del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en el campus de la Universidad EARTH	51
10	Descripción del Sistema de Descontaminación Productiva del Humedal de la Finca Pecuaria Integrada	52
11	Lagunas que conforman el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH	53
12	Metodología a seguir en el presente estudio	54
13	Distribución de las plantas acuáticas en estudio, en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada	56
14	Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en las raíces de las plantas acuáticas de las diferentes lagunas	67
15	Fotografía de las colonias encontradas en el medio Baird Paker en 1- <i>Pistia sp</i> y 2- <i>Eichhornia sp</i> para el segundo muestreo	68

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el primer muestreo	97
2	Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el segundo muestreo	98
3	Coloración rojiza presentado por <i>Eichhornia</i> sp y <i>Azolla</i> sp en la laguna 2 y 3 respectivamente, para el segundo muestreo.	99
4	Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el tercer muestreo	100
5	Características de las bacterias identificadas en los diferentes muestreos para el presente estudio	101
6	Fotografías de las bacterias identificadas en los diferentes muestreos para el presente estudio	105
7	Código de identificación (biotipos) proporcionado por el sistema API [®] 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el primer muestreo	110
8	Código de identificación (biotipos) proporcionado por el sistema API [®] 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el segundo muestreo	112
9	Código de identificación proporcionado por el sistema API [®] 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el tercer muestreo	114
10	Características generales del género <i>Acinetobacter</i>	116
11	Características generales del género <i>Aeromonas</i>	116
12	Características generales del género <i>Chryseomonas</i>	117
13	Características generales del género <i>Chromobacterium</i>	117
14	Características generales del género <i>Citrobacter</i>	118

15	Características generales del género <i>Enterobacter</i>	118
16	Características generales del género <i>Klebsiella</i>	119
17	Características generales del género <i>Kluyvera</i>	119
18	Características generales del género <i>Leclercia</i>	120
19	Características generales del género <i>Morganella</i>	120
20	Características generales del género <i>Pantoea</i>	121
21	Características generales del género <i>Providencia</i>	121
22	Características generales del género <i>Pseudomonas</i>	122
23	Características generales del género <i>Rahnella</i>	122
24	Características generales del género <i>Serratia</i>	123
25	Características generales del género <i>Staphylococcus</i>	123
26	Características generales del género <i>Stenotrophomonas</i>	123
27	Componentes del medio de cultivo del Agar Baird Parker	124
28	Componentes del medio de cultivo del Agar MacConkey	124
29	Componentes del medio de cultivo del Agar Nutritivo	125

1. INTRODUCCIÓN

El agua es clave para la vida humana y para el equilibrio ecológico de nuestro planeta (Pérez *et al*; 2000). Sin embargo, en la actualidad su viabilidad se ha visto amenazada debido al consumo excesivo de agua dulce (Pérez *et al*; 2000). La expansión económica y el crecimiento demográfico, acompañados de los estilos de vida de alto consumo han llevado al empleo cada vez mayor de agua y sumado que las actividades agrícolas, industriales y domésticas, generan desechos orgánicos e inorgánicos que comúnmente son descargados a ríos, vertientes o cuerpos de agua sin previo tratamiento afectando directamente su calidad (Gutiérrez y Garcés, 2002).

Con el fin de solucionar estos problemas de contaminación recientemente se ha incrementado el interés en utilizar tecnologías alternativas e innovadoras que proporcionen el tratamiento de las aguas con bajos costos de mantenimiento y de operación (Ulate, 2002). Un ejemplo de estos sistemas son los humedales, que son “Extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros” (Ramsar, 1971).

Los humedales constituyen uno de los ecosistemas más productivos y de mayor valor, que proporcionan al conjunto de la sociedad bienes y servicios, que tradicionalmente no han sido tomados en cuenta (Dugan, 1992). Durante muchos años han sido considerados como zonas insalubres e improductivas, con gran potencialidad para el cultivo y en muchas ocasiones, localizados en áreas de gran interés paisajístico por lo tanto, tienen importancia urbanística y turística (Dugan, 1992).

Dentro de la clasificación de estos ecosistemas se incluyen los humedales artificiales, que es una nueva tecnología diseñada por el hombre que tiene

como papel principal imitar los procesos que ocurren en humedales naturales (Ansola y De Luis, 1994).

Entre los procesos que han cobrado importancia son los que se refieren a los procesos naturales de tratamiento de aguas residuales (Rodríguez, 1995). El uso de humedales artificiales como depuradores naturales de aguas residuales está siendo investigado en los últimos años, desde diferentes puntos de vista; tanto sus componentes bióticos (macrófitos y microorganismos) y abióticos (sedimentación) (Pérez *et al*; 2000).

Tal es el caso de la Universidad EARTH, esta institución cuenta con diversos humedales tanto naturales como artificiales para el tratamiento de diferentes aguas de desecho, como son las provenientes de su Finca Pecuaria Integrada, las cuales son aguas principalmente producidas del lavado del área de ordeño y de corrales de una lechería y una porqueriza respectivamente (Ruiz, 2000). Desde que se estableció este sistema en el año 1999, los estudios sobre el proceso de descontaminación han sido constantes, en los dos últimos años han surgido diferentes proyectos que consisten en la caracterización de los diferentes componentes de estos ecosistemas tales como los componentes físicos (relieve y topografía) y en especial todos aquellos que se refieren a los factores relacionados con el agua (componentes químicos y biológicos) (Gutiérrez y Garcés, 2002).

Goavere (1994), señala que el conocimiento sobre todos éstos factores pueden ayudar a entender los diferentes procesos tan complejos que acontecen en estos ecosistemas, tal es el caso de los procesos naturales de depuración de aguas, donde el componente biológico (plantas acuáticas y los microorganismos asociadas a ellas) tienen un papel fundamental.

Se dice que las plantas acuáticas tienen un papel de suma relevancia ya que la utilización de éste tipo de macrófitas en humedales se caracterizan por extraer diversos compuestos del agua, tales como el nitrógeno, el fósforo y los metales pesados que son comunes contaminantes en las actividades agrícolas (Rosales, 2002 y Goavere, 1994). Además estas plantas

posteriormente pueden ser utilizadas como alimentos para distintos animales (Espinoza y Gutiérrez, 2002). Otro aspecto importante es que estas mismas plantas pueden servir de superficie (en especial sus raíces) para la colonización por parte de diversos grupos bacterianos (Rheinheimer, 1987). Las bacterias utilizan las plantas simplemente como substratos o se alimentan de sus productos metabólicos y principios nutritivos parcial o totalmente como comensales (Grant y Long, 1989). Ellas hacen uso de estas asociaciones mientras realizan sus funciones como por ejemplo la degradación tanto de los compuestos orgánicos presentes en forma sólida como los disueltos en el ambiente acuático (Rheinheimer, 1987).

Una forma de entender la dinámica que se cumple entre ambas partes, es identificando los diferentes grupos bacterianos que crecen en la superficie (perifiton) de las raíces de las plantas acuáticas, ya que el sistema radicular puede servir como una zona de colonización por muchos grupos bacterianos para formar agrupaciones mas o menos densas con el fin de llevar a cabo las funciones depurativas (Rheinheimer, 1987).

Una forma de identificación de estos grupos bacterianos, es con el uso de métodos de ecología microbiana, mediante el cultivo y aislamiento individual de cada grupo bacteriano (Atlas y Bartha, 2002). Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en el ambiente son cultivables (microorganismos no cultivables o poco viables) (Maier *et al*; 2000). Esto es debido a dificultades intrínsecas en el cultivo, al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo, y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir (Maier *et al*; 2000).

Al utilizar los métodos de ecología microbiana se puede llegar a entender las relaciones de los microorganismos con sus ambientes biótico y abiótico (Atlas y Bartha, 2002). La actual popularidad y rápido desarrollo de esta disciplina científica reflejan el interés público por el reconocimiento científico del papel de los microorganismos en los ecosistemas (Atlas y Bartha, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

El sector pecuario juega un papel muy importante en la economía de los países en vía de desarrollo, en Costa Rica el número de las aves, cerdos y ganado vacuno ha ido incrementándose desde el año de 1990, sin embargo, el problema que se ha generado, es que las excretas de estos animales son vertidas directamente a los cuerpos naturales de agua, provocando serios efectos ambientales (Nimukunda *et al*; 2004). Por esta razón es que en los últimos años, se ha buscado formas factibles para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de las actividades pecuarias antes de ser vertidos a los mantos acuíferos (Nimukunda *et al*; 2004).

En muchos países se han utilizado las plantas de tratamiento de aguas residuales como una opción eficiente para el tratamiento de toda ésta clase de desechos líquidos, el problema que se ha presentado con este tipo de tratamientos, es que son procesos costosos y requieren gran cantidad de equipo, además es una tecnología no disponible para todas las personas (Rodríguez, 1995). En casos como Costa Rica, se han buscado tecnologías naturales que sean accesibles para muchos, con el fin de darle tratamiento a las aguas de desecho, en especial las provenientes del sector pecuario (Goavere, 1994).

Los humedales artificiales pueden ser una opción tecnológica natural, económicamente rentable como sustituto de las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde la acción tanto de las plantas acuáticas como los microorganismos asociados a sus raíces cumplen una función trascendental (Jaqueja, 2004, Atlas y Bartha, 2002)

De aquí es donde surge la importancia de caracterizar e identificar algunos de los grupos principales de microorganismos que habitan en estos ambientes, ya que según muchos autores el proceso de tratamiento del agua esta influenciado por procesos biológicos, condicionados por variables físicas y químicas, desarrollados por la flora y fauna del humedal, donde la acción

de los microorganismos que habitan en las raíces de las plantas acuáticas y en los suelos del humedal, es fundamental (Atlas y Bartha, 2002). Ellos toman la materia orgánica presente en las aguas de desecho y la transforman a nutrientes que pasan a formar parte de la comunidad acuática (Álvarez, 2005).

De los humedales utilizados en la universidad EARTH para el tratamiento de las aguas residuales, esta propuesta de investigación se enfoca en la identificación de algunos grupos bacterianos que se encuentran en las superficies de las raíces de tres plantas acuáticas (*Eichhornia sp*, *Pistia sp*, *Azolla sp*) que habitan el humedal artificial empleado para depurar las aguas residuales originadas de las actividades de la Finca Pecuaria Integrada, que consisten mayoritariamente en aguas de ordeño y de lavado de una lechería y de una porqueriza.

A pesar de la existencia de varias especies más de plantas acuáticas en este humedal tales como *Ipomoea aquatica* y *Salvinia minima*, se escogieron las tres primeras especies antes mencionadas ya que como lo recalca Rodríguez (2000), estas plantas tienen funciones relevantes tales como servir de filtros biológicos removiendo sustancias tanto biodegradables como no biodegradables, nutrientes, sustancias tóxicas y microorganismos patógenos. Además para la escogencia de estas plantas se tomó en cuenta las mayores densidades de población dentro del humedal artificial y también las características propias de sus respectivas raíces (longitud).

Al describir la dinámica que se cumple entre las raíces de las plantas acuáticas y algunas de las bacterias asociadas a ellas, se puede entender un poco más las actividades que cumplen diversos grupos bacterianos en la degradación de diversas sustancias.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar algunos de los diferentes grupos bacterianos asociados a las raíces de tres especies de plantas acuáticas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un recuento estándar aeróbio mesofílico heterótrofo.
- Aislar las bacterias por medio de su cultivo en medios diferenciales.
- Identificar los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas de API 20 E.
- Describir morfológicamente las bacterias identificadas.

4. REVISIÓN LITERARIA

4.1. LOS ECOSISTEMAS DE HUMEDALES

4.1.1. Definición

El término “humedales” se refiere a una amplia gama de hábitats interiores, costeros y marinos que comparten ciertas características (Dugan, 1992). Existen muchas definiciones diferentes en relación con los humedales en este momento, una de las más utilizadas es la de la Convención Ramsar o Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional, que define humedales como: “Extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros” (Ramsar, 1971).

4.1.1.1. Clasificación

Dependiendo de sus características biológicas y físicas, la Convención Ramsar ha agrupado los humedales en varias categorías entre ellas, 30 corresponden a humedales naturales y 9 a humedales artificiales (Dugan, 1992).

Debido a la complejidad y a la diversidad de características de los humedales, Dugan (2002), menciona que se ha establecido una clasificación más sencilla de siete unidades paisajísticas que corresponden a humedales o donde los humedales son un componente importante. Estas unidades son: estuarios, costas abiertas, llanuras de inundación, pantanos de agua dulce, lagos, turberas y bosques de inundación.

4.1.2. Humedales artificiales

4.1.2.1. Definición

Los humedales artificiales son una tecnología creada como consecuencia de la influencia humana directa, diseñada para imitar los procesos que ocurren en los humedales naturales, donde se utilizan plantas y suelos nativos y sus microorganismos asociados, para mejorar la calidad del agua y proveer un mejoramiento ambiental (Ansola y De Luis, 1994).

Los humedales artificiales tienen la ventaja de comportarse como naturales y además se pueden controlar aspectos hidráulicos y biológicos tales como el flujo de agua y la vegetación a utilizar. El mayor costo para esta clase de humedales está asociado con el bombeo (si lo hay, con la transmisión y la distribución del agua al sitio, pequeños trabajos de terraplenado y el costo propio de la tierra (Rodríguez, 1995).

Además un humedal artificial puede requerir la instalación de una capa o membrana protectora que limite la precolación a las aguas subterráneas (Rodríguez, 1995).

Existen dos tipos de humedales artificiales:

4.1.2.2. Tipos de Humedales artificiales

- **Sistema de agua libre superficial**

Este sistema consiste en estanques o canales con algún tipo de barrera superficial que impida la filtración, además de suelo u otro medio que soporte la vegetación emergente y al agua con poca profundidad fluyendo a baja velocidad. En este tipo de humedales la poca profundidad de las aguas, su baja velocidad y la presencia de la base y tallos de las plantas acuáticas regulan el flujo de agua (Rodríguez, 1995).

- **Sistema de flujo subsuperficial**

Este sistema es esencialmente un filtro horizontal que cuenta además, con el componente de plantas emergentes con extensivo sistema de raíces dentro del medio. El medio que sirve como filtro es por lo general grava, pero también se ha utilizado los suelos naturales, en este tipo de humedales

artificiales la porosidad del medio filtrante tiene una relación directa con la degradación microbiana (Rodríguez, 1995).

Ambos sistemas son creados para mantener las funciones naturales de un humedal, además mantienen la importancia que tienen los humedales en los ecosistemas ecológicos.

4.1.3. Importancia de los ecosistemas de humedales

Desde épocas muy antiguas, los humedales han sido de gran importancia para el desarrollo de los pueblos. Dugan (2002) y Tabilo (1997), mencionan que humedales que alimentaron a las grandes civilizaciones de Mesopotamia y Egipto y aquellos de los valles del Níger, el Indo y el Mekong, siguen siendo esenciales para la salud, el bienestar, y la seguridad de los pueblos que viven en sus cercanías.

Desde hace varios años atrás, los humedales fueron considerados por una parte de la sociedad como ecosistemas improductivos e insalubres (Dugan, 1992 y Aguilar, 1996). Sin embargo, estos ecosistemas desempeñan una amplia variedad de funciones, de mucho valor.

Ahora los humedales se cuentan entre los ecosistemas más productivos del planeta y brindan importantes beneficios económicos y sociales, ya que el agua es el componente fundamental de los humedales (Cappato y Peteán, 2002). Estos sistemas cumplen un papel insustituible en la provisión de agua dulce, por ello son llamados los “riñones del planeta” (Cappato y Peteán, 2002).

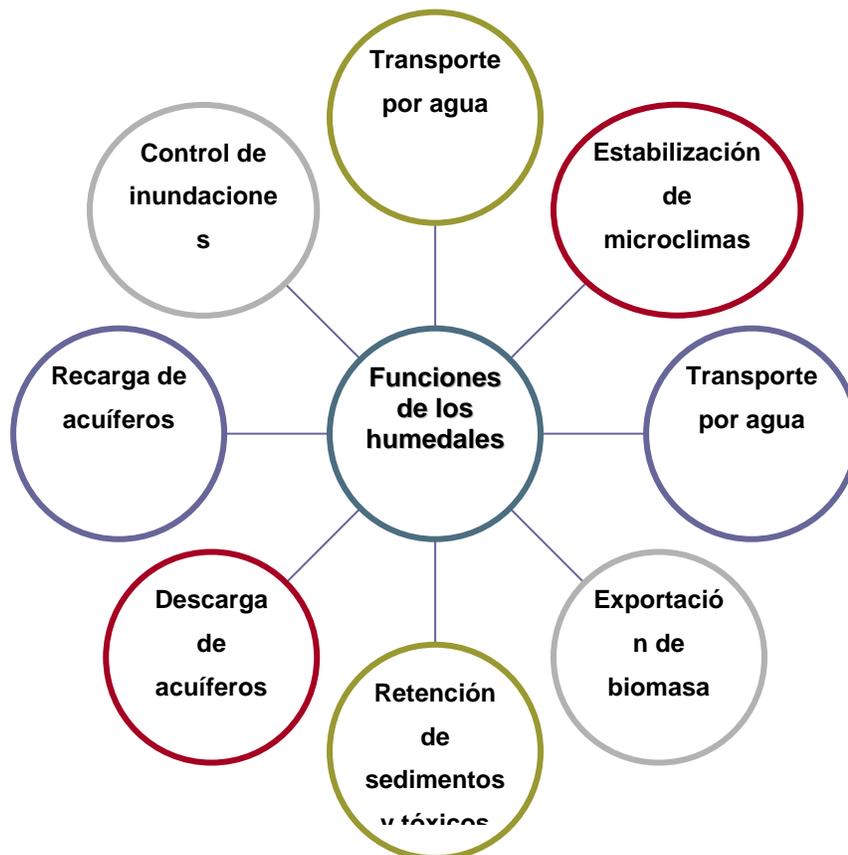
Diversas actividades humanas requieren de los recursos naturales provistos por los humedales y dependen por lo tanto del mantenimiento de sus condiciones ecológicas (Dugan, 1992; Barbier *et al*; 1991).

4.1.4. Función de los humedales

Los humedales están formados por una serie de componentes físicos, biológicos, y químicos tales como suelo, agua, especies animales vegetales, microorganismos y nutrientes (Convención de Humedales, 2000). Los procesos entre estos componentes y dentro de cada uno de ellos permiten

que los humedales desempeñen ciertas funciones (Dugan, 1992). Este mismo autor, menciona que la interacción entre las características físicas, químicas y biológicas del humedal, determina si un humedal cumple cierta función, genera productos específicos o posee ciertos atributos. Los humedales son ecosistemas muy productivos, pero sus diferencias y complejidad hacen muy difícil la generalización sobre sus funciones (Smith y Smith, 2001).

Se han identificado muchas de las funciones que son características de los humedales, pero como menciona Dugan (1992), no todas las características que se establezcan, están presentes en todos los tipos de humedales, ni todas las funciones se desempeñan de la misma manera en cada humedal. Como se menciona en la siguiente figura, para el presente estudio, las funciones más sobresalientes de los humedales de agua dulce son:



(Dugan, 1992)

Figura 1. Principales funciones de los ecosistemas de Humedales.

A continuación se detalla las múltiples funciones que pueden desempeñar los humedales:

- **Recarga de acuíferos**

Esto se cumple cuando el agua desciende desde el humedal hacia los acuíferos subterráneos, de ésta forma el agua llega más limpia al acuífero, que desde cuando empezó a filtrarse desde el humedal. En estos acuíferos, el agua ya puede ser extraída para el consumo humano (Dugan, 1992).

- **Descarga de acuíferos**

Esta función se cumple cuando el agua que ha sido almacenada bajo tierra asciende a un humedal y se transforma en agua superficial (Dugan, 1992).

- **Control de inundaciones**

Los humedales pueden disminuir la embestida destructiva de las crecidas de los ríos y evita la costosa producción de presas y embalses (Dugan, 1992).

- **Retención de sedimentos y sustancias tóxicas**

El sedimento es a menudo el mayor agente contaminador de agua en muchos ecosistemas hidrográficos. Los humedales pueden servir como pozos de depósito de sedimentos, ya que al disminuir el caudal, la tasa de asentamiento de los sedimentos aumenta, esto permite que las sustancias tóxicas se adhieran a las partículas de sedimento (Dugan, 1992). Los nutrientes van asociados a menudo a sedimentos y pueden depositarse al mismo tiempo, estos nutrientes sobre todo nitrógeno y fósforo de fuentes agropecuarias, pero también de desechos humanos y descargas industriales, se pueden acumular en el subsuelo, pueden ser transformados por procesos químicos y biológicos o ser absorbidos por la vegetación de humedal, que luego puede ser recogida y eliminada eficazmente del sistema (Convención de humedales, 2000).

Pero cabe recalcar que la acumulación de demasiado sedimento, puede alterar las funciones biológicas y otras variantes características de los humedales (Dugan, 1992).

- **Exportación de biomasa**

Estos ecosistemas sostienen la vida de densas poblaciones de peces, ganado o vida silvestre, que se alimentan de sus aguas ricas en nutrientes (Dugan, 1992 y Convención de Humedales, 2000).

- **Estabilización de microclimas**

Los ciclos hidrológicos, de nutrientes, de materia y los flujos de energía de los humedales, pueden estabilizar las condiciones climáticas locales, en particular las precipitaciones y las temperaturas (Dugan, 1992).

- **Transporte por agua**

Los humedales pueden servir como medio para el transporte de bienes y de pasajeros, y pueden ser usados como un medio alternativo de transporte (Dugan, 1992).

- **Recreación y turismo**

La recreación y el turismo, incluye la caza deportiva, la pesca, la observación de aves, la fotografía de la naturaleza, la natación y navegación en valeros (Dugan, 1992).

4.1.5. Productos de importancia brindados por los humedales

Según Dugan (1992), entre los productos de mayor importancia obtenidos a partir de ecosistemas de humedales son los siguientes (Figura 2).



Figura 2. Principales productos brindados por los humedales.

A continuación se detallan los diferentes productos que se pueden obtener de los humedales

- **Recursos forestales**

Los recursos forestales de muchos humedales generan una gran cantidad de bienes que van desde leña, madera para la construcción, corteza, resinas y

medicinas, estos dos últimos son productos forestales “secundarios no maderables”.

- **Recurso de vida silvestre**

Muchos de estos ambientes son ricos en vida silvestre, esto permite un recurso recreacional importante y productos comerciales que van desde carne y pieles, hasta huevos de aves. Smith y Smith, (2001) recalcan que los humedales son de vital importancia como zonas de nidificación e invernada para mucha fauna silvestre, muchas de ellas amenazadas por el hombre.

- **Pesquería**

Muchos de los humedales proporcionan hábitats ricos en nutrientes que los peces utilizan como áreas de desove y hábitat para peces adultos.

- **Recursos forrajeros**

El material vegetal que contienen los humedales, puede ser recolectado y puede utilizarse como forraje o puede utilizarse para el alimento de ganado.

- **Abastecimiento de agua**

Los humedales pueden usarse como fuente de agua para el consumo humano directo, para la agricultura, para la cría de animales y abastecimiento industrial.

Calidad del agua en humedales

Los sistemas de agua dulce, particularmente los humedales, cumplen un papel esencial en lo que se refiere a mantener la calidad del agua eliminando los contaminantes y ayudando a desintegrar y dispersar los desperdicios orgánicos. Sin embargo, la capacidad de filtración de los humedales y otros hábitats es limitada y puede verse superada por el exceso de desperdicios humanos, escorrentía agrícola y contaminantes industriales. En realidad la calidad del agua degenera diariamente por la acción de un amplio conjunto de contaminantes como aguas residuales, desperdicios provenientes de la producción de alimentos, fertilizantes, metales pesados, microbios patógenos, disolventes industriales, compuestos tóxicos como el petróleo y los plaguicidas, sales provenientes del riego, lluvia ácida y sedimentos.

Otra causa importante del aumento de la contaminación en las fuentes de agua dulce ha sido el uso cada vez mayor de estiércol y fertilizantes manufacturados (fuentes importantes de nutrientes como nitratos y fósforos), especialmente cerca de los grandes centros urbanos y zonas de agricultura intensiva. Las concentraciones de fósforo y nitrato son bajas en los sistemas naturales pero aumentan con la escorrentía proveniente de los agroecosistemas y de los efluentes industriales.

4.2.EL PAPEL DE LAS PLANTAS ACUÁTICAS EN HUMEDALES

4.2.1.Plantas acuáticas

4.2.1.1. Definición

Las plantas acuáticas también conocidas como hidrófilas, son aquellas plantas que su ciclo vital, en especial el reproductivo, lo realizan en ambientes acuáticos. En su composición es predominante la cantidad de agua, por ello su contenido de materia seca está entre el 5 % y el 15% a diferencia de las plantas terrestres que tienen de un 10% a un 30% de materia seca (Chará, 1994).

Las plantas acuáticas tienen en común su estructura herbácea. Las que se encuentran sumergidas o son flotantes no desarrollan cutícula en las superficies en contacto con el agua, para poder tomar de ella directamente los gases y los minerales que necesitan para vivir, y tampoco tienen tejidos mecánicos porque su capacidad de flotación las mantiene erguidas. Suelen tener tallos huecos, para poder transportar el aire hasta las raíces (Gerritsen y Greening. 1989).

Los hidrófitos están adaptados a crecer en agua o en suelos que son periódicamente anaerobios, a causa del exceso de agua (Smith y Smith, 2001).

Según Crow (2002), las plantas acuáticas pueden clasificarse como emergentes, flotantes y subemergentes, las emergentes son las que desarrollan las raíces debajo del espejo de agua, mientras su masa foliar sobresale en la superficie. Las flotantes se encuentran en la superficie de agua y sus raíces están suspendidas en el agua y las plantas subemergentes son las que crecen por debajo de la superficie de agua.

4.2.2.Dinámica de la vegetación en los humedales

En humedales de agua dulce, el régimen hídrico, incluyendo la profundidad y fluctuaciones de la lámina de agua, se considera el factor ecológico más importante que controlan (algunas veces en patrones complejos a corto y a largo plazo), los cambios en la distribución y composición de especies,

productividad y dinámica de nutrientes de las comunidades de plantas (Gerritsen y Greening, 1989).

4.2.3.Importancia de la vegetación acuática en humedales

Las plantas acuáticas cumplen un rol ecológico de vasta significancia al presentarse como productores primarios en las tramas tróficas, brindando alimentación no sólo a organismos herbívoros, sino que también omnívoros e insectívoros, debido al albergue que insectos encuentran en ellas además no sólo contribuyen de manera importante a la productividad de los humedales, sino que también proporcionan hábitat para muchas especies de plantas y animales, nidificación y/o refugio de fauna acuática, en especial para la avifauna (Jaqueja, 2004).

La flora puede ser un buen elemento para corroborar el grado de perturbación antrópica y la contaminación de un cuerpo de agua, en especial la flora de macrófitos, dado que constituye un grupo biológicamente interesante por su alto grado de especialización y por el uso potencial que ésta tiene, ya sea como alimento o depuración de aguas (Jaqueja, 2004).

4.2.4.Flora acuática en estudio

4.2.4.1.Eichhornia sp

Eichhornia es una planta flotante anual que pertenece a la familia Pontederiaceae (Crow, 2002). Alcanza una altura de 15 cm, las flores son de color violeta (Figura 3) y florece en enero y abril (Crow, 2002). Esta planta produce entre 100.000 a 120.000 Kg de materia fresca por hectárea por año. Bajo condiciones ideales cada planta puede producir hasta 248 brotes en 90 días (Nimukunda *et al*; 2004).Este prolífico potencial de crecimiento es sin duda lo que hace posible su extraordinaria capacidad de depuración (Rodríguez, 1984). En Costa Rica tiene una distribución desde la Vertiente Atlántica norte hasta la vertiente del Pacífico y es característico que crezca en lagunas, márgenes pantanosos de canales y cauces de aguas tranquilas

(Crow, 2002). Chambers y Oshant (2004) mencionan que esta especie no soporta los ambientes salinos.

En muchos lugares esta especie se ha constituido en un serio problema ambiental y económico debido a su rápida diseminación y abundante biomasa (Camacho, 1981). Estas características afectan notablemente la calidad del agua por el aporte de materia orgánica en descomposición y la consiguiente disminución del oxígeno disuelto en el agua, obstruye parcial o totalmente las tomas de agua, además, disminuye su valor estético y recreativo (Rosales, 2002).



Figura 3. *Eichhornia sp* presente en el humedal de la Finca Pecuaría Integrada de la Universidad EARTH.

4.2.4.2. *Pistia sp*

El género *Pistia* corresponde a las plantas acuáticas conocidas como lechugas de agua (Figura 4) son plantas flotantes con muchas raíces fibrosas, forma una roseta de hojas pubescentes y produce libremente estolones horizontales (Crow, 2002).

Su hábitat es de lagunas, pantanos, canales y arrozales y algunas veces se cultivan en jardines acuáticos, fuentes y estanques artificiales (Crow, 2002).

A pesar de que las coberturas naturales de *Pistia sp* sirven de protección a las larvas de animales, como por ejemplo los peces, e indirectamente como alimento debido al perifiton que se adhiere en sus raíces, su excesiva

cobertura causada por la alteración de su ambiente crean problemas ecológicos negativos entre los que se destacan: eutrofización, sedimentación y proliferación de insectos dañinos a la salud. Sin embargo, la biomasa de esta cobertura puede ser usada en la producción de forraje, biogas y para el tratamiento de aguas residuales (Rodríguez *et al*; 2000).



Figura 4. *Pistia sp* presente en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.

4.2.4.3. *Azolla sp*

El género *Azolla* corresponde a los helechos de agua diminutivos que flotan libremente en la superficie del agua, este género se halla diseminado por todas las regiones tropicales y subtropicales y puede crecer en lagunas, pantanos, marismas, aguas estancadas, charcas y cauces de agua lenta (Crow, 2002).

La *Azolla* es una planta de 1-2cm de largo que consiste en un tallo corto ramificado (Figura 5), que posee raíces delgadas sin ramificaciones que cuelgan hacia abajo en el agua (Crow, 2002). Estas raíces penetran el agua partiendo de los nudos de las ramas a lo largo del rizoma (Umaña, 1989). Cada hoja es bilobulada, el lóbulo superior tiene clorofila verde, mientras que el lóbulo inferior es incoloro, bajo ciertas condiciones también existe un pigmento de antocianina, que les confiere un color rojizo (Anexo 3) (Lancar y Krake, 2002). La coloración mencionada está relacionada, con la

contaminación en el sistema acuático o también un exceso de luz solar, *Azolla* prefiere más un lugar sombreado que la luz directa (Lancar y Krake, 2002). El crecimiento de esta especie se ve favorecido a un 50% de máximo de luz (49 klux) (Viquez, 1990).



Figura 5. *Azolla sp* presente en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.

Este helecho acuático, tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico gracias a la simbiosis que tiene con la cianobacteria *Anabaena azollae*, que vive en las cavidades de las frondas del helecho, además es capaz de usar su propia energía fotosintética, para fijar el nitrógeno atmosférico y producir amonio, lo que es aprovechado por la planta para sus propios requerimientos de nitrógeno, por lo que la planta al tener relativamente niveles altos de nitrógeno, ha sido una opción rentable como una fuente proteínica para alimento animal y como biofertilizante (Espinoza y Gutiérrez, 2002).

4.2.5. Raíces de plantas acuáticas

En las plantas acuáticas las raíces pueden estar ausentes. Si están presentes no son muy numerosas, sin embargo su función es similar a las de las plantas terrestres. Las raíces suelen ser adventicias y se originan en tallos o rizomas; por lo general tienen pelos radicales (Flores, 1999).

El sustrato y la concentración de O_2 y CO_2 limitan el desarrollo normal de raíces. La mayoría de especies tienen amplios espacios aéreos continuos

con el tallo y las hojas, estas estructuras parecen dar soporte y controlar el ingreso de agua al sistema aéreo (Flores, 1999).

Las raíces actúan como centro de absorción de nutrientes, el NH_4 , Ca, Cl, Fe, PO_4 , Rb, y Na, pueden ser transportados vía raíz por hidrófilas de agua dulce tales como las especies observadas en la Figura 6. (Flores, 1999).

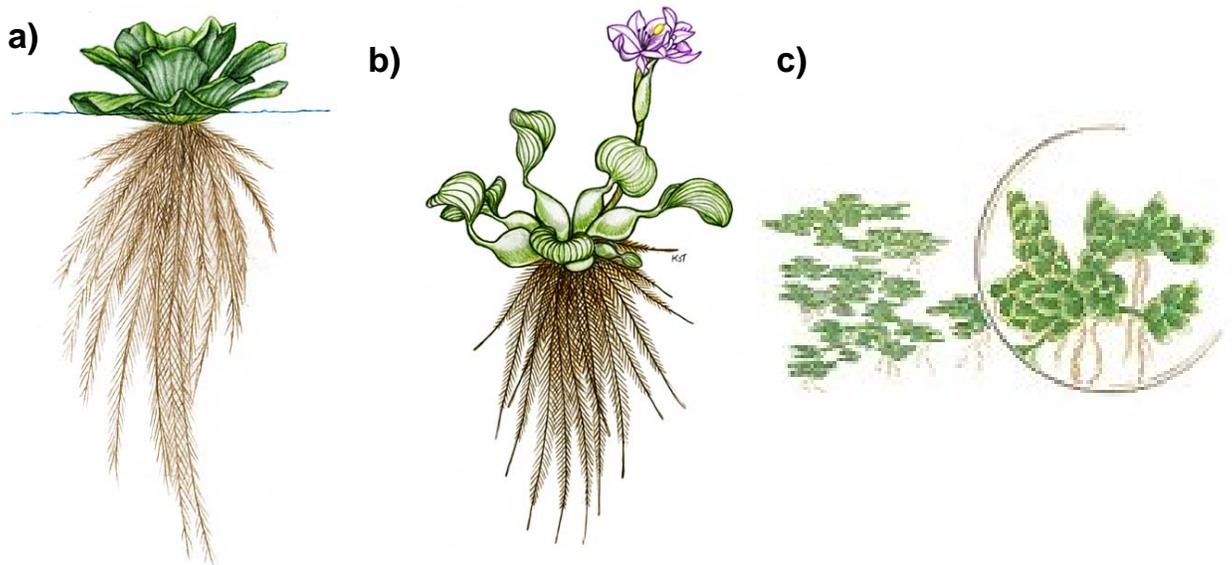


Figura 6. Sistemas radiculares de a) *Pistia sp.*, b) *Eichhornia sp.* c) *Azolla sp.*

4.3.MICROBIOLOGIA DE AGUAS NATURALES

4.3.1.Los microorganismos en sus hábitats naturales

El estudio de las comunidades microbianas, a pesar de su enorme importancia sólo ha empezado a ser abordado con detenimiento a partir de los años 90 (Álvarez, 2005).

4.3.2.Estructura del ambiente acuático

Según Wetzel (1995), citado en Atlas y Bartha (2002) los hábitats de agua dulce se clasifican de acuerdo a sus propiedades químicas y físicas. Los de aguas tranquilas, como lagos y estanques, se denominan hábitat lénticos y los de aguas corrientes, hábitat lóuticos. Grant y Long (1989), mencionan que en los ambientes lóuticos registran un medio relativamente uniforme en toda su profundidad, mientras, por el contrario en los ambientes lénticos se establecen diferentes niveles, diferenciándose en cuanto a la temperatura, densidad características químicas y biológicas.

4.3.3.Hábitats microbianos en el ambiente acuático

La microbiología de las aguas, estudia la estructura y la vida de los microorganismos de los diferentes ambientes acuáticos que existen en el planeta, así como su función en el ciclo material del agua, los sedimentos además de las relaciones de esos microorganismos con el resto de animales y plantas que tienen su hábitat en dichos medios (Grant y Long, 1989).

Son microorganismos, en sentido estricto, todos los seres vivos microscópicos, es decir, las bacterias, los hongos, las algas unicelulares, los protozoos y los metazoos. Hay que añadir además los virus, pero por razones metodológicas la microbiología ambiental se ha enfocado al estudio de hongos y bacterias (Grant y Long, 1989).

4.3.4.Microorganismos en columnas de agua dulce

Rheinheimer (1991) citado por Atlas y Bartha (2002), menciona que hay diferencias en la distribución vertical de las poblaciones bacterianas en ambientes acuáticos. Estas diferencias reflejan las oscilaciones verticales de

variables abióticas, como la penetración de la luz, la temperatura y la concentración de oxígeno (Atlas y Bartha, 2002).

Las bacterias aisladas más frecuentemente de los ambientes microbianos acuáticos (Cuadro 1) son los bacilos gram negativos, y de hecho el 90% de todos los aislamientos pertenecen a esta categoría, influyendo por lo general especies de *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* entre otros (Grant y Long, 1989).

En el cuadro 1 se resumen los diferentes ambientes microbianos presentes en ecosistemas acuáticos.

Cuadro 1. Hábitats microbianos en ambientes acuáticos.

Hábitat	Definición	Terminología común
Neustónico	Película superficial interfase aire/agua	Neuston
Planctónico	La columna de agua, sus habitantes libres	Plancton
Béntico	En y sobre los sedimentos permanentemente sumergidos	Bentos
Epibiótico	Sobre superficies vivas y no vivas lo suficientemente grandes para permitir una microflora mixta	Perifiton
Sestónico entérico fecal	En los contenidos intestinales de los animales y en sus heces, también en materia orgánica particulada	Seston

Fuente: (Grant y Long, 1989).

4.3.4.1.Hábitat Neustónico

4.3.4.1.1.Diversidad microbiana en el Neuston

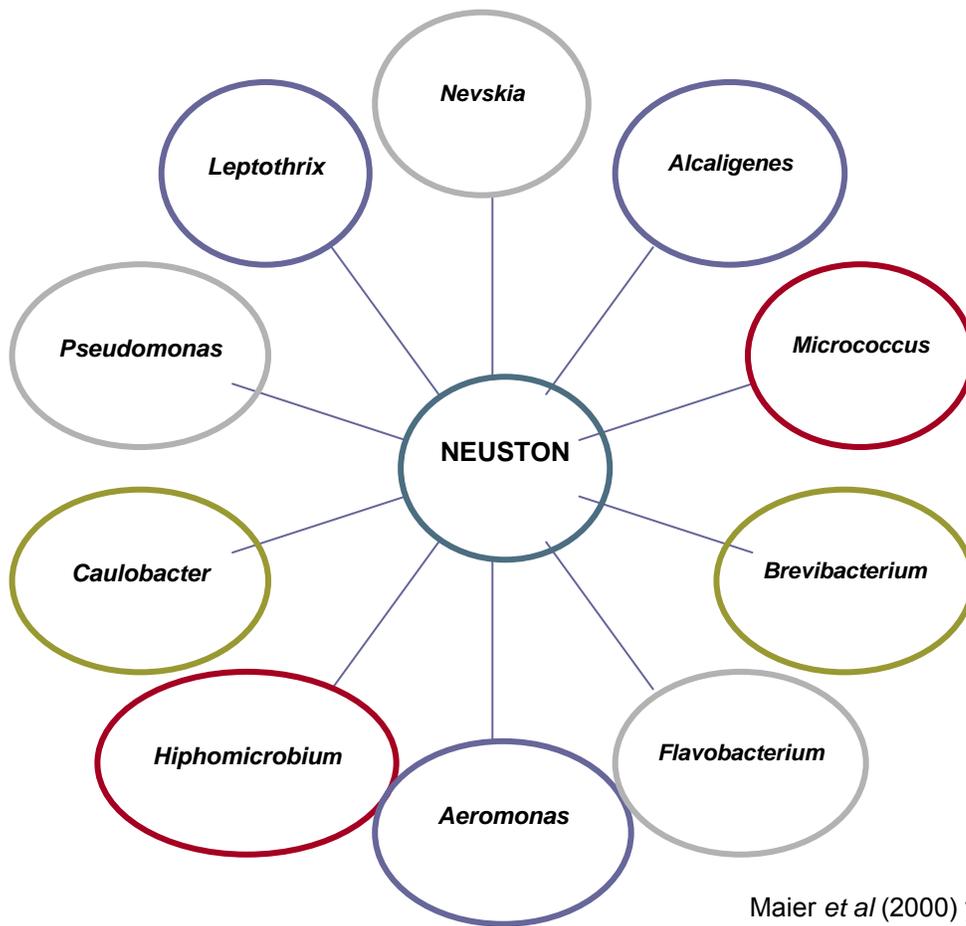
En condiciones de calma, los microorganismos forman una película en la superficie, conocida como neuston (Atlas y Bartha, 2002). Esta capa es un hábitat favorable para microorganismos fotoautótrofos, debido a que los productores primarios tienen acceso ilimitado al dióxido de carbono atmosférico y a la radiación luminosa (Atlas y Bartha, 2002).

Los productores secundarios también proliferan aquí, utilizan los compuestos orgánicos no polares que se acumulan debido a la tensión superficial de esta capa y a la elevada concentración de oxígeno atmosférico (Atlas y Bartha, 2002).

La microcapa superficial concentra de diez a cien veces más microorganismos que las columna de agua adyacentes (Maier *et al*; 2000).

4.3.4.1.2.Géneros bacterianos característicos del neuston

Entre los géneros bacterianos característicos de esta capa, Maier *et al* (2000) y Atlas y Bartha (2002), señalan los siguientes:



Maier *et al* (2000) y Atlas y Bartha (2002)

Figura 7 . Géneros bacterianos característicos del Neuston.

4.3.4.2.Hábitat Planctónico

El plancton se refiere a las comunidades microbianas suspendidas en la columna de agua. Los microorganismos fotoautotróficos dentro de esta comunidad incluye eucariotas (algas) y procariotas (cianobacterias), éstas son conocidas como el fitoplancton. Las poblaciones de bacterias heterótrofas son conocidas como bacterioplancton y las poblaciones de protozoos como zooplancton. Estos tres grupos conforman la comunidad microbiana planctónica (Maier *et al*; 2000).

El fitoplancton son los productores primarios en la red alimentaria, usan el proceso de fotosíntesis para convertir el CO₂ a compuestos orgánicos, ésta

producción primaria es el mayor recurso de carbono y energía que es transferida a otros niveles tróficos dentro de la red. Los compuestos orgánicos producidos en esta etapa pueden ser divididos en dos clases: particulados y disueltos, dependiendo del tamaño. La materia orgánica particulada corresponde a grandes macromoléculas y la materia orgánica disuelta, corresponde a pequeños componentes como aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos que son rápidamente tomados por los microorganismos y son reciclados (Maier *et al*; 2000).

4.3.4.2.1. Diversidad microbiana en el Plancton

Los miembros fotoautótrofos de las familias de las clorobiáceas y de las cromatiáceas son autóctonos de comunidades microbianas de agua dulce a una profundidad mayor, allí donde la luz todavía penetra, pero la tensión del oxígeno es baja y hay bastante cantidad de sulfuro de hidrógeno (Atlas y Bartha, 2002).

Las poblaciones heterótrofas se distribuyen a través de la columna vertical del agua pero generalmente alcanzan la concentración máxima cerca de la termoclina* y cerca del fondo del ambiente acuático, donde hay materia orgánica disponible (Atlas y Bartha, 2002).

4.3.4.3. Hábitat Béntico

El ambiente bentónico es la zona de transición entre la columna de agua y el sedimento. Esta interfase colecta todo el material orgánico que sedimenta de la columna de agua o que es depositado del ambiente terrestre. Esta zona es caracterizada por el aumento en la concentración de microorganismos comparado con el hábitat planctónico, la concentración depende de la cantidad de materia orgánica presente y la disponibilidad de oxígeno. El bentos es muy importante en los sistemas acuáticos, debido al reciclaje de elementos esenciales tales como el carbono, nitrógeno y el azufre (Maier *et al*; 2000).

* Zona de un hábitat acuático caracterizada por un descenso rápido de la temperatura.

4.3.4.3.1. Diversidad microbiana en el ambiente bentónico

Los microorganismos que se encuentran en el fondo de los sistemas acuáticos son diferentes a los que ocupan las capas superiores del agua. Y están altamente adaptados a los sedimentos y a las condiciones de materia orgánica específicas de su medio ambiente (Ecological Society of America, 2003)

Las bacterias anaerobias fotoautótrofas ocupan la superficie del sedimento, lo que a menudo le confiere al agua un color característico (Atlas y Bartha, 2002).

Estas bacterias de respiración anaerobia son miembros destacados de la microbiota del sedimento y entre ellas figuran especies de *Pseudomonas*, que pueden llevar a cabo la actividad desnitrificadora (Atlas y Bartha, 2002).

Según Atlas y Bartha (2002) y Maier *et al* (2000), en el sedimento las bacterias anaerobias estrictas ocupan nichos importantes, entre ellas se encuentran especies formadoras de endosporas del género *Clostridium*, bacterias metanógenas que producen metano y especies de *Disulfovibrio*, que producen sulfuro de hidrógeno.

La suerte de estos organismos es crítica para sustentar los ecosistemas de agua dulce dado que ellos son responsables de la mayoría del trabajo de purificación (Atlas y Bartha, 2002).

4.3.4.4. Perifiton

4.3.4.4.1. Definición

Como lo mencionan Grant y Long, 1989, el perifiton corresponde a aquellas superficies vivas y no vivas lo suficientemente grandes para permitir una microflora mixta dentro del ambiente acuático.

4.3.4.4.2. Microorganismos asociados al perifiton de las raíces de plantas acuáticas.

Una gran parte de las bacterias y hongos presentes en las aguas viven temporal o permanentemente sobre la superficie o en el interior de las

especies vegetales. A respecto cabe señalar que las relaciones entre los microorganismos y los seres vivos colonizados por ellos, son de naturaleza muy diversa (Grant y Long, 1989).

Así las bacterias y los hongos utilizan las plantas simplemente como substratos o se alimentan de sus productos metabólicos o principios nutritivos parcial o totalmente como comensales (Grant y Long, 1989).

4.3.4.4.3.Colonización superficial

Sobre la superficie de numerosas plantas, en especial sobre sus raíces los microorganismos pueden colonizarlas, al menos temporalmente, para formar allí una agrupación más o menos densa (Rheinheimer, 1987). Desde las bacterias, peces, mamíferos acuáticos y plantas pueden servir como substrato a los microorganismos. Sin embargo hay otros en los que no se produce ninguna colonización, a causa, sin duda, a la presencia de sustancias inhibitorias. Los microorganismos presentes en las partes superficiales se alimentan principalmente de excreciones de las plantas (Rheinheimer, 1987).

Como se puede comprobar, son muchos los lugares donde pueden habitar los microorganismos dentro del ambiente acuático, y por ende pueden desempeñar diferentes funciones según sea este lugar, de ahí la importancia de conocer cada uno de ellos además de todos los factores y propiedades tanto físicas como químicas que influyen en el crecimiento microbiano dentro de estos ambientes.

4.3.5.Propiedades físicas y químicas del ambiente acuático

Existen un gran número de factores físicos y químicos que influyen sobre el crecimiento de los microorganismos en el agua. Estos factores, no se relacionan solamente con el volumen y composición específica de las poblaciones microbianas, sino que también repercuten en el metabolismo de muchas de estas poblaciones (Rheinheimer, 1987).

Aunque los diversos factores de los medios naturales que ejercen su acción sobre los seres vivos, son siempre numerosos , pero algunos de ellos

destacan de los demás por su importancia particular, son aquellos que limitan la capacidad vital de los microorganismos en un ambiente limitado (Rheinheimer, 1987).

4.3.5.1.Luz

La luz es un factor ecológico importante en las aguas, pero su intensidad disminuye allí con gran rapidez, la intensidad luminosa biológicamente activa se conserva en las capas superiores hasta una profundidad de 10 a 100 m, según el grado de turbidez del agua (Rheinheimer, 1987).

4.3.5.2.Temperatura

Las manifestaciones vitales de todos los microorganismos están supeditadas a la temperatura. Las bacterias, las cianofíceas y los hongos no pueden desarrollarse sino dentro de un margen de temperatura muy estrecha que estima entre los -10 y $+100$ °C (Rheinheimer, 1987).

Dentro de estos límites, influye la temperatura sobre la tasa de crecimiento, las necesidades nutritivas y, en medida muy escasa, sobre la composición enzimática y química de las células (Grant y Long, 1989).

De todos modos, entre estos grupos no hay un límite neto, sino más bien una transición gradual, muchos microorganismos tienen poder de adaptarse a temperaturas más bajas y más altas. La temperatura está influenciada en mayor o en menor medida por otros factores, como la provisión de nutrientes, la concentración de sales, el valor de pH, los productos del metabolismo (Rheinheimer, 1987).

Los efectos inequívocos producidos por la temperatura sobre las manifestaciones vitales de las bacterias in vitro, en cultivos puros y en condiciones óptimas, no se observan a veces más que en la naturaleza en especial en los ambientes acuáticos; pues aquí suelen concurrir un gran número de seres vivos y muy diversos, cuyos procesos biológicos cursan paralelamente o antagónicamente. De ahí que no pueda estudiarse la influencia de la temperatura para cada una de las especies por separado (Rheinheimer, 1987).

Grant y Long (1989), por otra parte, mencionan que no es tampoco extraño que se reúnan simultáneamente varios efectos superpuestos, esto ocurren en especial con aguas muy contaminada, ya que la elevación de la temperatura intensifica la actividad y acorta el periodo generativo pero a la vez aumenta la acción toxica y acelera la autolisis. Por tanto, las condiciones de un medio acuático determinado pueden ser favorables para ciertos microorganismos, dando lugar a su multiplicación rápida y desfavorable para otros, este es el caso de muchas bacterias de agua dulce.

4.3.5.3. Enturbamiento

El enturbamiento del agua ejerce también influencia sobre la vida de los microorganismos. Lo origina el seston, que esta constituido por el conjunto de materias vivas y muertas suspendidas en el agua, las cuales dan el origen a los sedimentos (Rheinheimer, 1987).

El seston consta de los siguientes tres componentes:

1. Sustancias de origen mineral transportadas desde la tierra a las aguas.
2. Materiales detríticos orgánicos e inorgánicos triturados.
3. Plancton, es decir organismos vegetales y animales suspendidos en el agua.

Además el seston desempeña una función importante como substrato de muchos microorganismos.

4.3.5.3.1. Materiales detríticos y la flora microbiana

Los materiales detríticos están compuestos por una flora compuesta de numerosos hongos y bacterias, estos microorganismos pueblan no solamente los componentes orgánicos sino también los inorgánicos. Las materias en suspensión adsorben en su superficie los principios nutritivos que están disueltos en el agua a escasa concentración, de tal forma que los microbios encuentran allí unas condiciones de alimentación más favorables que libremente en el medio líquido (Rheinheimer, 1987).

La absorción a las partículas detríticas hace también inofensivas las sustancias tóxicas e inhibitorias. De aquí que las materias en suspensión produzcan un efecto favorable, especialmente lo que afecta el desarrollo bacteriano, aparte hay que añadir que brinda cierta protección contra la luz (Rheinheimer, 1987).

El aumento o la disminución de residuos detríticos no trae como consecuencia el incremento o reducción de las poblaciones microbianas.

De ahí en general que se puede afirmar que los incrementos en la turbidez de las aguas, que vayan acompañados con una elevación en el número de bacterias, son atribuidos al menos en parte, a un aumento de las materias orgánicas en suspensión. Por el contrario, si la concentración bacteriana varía muy poco, hay que buscar las causas en las sustancias inorgánicas que flotan en la masa líquida (Maier *et al*; 2000)

4.3.5.4. Concentración de iones hidrónico y potencial redox

El valor del pH influye poderosamente sobre el crecimiento y la reproducción de los microorganismos. La mayoría de las bacterias se desarrollan en un rango de pH de 4 a 9 (Rheinheimer, 1987).

El pH óptimo de la mayor parte de las bacterias de ambientes acuáticos fluctúa entre 6.5 a 8.5, pero no es raro observar en estos ambientes oscilaciones relativamente grandes que repercute directamente en la composición de las poblaciones de bacterias y de hongos. Estas grandes oscilaciones provocan alteraciones fisiológicas y no son raras las alteraciones morfológicas. Algunos microorganismos tienden entonces a producir formas de involución, como en el caso de las células bacilares que aumentan de tamaño y ostentan abultamientos y ramificaciones irregulares (Rheinheimer, 1987).

4.3.5.5. Sustancias inorgánicas

Hay muchas formas inorgánicas que influyen en la vida de muchos microorganismos. A respecto corresponde un papel muy importante a los compuestos de nitrógeno y fósforo, los cuales representan el factor mínimo

de la vida vegetal como principios nutritivos de importancia vital en la zona productiva de muchas aguas. Además el nitrógeno vinculado a los nitratos puede servir para oxidar las sustancias orgánicas en condiciones anaerobias por parte de numerosas bacterias que tienen la capacidad de llevar a cabo la desnitrificación (Rheinheimer, 1987).

4.3.5.6.Sustancias orgánicas

Las sustancias orgánicas suspendidas y disueltas en el agua, tienen importancia principalmente como base de la nutrición de los microorganismos. De su concentración y composición dependen en gran parte el volumen y la combinación específica de las poblaciones de bacterias (Rheinheimer, 1987).

4.3.5.7.Gases disueltos

A parte de sales y compuestos orgánicos, en las aguas hay también pequeñas cantidades de gases disueltos, que pueden ejercer una influencia considerable sobre la vida de los microorganismos. A tal respecto, se trata principalmente de oxígeno, CO₂ y nitrógeno, los cuáles están pasando constantemente del aire al agua, aparte de esto los gases disueltos pueden formarse en el agua o en el suelo en virtud de procesos bioquímicos (Maier *et al*; 2000 y Rheinheimer, 1987).

4.4.FUNCION DEPURADORA DE HUMEDALES

La depuración de aguas residuales es un problema a escala mundial que ha generado interés en las áreas densamente pobladas ya que son muchos los contaminantes que son desechados en este tipo de ambientes (Pérez *et al*; 2000). Por esta razón se han buscado en los últimos años soluciones que brinden un tratamiento efectivo de las aguas, con el fin de mejorar su calidad y así disminuir el efecto ambiental que esta contaminación puede producir a mediano y largo plazo Johnston (1991).

Una posible solución que ha cobrado gran interés es la utilización de humedales como depuradores de aguas residuales como lo mencionan Mitsch y Gosselink (1993), citados por Pérez *et al*; (2000). Esto debido a que los humedales son cuerpos de agua comunes en las cercanías de centros urbanos, industriales y de explotación agrícola, que en la mayoría de los casos producen gran cantidad de desechos prioritariamente de naturaleza orgánica.

4.4.1. Descomposición de materia orgánica

Según Mason (1976) citado por Álvarez (2005), la descomposición se emplea para referirse a la destrucción de materiales orgánicos de origen animal, microbiano o vegetal. Satchell (1974), mencionado por el mismo autor, recalca que este proceso engloba dos subprocesos simultáneos:

1. La fragmentación de partículas de un tamaño mayor en otras cada vez menores, hasta que los componentes estructurales ya no son reconocibles.
2. El catabolismo de los compuestos orgánicos.

Bajo ambos procesos, los humedales pueden actuar como lugar para la degradación de los desechos que son depositados en ellos y así englobar el proceso de descomposición como un proceso natural ecosistémico.

4.4.2. Capacidad depuradora de humedales

Según Johnston (1991), la capacidad depuradora de los humedales se basa, a grandes rasgos, en dos mecanismos:

1. La utilización de los nutrientes disueltos en el agua por los productores primarios (macrófitos y microorganismos).
2. La sedimentación de las partículas que lleva el agua, al atravesar lentamente amplias superficies.

Es difícil de cuantificar la función depuradora del humedal ya que tanto la entrada como la salida de agua están sujetas a múltiples variaciones (Pérez *et al*; 2000). Gran cantidad del agua que se aporta a la mayoría de humedales es de origen antropogénico (aguas residuales de poblaciones cercanas, de agricultura o de industria). Los aportes de agua al llegar al humedal disminuyen su velocidad, lo que ayuda a que las sustancias en suspensión sedimenten, los aportes de agua provenientes de los acuíferos y las precipitaciones suelen ser menos cuantiosos y sujetos a ciclos generalmente estacionales (Pérez *et al*; 2000). El humedal hace de "filtro" de numerosos contaminantes, es decir, la cantidad de sustancias que entran a este ecosistema es mayor que la que sale (Johnston, 1991)

4.4.2.1. Entrada de materia orgánica en los humedales

En los sistemas acuáticos, como los humedales el movimiento de sedimentos y la afluencia de la materia orgánica son componentes importantes de la estructura del hábitat y de su dinámica, las entradas naturales de materia orgánica incluyen el escurrimiento superficial estacional y restos vegetales tales como hojas y material vegetal senescente de las comunidades terrestres (Ecological Society of America, 2003). El aporte de materia orgánica desde la superficie terrestre es una fuente particularmente importante de energía y nutrientes (Ecological Society of America, 2003).

4.4.2.2. Descomposición de materia orgánica en ambientes acuáticos

Según Heinselman (1963) citado por Pérez *et al* (2000), existen muchos factores que pueden afectar al ritmo de acumulación y degradación de la materia orgánica:

- 1) Clima: influyen múltiples factores, tales como, la velocidad de descomposición
- 2) Naturaleza del material vegetal: diferentes especies de plantas tienen velocidades de descomposición diferentes.
- 3) Fuego: destruye la vegetación pero las cenizas aumentan la cantidad de nutrientes disponibles para los productores primarios.
- 4) Inundaciones que pueden provocar condiciones anaerobias.
- 5) Alteraciones humanas: cultivos, vertidos, desecación,...

4.4.3. Papel de las plantas acuáticas en la autodepuración de las aguas

Como se ha mencionado con anterioridad, los humedales son una variante adecuada para la depuración de agua. En ellos las plantas acuáticas funcionan como filtros biológicos removiendo sustancias tanto biodegradables como no biodegradables, nutrientes, sustancias tóxicas y microorganismos patógenos (Rodríguez *et al*; 2000).

4.4.4. Papel de los microorganismos en la autodepuración de las aguas

Como en la mayoría de ambientes acuáticos, algunos sufren constantemente una contaminación más o menos intensa, motivada por los desechos que van a caer en ellos. La depuración natural de las aguas tiene una importancia extraordinaria porque gracias a este proceso se eliminan muchas impurezas (Rheinheimer, 1987).

Es indudable que en este sentido desempeñan un papel importante los procesos físicos y químicos, como lo son los fenómenos de sedimentación y oxidación pero los procesos biológicos son decisivos en este caso. En la

autodepuración de las aguas intervienen numerosos seres vivos, empezando por las aves y los peces hasta llegar a los microorganismos (Ecological Society of America, 2003)

Pero el papel decisivo lo tienen los hongos y las bacterias, porque tienen poder para degradar tanto los compuestos orgánicos presentes en forma sólida como los disueltos (Rheinheimer, 1987). A pesar de su enorme importancia el papel de los microorganismos sólo ha empezado a ser abordado en profundidad en los años 90, ya que antes, los procesos de descomposición microbiana, fueron vistos como un proceso que solo involucraba comunidades de macroinvertebrados (Álvarez, 2005). Además en los últimos años las rutas de degradación aerobia y anaerobia de la materia orgánica son hoy día conocidas en gran detalle (Smith y Smith, 2001).

A medida que progresa la autodepuración de las aguas, se modifica también la población microbiana, al haber menor cantidad de materia orgánica hay menor proporción de bacterias y con esta, igualmente el déficit de O_2 a consecuencia de la reducción paulatina de consumo (Rheinheimer, 1987).

El poder de autodepuración de las aguas es muy variable. Alcanza su grado máximo donde la agitación permite un activo intercambio gaseoso con la atmósfera, ya que la descomposición de materia orgánica no suele ser posible más que en la presencia de oxígeno, por lo que es necesario suministrar éste continuamente (Rheinheimer, 1987).

En aguas estancadas, el recambio gaseoso es insuficiente, por lo que el faltante de oxígeno provoca que la autodepuración se altere. En tal caso se producen los cambios materiales por sedimentación de la materia orgánica preferentemente (Rheinheimer, 1987).

4.4.4.1. El papel bacteriano en la autodepuración

En el caso de los microorganismos, se ha asumido que las bacterias son cada vez más importantes conforme el tamaño de partícula de materia orgánica en degradación disminuye (Figura 8), esto se ve acompañado por

un aumento de actividades oxidativas en detrimento de las actividades hidrolíticas (Álvarez, 2005).

Según Smith y Smith (2001), los microorganismos usan los detritos como fuente de carbono y les añaden nitrógeno y fósforo que obtienen del agua y los sedimentos circundantes. Ésta acumulación de los nutrientes en el material descompuesto ayuda a la retención de N y P en el humedal, donde permanecen disponibles para las plantas emergentes y de otros tipos.

Gran parte del material más a menudo se incorpora a los fangos anaerobios del fondo, donde la descomposición produce metano y sulfuro de hidrógeno. Por lo tanto, en los sedimentos por su propia estructura inestable y sus condiciones anaerobias, las bacterias se consideran el grupo heterotrófico mas importante (Álvarez, 2005).

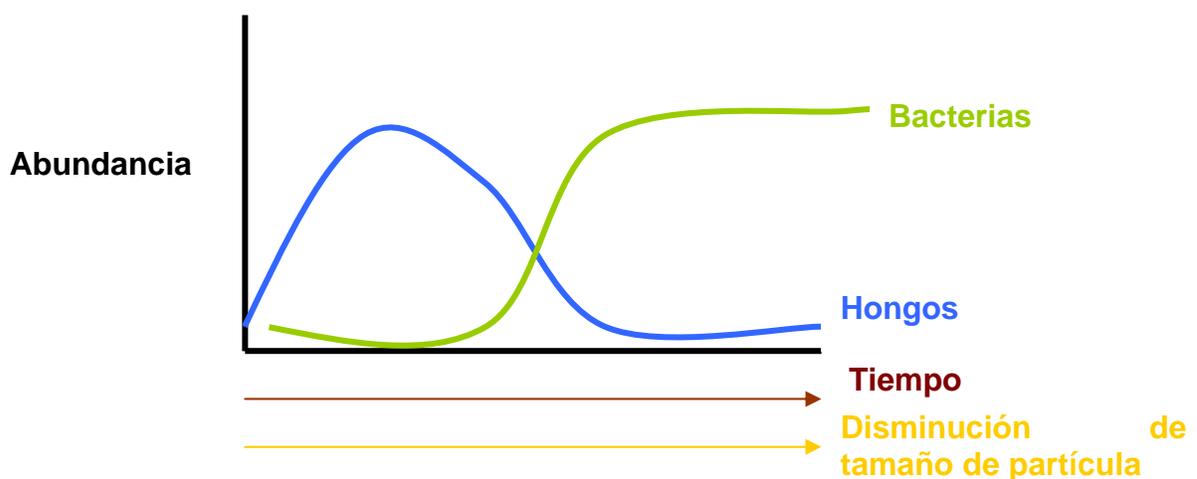


Figura 8. Abundancia relativa de hongos y bacterias según avanza el proceso de descomposición y el tamaño de partícula de materia orgánica disminuye (Álvarez, 2005).

Según Kadlec y Knight (1995), los grupos más importantes de bacterias que intervienen en los humedales para la depuración del agua son las siguientes:

Cuadro 2. Grupos bacterianos que intervienen en el tratamiento de aguas ecosistemas de humedales.

Grupo	Géneros representativos	Características
Bacterias fototróficas	<i>Rodospirillum, Chlorobium</i>	Miembros de este género son no-simbióticos fijadores de N.
Bacterias deslizantes	<i>Beggiatoa, Flexibacter, Thiothrix</i>	Bacterias filamentosas, encontradas en lodos
Bacterias filamentosas	<i>Sphaerotilus</i>	Bacterias filamentosas comunes en aguas contaminadas
Bacterias de superficies	<i>Caulobacter, Hyphomicrobium</i>	Bacterias acuáticas que crecen en superficies
Bacilos y cocos negativos aerobios	<i>Pseudomonas, Zooglea, Azotobacter, Rhizobium</i>	<i>Pseudomonas spp</i> desnitrifica el NO ₂ a N ₂ bajo condiciones anaerobias y puede oxidar el gas hidrógeno. <i>Azotobacter spp.</i> Es un fijador no simbiótico de nitrógeno y <i>Rhizobium</i> es son bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno.
Bacilos negativos anaerobios facultativos	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Aeromonas</i>	<i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> son fijadores de nitrógeno no simbióticos.
Bacterias Gram-negativas anaerobias	<i>Desulfovibrio</i>	Reducen el sulfato a hidrógeno de sulfato
Bacterias quimilitróficas	<i>Nitrosomonas, Nitrobacter, Thiobacillus</i>	<i>Nitrosomonas</i> catalizan la conversión de NH ₄ a NO ₂ , <i>Nitrobacter</i> oxida el NO ₂ a NO ₃
Bacterias productoras de metano	<i>Methanobacterium</i>	Bacterias anaerobias de sedimentos transforman el carbonato a metano
Cocos Gram-positivos	<i>Streptococcus</i>	Bacterias productoras de algunas infecciones
Bacilos productores de endosporas y cocos	<i>Clostridium, Bacillus</i>	Algunos <i>Clostridium spp</i> son fijadores de nitrógeno no simbióticos
Actinomicetos y organismos relacionados	<i>Nocardia, Frankia, Streptomyces</i>	Bacterias filamentosas que están tanto en el agua como en el suelo de los humedales; son fijadores de nitrógeno.

Fuente: Kadlec y Knigh (1995).

4.4.4.2. Metabolismo bacteriano

La mayoría de las transformaciones químicas conducidas por los microorganismos están controladas por enzimas (proteínas específicas que catalizan las reacciones químicas) (Kadlec y Knight, 1995).

En el metabolismo microbiano se incluye el uso de enzimas para romper los complejos orgánicos a simples compuestos con la liberación de energía (catabolismo) o la síntesis de compuestos orgánicos (anabolismo). El metabolismo microbiano no sólo depende de la presencia de las enzimas adecuadas, también influye las condiciones ambientales como la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH (Kadlec y Knight, 1995).

Los microorganismos pueden ser clasificados según sus requerimientos metabólicos. Las bacterias fotoautotróficas usan la luz como recurso energético para la síntesis de compuestos orgánicos. El sulfuro de hidrógeno o el sulfuro elemental sirven como aceptores de electrones en las reacciones de oxidación y reducción (Álvarez, 2005).

Las bacterias fotoheterótrofas usan la luz como un recurso energético y el carbono orgánico para la síntesis celular. Los compuestos orgánicos usados comúnmente por estas bacterias están los alcoholes, los ácidos grasos, otros ácidos orgánicos y carbohidratos (Álvarez, 2005).

Las bacterias quimioautotróficas obtienen su energía de la oxidación de compuestos químicos inorgánicos reducidos, y usan el CO₂ como fuente de carbono para la síntesis celular. Un número importante de bacterias que son importantes en los humedales para el tratamiento de aguas de desecho son las bacterias quimioautotróficas, por ejemplo *Nitrosomonas* oxida el amonio a nitritos, y *Nitrobacter* oxida los nitritos a nitratos y géneros como *Pseudomonas* derivan su energía oxidando el hidrógeno gaseoso (Kadlec y Knight, 1995)

Según estos mismos autores, las bacterias quimioheterótrofas derivan su energía de compuestos orgánicos y utilizan estos u otros compuestos para la síntesis celular.

Durante el metabolismo microbiano, los carbohidratos son degradados a ácido pirúvico con la producción neta de dos moléculas de ácido pirúvico y dos ATP por cada molécula de glucosa y la subsecuente descomposición del ácido pirúvico mediante fermentación o respiración (Kadlec y Knight, 1995)

La respiración aeróbica es el proceso de reacciones bioquímicas donde los carbohidratos son descompuestos a CO_2 , agua y energía. Para la completa oxidación el oxígeno y el hidrógeno tienen que estar disponibles como aceptores finales de electrones (Kadlec y Knight, 1995).

La respiración anaerobia es un proceso catabólico alternativo que ocurre en la ausencia de oxígeno. En este proceso otros compuestos inorgánicos son usados como aceptores finales de electrones, Una variable y pequeña cantidad de energía es derivada durante este proceso (Kadlec y Knight, 1995). Esta forma de respiración es importante a una gran cantidad de grupos bacterianos que viven en los humedales y otros ambientes acuáticos ya que bacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus* usan el nitrato como aceptor final de electrones, produciendo nitritos o nitrógeno gaseoso (Kadlec y Knight, 1995).

4.4.5. Importancia de la depuración de aguas provenientes de actividades pecuarias

Según Nimukunda *et al* (2004), entre los aspectos más importantes del porqué se deben tratar las aguas generadas por actividades pecuarias son las siguientes:

- Las excretas de las vacas, gallinas y cerdos tienen un alto contenido de materia orgánica y nutrientes tales como nitrógeno y fósforo. Si se vierten las aguas residuales, provenientes de estas fuentes, directamente a los cuerpos naturales del agua, se favorece el crecimiento rápido de las plantas acuáticas. Cuando estas plantas mueren, agregan materia orgánica, la cual necesitaría mucho oxígeno para descomponerse. El resultado es la reducción de la cantidad de oxígeno en el agua. Esta falta de oxígeno perjudica la vida acuática.
- Las excretas pecuarias contienen microorganismos patógenos; tales como, bacterias y helmintos. Al verter las aguas de esta fuente al los mantos acuíferos, se pone en peligro la vida del ser humano y otros animales. Según Spellman (2002) citado por Nimukunda *et al* (2004) la bacteria *Escherichia coli* y otros microorganismos que se encuentra en las excretas de los animales, pueden causar infecciones severas al tomar el agua contaminada.
- Algunos alimentos que se utilizan para los animales contienen metales pesados; tales como mercurio, cobre, zinc y plomo. Estos metales pesados son muy tóxicos, y han sido detectados en las excretas de los animales.

A pesar de las enormes ventajas que se pueden obtener de los humedales como fuente de tratamiento de aguas, también tiene sus desventajas al establecerlos para este uso.

4.4.6. Desventajas del uso de humedales como depuradores de aguas.

Según Rodríguez (1995), algunos inconvenientes que presentan estos sistemas son:

- Limitaciones geográficas para la supervivencia de la vegetación, por ejemplo altitud, temperatura, humedad, clima.
- Los humedales requieren de cuatro a diez veces más de área disponible en comparación con otros sistemas de tratamiento tradicionales.
- Normalmente en los humedales artificiales se hace difícil establecer un flujo uniforme a través de los mismos y también la escogencia de la vegetación apropiada.
- En muchos lugares no se tiene ni el suelo ni las propiedades geológicas necesarias para un funcionamiento efectivo del humedal.
- En algunos casos se puede dar una acumulación de vegetación o lodos que pueden llegar a tal punto que se necesite removerlos

4.5. METODOS DE ECOLOGIA MICROBIANA

La ecología microbiana es la ciencia que explora las interrelaciones entre los microorganismos y su ambiente vivo (biótico) y no vivo (abiótico), por lo que está comúnmente interesada en el aislamiento y la numeración de microorganismos viables, presentes en diferentes ecosistemas (Atlas y Bartha, 2002).

4.5.1. Cultivo de microorganismos

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Madigan *et al*; 1999).

4.5.1.1 Crecimiento microbiano en medio sólido

La cinética de crecimiento en medio sólido, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa. Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de substrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo. Si el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un “césped” cuando se realizan los cultivos en placas de laboratorio (Madigan *et al*; 1999).

En el caso de microorganismos móviles (deslizantes) que tienen un crecimiento trófico no se producen colonias aisladas sino formaciones más difusas (Rodríguez *et al*; 2000).

4.5.1.2. Medios de cultivo

Un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando es el caso que están compuestos por mezclas de extractos de materiales muy complejos. Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos normalmente agar (Madigan *et al*; 1999).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros, los diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos, los selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores y los medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño (Rodríguez *et al*; 2000).

Entre algunos de los medios diferenciales podemos señalar:

4.5.1.2.1. Agar MacConkey

El agar MacConkey contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben a las bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Contiene lactosa como único carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH, cuyo ámbito de viraje está entre pH 8.0 (amarillo) y pH 6.8 (rojo) (Rodríguez *et al*; 2000).

4.5.1.2.2. Base Agar Cetrimida

Medio para el aislamiento selectivo e identificación de *Pseudomonas* la cetrimida favorece el crecimiento *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.1.2.3. Agar Baird Parker

El Agar Baird Parker es un medio de cultivo utilizado usualmente en microbiología para la detección de *Staphylococcus* coagulasa positivos, principalmente *S. aureus* (Rodríguez *et al*; 2000).

El medio completo consiste en un medio base con glicina, piruvato de sodio, cloruro de litio, entre otras sustancias y un suplemento que contiene telurito de potasio y yema de huevo (Rodríguez *et al*; 2000 y Montero, 2003)

La importancia que radica en la utilización de esta clase de medios diferenciales es que facilita los métodos de aislamiento según la clase de microorganismos deseados.

4.5.2. Métodos de aislamiento

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales (Rodríguez *et al*; 2000 y Madigan *et al*; 1999).

Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las muestras ambientales son cultivables (microorganismos no cultivables o poco viables). Esto es debido a dificultades intrínsecas en el cultivo, al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo, y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir (Maier *et al*; 2000).

4.5.2.1. Contaje de viables

Una célula viable se define como la que es capaz de dividirse para dar lugar a la descendencia y la forma habitual de llevar a cabo un contaje de este tipo,

es determinando en número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido (Madigan *et al*; 1999 y Maier *et al*; 2000)

A menudo a este método se le denomina “contaje en placa o contaje de colonias”. Lo racional que subyace en este tipo de contaje es que cada célula viable puede dar lugar a una colonia (Madigan *et al*; 1999).

Hay dos maneras de llevar a cabo el contaje en placa:

4.5.2.1.1. Siembra en superficie

En este método un volumen no mayor de 0.1 ml de una dilución apropiada se extiende por toda la superficie del medio utilizando una barra de vidrio doblada estéril y la placa se incuba hasta que aparezcan las colonias. Es importante que la superficie esté bien seca de modo que el líquido que se extiende por la superficie se empape rápidamente en el medio (Madigan *et al*; 1999 y Maier *et al*; 2000).

4.5.2.1.2. Método de vertido

En este método se pipetea un volumen conocido (0.1-1ml) de la dilución en el medio de cultivo fundido previamente y enfriado aproximadamente a 40°C, después de mezclado se vierte rápidamente en una placa petri y se incuba. Debido a que la muestra se mezcla con agar fundido el volumen puede ser superior al primer método (Madigan *et al*; 1999 y Maier *et al*; 2000). Para efectuar éste método las diluciones que se hagan se deben de hacer con sumo cuidado para que los datos arrojados sean verdaderamente representativos.

4.5.3. Diluciones seriadas

Para efectuar los métodos de contaje de viables, el número de colonias que se desarrollan en las placas no debe ser muy elevado para poder contar adecuadamente y por otra parte el número de colonias no debe ser muy bajo para que el contaje tenga significado estadístico. Lo habitual es que el número de colonias oscile entre 30 y 300 por placa (Madigan *et al*; 1999)

Para obtener un buen número de colonias y para que no haya errores en el contaje en placa, la muestra debe ser casi siempre diluida. Ya que uno casi

nunca conoce el número de viables *a priori*, normalmente es necesario hacer más de una dilución generalmente seriadas en base 10 (Madigan *et al*; 1999)

4.5.4. Errores en el contaje de placa

El número de colonias obtenido en un contaje de viables depende no solamente del tamaño del inóculo, sino también del medio de cultivo y las condiciones de incubación empleadas; también depende del tiempo de la incubación. Las células depositadas sobre el agar no desarrollarán colonias al mismo tiempo de modo que si el tiempo de incubación es corto se obtendrá un número más bajo que el real (Madigan *et al*; 1999)

El contaje de viables puede ser fuente de errores muy grandes de modo que hay que tomar muchas precauciones y replicar las placas de las diluciones claves. Para representar el resultado más claramente, el contaje de viables a menudo se expresan como unidades formadoras de colonias en lugar de células viables (ya que una unidad formadora de colonia puede contener más de una célula) (Madigan *et al*; 1999).

Una vez obtenido el contaje de viables se pueden utilizar varias técnicas entre ellas el cultivo puro de bacterias, con el fin de aislarlas por separado, para que así sea mucho más fácil la manipulación y los estudios posteriores.

4.5.5. Técnicas de cultivo puro

Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con seguridad (Rodríguez *et al*; 2000).

Sin embargo, cada vez se conoce más sobre el funcionamiento de las comunidades bacterianas lo que debe hacernos reflexionar sobre el hecho de que un cultivo puro supone unas condiciones no naturales y que por consiguiente, la fisiología de los microorganismos en ambientes naturales

puede ser diferente de la que presentan en condiciones de cultivos puros (Madigan *et al*; 1999).

4.6. Identificación de microorganismos

4.6.1 API®

Los API son versiones miniaturizadas de los procedimientos convencionales utilizados para la identificación de bacterias, Incluyen versiones específicas para una gran variedad de bacterias facultativas, microaerofílicas e incluso anaerobias y también para levaduras. Fueron diseñadas en la época de 1970 y continúan siendo un método de referencia en la evaluación de los sistemas automatizados de identificación (Rodríguez *et al*; 2000).

Estos sistemas utilizan una bandeja con una serie de pequeños depósitos, denominados como microtúbulos y contienen sustratos deshidratados para diferentes pruebas. Las reacciones se leen luego de un periodo de incubación, generalmente 18 a 24 horas, ya sea directamente por el desarrollo de un color; o bien, después de agregar los reactivos reveladores del producto de reacción (Rodríguez *et al*; 2000).

4.6.1.1. API 20E

El API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram negativos no exigentes, que incluyen 21 tests bioquímicos miniaturizados.

4.6.1.1.1. Fundamento

La galería de 20 microtúbulos del API 20, contiene los sustratos deshidratados. Los microtúbulos se inoculan con la suspensión bacteriana que reconstituye los tests. Las reacciones producidas durante el tiempo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la Tabla de lectura y la identificación se obtiene con la ayuda de un catálogo analítico o de un software de identificación.

5. METODOLOGIA

5.1. Descripción del sitio

La Universidad EARTH se ubica en la confluencia de los Ríos Parismina y Destierro, en la zona Atlántica de Costa Rica. Se ubica en el trópico húmedo a 40 m.s.n.m, con una precipitación anual de 3500 mm y una temperatura media de 27°C (Ruiz, 2002)

En su parte este y norte esta bordeada por el río Parismina. Existen otros ríos de gran importancia también como lo son: el Destierro que corre por el límite oeste, el Dos Novillos que corre por el límite sudeste a noreste. También existe una red de ríos secundarios que ayudan en el drenaje (Luna, 1999)

Los humedales se encuentran localizados entre las lomas de la parte central y noreste, formando parte de la gran cuenca de Parismina, desempeñando una función muy importante como captadores y reservorios de agua (Luna, 1999)

Uno de estos sistemas es el utilizado en la Finca Pecuaria Integrada, el cuál es un humedal artificial construido en 1999, el cual trata en su mayoría las aguas residuales de la actividad de ordeño y excremento de una lechería y una porqueriza (Ruiz, 2002). En el caso de la lechería se manejan 60 cabezas de ganado con sus respectivas crías. Mientras que el área de la porqueriza 98 cerdos distribuidos entre: cerdos de crecimiento, gestación, engorde, lactantes.

La figura 9 muestra la localización del humedal de la Finca Pecuaria Integrada dentro del campus de la Universidad.

5.2. Descripción del humedal de la Finca Pecuaria Integrada

El sistema de descontaminación productiva usado tanto en la lechería como la porqueriza que conforman la Finca Pecuaria Integrada, consta de prioritariamente de un biodigestor de plástico que es el primer lugar donde se introducen las excretas de los animales, en este punto se produce biogas que es utilizado dentro de las instalaciones y también se reducen en este

punto la cantidad de microorganismos patógenos y favorece la actividad de las bacterias para la degradación de la materia orgánica.

Posteriormente el agua que sale del biodigestor cae en una serie de canaletas con una profundidad aproximada de 0.4 m y un ancho de 1 m, éstas contienen plantas acuáticas. En este punto se da una absorción primaria de los nutrientes que están en el agua y además ayuda a la sedimentación de los sólidos en suspensión.

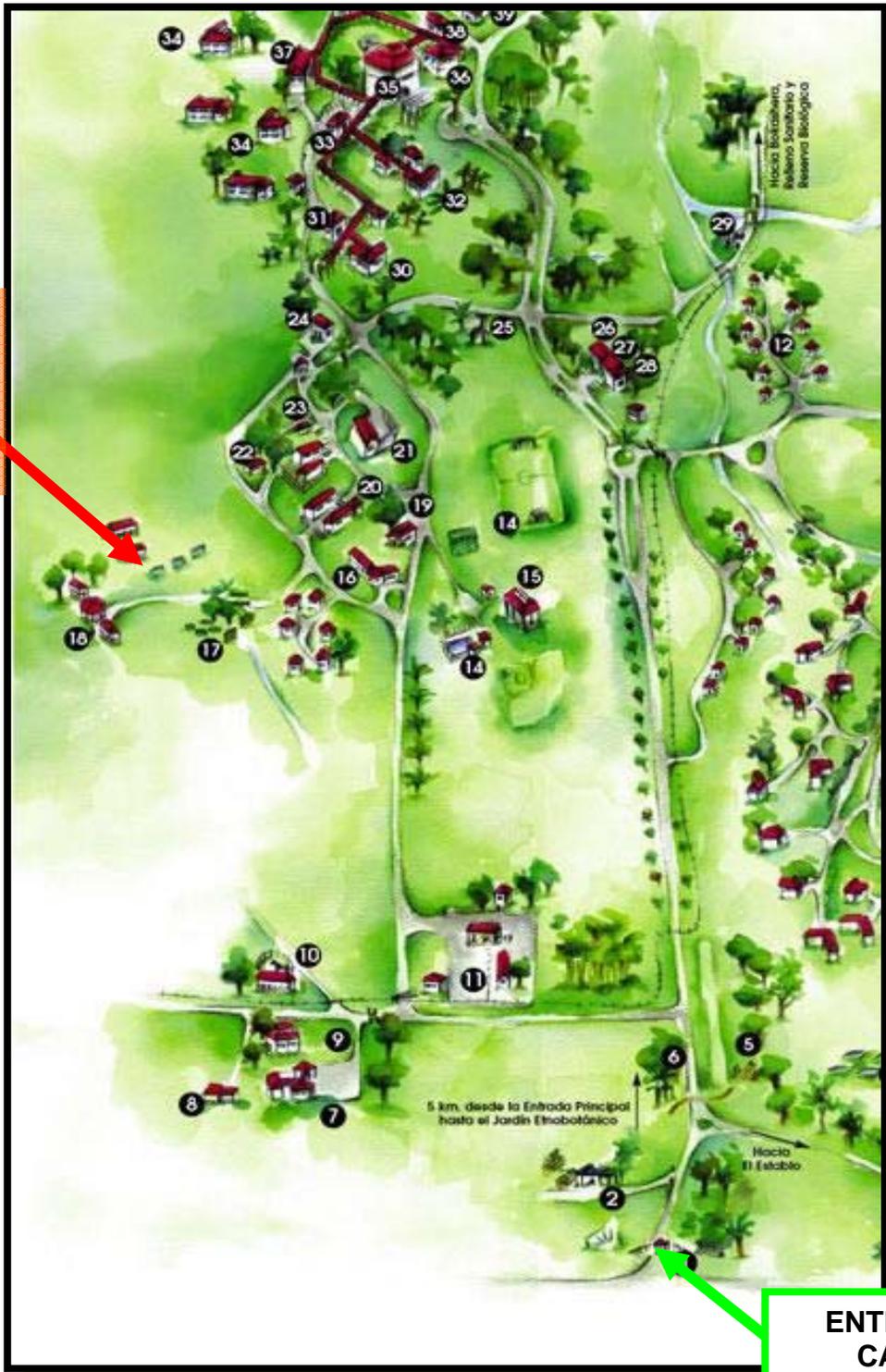
Posteriormente el agua generada en este punto es transportada hacia las lagunas del humedal artificial, el cuál consiste en cuatro lagunas conectadas entre sí, cada una de éstas contienen diferentes especies de plantas acuáticas emergentes.

Las aguas de desecho de la lechería se depositan en la laguna uno de éste humedal y las aguas que provienen de la porqueriza son depositadas en la laguna dos.

Una vez que han pasado hasta la laguna cuatro del humedal, las aguas de desecho ya tratadas son desechadas a la cuenca del Río Parismina. La figura 10 resume los diferentes pasos en el proceso de descontaminación que se lleva acabo en esta Finca.

El sistema de humedales artificiales para descontaminación de aguas presenta 4 lagunas, las mismas que tienen un área total de 3276,63 m² y una capacidad de almacenamiento de agua de 8349,10 m³. El área que representa cada laguna (1, 2,3 y 4) de oxidación es de 704,28 m², 840.3 m², 688,76 m² y 1043,29 m² respectivamente. Así, el perímetro para el orden respectivo de cada laguna es 126,14 m, 143,15 m, 118,10 m y 147,53 m. La capacidad de almacenamiento de agua en las lagunas se encuentra distribuido de la siguiente forma: 889,96 m³, 2367,07 m³, 2152,94 m³ y 2939,28 m³ respectivamente

**HUMEDAL
DE LA
FINCA
PECUARIA
INTEGRADA**



**ENTRADA AL
CAMPUS**

Figura 9. Localización del humedal de la Finca Pecuaria Integrada en el campus de la Universidad EARTH. (Disponible en www.earth.ac.cr/esp/mapa/)



LECHERIA



Biodigestor



Canaletas



Laguna 1 del Humedal artificial



PORQUERIZA



Biodigestor



Canaletas



Laguna 2 del Humedal artificial

Figura 10. Descripción del Sistema de Descontaminación Productiva del Humedal de la Finca Pecuaria Integrada.

5.3. Lugar de muestreo

Las muestras son colectadas, de las cuatro lagunas que componen el humedal artificial de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH (Figura 11).



Laguna 1



Laguna 2



Laguna 3

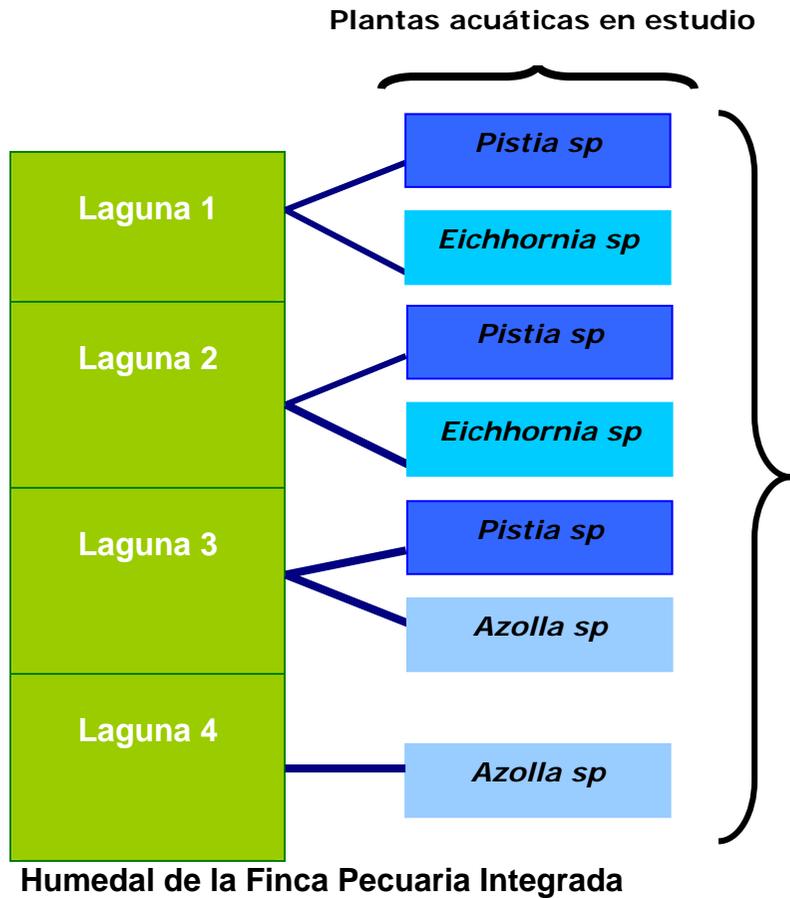


Laguna 4

Figura 11 . Lagunas que conforman el humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.

METODOLOGIA

LUGAR Y TOMA DE MUESTRAS



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

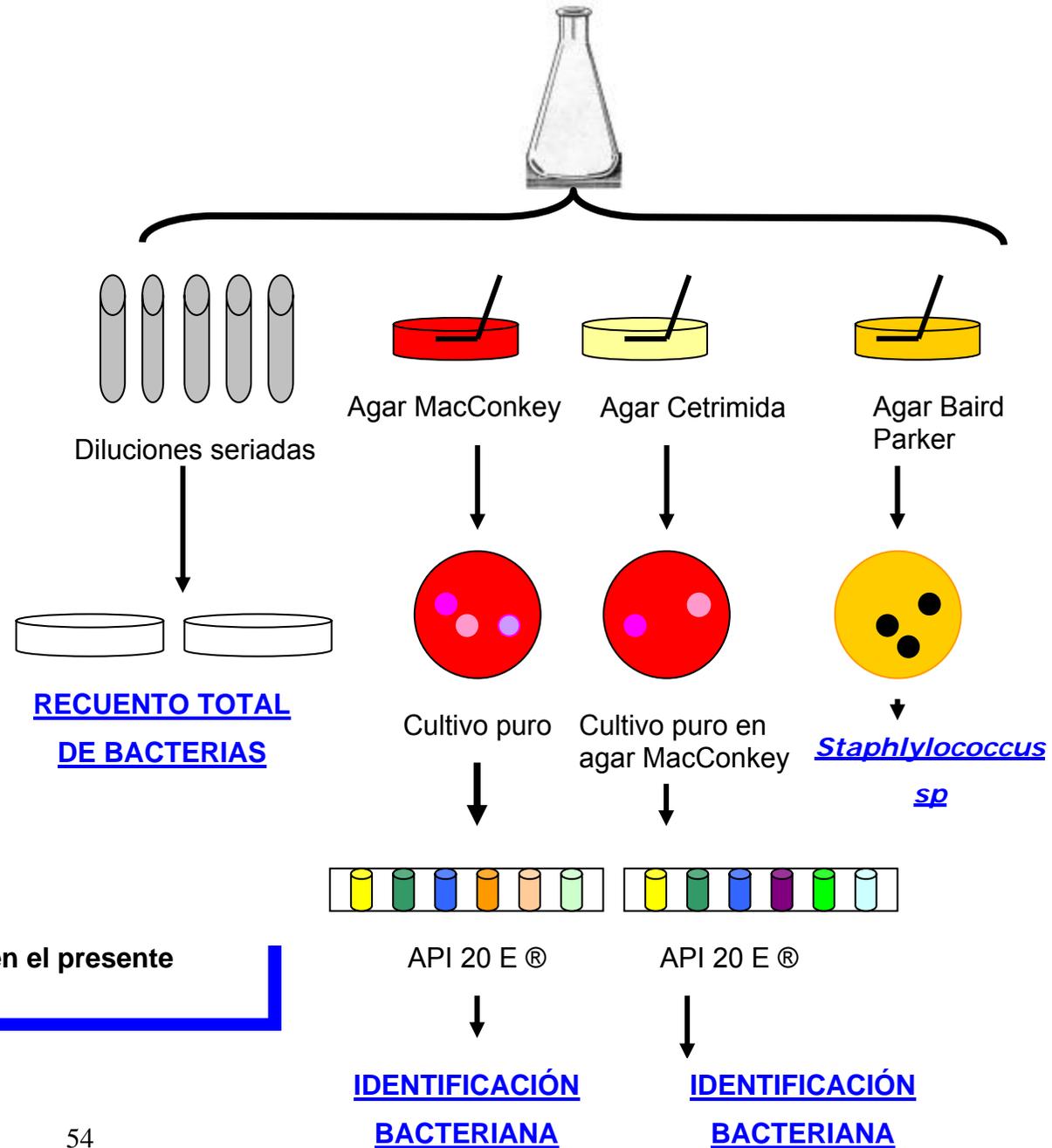


Figura 12 . Esquema general de la metodología a seguir en el presente estudio

5.4. Muestra de plantas acuáticas

Debido a la densidad de población de las diferentes plantas acuáticas que habitan en las diferentes lagunas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada, se tomaron como muestras para el proyecto los géneros que corresponden a *Eichhornia sp*, *Pistia sp* y *Azolla sp*.(En el cuadro 3 se especifica, las especies tomadas de cada laguna del humedal)

Otra de las razones de la escogencia de *Eichhornia sp* y *Pistia sp* es debido a que éstas plantas se encuentran en al menos el 50% de las lagunas que conforman el humedal mientras que *Azolla sp* también fue escogida por la población casi del 100 % dentro de una sola laguna del humedal (Laguna 4). La figura 13, esquematiza la distribución de las plantas acuáticas dentro del humedal.

El siguiente cuadro muestra la escogencia de plantas acuáticas establecida para los análisis microbiológicos posteriores en cada una de las lagunas que conforman el humedal en estudio.

Cuadro 3. Especies de plantas acuáticas tomadas de las diferentes lagunas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH.

Número de Laguna	Plantas acuáticas
Laguna 1	<i>Eichhornia sp</i> y <i>Pistia sp</i>
Laguna 2	<i>Eichhornia sp</i> y <i>Pistia sp</i>
Laguna 3	<i>Pistia sp</i> y <i>Azolla sp</i>
Laguna 4	<i>Azolla sp</i>

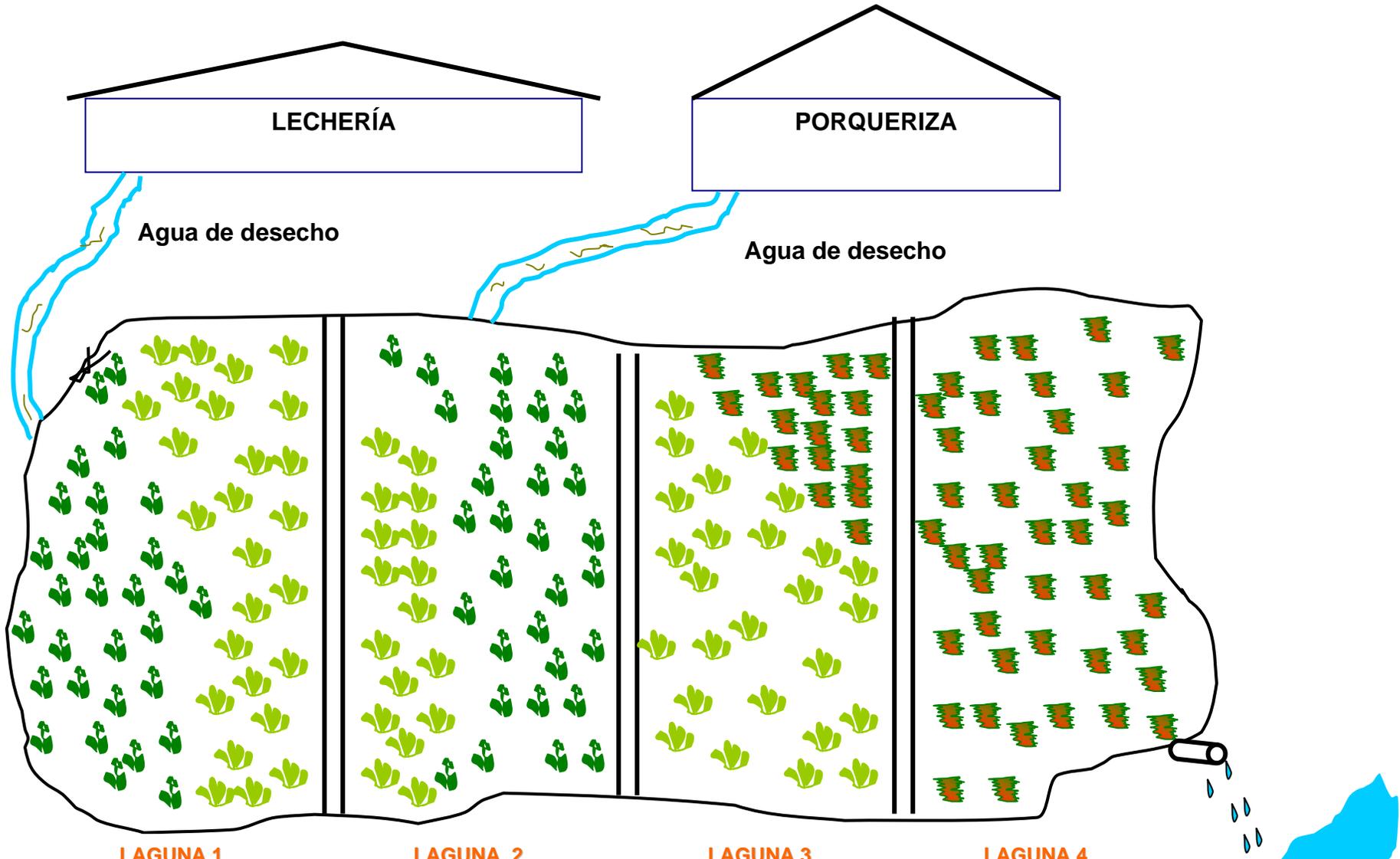


Figura 13. Distribución de las plantas acuáticas en estudio en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada

Simbología

-  = *Eichhornia sp*
-  = *Pistia sp*
-  = *Azolla sp*

5.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

5.5.1. Preparación de medios de cultivo.

1. Se pesó la cantidad requerida de agar y se depositó en un erlenmeyer. Se añadió la cantidad de agua destilada según la cantidad de medio de cultivo que se requería hacer.
2. Se calentó el medio agitando el erlenmeyer periódicamente para evitar que el medio que no se haya disuelto, se quemara. Se debe tener cuidado ya que el medio puede ebulir muy rápido, provocando la pérdida de cierta cantidad de medio.
3. Se observó si en las paredes habían grumos de Agar, si era así, se seguía calentando hasta su eliminación.
4. Una vez disuelto todo el agar, se tapaba el erlenmeyer con algodón y papel aluminio, y se esterilizaban en autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Finalizado el tiempo de esterilización, se dejaba enfriar el erlenmeyer hasta que llegara a una temperatura de 48°C.
6. Se agitó el recipiente para homogenizar el agar.
7. Se distribuyó 20 ml del medio preparado por placa petri estéril.
8. Se tapaban las placas petri y se dejaban en reposo hasta que solidificara el agar (aproximadamente 15 min).

5.5.2. Preparación de la muestra.

1. Se pesaron 5 gramos de raíces de cada una de las especies de plantas acuáticas en estudio.
2. Se maceró el tejido vegetal con la ayuda de un mortero y pistilo estériles por 5 minutos.
3. Posteriormente se colocó el material macerado en un erlenmeyer con 50 ml de agua peptonada.
4. Se agitó por aproximadamente 15 min en un agitador mecánico

5.5.3. Recuento bacteriano aeróbio mesofílico heterótrofo

1. Una vez finalizado el tiempo de agitación se procedió a preparar diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}) en agua peptonada conteniendo 9 ml por tubo.
2. Se tomó 1ml de cada dilución y se colocó en una placa de Petri estéril.
3. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 48 horas.
4. Transcurrido el tiempo de incubación, se reportaron la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g).

5.5.4. Aislamiento en medios diferenciales.

1. Se prepararon 2 placas por muestra de los siguientes medios diferenciales (Anexo 27, 28 y 29):
 - MacConkey
 - Agar Cetrimida
 - Agar Baird Parker (Al utilizar este medio se agregó previamente yema de huevo con Telurito de Potasio con técnica aséptica).
2. Se Tomó 0.1 ml de la dilución de 10^{-1} y 10^{-3} realizada anteriormente y se colocó sobre la superficie de los medios mencionados.
3. Se esparció el líquido con la ayuda de una espátula de digalysky sobre toda la superficie del Agar.
4. Se incubó las muestras a temperatura ambiente por 48 horas.

5.5.5. Técnica de cultivo puro

1. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se determinaron los diferentes morfotipos de las colonias crecidas en los medios MacConkey y Cetrimida.
2. De cada morfotipo, se tomó una asada de una colonia y se colocó en un medio nuevo de cultivo MacConkey.
3. La colonia se colocó cerca de la pared del plato y se distribuyó (en forma de rayas) hasta la mitad del plato.

4. Se esterilizó el asa y se dejó enfriar.
5. Se rotó la placa 45° y se inclinó lo suficiente para observar la zona que se rayó con anterioridad. El inóculo se volvió esparcir tratando de ingresar a la zona rayada unas tres veces y haciendo nuevamente unas 10 rayas.
6. Se giró la placa nuevamente y se volvió a rayar tratando de introducir el asa unas tres veces en la última zona rayada.
7. Se incubaron las placas a temperatura ambiente por 48 horas.
8. Después de finalizado el tiempo de incubación se corroboró que las colonias aisladas fueran diferentes entre ellas.

5.6. Identificación bacteriana

5.6.1. Identificación de colonias crecidas en Agar Baird Parker.

1. Al finalizar las 48 horas de incubación se determinó las colonias negras brillantes que son características de *Staphylococcus sp.*

5.6.2. Identificación de las colonias aisladas en medio de cultivo Agar MacConkey y Cetrimida.

1. Para la identificación de las colonias que estaban en cultivo puro se utilizó el API 20E, para esta parte del procedimiento cada colonia debía tener entre 18 –24 horas de cultivo.

5.7. Uso del sistema de identificación API 20E

5.7.1. Preparación de la galería

1. Se montó el fondo y tapa de una cámara de incubación y se repartió aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.

2. Se inscribió la referencia de la cepa bacteriana en la lengüeta lateral de la cámara (no se inscribió sobre la tapa, ya que puede quedar desplazada durante la manipulación).
3. Se sacó la galería del envase.
4. Se colocó la galería en la cámara de incubación.

5.7.2. Preparación del inóculo

1. Con el asa bacteriológica se extrae una sola colonia bien aislada procedente del Agar McConkey (Utilizar cultivos jóvenes de 18 a 24 horas).
2. Se realizó una suspensión bacteriana (0.5 McFarland) homogenizando cuidadosamente las bacterias en el medio.
3. La suspensión se utilizó inmediatamente después de su preparación.

5.7.3. Inoculación de la galería

1. Se llenaron los tubos y las cúpulas de los ensayos CIT, VP, GEL, con la suspensión bacteriana, utilizando una micropipeta.
2. Se llenaron los tubos (no las cúpulas) de los otros ensayos.
3. Se creó anaerobiosis en los ensayos ADH, LDC, ODX, HS, URE llenando su cúpula con aceite de parafina.
4. Se cerró la cámara de incubación
5. Se dejaron en incubación a 36°C durante 18 a 24 horas.

5.7.4. Lectura e interpretación de la Galería

- Después de la incubación, la lectura de la galería se hizo remitiéndose a parámetros ya establecidos (Cuadro 4):

Cuadro 4. Pruebas y resultados al aplicar un inóculo bacteriano a una galería del API 20 E.

Tests	Componentes activos	Resultados	
		Negativo	Positivo
ONPG	2-nitro-fenil-D galactopiranosida	Incoloro	Amarillo (1)
ADH	L-arginina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
CIT	Citrato trisódico	Verde pálido/ amarillo	Azul-verde/azul (3)
HS	Tiosulfato sódico	Incoloro/grisáceo	Depósito negro
URE	Urea	Amarillo	Rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	Amarillo	Marrón/rojizo
IND	L-triptófano	Incoloro, verde pálido/ amarillo	Rosa
VP	Piruvato sódico	Incoloro	Rosa/rojo
GEL	Gelatina (origen bovino)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	Azul/azul verdoso	Amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	D-sorbitol	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	L-ramnosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	D-sacarosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	D-melibiosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	L-arabinosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
OX		Azul/azul verdoso	Amarillo

(1) Un color amarillo también implica resultado positivo

(2) La aparición de color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa.

(3) Lectura de la cúpula (zona aerobia).

2. Para la lectura de los microtúbulos TDA, IND Y VP se deben de agregar, los reactivos TDA, James y VP1 Y VP2 que vienen en el sistema.

6. RESULTADOS

Al tomar las muestras de las diferentes lagunas, cada una de las plantas acuáticas presentaron diferentes características en su sistema radicular (Cuadro 5, 6 y 7).

Cuadro 5. Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el primer muestreo.

Planta	Apariencia física	Observaciones		
		Color	Presencia de mal olor	Longitud (cm)
Laguna 1				
<i>Pistia sp</i>	Consistencia viscosa, con lodo adherido	Negro	Sí	15
<i>Eichhornia sp</i>	Consistencia viscosa, con lodo adherido	Negro	Sí	8
Laguna 2				
<i>Pistia sp*</i>	Pelos radicales más limpios.	Amarillo/ Café	No	18
<i>Eichhornia sp</i>	Pelos radicales más limpios.	Café	No	10
Laguna 3				
<i>Pistia sp</i>	Totalmente limpias sin materia adherida	Café	No	35
<i>Azolla sp</i>	Raíces muy finas y limpias	Café	No	3
Laguna 4				
<i>Azolla sp</i>	Raíces muy finas y limpias	Café	No	4

* La distribución de esta especie en la laguna era menor que *Eichhornia sp* (Anexo 1)

Para el segundo muestreo las raíces de las plantas acuáticas en estudio presentaron las siguientes características físicas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el segundo muestreo.

Planta	Observaciones			
	Apariencia física	Color	Presencia de mal olor	Longitud (cm)
Laguna 1				
<i>Pistia sp</i>	Consistencia viscosa, con lodo adherido	Negro	No	16
<i>Eichhornia sp</i>	Consistencia viscosa, con lodo adherido	Negro	Sí	8
Laguna 2				
<i>Pistia sp</i> *	Pelos radicales más limpios.	Amarillo/ Café	No	13
<i>Eichhornia sp</i> **	Pelos radicales más limpios.	Negro	Sí	11
Laguna 3				
<i>Pistia sp</i>	Totalmente limpias sin materia adherida	Café	No	32
<i>Azolla sp</i> ***	Raíces muy finas y limpias	Café	No	2
Laguna 4				
<i>Azolla sp</i> ****	Raíces muy finas y limpias	Café	No	3.5

* La densidad sobre la laguna fue mayor a la del primer muestreo (Anexo 2)

**Las plantas presentaban una coloración rojiza y había mucho material vegetal muerto sobre la laguna (Anexo 3)

*** Las plantas tenían una coloración totalmente rojiza (Anexo 3)

****Plantas con coloración verde distinta a la de la misma especie en la laguna tres (Anexo 2)

Para el tercer muestreo las raíces de las plantas acuáticas en estudio presentaron las siguientes características físicas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características físicas de las raíces de las plantas acuáticas del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el tercer muestreo.

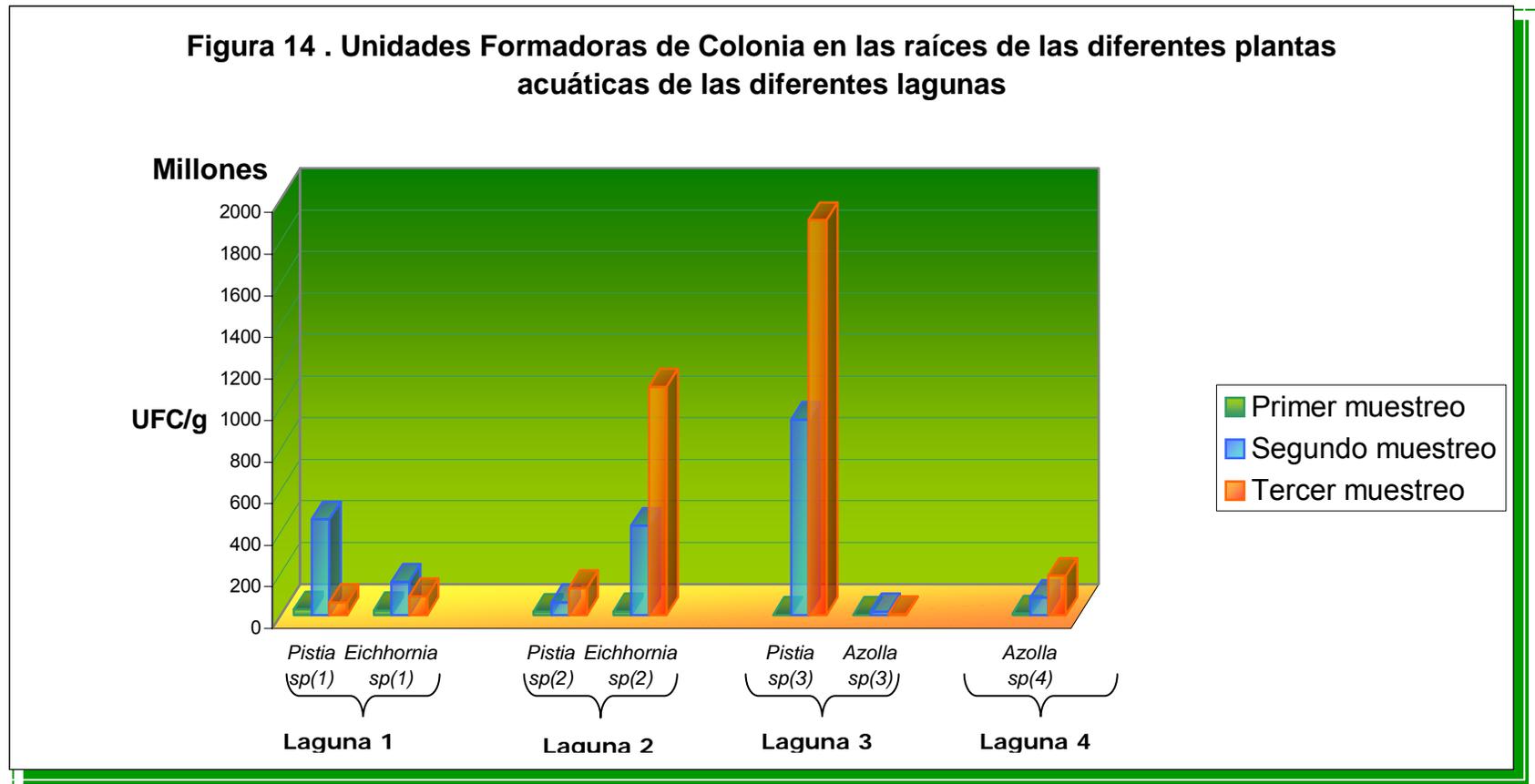
Planta	Observaciones			
	Apariencia física	Color	Presencia de mal olor	Longitud (cm)
Laguna 1				
<i>Pistia sp</i>	Viscosas con lodo adherido en toda la raíz	Negro	Sí	13
<i>Eichhornia sp</i>		Negro	Sí	7
Laguna 2				
<i>Pistia sp</i>	Raíces con lodo adherido pero en mayor cantidad que en la laguna anterior	Negro/ café	No	16
<i>Eichhornia sp</i>	Raíces con lodo adherido en mayor proporción que la laguna anterior	Negro/ café	No	9
Laguna 3				
<i>Pistia sp</i>	Raíces largas y limpias	Verde/ café	No	20
<i>Azolla sp</i>	Raíces finas y limpias	Negro/ café	No	
Laguna 4				3
<i>Azolla sp</i>	Raíces finas y limpias	Negro/ café	No	4.5

Al efectuar el análisis del Recuento Estándar Aeróbico Mesofílico Heterótrofo bacteriano a las muestras de las plantas acuáticas en estudio, se les determinó la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia que se encontraban por gramo de raíz (Cuadro 8)

Cuadro 8. Unidades formadoras de colonia (UFC) encontradas en las raíces de las distintas plantas para los diferentes muestreos.

Muestra	I Muestreo (UFC)/g	II Muestreo (UFC)/g	III Muestreo (UFC)/g	Promedio
Laguna 1				
<i>Pistia sp</i>	2.7×10^7	4.6×10^8	6.2×10^7	1.8×10^8
<i>Eichhornia sp</i>	2.3×10^7	1.6×10^8	9.1×10^7	9.1×10^7
Laguna 2				
<i>Pistia sp</i>	$1,6 \times 10^7$	6.3×10^7	1.3×10^8	7.0×10^7
<i>Eichhornia sp</i>	1.7×10^7	4.3×10^8	1.1×10^9	5.2×10^8
Laguna 3				
<i>Pistia sp</i>	1.5×10^7	9.4×10^8	1.9×10^9	9.5×10^8
<i>Azolla sp</i>	0.6×10^6	1.8×10^7	4.5×10^6	2.3×10^7
Laguna 4				
<i>Azolla sp</i>	0.8×10^7	8.3×10^7	1.9×10^8	9.4×10^7

La siguiente figura muestra la distribución de los resultados obtenidos al efectuar el Recuento Estándar a las diferentes raíces de las plantas acuáticas que habitan en las diferentes lagunas del humedal de la Finca Pecuaría Integrada.



* Dentro de cada paréntesis se especifica el numero de laguna correspondiente para las diferentes especies de plantas acuáticas.

El siguiente cuadro muestra los resultados obtenidos para la identificación de *Sthaphylococcus sp* en el medio de cultivo Baird Parker para los tres muestreos.

La presencia de *Sthaphylococcus sp*, se determinó observando las colonias negras y brillantes crecidas en el medio antes mencionado, algunas presentaban halos (característicos de *Sthaphylococcus aureus*) (Figura 15)

Cuadro 9. Presencia de *Sthaphylococcus sp* en la superficie de las raíces de las diferentes plantas acuáticas para los diferentes muestreos.

Muestra	I MUESTREO	II MUESTREO	III MUESTREO
Laguna 1			
<i>Pistia sp</i>	√	√	X
<i>Eichhornia sp</i>	√	√	X
Laguna 2			
<i>Pistia sp</i>	√	X	X
<i>Eichhornia sp</i>	√	X	X
Laguna 3			
<i>Pistia sp</i>	√	X	X
<i>Azolla sp</i>	√	X	X
Laguna 4			
<i>Azolla sp</i>	-----*	X	X

√: Presencia de *Sthaphylococcus sp*

X: Ausencia de *Sthaphylococcus sp*

* No se hizo lectura de esta placa.

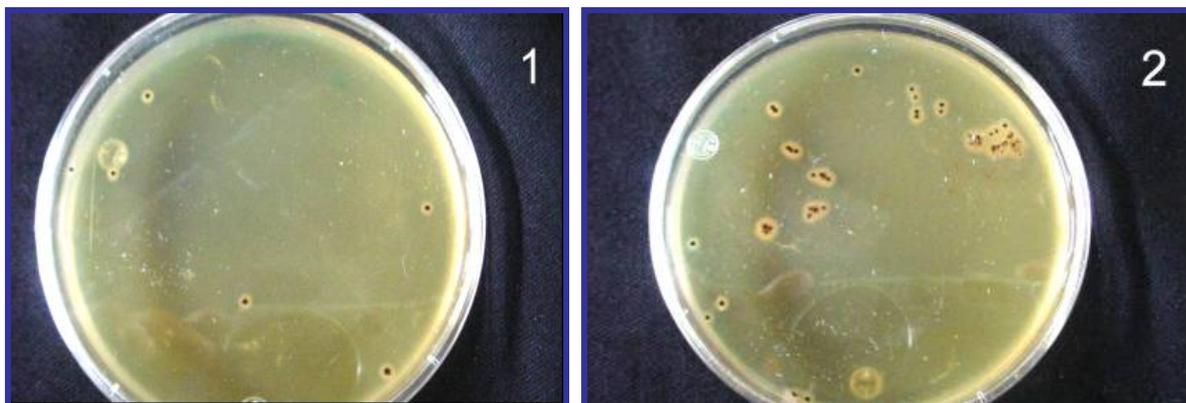


Figura 15. Fotografía de las colonias encontradas en el medio Baird Parker en 1- *Pistia sp* y 2- *Eichhornia sp* para el segundo muestreo.

Los diferentes géneros y especies bacterianos encontrados en las plantas acuáticas que habitan en la laguna 1 del humedal de la Finca Pecuaría Integrada para los diferentes muestreos se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 10. Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 1 del humedal de la Finca Pecuaría Integrada.

PLANTA	I MUESTREO Especie bacteriana	II MUESTREO Especie bacteriana	III MUESTREO Especie bacteriana
<i>Pistia</i> sp	<i>Morganella morganii</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Citrobacter braakii</i>
	<i>Citrobacter koseri/farmeri</i> <i>Kluyvera</i> sp	<i>Citrobacter braakii</i> <i>Klebsiella</i> sp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>
		<i>Pseudomonas fluorescens putida</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	
<i>Eichhornia</i> sp	<i>Pantoea</i> sp	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia fonticola</i>
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
	<i>Shigella</i> sp	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Klebsiella</i> sp
	<i>Pasteurella pneumoniae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	

Los diferentes géneros y especies bacterianas encontrados en las plantas acuáticas que habitan en la laguna 2 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para los diferentes muestreos se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 11. Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 2 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.

PLANTA	I MUESTREO Especie bacteriana	II MUESTREO Especie bacteriana	III MUESTREO Especie bacteriana
<i>Pistia sp</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Klebsiella sp</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pantoea spp2</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
	<i>Citrobacter sp</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
		<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Citrobacter youngae</i>
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	
<i>Eichhornia sp</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>
	<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Klebsiella sp</i>	

Los diferentes géneros y especies bacterianos encontrados en las plantas acuáticas que habitan en la laguna 4 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para los diferentes muestreos se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 12. Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 3 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.

PLANTA	I MUESTREO Especie bacteriana	II MUESTREO Especie bacteriana	III MUESTREO Especie bacteriana
<i>Pistia</i> sp	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter youngae</i>
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pantoea spp1</i>
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila gr.1</i>
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			<i>Klebsiella sp</i>
			<i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>Azolla</i> sp			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Pantoea spp2</i>
		<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pantoea spp3</i>
			<i>Chromobacterium violaceum</i>

Los diferentes géneros y especies bacterianos encontrados en las plantas acuáticas que habitan en la laguna 4 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada para los diferentes muestreos se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 13. Bacterias identificadas en las raíces de las plantas acuáticas localizadas en la laguna 4 del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.

PLANTA	I MUESTREO Especie bacteriana	II MUESTREO Especie bacteriana	III MUESTREO Especie bacteriana
<i>Azolla</i> <i>sp</i>	<i>Pantoea spp3</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pantoea spp2</i>
	<i>Pantoea spp2</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Klebsiella sp</i>
		<i>Klebsiella sp</i>	

La totalidad de especies bacterianas encontradas en los tres muestreos efectuados se detallan a continuación en el siguiente cuadro.

Cuadro 14. Total de especies bacterianas identificadas en el presente estudio.

Especies bacterianas encontradas		
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pantoea spp1</i>	<i>Pantoea spp2</i>
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Kluyvera sp</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Pantoea spp3</i>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	<i>Citrobacter sp</i>	

7. DISCUSIÓN

Los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes se basan en el hecho de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra (Rodríguez *et al*; 2000). Sin embargo, únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias en muestras ambientales son cultivables (Escalante *et al*; 2001).

Para explicar este fenómeno se podría decir que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural (Atlas y Bartha, 2002 y Escalante *et al*; 2001). Además, hay poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (Escalante *et al*; 2001).

Se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero con un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados, la base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas, y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables, por tanto, 90.0 a 99.9% de las bacterias no cultivables están representadas por su contraparte cultivable (Escalante *et al*; 2001)

En el presente estudio se realizó el recuento estándar en placas o recuento de aerobios mesofílicos heterótrofos, esencialmente se determinó el número de colonias que se desarrollaron cuando se sembró una cantidad determinada de raíz de planta acuática, en placas de agar de composición estándar preparadas bajo condiciones estipuladas. Cabe mencionar que este recuento no estipula todas aquellas bacterias con metabolismo anaerobio ni aquellas que requieren condiciones estrictas de cultivo para su crecimiento. La importancia de realizar este recuento de bacterias radica en que los resultados aportan información valiosa acerca del número total de bacterias

viables, y constituyen un recurso de evaluación para determinar el grado de exposición del agua a contaminación por materia orgánica (Botero *et al*; 2002).

Algunas de las limitaciones de el uso de esta técnica son, que puede impedir el crecimiento de ciertas bacterias que comúnmente se desarrollan en el ambiente acuático, ya que en el proceso de laboratorio no soportan el proceso de plaqueado, como lo mencionan Atlas y Batha (2002), hay ciertos grupos que mueren debido a que no toleran la temperatura requerida para mantener fundido el agar. Además que algunos medios de tipo general como el agar estándar, tiene concentraciones de nutrientes mucho mayores que las que se dan en ecosistemas naturales, por lo que pueden ser extremadamente tóxicas para algunas bacterias e impedir su crecimiento (Atlas y Bartha, 2002).

Al efectuar dicho recuento, los datos arrojados demuestran que no existe una tendencia establecida en el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo de raíz para los diferentes muestreos. Además, debido a la incertidumbre tan alta de este método no se pueden afirmar con certeza muchas variables ya que éstas pueden estar variando con el tiempo.

Para el caso de las plantas acuáticas que habitan en el humedal uno, se puede notar que para ambas plantas acuáticas en el segundo muestreo las UFC/g aumentaron para ambas especies y para el tercer muestreo tuvieron una disminución casi proporcional de lo que aumentaron en el muestreo previo. Si suponemos que para el segundo muestreo las unidades formadoras de colonia hubieran seguido aumentando significativamente podríamos decir que entre las razones por las cuales se pudo haber dado este aumento en el segundo muestreo radica, en que la carga de material de desecho que es sacado de la lechería para la época de muestreo fue mayor que la de los otros dos estudios, además cabe recalcar que las condiciones ambientales de la región donde se localizan las lagunas puede ser un factor que intervenga en los resultados ya que para los diferentes muestreos, la

lluvia en días previos pudo haber ocasionado que el movimiento de agua dentro de la laguna fuera mayor, por lo que la cantidad de bacterias que pudieron quedarse en las superficies de las raíces fueran menores que aquellas que estaban en un ambiente más léntico. Como se detallará más adelante en las diferentes muestras de las lagunas, en todos los casos (con excepción de la laguna uno) para el tercer muestreo hubo un aumento de UFC/g que en caso de haber demostrado una amplia diferencia significativa, los resultados se podrían relacionar con el factor lluvia ya que según información brindada por los trabajadores del lugar para la época de ese muestreo, las lluvias eran pocas y de baja intensidad en comparación a semanas anteriores.

Para el caso de esta misma laguna, se encontraron más UFC/g en *Pistia sp* que en *Eichhornia sp*, en el caso de haber mantenido una mayor diferencia significativa entre ambas partes, las razones del porqué se puede estar dando esta diferencia entre raíces de plantas diferentes en las mismas lagunas, puede ser debido a la cantidad de especies de macrófitas dentro de cada laguna. Como se puede observar en los Anexos 1, 2 y 4, para la laguna uno, siempre hubo una mayor cantidad de especies de *Pistia sp* en comparación de *Eichhornia sp*. Podríamos relacionar estos resultados con respecto a la depuración de aguas dentro del ecosistema, ya que al haber una mayor cantidad de bacterias aeróbicas heterótrofas, la posibilidad de que hayan mayor cantidad de bacterias que estén ayudando al proceso de depuración de aguas, también es mayor.

Para las muestras de raíces de las plantas de la segunda laguna, se puede observar como fueron aumentando las UFC/g en los diferentes muestreos, para el caso del segundo muestreo se muestra un aumento que si al igual que para la laguna uno, hubiera mantenido una gran diferencia significativa, los resultados podrían explicarse debido a que la cantidad de material desechado, en este caso por la porqueriza, haya sido mucho mayor y como esta laguna tiene su propia entrada de aguas de desecho pudo haber

sucedido que la cantidad de desechos que estuvieran entrando en la segunda laguna fueran mayor que los que estuvieran llegando a la primera laguna. Esta es una de las razones por la cuál se puede explicar, un aumento significativo de número de UFC/g entre las lagunas.

Según los resultados obtenidos, hay una mayor cantidad de UFC/g en raíces de *Eichhornia sp* comparado con la misma especie que habita en la laguna (*Pistia sp*), en caso de que estos resultados hubieran mantenido una relación significativa, concordaría con la hipótesis de que entre mayor sea la cantidad de individuos dentro de cada laguna, hay mayor probabilidad que la cantidad de bacterias asociadas a ellas aumente, tal y como se muestra en este caso donde como se puede observar en los Anexos 1,2 y 4 para la segunda laguna del humedal hubo una mayor densidad de individuos de *Eichhornia sp* que de *Pistia sp* y se puede observar como la población de *Pistia sp* va disminuyendo en cada muestreo, mientras que los individuos de *Eichhornia sp* van abarcando cada vez más área dentro de la laguna. Si los resultados hubieran mantenido hasta significancia podríamos deducir que la dinámica que se está dando en esta laguna los procesos mayoritarios de depuración de aguas se podrían estar estableciendo en áreas cercanas a *Eichhornia sp*. En el caso de la tercera laguna donde se comparan las UFC/g obtenidas tanto de muestras de *Pistia sp* como de *Azolla sp* se puede corroborar que también hay un aumento poco significativo en el número encontrado de estas unidades en ambas especies. En caso de que la diferencia entre ambas especies hubiera sido más amplia, para el caso de *Azolla sp* su distribución dentro de la laguna tres fue la menor proporción con respecto a las otras muestras en estudio, por lo que posiblemente a eso se deba que las proporciones mayores de UFC/g estuvieran dadas para *Pistia sp*. En esta laguna, *Pistia sp* abarcaba aproximadamente un 95% del total de la laguna, mientras que *Azolla sp*, abarcaba el 5% restante, un aspecto sobresaliente es que la distribución de esta especie fue disminuyendo con respecto a los diferentes muestreos y conforme la proporción iba disminuyendo la tendencia

de UFC/g aumentaba (aunque no fuera tan amplio) tal como lo que sucedió en la especie *Pistia sp* de la laguna dos, donde en el muestreo final habían muy pocas especies, pero los resultados arrojaron mayor cantidad de UFC/g con respecto a los dos anteriores muestreos. Cabe mencionar que la ubicación de las plantas de *Azolla sp*, era al final de la laguna tres cerca de la salida de agua hacia la laguna cuatro, por tal razón se decidió tomar las muestras de *Azolla sp* de la laguna cuatro de un punto medio de la laguna, para ver la dinámica que se estaba dando entre ambas lagunas.

Cabe resaltar que para las muestras que se tomaron de la laguna cuatro, se esperaba que los resultados fueran de pocas UFC/g con respecto a las demás lagunas y en especial con la laguna tres, ya que este es el último proceso por el que pasan las aguas de desecho de la Finca Pecuaria Integrada, pero sucedió lo contrario, los resultados arrojados demostraron que hay una mayor proporción de estas unidades formadoras de colonia por gramo de muestra de raíz, si estas proporciones hubieran mantenido una mayor diferencia significativa se podría relacionar a que en la laguna cuatro la especie *Azolla sp* era la única que se encontraba por lo que sus respectivas raíces eran las únicas superficies para adherirse dentro del sistema acuático.

Otro aspecto a tomar en cuenta es la coloración de las Azollas dentro de ambas lagunas (laguna 3 y 4), en el caso de la laguna 3, esta especie fue tomando una coloración rojiza más intensa en el transcurso de los diferentes muestreos (Anexo 3), está coloración como mencionan Lancar y Krake (2002) es sinónimo que todavía hay mucha contaminación en el sistema acuático. Para el caso de la laguna cuatro la especie tenía una coloración verduzca, que es sinónimo de baja contaminación, pero al efectuar el recuento como se indicó anteriormente para esta laguna los UFC/g fueron más altos que la laguna tres, si los resultados hubieran mantenido una diferencia significativa más marcada, una de las razones del porqué puede estar pasando esto, es que en la laguna cuatro puede que estén trabajando

las bacterias autóctonas mayoritariamente, que aquellas que vienen directamente con el agua residual. Según estos mismos autores la intensidad de luz que llegue al sistema también puede provocar tal coloración en las plantas por lo que no podríamos afirmar con tanta certeza las diferencias en contaminación.

Para los diferentes muestreos, las raíces de las plantas acuáticas presentaban diferentes características físicas que nos podrían ayudar a entender el porqué se podrían dar diferencias relevantes de UFC entre lagunas. Como se mencionó anteriormente las lagunas uno y dos en la mayoría de los muestreos presentaron los más altos promedios de UFC, por lo que presumiblemente se podría decir que la contaminación por materia orgánica dentro de éstas lagunas es mucho mayor, al ver los cuadros donde se detallan las características físicas de las plantas en estudio se observa como en al menos alguna de las plantas acuáticas de estos lugares presentaron mal olor, además de una apariencia muy sucia. Ambas características nos dicen que el grado de contaminación es alto y por ende la oxigenación es poca.

Con respecto a la longitud de la raíces (Cuadros 5, 6 y 7), se puede decir que presumiblemente en promedio las raíces que tuvieron mayor longitud en las diferentes lagunas como el caso de *Pistia sp* de la laguna tres, obtuvo los más altos índices de UFC, mientras que especies como *Azolla sp* que tuvo longitudes de raíz muy bajas, presentaron en promedio los índices de UFC/g más bajos. Aunque no se puede asegurar que la longitud de las raíces es un factor determinante ya que como se puede observar, para la laguna uno y dos, la tendencia entre plantas acuáticas cambia en algunos muestreos.

Con respecto a las bacterias identificadas dentro de cada especie de las diferentes lagunas, se encontraron diversidad de bacterias con diferentes metabolismos entre ellos un menor porcentaje de bacterias aeróbicas y en un porcentaje mayor bacterias con metabolismo facultativo.

Estos metabolismos diferentes permiten a las bacterias catalizar una amplia gama de sustancias dentro del ambiente acuático (Fontúrbel e Ibáñez, 2004). La importancia de los procesos aeróbicos dentro del humedal artificial estudiado radica en que en que estos procesos funcionan con una amplia gama de sustancias posibles de degradar en ciclos relativamente sencillos, estos procesos son comunes en especies bacterianas tales como algunas de las encontradas en el presente estudio, como por ejemplo las de los géneros que corresponden a la familia de las enterobacteriaceas tales como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Fontúrbel e Ibáñez, 2004). También se identificaron otros grupos como *Citrobacter* y *Serratia*, pero éstos no se encargan de la descomposición directa de la materia orgánica sino son simples acompañantes de estos procesos degradativos (Universidad de Granada, 2004).

La familia enterobacteriaceae está definida por un conjunto de características fenotípicas bioquímicas y fisiológicas que les permite adherirse a ciertas superficies para cumplir con su metabolismo determinado (Lennetech., 2005). Las bacterias que se asocian a las superficies de raíces de plantas acuáticas, lo hacen de una forma natural, ya que según estudios en ecología microbiana las bacterias en su medio natural se desarrollan formando comunidades de microorganismos embebidos en cualquier superficie ya sea viva o inerte mediante la excreción de exopolisacáridos, los cuales les permiten la adhesión (Lasa, 2005).

Cabe recalcar que muchos son los grupos bacterianos que pueden ser capaces de adherirse a las superficies de la raíces, ya que como menciona Lasa (2005), la capacidad de adherirse las bacterias a superficies vivas no está restringido a ningún grupo bacteriano y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de hacerlo, pero para efectos de nuestro estudio y por razones metodológicas el enfoque está guiado hacia la familia de las

enterobacteriaceas que de alguna forma pueden desempeñar dichas asociaciones y al mismo tiempo contribuir a la depuración de las aguas.

Como lo menciona Lasa (2005), en la adhesión de las bacterias a las raíces el componente mayoritario de estas comunidades es el agua, la asociación es muy poco sólida y presenta canales donde se da el flujo de agua, los nutrientes y el oxígeno.

Podríamos decir que unos de los factores dentro del ambiente acuático que permite a las bacterias la adhesión a la superficie de las raíces y que no permanezcan en suspensión dentro del ambiente planctónico, radica en que muchos de los géneros pertenecientes a las enterobacteriasceas tienen flagelos y fimbrias que les pueden ayudar en una adhesión primaria. Según Lasa (2005), los flagelos pueden permitir alcanzar las superficies dentro del agua y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas.

Sin embargo como se, entre los resultados obtenidos se encuentran bacterias gram-positivas no móviles como los estafilococos, por lo que podríamos decir que para las bacterias no es un requisito esencial el poseer esas estructuras especializadas(flagelos y fimbrias), para poder adherirse a las raíces.

Para el caso de los estafilococos Lasa (2005) sugiere que estas bacterias excretan ciertas proteínas de superficie que les permiten la adherencia a estos lugares dentro del agua.

A pesar que dentro de la familia de las enterobacteriaceas hay muchos géneros de importancia clínica, según las identificaciones realizadas a las muestras de las lagunas, se trató de establecer algunas de las funciones que podrían tener dentro de estos ecosistemas ya sea directamente en el proceso de tratamiento de las aguas o como agentes secundarios.

Para el caso del grupo identificado *Acinetobacter* sp, permite la eliminación de fosfatos del agua acumulando polifosfatos en los tejidos celulares, esta bacteria puede absorber una mayor cantidad de fosfatos de la que necesita para su síntesis celular (Lennetech, 2005)

El almacenamiento de polifosfatos hace que las *Acinetobacter* sean capaces de sobrevivir temporalmente en circunstancias anaeróbicas (Lennetech., 2005). Cuando las *Acinetobacter* residen en una zona anaeróbica en las aguas residuales, absorbe ácidos grasos y los almacena como sustancias de reserva, durante este proceso, los polifosfatos se descomponen para obtención de energía, haciendo que se liberen fosfatos en la zona aeróbica, cuando las *Acinetobacter* entran en la zona aeróbica absorben fosfatos y los almacenan lo que provoca que el contenido en fosfatos del agua residual disminuya (Lennetech, 2005). A pesar, que los principales procesos de eliminación del fósforo están atribuidos a este grupo, hay otros géneros bacterianos mayoritarios de agua dulce que permiten una eliminación exitosa de estos compuestos tales como *Aeromonas* y *Klebsiella* (IGME, 2002), los cuales fueron géneros encontrados repetitivamente en las diferentes muestras. Según Kadlec y Knigh (1995), el grupo de *Klebsiella* puede ayudar también en la fijación de nitrógeno dentro de los sistemas acuáticos. En el caso de *Aeromonas* fue uno de los grupos bacterianos encontrados mayoritariamente, tanto en las diferentes lagunas del humedal como entre distintas plantas acuáticas por lo que se podría mencionar que algunas de las funciones depuradoras dadas en el ecosistema se pueden estar llevando a cabo por este grupo de bacterias, aunque no se encontró literatura donde se detalle alguna función en específicos de estas bacterias dentro de ecosistemas acuáticos a pesar de que Montoto *et al* (2000) mencionan que este grupo de bacterias es muy común dentro de ambientes de aguas dulces o con baja concentración salina. Esta podría ser una de las razones de incidencia que se dio en las diferentes lagunas del humedal con respecto a este género bacteriano.

Las bacterias nitrificantes como *Pseudomonas* cumplen un papel muy importante en la depuración de aguas residuales ya que ellas reducen biológicamente los nitratos a nitrógeno en su forma gaseosa. Durante el proceso de reducción las bacterias transforman el nitrato a nitrito y éste en

óxido nítrico luego óxido nitroso y finalmente a nitrógeno gas que es liberado a la atmósfera (IGME, 2002).

El proceso de desnitrificación implica la transferencia de electrones entre un dador de electrones reducido a un aceptor de electrones oxidado (oxígeno, nitrito, nitrato, o sulfato), para llevar a cabo el proceso de desnitrificación estas bacterias requieren necesariamente esta fuente de carbono orgánico para oxidar, la cual es la materia orgánica presente en el agua residual (IGME, 2002). Como se puede observar en los resultados, en todas las lagunas hubo presencia de este género bacteriano, por lo que podríamos relacionar esta alta incidencia con procesos depurativos, ya que se puede deducir que *Pseudomonas sp*, esta trabajando simultáneamente en las cuatro lagunas.

Algunas especies de *Chromobacterium sp* debido a su metabolismo facultativo, pueden ayudar a los procesos de desnitrificación, mientras que en ausencia de oxígeno intervienen en procesos fermentativos (Universidad de Granada, 2004). Este corresponde a un género con alta incidencia en los diferentes muestreos para las diferentes macrófitas de las cuatro lagunas, la capacidad que tiene de vivir en condiciones óxicas como anóxicas, podría ser una de las razones de su alta incidencia además podríamos relacionarlo al igual que *Pseudomonas sp*, en la importancia de los procesos depurativos dentro del humedal artificial.

Un aspecto importante es que tanto en las lagunas 1 y 2 hubo alta incidencia de géneros de *Enterobacter sp* y *Pseudomonas sp*. Como lo menciona Opazo (1991), estos géneros anaerobios facultativos son comunes en la digestión de aguas dentro de biodigestores, y como se detalla en la metodología. para ambas lagunas hay un biodigestor previo donde llegan los desechos antes de ser depositados en las lagunas del humedal por lo que este factor estaría estrechamente relacionado con la alta incidencia de estos grupos para los diferentes muestreos.

Para el caso de los grupos que corresponden a *Enterobacter*, dentro de sistemas acuáticos varios autores en especial Kadlec y Knigh (1995), mencionan que la intervención de estas bacterias pueden estar ayudando a la fijación de nitrógeno.

Con respecto algunos grupos bacterianos tales como *Morganella*, *Providencia* y *Pantoea*, no se encontró literatura que los asocie con sistemas de depuración de sistemas acuáticos pero si son comunes en estos ecosistemas, como menciona Lasa (2005), estos grupos bacterianos tienen una extrema movilidad, por lo que debido a este hecho se puede explicar el porqué se encontraron tan pocas veces en los diferentes muestreos ya que debido a esta característica es más probable que se muevan dentro de la columna de agua antes de mantenerse adheridos o cerca de las raíces de alguna planta. Una de las características de estos grupos es que hay cepas patógenas que pueden causar infecciones tanto en el hombre como en los animales (Holt *et al*; 1994).

Para el caso de la identificación de *Staphylococcus sp* se puede observar que durante el primer muestreo, en todas las plantas acuáticas del humedal hubo la presencia de este género bacteriano, mientras que para el segundo muestreo solamente en las raíces de las macrófitas de la laguna uno, para el caso del muestreo tres los resultados arrojaron que en ninguna planta acuática se encontraba este género bacteriano.

La variabilidad que se muestra en la presencia de este grupo bacteriano en los diferentes muestreos, se podría deber a las características propias del género ya que al estar ausente de flagelos o fimbrias, podría provocar que en un leve aumento en el movimiento del agua se produzca una dispersión de los microorganismos, no permitiendo así que las bacterias puedan contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas que se producen en zonas cercanas a las raíces, desfavoreciendo su adhesión (Atlas y Bartha, 2002). Según estos mismos autores en ambientes acuáticos la proporción de

géneros Gram positivos que se desarrollan es muy baja y que son más comunes en ambientes terrestres.

Con respecto a las funciones depurativas de éste grupo bacteriano, Rodríguez *et al* (2000), mencionan que no son comunes en este tipo de actividades dentro del ambiente acuático ya que su importancia se ha centralizado más en la microbiología de alimentos.

8. CONCLUSIONES

- Las raíces de plantas acuáticas pueden servir de superficie para que las bacterias realicen sus actividades, pero no necesariamente tiene que haber una asociación mutualista entre ambas partes.
- Distintos grupos de bacterias dentro de sistemas acuáticos pueden ejercer funciones directas en la depuración de aguas residuales mientras que otras agrupaciones pueden que no intervengan en estos procesos.
- La longitud de las raíces de plantas acuáticas puede ser un factor importante en lo que se refiere a la adhesión de bacterias a estas estructuras.
- La cantidad de individuos de cada especie de macrófitas es un factor importante en la adhesión de los grupos bacterianos a las superficies de sus raíces.
- La laguna uno del humedal es la etapa más contaminada del sistema, por ello la gran cantidad de géneros identificados en comparación con las otras lagunas.
- Las condiciones lluviosas son un factor que puede limitar la adhesión de los grupos bacterianos a la superficie de las raíces.
- En las superficies radiculares de *Eichhornia sp* se encuentran mayor cantidad de géneros bacterianos.
- *Azolla sp* al ser una planta de ambientes acuáticos limpios, se encuentran menor cantidad de géneros bacterianos.
- El género bacteriano *Pseudomonas sp* podría ser uno de los grupos mas importantes dentro del humedal artificial, en lo que concierne a procesos depurativos.
- El grupo de las *Aeromonas sp* es un grupo de los más comunes dentro de ambientes acuáticos por lo que ha esta razón se puede deber la alta incidencia de este género en los diferentes muestreos.

- El género *Acinetobacter* sp podría estar interviniendo en procesos de eliminación de fosfatos en las cuatro lagunas del humedal artificial.
- El género *Chromobacterium* sp, corresponde a uno de los grupos con mayor incidencia en las diferentes lagunas.
- Existe una diversidad de especies del género *Citrobacter*, dentro de las cuatro lagunas del humedal artificial.
- A pesar de que algunos grupos bacterianos son de importancia clínica, en el ambiente acuático puede ser que para ese género bacteriano no corresponda la cepa patógena.
- Los métodos empleados para el cálculo del número de microorganismos, por técnicas de recuento, deber recuperar microorganismos vivos de las muestras ambientales, mantener su viabilidad y permitir su crecimiento en el laboratorio.
- En muestras ambientales y con los métodos de microbiología clásica sólo es posible cultivar e identificar una pequeña parte del total de microorganismos que componen estos ecosistemas.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario que en las diferentes lagunas del humedal se lleve un control estricto de la eliminación de plantas acuáticas cuando hay una sobrepoblación además se deben buscar posibles usos de éstas plantas, ya que la acumulación de material vegetal cerca de las lagunas no brinda un buen panorama estético al humedal.
- Se debe tomar importancia a los desechos que están siendo tratados en el Sistema de Descontaminación Productiva, con el fin de que los materiales o químicos que utilicen tanto dentro de la lechería como en la porqueriza no vayan a influir negativamente en el desarrollo de la flora microbiana que sea importante en la depuración de aguas.
- En el laboratorio es preferible que las muestras se monten en un periodo no mayor a las 24 horas con el fin de que los datos sean representativos y evitar así la muerte de algunas bacterias.
- Para el recuento estándar de bacterias aeróbicas mesofílicas heterótrofas, se recomienda la utilización del método de vaciado en placa ya que permite un mejor conteo de colonias además se evita el crecimiento de algunos grupos bacterianos que son comunes en muestras ambientales, los cuales pueden producir swarming el cual dificulta el conteo.
- Es conveniente que las colonias bacterianas aisladas se purifiquen al menos dos veces en medios de cultivo nuevos para evitar contaminación con otras bacterias.
- Es recomendable que cuando se establezca el aislamiento de bacterias en medios diferenciales se estandarice muy bien la concentración del inóculo, ya que a diluciones muy concentradas el aislamiento de las diferentes colonias se hace muy complicado.

- Puede resultar eficaz el uso del APIstaph para el caso de la identificación de las bacterias que presumiblemente correspondan a *Staphylococcus sp* y *Staphylococcus aureus*.
- Se podría hacer uso de métodos moleculares para facilitar la identificación de grupos bacterianos específicos.

10. LITERATURA CITADA

- Aguilar, G. 1996. Guía de procedimientos para el manejo de humedales en Costa Rica. 1 ed. UICN (Unión Mundial para la Naturaleza). San José, CR. 70 p.
- Álvarez S. 2005. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. Revista Científica y Técnica de ecología y medio ambiente. Ecosistemas. Disponible en:http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=118&Id_Categoria=2&tipo=portada. Visitado: 8 agosto, 2005.
- Ammour, T; Imbach, A; Suman, D; Windevoxhel, N. 1999. Manejo productivo de Manglares en América Central. CATIE, Turrialba, CR. 364 p.
- Ansola, G. y De Luis, E. 1994. Concentración de nutrientes en helófitos acuáticos utilizados en depuración de agua residual. Limnética. 10 (1): 33-36.
- Atlas, R y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación. S.A. Madrid, España 677pp.
- Barbier E; Constanza R; Twilley R. 1991. Lineamientos para la evaluación de humedales tropicales. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Proyecto Conservación para el Desarrollo Sostenible en América Central. 63 pp.- Informe Técnico.
- Botero, L; Zambrano, J; Oliveros,C; León, D; Sarcos, M; Martínez, M. 2002. Calidad microbiológica del agua de un sistema de lagunas de estabilización a ser empleada en irrigación. Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental. Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela. 12pp.
- Camacho, M. 1981. Utilización de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) para el tratamiento de aguas residuales. Universidad de Costa Rica. Proyecto de Graduación. San José, Costa Rica.97 pp.

- Cappato, J Peteán, J. 2002. Humedales y su importancia. Fundación Amigos de la Tierra. Buenos Aires, Argentina. Disponible en <www.proteger.org.ar>. Consultado 25 de julio, 2005.
- Chará, J. 1994. La acuacultura, una alternativa para descontaminar y producir. Memorias del III Seminario Internacional: Desarrollo Sostenible y Sistemas Agrarios. Cali, Colombia. pp 165-178.
- Chambers, N; Oshant, T. 2004. Plantas invasoras del desierto Sonorense. Sonoran Institute y Environmental Education Exchange. Disponible en <http://www.sonoran.org/programs/pdfs/invasive_plants_sp.pdf>. Consultado: 26 setiembre, 2005.
- Convención de humedales. 2000. Notas informativas sobre los valores y las funciones de los humedales. Día Mundial de los Humedales Ramsar. Disponible en <http://www.ramsar.org/info/values_sediment_s.htm>. Consultado: 16 agosto, 2005.
- Crow, G. 2002. Plantas acuáticas del Parque Nacional Palo Verde y el Valle del Río Tempisque. INBIO. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. 294 pp.
- Dugan, P. 1992. Conservación de Humedales: un análisis de tema de actualidad y acciones necesarias. UICN (Unión Mundial para la Naturaleza). Gland, Suiza. 100 p.
- Ecological Society of America. 2003. Tópicos en ecología. Ecosistemas de agua dulce sustentables. Numero 10. Volumen 2.
- Escalante, A; Gosset, G; Martínez, A y Bolívar, F.2001. Diversidad bacteriana del suelo y el agua: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. UNAM.10 pp.
- Espinoza, Y; Gutiérrez, R. 2002. Variabilidad intraespecífica de *Azolla fuliculoides* colectadas en Venezuela. Instituto de Investigaciones en Recursos Agroecológicos. INIA. Aragua, Venezuela.12 pp.

- Flores, E. 1999. La planta estructura y función. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 884pp.
- Fontúrbel, F; e Ibáñez, C. 2004. Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. Disponible en <http://www.biologia.org/?pid=5000&page=0&id=85>. Consultado: 9 noviembre, 2005.
- Gerritsen, J. & H. Greening. 1989. Marsh seed banks of Okefenokee Swamp: Effects of hydrologic regime and nutrients. *Ecology* 70: 751 - 763.
- Goavere, G. 1994. Sistemas de plantas acuáticas. Tecnología para la recuperación de ríos. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. 78 pp.
- Grant, W; Long, P. 1989. Microbiología ambiental. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 298 pp.
- Gutiérrez, R; Garcés, K. 2002. Caracterización de las plantas acuáticas del sistema de descontaminación productivo de aguas servidas en la Finca Pecuaria Integrada de la Universidad EARTH. Proyecto de Graduación. Guácimo, Costa Rica. 135 pp.
- Hidalgo, J; Junod, J; Sandoval. M. Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. Facultad de Agronomía. Departamento de suelos. Universidad de Concepción. Chile. 9 pp.
- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J; Williams, S. 1994. *Bergeys Manual of determinative bacteriology*. William & Wilkins Editor. 9th edition. 787 pp.
- Instituto Geológico y Minero de España (IGME). 2002. Hidrogeología y Aguas Subterráneas. La depuración de aguas residuales urbanas de pequeñas poblaciones mediante infiltración directa en el terreno. Los métodos naturales de depuración de aguas residuales urbanas. Madrid, España. Disponible en: <www.igme.es> Consultado 22 de noviembre, 2005

- Jaqueja, X. 2004. Evaluación y lineamientos de restauración fitosociológica de los humedales de la cuenca del Río Budi, Región de la Arucania. Tesis Lic. Temuco, Chile. Universidad Católica de Temuco.
- Johnston, C.A., 1991. Sediment and Nutrient Retention by Freshwater wetlands: Effects on Surface Water Quality. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21 (5, 6): 491- 565.
- Kadlec, R y Knight, R. 1995. Treatment wetlands. University of Michigan and Wetland Management Services. 893 pp.
- Lancar L y Krake. K. 2002. International Commission on Irrigation and Drainage. Aquatic weeds and their management. Australia. 65 pp.
- Lasa, I. 2005. Biofilms bacterianos. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. 5pp.
- Lenntech, 2005. FAQ de la microbiología del agua. Disponible en < <http://www.lenntech.com/espanol/FAQ-microbiologiadel-agua.htm>>. Consultado: 9 noviembre, 2005.
- Luna, L. 1999. Caracterización biofísica del humedal de la lechería de la Universidad EARTH. Proyecto de Graduación. Guácimo, Costa Rica. 62 pp
- Madigan, M ; Martinko, J y Parker, J. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Prentice Hall. Madrid, España. 985 pp.
- Maier, R; Pepper, I; Gerba, C. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. Canada. 585 pp.
- Metcalf y Eddy Inn. 1995. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. McGraw-Hill/interamericana de España S.A. 1485 pp.
- Montero, V. 2003. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Ingeniería en Biotecnología. Prácticas de laboratorio de microbiología aplicada. 31 pp.

- Montoto, V; Galano, C; Carrió, C y Lovaina, P. 2000. Incidencia de *Aeromonas spp* en la provincia de Santiago de Cuba. Centro Provincial de Epidemiología y Microbiología. 5 pp.
- Nimukunda F; Botero, R; Yeomans, J y Cortés, G. 2004. Manual Para la Descripción y el Mantenimiento del Sistema de Descontaminación Productiva de las Aguas Residuales Provenientes de las Actividades. EARTH. Costa Rica. 24 pp.
- Pérez, M; Sanchez, S; Rojo, C. 2000. Función depuradora de los humedales II: Una revisión bibliográfica sobre el papel del sedimento. SEHUMED. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia. España. pp. 123-130.
- Ramsar, Convención de. 1971. Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional Especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas. Ramsar, 2.2.1971. modificada según el protocolo de París, 3.12.1982. 4 p.
- Rheinheimer, G. 1987. Microbiología de las aguas. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 298 pp
- Rodríguez, C; Díaz, M; Guerra, L; Hernández, J. 2000. Acción depuradora de las plantas acuáticas tratamiento de aguas residuales. Facultad de Ingeniería Química. Instituto Superior Politécnico. La Habana, Cuba. 11 pp.
- Rodríguez, E; Gamboa, M; Hernández, F; García, J. 2000. Bacteriología General: Manual de laboratorio. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. 263 pp.
- Rodríguez R; Julio, C; Palma, J. 2000. Valor nutritivo del repollito de agua (*Pistia stratiotes*) y su posible uso en la alimentación animal. Laboratorio de Recursos Acuáticos. Universidad de Oriente, Caicara del Orinoco. Venezuela. 10 pp.

- Rodríguez, L. 1984. Uso de jacinto de agua *Eichhornia crassipes* para la depuración de aguas contaminadas con cromo. Universidad de Costa Rica. Proyecto de Graduación. San José, Costa Rica. 36 pp.
- Rodríguez, R. 1995. Humedal Sistema de Tratamiento Natural de Aguas Residuales. Universidad de Costa Rica. Proyecto de Graduación. San José, Costa Rica. 86 pp.
- Rosales, E. 2002. Utilización de lagunas para el tratamiento de de remanentes de granjas porcinas. Centro de Investigación en Vivienda y Construcción (CIVCO). Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 25 pp.
- Ruiz, A. 2002. Calidad de las aguas servidas del sistema de descontaminación en la finca pecuaria integrada de la Universidad EARTH. Proyecto de Graduación. Guácimo, Costa Rica. 60 pp
- Smith, R; Smith, T. 2001. Ecología. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 642 pp.
- Tabilo, E. 1997. El beneficio de los humedales en América Central. El potencial de los humedales para el desarrollo. EUNA. Heredia. Costa Rica. 48pp.
- Ulate, E. 2002. Evaluación de un sistema de tratamiento terciario con plantas acuáticas mediante un modelo de laboratorio. Universidad de Costa Rica. Proyecto de Graduación. San José, Costa Rica. 113 pp.
- Umaña, 1989. Comportamiento de *Azolla filiculoides* bajo condiciones de invernadero. Tesis de graduación. Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. 71 pp.
- Universidad de Granada. 2004. Características del agua residual urbana. Variables microbiológicas. Disponible en <http://www.ugr.es/mita/introl.PDF>. Consultado 10-11-05
- Viquez, M. 1990. Crecimiento y producción de biomasa de *Azolla filiculoides* con tres dosis de fósforo bajo condiciones de invernadero. Tesis de

graduación. Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional.116
pp.

10. ANEXOS



Anexo 1. Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el primer muestreo.

1. Primera laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada
2. Segunda laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.
3. Tercera laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.
4. Cuarta laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.



Anexo 2. Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaría Integrada para el segundo muestreo.

1. Primera laguna del humedal de la Finca Pecuaría Integrada
2. Segunda laguna del humedal de la Finca Pecuaría Integrada.
3. Tercera laguna del humedal de la Finca Pecuaría Integrada.
4. Cuarta laguna del humedal de la Finca Pecuaría Integrada.



Anexo 3. Coloración rojiza presentado por *Eichhornia sp* y *Azolla sp* en la laguna 2 y 3 respectivamente, para el segundo muestreo.



Anexo 4. Estado de las diferentes lagunas en el humedal de la Finca Pecuaria Integrada para el tercer muestreo.

1. Primera laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada
2. Segunda laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.
3. Tercera laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada.
4. Cuarta laguna del humedal de la Finca Pecuaria Integrada

Anexo. 5. Características de las bacterias identificadas en los diferentes muestreos para el presente estudio.

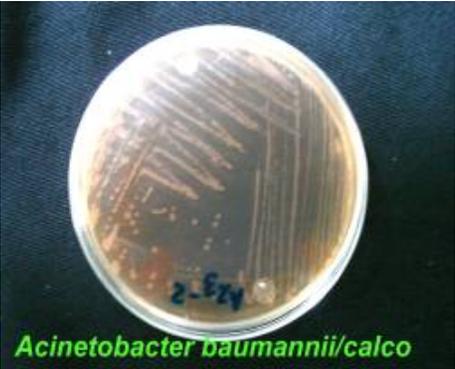
Especie bacteriana	Forma	Gram	Oxidasa	Lactosa	Descripción de la colonia
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Las colonias tenían una coloración rosado muy claro, presentaban al centro de la colonia una coloración mucho más oscura (morado).
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Colonias con coloración blanca, eran colonias grandes y opacas con borde regular
<i>Citrobacter braakii</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con el borde totalmente irregular, la coloración total de las colonias era naranja pero los bordes poseían diferentes tonalidades.
<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con el borde totalmente irregular, la coloración total de las colonias era naranja pero los bordes poseían diferentes tonalidades
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con el borde totalmente irregular, la coloración total de las colonias era naranja pero los bordes poseían diferentes tonalidades
<i>Citrobacter sp</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con el borde totalmente irregular, la coloración total de las colonias era naranja pero los bordes poseían diferentes tonalidades
<i>Citrobacter youngae</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con el borde totalmente irregular, la

					coloración total de las colonias era naranja pero los bordes poseían diferentes tonalidades irregular y blanco.
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Negativo	Colonias moradas brillantes y elevadas.
<i>Chryseomonas luteola</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Colonias translucidas con el borde muy poroso al colocar la placa hacia la luz tomaban una coloración café.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias rosado muy claro, con el borde irregular y poco brillantes
<i>Enterobacter asburiae</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Apariencia cremosa, el centro es un poco más oscuro, son muy brillantes. Colonias grandes
<i>Enterobacter cloacae</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con varias tonalidades en la colonia: una coloración externa incolora, una intermedia blanquizca y la parte interna con una coloración rosado-naranja.
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Colonias pequeñas, con coloración blanca con un punto oscuro al centro. Hacia la luz tiene un color verde.

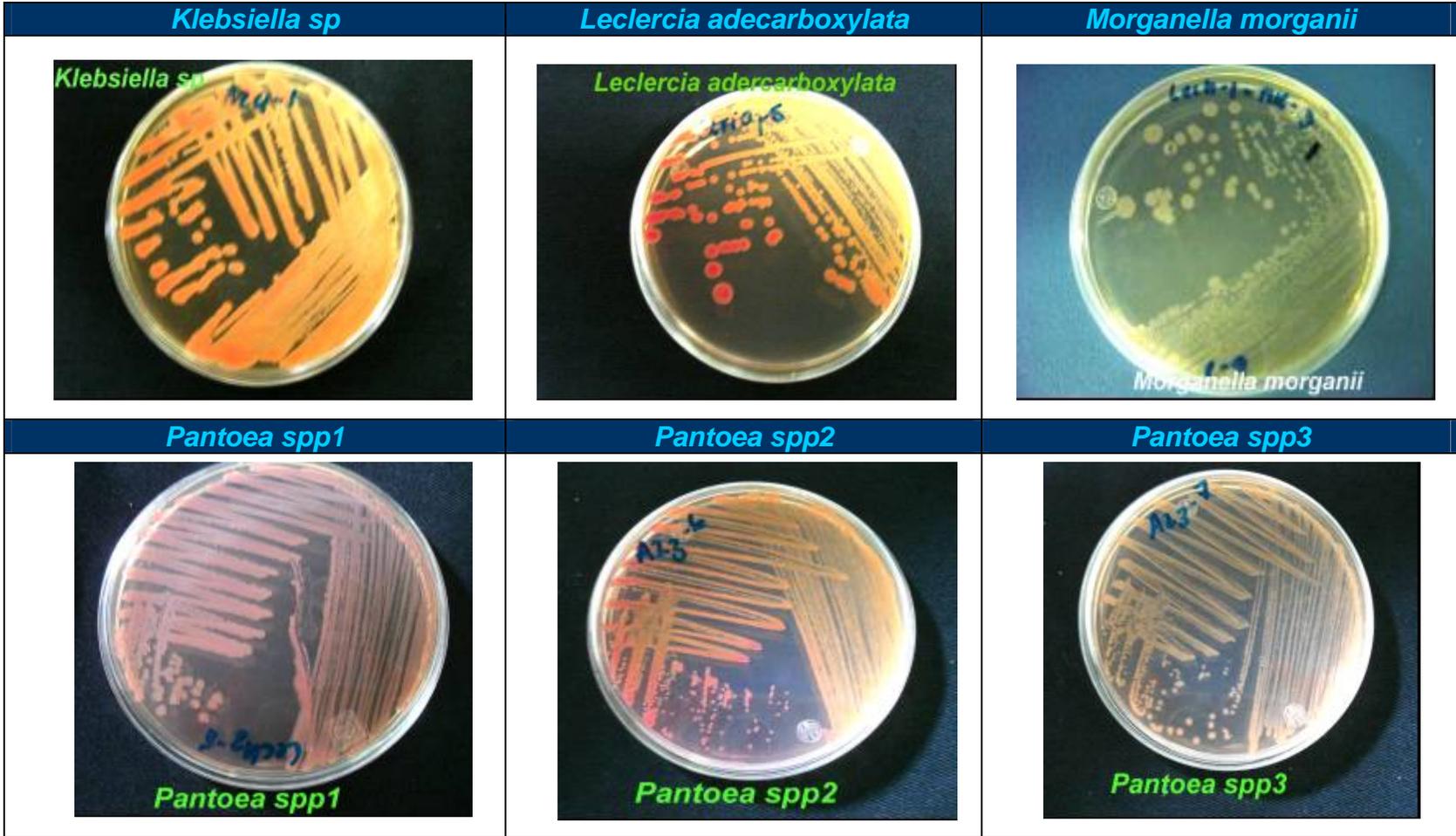
<i>Klebsiella sp</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con apariencia mucosa, tienen color rosado oscuro, brillosas elevadas y con el centro oscuro
<i>Kluyvera sp</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Las características no fueron tomadas
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias rosado oscuro, con el borde blanco y tienen el borde brillante.
<i>Morganella morganii</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Las características no fueron tomadas
<i>Pantoea spp1</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias brillantes cremosas, en algunas partes tiene coloración rosado y en otras amarilla
<i>Pantoea spp2</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias con color naranja, con el borde blanco y regular, son poco elevadas y brillantes.
<i>Pantoea spp3</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias color amarillo-naranja, poco brillantes con el borde irregular
<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias transparentes con un tono más oscuro al centro de tamaño muy pequeño.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Colonias con coloración blanca y hacia la luz tienen color verde claro y son brillosas.
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Colonias con coloración blanca y hacia la luz tienen color verde claro y son brillosas.

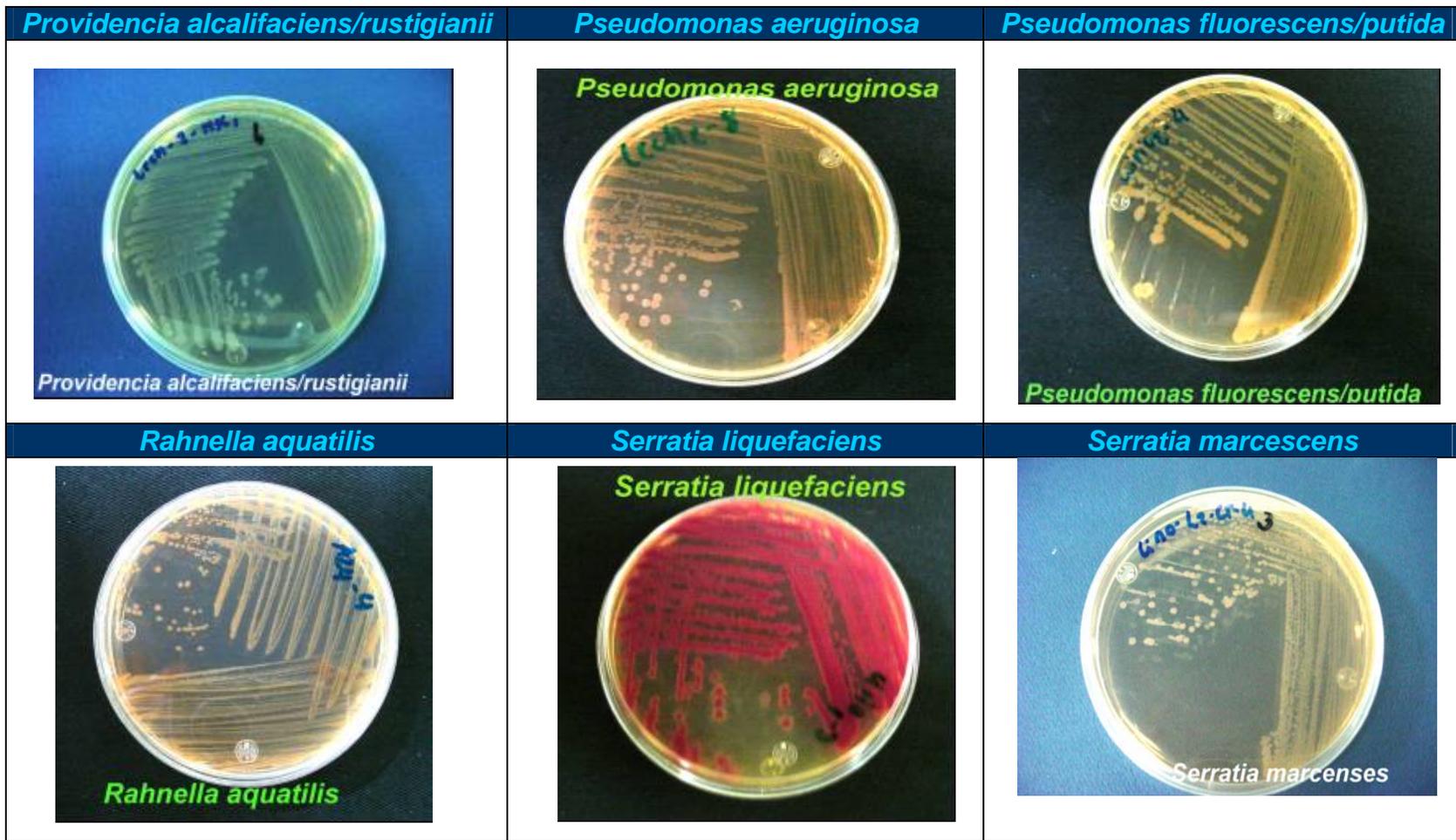
<i>Rahnella aquatilis</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias amarillas, brillantes poco elevadas y con el borde regular
<i>Serratia fonticola</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias grandes con el borde muy claro y son poco elevadas y brillantes.
<i>Serratia liquefaciens</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Colonias grandes con el borde muy claro (blanco) y son poco elevadas y brillantes.
<i>Serratia marcescens</i>	Bacilo	Negativo	Negativo	Positivo	Son colonias planas, con borde regular, tienden adheridas como diminutas colonias alrededor.

Anexo. 6. Fotografías de las bacterias identificadas en los diferentes muestreos para el presente estudio.

<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Citrobacter braakii</i>
 <p data-bbox="289 721 688 748"><i>Acinetobacter baumannii/calco</i></p>	 <p data-bbox="890 396 1234 423"><i>Aeromonas hydrophila</i></p>	 <p data-bbox="1482 396 1764 423"><i>Citrobacter braakii</i></p>
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	<i>Citrobacter sp</i>	
 <p data-bbox="491 1224 722 1252"><i>Citrobacter koseri</i></p>	 <p data-bbox="911 875 1142 902"><i>Citrobacter sp</i></p>	

<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
 <p><i>Chromobacterium violaceum</i></p>	 <p><i>Chryseomonas luteola</i></p>	 <p><i>Enterobacter aerogenes</i></p>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Flavimonas oryzae</i>
 <p><i>Enterobacter asburiae</i></p>	 <p><i>Enterobacter cloacae</i></p>	 <p><i>Flavimonas oryzae</i></p>





Serratia odorifera



Citrobacter freundii



Anexo 7. Código de identificación (biotipos) proporcionado por el sistema API® 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el primer muestreo.

Muestra	Especie bacteriana	Código de identificación(biotipos)
Laguna 1		
Pistia sp	<i>Morganella morganii</i>	0-170-000
	<i>Citro.kos/farmeri</i>	1-344-572
	<i>Kluyvera sp</i>	1-344-572
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-205-044
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-212-044
Eichhornia sp	<i>Pantoea sp</i>	1-205-773
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-305-573
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	0-200-040
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	5-305-573
	<i>Shigella sp</i>	0-040-100
	<i>Escherichia coli</i>	0-040-100
	<i>Past. pneumoniae</i>	0-040-100
Laguna 2		
Pistia sp	<i>Enterobacter asburiae</i>	3-304-723
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-200-044
	<i>Citrobacter sp</i>	-----*
	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	0-264-002
Eichhornia sp	<i>Serratia marcescens</i>	5-306-561
	<i>Serratia liquefaciens</i>	5-306-561
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0-200-044
	<i>Serratia marcescens</i>	5-317-561
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-304-573
	<i>Chryseomonas luteola</i>	2-204-042
Laguna 3		
Pistia sp	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2-206-024
	<i>Serratia marcescens</i>	5-317-361
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-247-107

	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0-204-042
Azolla sp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-206-044
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0-205-042
	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-205-044
Laguna 4		
Azolla sp	<i>Pantoea spp3</i>	1-204-332
	<i>Pantoea spp2</i>	1-245-163
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-305-573
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-304-563
	<i>Serratia odorifera</i>	5-245-753

Anexo 8. Código de identificación proporcionado por el sistema API® 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el segundo muestreo.

Muestra	Especie bacteriana	Código de identificación(biotipos)
Laguna 1		
Pistia sp	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	0-200-040
	<i>Citrobacter braakii</i>	3-744-573
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5-215-773
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-246-105
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-305-463
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-203-044
Eichhornia sp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5-215-773
	<i>Serratia liquefaciens</i>	1-307-563
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-047-127
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1-044-153
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0-202-000
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-203-044
Laguna 2		
Pistia sp	<i>Citrobacter koseri</i>	3-344-553
	<i>Pantoea spp2</i>	1-244-363
	<i>Serratia marcescens</i>	5-317-761
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-206-046
	<i>Chryseomonas luteola</i>	2-204-042
Eichhornia sp	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-247-104
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-202-004
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2-206-004
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-200-004
	<i>Citrobacter sp</i>	-----
Laguna 3		
Pistia sp	<i>Citrobacter freundii</i>	3-304-572
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6-247-105

	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-203-044
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-246-105
Azolla sp	<i>Klebsiella sp</i>	-----
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-304-573
	<i>Chryseomonas luteola</i>	1-201-000
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-202-004
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2-206-004
	Laguna 4	
Azolla sp	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-247-124
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0-207-042
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-304-573
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2-006-024
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-204-044
	<i>Klebsiella sp</i>	-----

Anexo 9. Código de identificación proporcionado por el sistema API® 20E, para las diferentes bacterias identificadas en el tercer muestreo.

Muestra	Especie bacteriana	Código de identificación(biotipos)
Laguna 1		
Pistia sp	<i>Citrobacter braakii</i>	1-744-553
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-202-000
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-305-763
	<i>Chryseomonas luteola</i>	2-206-002
	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	0-224-000
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-246-127
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-216-006
Eichhornia sp	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-246-127
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-246-127
	<i>Serratia fonticola</i>	5-304-743
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-304-573
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-202-044
Laguna 2		
Pistia sp	<i>Klebsiella sp</i>	-----
	<i>Enterobacter asburiae</i>	3-305-723
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-046-127
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-000-004
	<i>Citrobacter youngae</i>	3-604-513
	<i>Ebterobacter cloacae</i>	3-305763
Eichhornia sp	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0-204-042
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	5-305-773
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-201-004
	<i>Enterobacter sp</i>	-----

Laguna 3		
<i>Pistia sp</i>	<i>Citrobacter youngae</i>	1-604-513
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-246-127
	<i>Pantoea spp1</i>	1-004-161
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7-047-127
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-206-044
<i>Azolla sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	-----
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0-204-042
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3-305-573
	<i>Pantoea spp2</i>	1-245-163
Laguna 4		
<i>Azolla sp</i>	<i>Pantoea spp2</i>	1-245-773
	<i>Rahnella aquatilis</i>	1-205-573
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3-247-105
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	2-204-044

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS GENEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS (Holt *et al*; 1994).

Anexo 10. Características generales del género *Acinetobacter*.

Género: <i>Acinetobacter</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos con un diámetro de 0.5-2.5 μm y un largo de 1.5-2.5 μm .	
Movilidad	No móviles
Metabolismo	Aerobio, tienen un estricto sistema respiratorio donde el oxígeno es el aceptor final de electrones
Temperatura óptima de crecimiento	Todas las especies crecen entre 20-30°C, pero la temperatura óptima es de 33-35°C
Características generales	Comúnmente se encuentran en pares o en cadenas de variable tamaño, son oxidasa negativo, catalasa positivo, la D-Glucosa es el único carbohidrato utilizado por algunas especies
Hábitats comunes	Suelo y agua
Tipos de especies	<i>Acinetobacter/calcoaceticus</i>

Anexo 11. Características generales del género *Aeromonas*.

Género: <i>Aeromonas</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, con extremos redondeados, tienen apariencia esférica y poseen un diámetro de 0.3-1.0 μm y 1.0-3.5 μm de largo.	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de un solo flagelo polar (flagelos peritricos pueden formarse en medios sólidos)
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	La temperatura óptima de crecimiento es de 22-28°, algunas crecen bien a 37°C pero algunas especies no
Características generales	Comúnmente se encuentran en pares y pequeñas cadenas. Son oxidasa positivo y catalasa positivo y reducen nitratos
Hábitats comunes	Agua
Tipos de especies	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Anexo 12. Características generales del género *Chryseomonas*.

Género: <i>Chryseomonas</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, con bordes curvados.	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de 10-12 flagelos polares
Metabolismo	Aerobios, tienen un estricto sistema de respiración
Temperatura óptima de crecimiento	18-42°C
Características generales	Oxidasa negativo, catalasa positivo
Hábitats comunes	Se han encontrado en muchos ambientes, generalmente son saprofitos, que pueden ser ocasionalmente patógenos
Tipos de especies	<i>Chryseomonas luteola</i>

Anexo 13. Características generales del género *Chromobacterium*

Género: <i>Chromobacterium</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, de 0.6-09 µm de diámetro y 1.5-3.5 µm de largo.	
Movilidad	Utilizan un flagelo polar y usualmente de 1-4 flagelos laterales
Metabolismo	Anaerobios facultativos
Temperatura óptima de crecimiento	25°C
Características generales	Producen colonias moradas en medio sólido, tienen un metabolismo fermentativo, son oxidasa positivo, catalasa positivo e indol negativo.
Hábitats comunes	Son microorganismo de suelo y de ambientes acuáticos. Pueden producir serias infecciones en mamíferos, incluyendo a humanos.
Tipos de especies	<i>Chromobacterium violaceum</i>

Anexo 14. Características generales del género *Citrobacter*.

Género: <i>Citrobacter</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 1 µm de diámetro y 2-6 µm de largo.	
Movilidad	Mediante flagelos peritricos.
Metabolismo	Anaerobios facultativos.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	Son oxidasa negativo, catalasa positivo.
Hábitats comunes	La mayoría de estos géneros se han encontrado en heces de humanos y animales, diversos estudios demuestran que es un habitante natural del tracto intestinal.
Tipos de especies	<i>Citrobacter freundii</i>

Anexo 15. Características generales del género *Enterobacter*.

Género: <i>Enterobacter</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.6-1.0 µm de diámetro y 1.2-3.0 µm de largo	
Movilidad	Se movilizan mediante flagelos peritricos (excepto <i>E. Asburiae</i>)
Metabolismo	Anaerobios facultativos quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	30-37°C
Características generales	D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y gas
Hábitats comunes	Comúnmente distribuidos en la naturaleza, especialmente en agua fresca, suelo, vegetales y heces humanas. <i>E. cloacae</i> , <i>E. Sakasakii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. Agglomerans</i> y <i>E. Gergoviae</i> , son patógenos oportunistas, causan quemaduras, infecciones urinarias y meningitis.
Tipos de especies	<i>Enterobacter cloacae</i>

Anexo 16. Características generales del género *Klebsiella*.

Género: <i>Klebsiella</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.3-1.0 µm de diámetro y 0.6-6.0 µm de largo. Comúnmente se encuentran en pares o en cadenas pequeñas.	
Movilidad	No móviles
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	Son oxidasa negativo, catalasa positivo, reducen nitratos. La mayoría de las especies fermentan todo tipo de carbohidratos.
Hábitats comunes	Comúnmente se encuentran en heces humanas, suelo, agua, frutas y vegetales. La mayoría de las especies son parásitos oportunistas que pueden causar neumonía e infecciones urinarias.
Tipos de especies	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>

Anexo 17. Características generales del género *Kluyvera*.

Género: <i>Kluyvera</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.5-0.7 µm de diámetro y 2-3 µm de largo.	
Movilidad	Se movilizan mediante flagelos peritricos
Metabolismo	Anaerobios facultativos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de gas y ácidos. Oxidasa negativo, catalasa positivo, indol negativo y reducen nitratos. Fermentan la mayoría de carbohidratos.
Hábitats comunes	Comunes en comida, agua, suelo. Tienden afectar el tracto respiratorio, el tracto urinario. Son patógenos oportunistas.
Tipos de especies	<i>Kluyvera ascorbata</i>

Anexo 18. Características generales del género *Leclercia*.

Género: <i>Leclercia</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de flagelos peritricos
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de gas y ácidos, son oxidasa negativo, catalasa positivo Algunas especies producen un pigmento amarillo.
Hábitats comunes	Sangre, alimentos y agua
Tipos de especies	<i>Leclercia adecarboxylata</i>

Anexo 19. Características generales del género *Morganella*.

Género: <i>Morganella</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.6-0.7 µm de diámetro y 1.0 -1.7 µm de largo.	
Movilidad	Mediante flagelos peritricos
Metabolismo	Anaerobios facultativos.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	El swarming no ocurre en las bacterias que corresponden a este género. Son oxidasa negativo, catalasa positivo. Hidrolizan la ureasa y en su metabolismo no producen H ₂ S
Hábitats comunes	Se han encontrado estos géneros en restos fecales de humanos, perros y otra clase de mamíferos. Son invasores oportunistas secundarios, se han aislado del tracto respiratorio y del tracto urinario cuando hay infecciones.
Tipos de especies	<i>Morganella morganii</i>

Anexo 20. Características generales del género *Pantoea*.

Género: <i>Pantoea</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.5-1.0 µm de diámetro y 1-3 µm de largo	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de flagelos peritricos
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	30°C
Características generales	La mayoría de las especies producen un pigmento amarillo, son oxidasa negativo, catalasa positivo e indol negativo. Reducen nitratos.
Hábitats comunes	Superficies de plantas, semillas, suelo, agua, sangre y orina. Son patógenos oportunistas
Tipos de especies	<i>Pantoea agglomerans</i>

Anexo 21. Características generales del género *Providencia*.

Género: <i>Providencia</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.6-0.8 µm de diámetro y 1.5-2.5 µm de largo	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de flagelos peritricos. El swarming no ocurre en este género.
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	37°C
Características generales	D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y algunas especies producen gas. Son oxidasa negativo, catalasa positivo e indol positivo.
Hábitats comunes	Se han encontrado en infecciones urinarias, es un patógeno humano.
Tipos de especies	<i>Providencia alcalifaciens</i>

Anexo 22. Características generales del género *Pseudomonas*.

Género: <i>Pseudomonas</i>	
Este género corresponde a bacilos curvados gram negativos, tienen de 0.5-1.0 μm de diámetro y 1.5-5.0 μm de largo	
Movilidad	La movilidad la logran mediante uno o varios flagelos polares, raramente son no móviles. En algunas especies se forman flagelos laterales
Metabolismo	Aeróbicos, tienen un estricto sistema de respiración donde el oxígeno es el aceptor terminal de electrones, en algunos casos pueden utilizar nitrato, permitiendo el crecimiento anaerobio.
Temperatura óptima de crecimiento	30°C
Características generales	Muchas especies almacenan polihidroxibutirato como una reserva de carbono. No crecen en medios ácidos, son oxidasa positivo o negativo, catalasa positivo.
Hábitats comunes	Muy distribuidos en la naturaleza, algunos pueden ser patógenos para humanos, plantas y animales
Tipos de especies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Anexo 23. Características generales del género *Rahnella*.

Género: <i>Rahnella</i>	
Este género corresponde a bacilos pequeños gram negativos con un diámetro de 0.5-0.7 μm y un largo de 2-3 μm .	
Movilidad	Son no móviles a 36°C y son móviles con la ayuda de flagelos peritricos a 25°C
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	25-37°C
Características generales	Oxidasa negativo, catalasa positivo, la mayoría de las especies utilizan D-Glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácidos y gases
Hábitats comunes	Agua
Tipos de especies	<i>Rahnella aquatilis</i>

Anexo 24. Características generales del género *Serratia*.

Género: <i>Serratia</i>	
Este género corresponde a bacilos gram negativos, tienen de 0.7-1.5 µm de diámetro y 2-5 µm de largo	
Movilidad	Se movilizan con la ayuda de flagelos peritricos
Metabolismo	Anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, tienen ambos tipos de respiración y un metabolismo fermentativo.
Temperatura óptima de crecimiento	30- 37°C
Características generales	D-Glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con la producción de ácido y algunas especies producen gas. Son oxidasa negativo, catalasa positivo e indol negativo (excepto para <i>S. fonticola</i>). Reducen nitratos.
Hábitats comunes	Algunas son de importancia clínica, se pueden encontrar en el suelo, agua, superficie de plantas y otros ambientes diferentes, son comunes en el tracto respiratorio de insectos y roedores.
Tipos de especies	<i>Serratia marcescens</i>

Anexo 25. Características generales del género *Staphylococcus*.

Género: <i>Staphylococcus</i>	
Células esféricas gram positivas de 0.5-1.5 µm de diámetro,	
Movilidad	Son no móviles y no esporulados
Metabolismo	Anaerobios facultativos
Temperatura óptima de crecimiento	30-37°C
Características generales	Comúnmente no se encuentran agrupadas y tienen una coloración opaca
Hábitats comunes	Están asociados con la piel, las membranas mucosas, pero se ha aislado principalmente de comida y agua. Algunas especies son patógenos oportunistas
Tipos de especies	<i>Staphylococcus aureus</i>

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Baird Parker:

Medio base

Anexo 27. Componentes del medio de cultivo Baird Parker.

Compuesto	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Glicina	12 g
Piruvato de Sodio	10 g
Cloruro de Litio	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	950 ml
PH final	7.0 ⁺ .2

Enriquecimiento:

Fuente: (Rodríguez *et al*, 2000)

- Telurito
- Yema de huevo.

Preparar el medio base, esterilizar y enfriar a 45-50°C . Calentar el enriquecimiento a 45 –50°C y añadir asépticamente a la base y mezclar.

Agar MacConkey

Anexo 28. Componentes del medio de cultivo Agar MacConkey.

Compuesto	Cantidad
Peptona (Gelysate, Bacto peptone)	17,0 g
Peptona (Polypeptone, Bacto proteose peptone)	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Cloruro de Litio	5,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 ml
Cristal Violeta	0.001 g
PH final	7.1 ⁺ .2

Fuente: (Rodríguez *et al*; 2000)

Agar Nutritivo

Anexo 29. Componentes del medio de cultivo Agar Nutritivo.

Compuesto	Cantidad
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Cloruro de Litio	8,0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 l
PH final	7,2 ⁺ .0,2

Fuente: (Rodríguez *et al*; 2000)