

Lej 136



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS DEL TRACTO
INTESTINAL DE LOS PENEIDOS:

Penaeus aztecus, Penaeus duorarum y Penaeus
setiferus.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

JOAQUIN PORRAS AGUIRRE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Introducción

1.1 Objetivos

1.2 Antecedentes del área

2. Materiales y métodos

2.1 Trabajo a bordo

2.1.1 Recolecta de camarones

2.1.2 Disección de los camarones

2.2 Trabajo de laboratorio en tierra

2.2.1 Aislamiento y purificación de cepas

2.2.2 Pruebas morfológicas

2.2.3 Pruebas fisiológicas y nutricionales

2.2.4 Estudio matemático

2.2.4.1 Recolecta de la información

2.2.4.2 Codificación de resultados

2.2.4.3 Tratamiento matemático

2.2.4.4 Estudio crítico de resultados

2.2.5 Índices de evaluación del catabolismo potencial en las bacterias

3. Resultados y discusión

3.1 Análisis global

3.1.1 Caracteres morfofisiológicos

3.1.2 Caracteres nutricionales

3.2 Análisis por fenones

3.2.1 Descripción de fenones

3.2.2 Discusión de fenones

4. Conclusiones

5. Apéndice

6. Bibliografía

INTRODUCCION

A partir de los derrames de los supertanques Torrey Canyon ocurrido a 15 millas de Cornwall en Inglaterra (Smith, 1958); el - Santa Barbara ocurrido a 15 millas de las costas de Santa Barbara en California (Stroughan, 1971) y el del Amoco Cadiz ocurrido a 320 km fuera de las costas de Gran Bretaña en el Canal Inglés (Atlas et al, 1981), se observó que los derrames de hidrocarburos fósiles ocurridos en zonas cercanas a la costa, producen un impacto ecológico más marcado que los que acontecen en zonas lejanas a ésta, puesto que los diferentes factores que intervienen en el intemperismo de los mismos, tienen un mayor efecto en áreas de mar abierto, estos factores pueden ser físicos, químicos o biológicos, y comprenden a la fotooxidación, emulsificación, disolución, evaporación, sedimentación y la biodegradación.

La constatación de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos fósiles (ZoBell, 1946) propició el desarrollo de estudios en esta disciplina, cuyos primeros resultados establecieron que diversos factores determinan la extensión y velocidad de degradación del petróleo, entre los que podemos enumerar a la temperatura, presión, concentración de oxígeno, concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, la composición química y el estado físico del petróleo así como la estructura de la comunidad microbiana (Atlas et al, 1981).

La biodegradación es considerada como uno de los procesos más importantes del intemperismo, si bien un ecosistema contaminado no podría recuperarse solo mediante dicho proceso, sino más bien con la conjunción de todos los procesos que intervienen en el intemperismo.

Un grupo bastante heterogéneo de microorganismos es el que actúa en la biodegradación, este grupo está conformado por bacterias, hongos, algas y levaduras (Ahern et al., 1971; Walker et al., 1975; Austin et al., 1977; Bartha y Atlas, 1977; Cerniglia, et al., 1980). Asimismo, la información genética existente en los microorganismos para degradar petróleo no es específica de algún género en particular, y puede o no expresarse dependiendo de la cantidad de hidrocarburos existentes en el medio, además esta información genética no es exclusiva de comunidades bacterianas marinas sino también de las del medio terrestre y aún de las patógenas (Colwell y Walker, 1977).

Muchos de los trabajos antes expuestos utilizan los métodos numéricos que fueron introducidos por vez primera a la taxonomía en 1763 por el botánico francés Michael Adanson, sin embargo su aplicación en microbiología no fué sino hasta 1963 año en que Sneath y Sokal publican su libro titulado "Principios de Taxonomía Numérica", se ha comprobado que la taxonomía numérica constituye una fuerte herramienta tanto para la Microbiología como para la Ecología.

Los estudios sobre intemperismo del petróleo se han enfocado generalmente hacia la columna de agua o hacia el sedimento, y se ha ignorado el papel que puede jugar la biota marina, o su microflora intestinal sin embargo ya en 1972 Lee et al., estableció que los mejillones son capaces de degradar el petróleo, en 1975 Botello estudio la degradación del petróleo en los camarones Penaeus aztecus y Penaeus duorarum en 1978 el mismo Botello postuló que la acción de los hidrocarburos fósiles sobre los camarones, está relacionada con los niveles de acumulación, el tiempo de permanencia en el organismo y la composición de la mezcla de hidrocarburos.

Con respecto a los estudios de microflora intestinal, en 1975, Colwell et al., estudiaron la flora heterótrofa de Callinectes sapidus (jaiba); Boyle et al., 1976, reportaron a Vibrio sp y Pseudomonas sp como los géneros más comunes en la flora de Isópodos; en 1979, Bensoussan et al., encontraron una mayor especialización hacia la utilización de ciertos substratos químicos en la flora de los equinodermos (Solaster sp y Pseudostichopus villosus) que en las comunidades de los sedimentos donde fueron capturados dichos organismos.

Bianchi et al., 1979, encontraron diferencias significativas en los números poblacionales de equinodermos (Solaster sp, Pseudostichopus villosus, Ophidiidae etc.) holoturidos, bivalvos con respecto al medio (agua y sedimentos) donde fueron colectados;

en 1979, Sochard et al., reportaron a Vibrio sp y Pseudomonas sp como los géneros más abundantes en la flora de Copépodos (Acartia tonsa), en 1980 Bianchi y Bianchi reportaron también que para Disentrarchus labrax (pez Serránido) el género más abundante en su microflora es Vibrio sp; Oliver et al., 1982 reportan a Pseudomonas sp como el género más abundante en la flora intestinal de Glyphocrangen sp (camarón) así como también de los sedimentos adyacentes. Oliver en 1982, propone que el intestino de los invertebrados es un sitio rico en nutrientes capaz de sostener más eficientemente una microflora que el ambiente de los sedimentos o el agua en los que vive el invertebrado; en 1976, Schwarz et al. y Ohwada et al., 1980 proponen también al intestino como un sitio ideal para sostener una microflora por el hecho de abatir en gran medida la presión hidrostática del fondo marino. Sin embargo, la comunidad de bacterias hidrocarboclasticas de tracto intestinal de organismos marinos ha sido como anteriormente se cita ignorada, puesto que los estudios antes reportados abarcan a la población de bacterias heterotrofas en general.

A través de los trabajos sobre la microflora de tracto digestivo de vertebrados (principalmente rumiantes) se tiene el conocimiento de que la acción de la microflora puede manifestarse en el intestino, modificando cualitativamente su contenido, la anatomía del tubo, su fisiología digestiva, el sistema inmune y ejerciendo un efecto de barrera contra cepas exógenas (Ducluzeau,

1979); probablemente las 3 primeras características podrían también ocurrir en invertebrados.

1.2 Antecedentes del área

En 1978, el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, inició una serie de estudios interdisciplinarios denominados OPLAC (Oceanografía de la Plataforma de Campeche), tendientes a evaluar los aspectos ecológicos de la Sonda de Campeche.

En 1979 con el derrame del pozo petrolero Ixtoc-I, los objetivos fueron enfocados a evaluar el impacto ecológico del derrame.

En 1980, durante el crucero oceanográfico OPLAC-II el grupo de Microbiología Marina estudió el área, encontrando que la Sonda no fue afectada por el derrame, y que la alteración de la estructura poblacional (heterotrofas-hidrocarboclasticas) observada en el área de plataformas es debida a la contaminación crónica de hidrocarburos, este efecto localizado fue denominado "efecto plataforma" y desaparece cuando aumenta la distancia al sitio de explotación petrolera (Lizárraga, et al., 1982).

En 1980 Atlas, et al., estudiaron los potenciales de biodegradación en el área del Ixtoc-I (Sonda de Campeche), y encontraron que era menor que la reportada para las costas

británicas donde ocurrió el accidente del Supertanque Amoco Cádiz, esto fue atribuido a los bajos niveles de nitrógeno y fósforo de la Sonda. Muñoz-Rubio 1983, reportó hacia los Gram - anaerobios facultativos como flora hidrocarbónica clástica dominante de la Sonda de Campeche, encontrando un gran potencial heterotrófico en sus poblaciones e infiriendo de manera indirecta que el derrame del pozo petrolero - Ixtoc-I no afectó al menos a las poblaciones bacterianas - en la Sonda.

El presente trabajo formó parte del programa OPLAC y fué - realizado en invertebrados tomando en cuenta la escasez de información antes referida (aún para la Sonda de Campeche) y precisamente en el camarón por constituir una industria importante para la Sonda de Campeche, siendo la principal fuente pesquera del recurso en todo el Golfo de México y aún del Océano Pacífico, aproximadamente el 65% de la captura total del país proviene de la Sonda, produciendo 22 toneladas anuales por barco, manteniendo una flotilla total en la Sonda de 655 barcos (Soto, 1979).

Las especies de mayor importancia comercial en la Sonda de Campeche que se extiende desde Tabasco hasta Yucatán --- (aproximadamente 780 km) con una profundidad media de 90 m, son el objeto de este estudio: Penaeus aztecus (camarón café) que se distribuye en áreas ricas en materia orgánica y

con profundidades entre 40 y 80 m; Penaeus duorarum (camaron rosado) que se distribuye en áreas carbonatadas con profundidades entre 20 y 40 m y finalmente Penaeus setiferus (camaron blanco) del cual su distribución se sobrelapa con las dos especies antes mencionadas, el patrón de distribución de estos peneidos presenta cambios territoriales y cuantitativos que son atribuidos a las variaciones estacionales de la Sonda (Soto, et al 1980).

El presente trabajo toma en cuenta la contaminación crónica y accidental de hidrocarburos en la Sonda de Campeche - que de alguna manera afectan a las poblaciones de camarón ahí existentes, y pretende contribuir al conocimiento de la biología de los mismos, teniendo como objetivos principalmente dos aspectos:

- a) conocer la morfología, fisiología y rasgos nutricionales de la flora bacteriana hidrocarbonoclastica de los peneidos antes mencionados para entender el papel ecológico que juega dicha flora en el camarón y
- b) tratar de elucidar el papel que puedan jugar los camarones citados en la biodegradación del petróleo, para en estudios futuros considerar la microflora de estos invertebrados como factor de degradación.

MATERIALES Y METODOS

1. Trabajo a bordo

2.1.1 Recolección de camarones: Los camarones fueron colectados en tres etapas (Tabla 1) en las estaciones marcadas en el mapa de la figura 1, durante la serie de cruceros denominados OPLAC. Todos los organismos fueron muestreados con red camaronera tipo comercial de 19 m de longitud, 9 m de abertura de boca y 3.2 cm de luz de malla, en lances de media hora a bordo del barco camaronero "LA NUEVA LEY DE PESCA" a una velocidad de 2 a 3 nudos por hora.

2.1.2 Disección de los camarones (fig. 2): posterior a su captura, los camarones fueron disectados para extraer el intestino desde su insercción al hepatopáncreas hasta el ano procurando trabajar con organismos de la misma talla y sexo para cada especie; con objeto de tener una dilución precisa a la cual referirse se disectaron 5 organismos extrayendo sus correspondientes intestinos que sumaron 1 g de peso húmedo (al agregarse en el medio fueron diluidos 10^{-2} en relación PESO/VOLUMEN). A fin de seleccionar cepas hidrocárboclasticas los intestinos extraídos en condiciones de esterilidad se depositaron en un frasco de vidrio que contenía 99 ml de medio "CRUDO IXTOC-I";

* Todos los medios mencionados se encuentran descritos en el apéndice.

este medio de cultivo ya inoculado con los intestinos fué homogenizado por espacio de 10 min para después proceder a aislar y purificar cepas. Debido a que en la disección también se maneja el contenido intestinal, los resultados son de las poblaciones autóctonas y aloctonas del intestino.

2. Trabajo de laboratorio en tierra

2.2.1 Aislamiento y purificación de cepas (Colonias): Los medios inoculados con los intestinos, fueron incubados a 25 °C durante un mes, al término de este se efectuó una resiembra volviendo a incubar otro mes, terminado el tiempo de incubación se hicieron diluciones al décimo con siembra de una alícuota de .1 ml en medio tipo ZoBell (Sal. 20%, ZoBell Openheimer - 1952), este sembrado fué por duplicado y se incubó a 25 °C durante 48 hrs al cabo de las cuales se escogieron las diluciones convenientes con objeto de aislar 36 cepas para su posterior purificación por el método de siembra-resiembra (Thibault et al, 1963), haciendo un total aproximado de 6-7 resiembras, cada cepa pura se conservo en un frasco de vidrio de 15 ml, con 10 ml de medio tipo ZoBell sal. 20%, a 6 °C. Esta metodología permitió obtener ceparios puros de cada especie de camarón trabajada.

LOCUCERO NO.	FECHA	ESTACION	INDIVIDUOS COLECTADOS	ESPECIE	NUMERACION
PLAC	III Sep. 1980	10	5	<u>P. aztecus</u>	2000-2035
PLAC	IV Nov. 1980	32	5	<u>P. aztecus</u>	2036-2065
		5	10	<u>P. aztecus</u>	2066-2125
PLAC	V Abril 81	7	5	<u>P. setiferus</u>	3031-3060
		10	5	<u>P. duorarum</u>	3061-3090
		10	5	<u>P. aztecus</u>	3001-3030

ABLA 1. Fecha de colecta de las muestras y números asignados a las cepas aisladas, ubicación de estaciones en la Fig. 1.

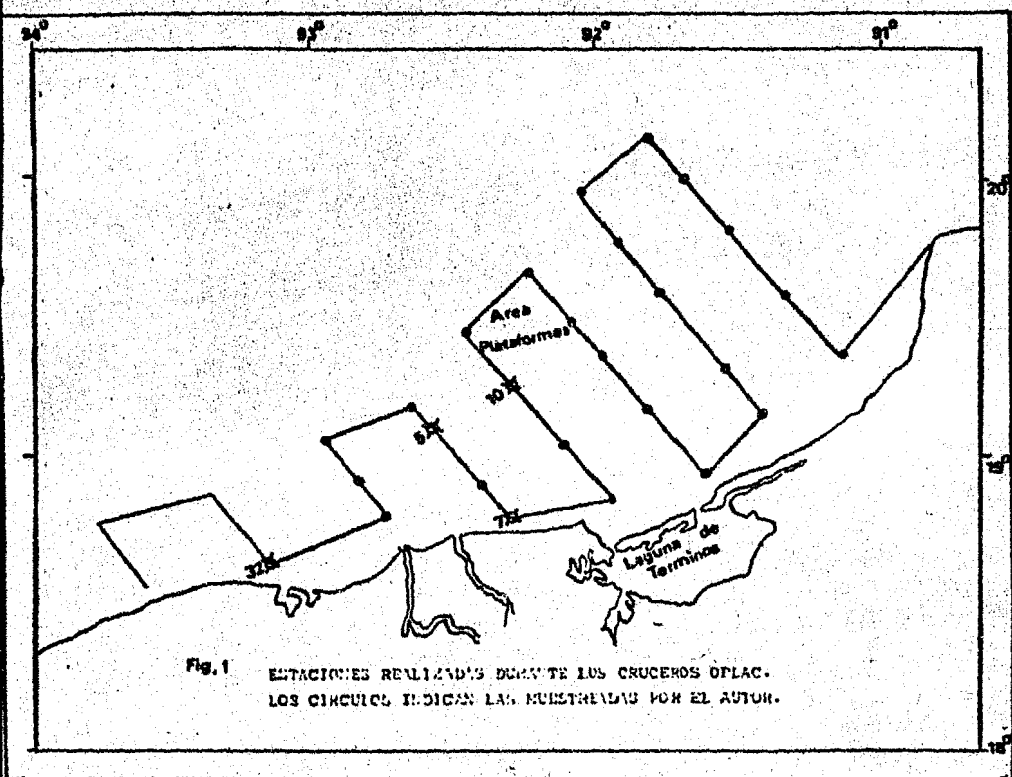


Fig. 1 ESTACIONES REALIZADAS DURANTE LOS CRUCEROS OPLAC.
 LOS CIRCULOS INDICAN LAS MUESTREAS POR EL AUTOR.

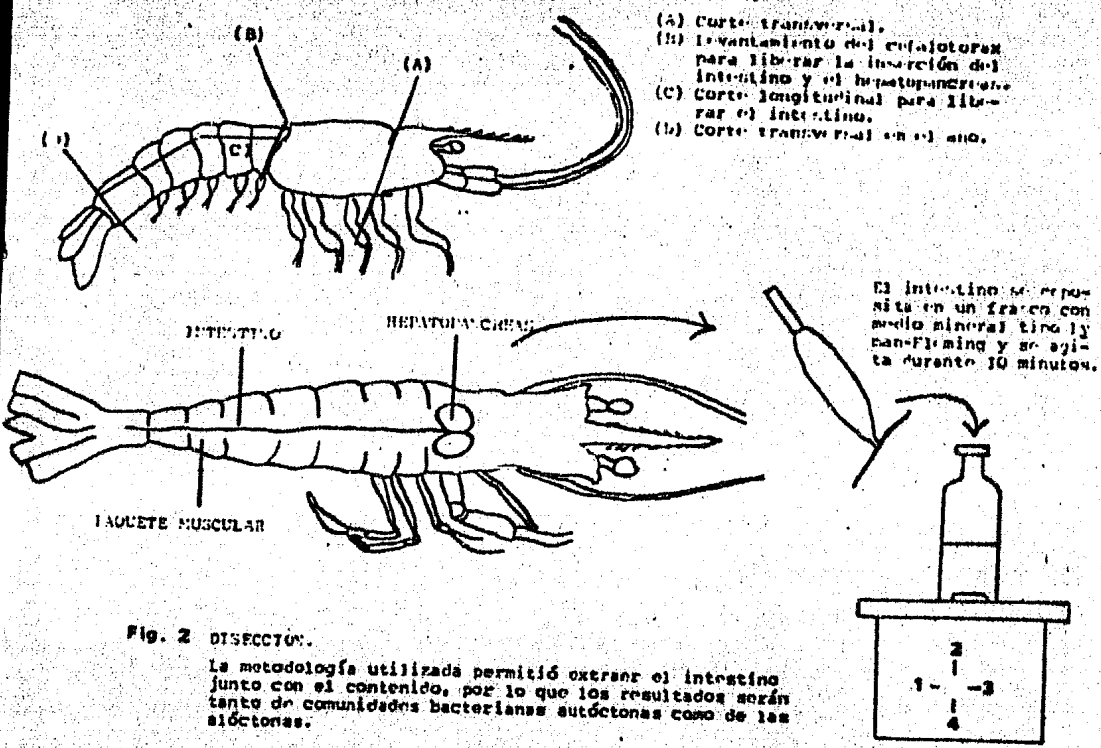


Fig. 2 DISECCIÓN.

La metodología utilizada permitió extraer el intestino junto con el contenido, por lo que los resultados serán tanto de comunidades bacterianas autóctonas como de las alopátonas.

NOMBRE	COLECCION PROVENIENTE	NUMERACION
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	9061
<i>Bacillus lincheniformis</i>	ATCC 14580	9001
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581	9003
<i>Bacillus polymyxa</i>	ATCC 842	9004
<i>Bacillus sphaericus</i>	ATCC 14577	9006
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	9000
<i>Brevibacterium stationis</i>	ATCC 14403	9062
<i>Brevibacterium albidum</i>	ATCC 15831	9063
<i>Flavobacterium marinotypicum</i>	ATCC 19260	9200
<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	ATCC 23333	9067
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 17423	9056
<i>Pseudomonas marina</i>	ATCC 27129	9053
<i>Pseudomonas mendocina</i>	ATCC 25411	9052
<i>Pseudomonas putida</i>	(+) P _P G ₁	9058
<i>Pseudomonas putida</i>	(+) P _P S ₁₂₆	9060
<i>Pseudomonas arvilla</i>	(+) PaW ₁	9057

TABLA 2. Cepas de colección utilizadas

ATCC = American Type Culture Collection

(+) por cortesía de Shapiro, J.A. University of Chicago.

Con el objeto de comparar nuestras cepas silvestres, se utilizaron 17 cepas de colección señaladas como - degradadoras de petróleo referidas en la tabla 2 -- (Bartha y Atlas, 1977; Austin et al., 1977), por tal motivo se les hicieron las mismas pruebas que a las cepas silvestres.

Las pruebas realizadas son las propuestas por Stanier, 1966 comunmente utilizadas en Taxonomía Numérica. Este trabajo utilizó la Taxonomía Numérica por las siguientes ventajas, utiliza un mínimo de 60 pruebas - taxonómicas, todas ellas con igual valor o peso, y además las aplica a todas y cada una de las cepas trabajadas, estableciendo los taxa en base a porcentos de similitud (Colwell, 1970; Sneath y Sokal, 1973).

2.2.2 Pruebas morfológicas (Tabla 2): Con objeto de identificar a cada cepa manejada por sus características - morfológicas y evitar confusiones durante el proceso de siembra-resiembra se les practicaron 17 pruebas a cada cepa trabajada.

2.3.2 Pruebas fisiológicas y nutricionales (Tabla 3): A - fin de obtener el potencial heterotrófico, a cada cepa se le hicieron 86 pruebas, de las cuales 25 fue--ron fisiológicas y 59 nutricionales; de acuerdo al tipo de medio utilizado todas la pruebas pueden divi

dirse en 3 grupos, los cultivos sólidos, los cultivos líquidos y las reacciones que no necesitaron de medio de cultivo (ver apéndice).

Utilización del inoculador tipo Multipoint (Fig 3)

Para el manejo de este aparato, el cepario fue dividido en series de 20 cepas cada una, manejando entre 3 y 4 series por día de la siguiente manera: Las cepas fueron sembradas masivamente en medio tipo ZoBell y de cada cepa crecida se hizo una suspensión de 5ml altamente concentrada en medio mineral tipo Lymana y Fleming (aproximadamente 10^7 cel/ml), esta suspensión se utilizó para inocular todos los medios líquidos a razón de \pm .3 ml cada uno; el resto de la suspensión fué usada para el inoculador semiautomático que siembra simultáneamente 20 cepas en cada medio probado. Todas las lecturas de las pruebas fueron contra testigo y el criterio fué de positivo cuando el crecimiento era mayor que el testigo y negativo si el crecimiento era igual o menor que él.

TABLA 3. PRUEBAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO TAXONOMICO

Número de la prueba	Nombre	Clave	Concentración	Esterilización
---------------------	--------	-------	---------------	----------------

PRUEBAS NUTRICIONALES

Carta 1 CARBOHIDRATOS

1	L-arabinosa	LARA	2 g/l	Filtración
2	Ribosa	RIBO	"	"
3	Xilosa	XILO	"	"
4	Fructosa	FRUC	"	"
5	Galactosa	GALA	"	"
6	Glucosa	GLUC	"	"
7	Manosa	MANO	"	"
8	Ramnosa	RHAM	"	"
9	Celobiosa	CELO	"	"
10	Lactosa	LATO	"	"
11	Maltosa	MALT	"	"
12	Sacarosa	SACA	"	"
13	Trealosa	TREA	"	"
14	Almidon	AMID	"	"

ACIDOS GRASOS

15	Acetato	ACET	"	"
16	Propionato	PROP	2 ml/l	"
17	Butirato	BUTY	"	"
18	Pelargonato	PLAR	"	Autoclavado
19	Palmitato	PALM	2 g/l	Calentamiento

ACIDOS DICARBOXILICOS

20	Oxalato	OXAL	1 g/l	Filtración
21	Malonato	MALO	"	"
22	Succinato	SUCI	"	"
23	Maleato	MALE	"	"

HIDROXIACIDOS

24	Lactato	LATA	2 ml/l	"
----	---------	------	--------	---

ACIDOS ORGANICOS

25	Citrato	CITR	1 g/l	"
26	Piruvato	PYRU	"	"

Número de la prueba	Nombre	Clave	Concentracion	Esterilización
---------------------	--------	-------	---------------	----------------

Carta 1

27	Alfa-ceto glutarato	COTA	1 g/l	Filtracion
----	---------------------	------	-------	------------

ALCOHOLES

28	Glicerol	GLOL	2 ml/l	"
29	Adonitol	ADOL	1 g/l	"
30	Meso-inositol	MIOL	"	"
31	Manitol	MAOL	"	"
32	Sorbitol	SOOL	"	"
33	Metanol	MEOL	"	"
34	Etanol	ETOL	"	"
35	Propanol	PROL	"	"
36	Butanol	BUOL	"	"
37	Dulcitol	DUOL	2 g/l	"

AROMATICOS

38	Fenol	FENO	0.25 g/l	"
----	-------	------	----------	---

AMINOACIDOS

39	L-Fenilalanina	LFAL	1 g/l	"
40	L-tirosina	LFIR	2 g/l	"
41	L-histidina	LHIS	1 g/l	"
42	L-triptofano	LTRY	"	"
43	L-alanina	LALA	"	"
44	L-treonina	LTHR	"	"
45	L-valina	LVAL	"	"
46	L-leucina	LLEU	"	Calentamiento
47	Asparagina	ACIN	"	Filtración
48	Metionina	MTIO	"	"
49	L-glutamato	LGLU	"	"
50	L-lisina	Llys	"	"
51	L-arginina	LARG	"	"
52	L-ornitina	LORN	"	"
53	L-cisteina	CTEI	"	"

COMPUESTOS AMINADOS

54	Etolamina	ETNH	"	"
55	Butilamina	BUTH	"	"
56	Urea	URFA	"	"
57	Tiourea	TIOU.	"	"
58	Timina	TYMI	"	Calentamiento
59	Tiamina	TIAM	"	Filtracion

Número de la prueba	Nombre	Clave	Concentracion	Esterilización
---------------------	--------	-------	---------------	----------------

Carta 1

PRUEBAS FISIOLÓGICAS

60	Prototrofia	PROT		Filtración y Autoclavado
61	Prototrofia + vitaminas	PRVI		"
62	Prototrofia + vitaminas + aminoac.	PRVA		"
63	Reducción Nitratos	RNOS		Autoclavado
64	Reducción nitritos	RNIS		"
65	Prod. N ₂ gas	RENS		"
66	Oxid. gluco.	OGLU		"
67	Ferm. gluco.	FGLU		"
68	Acumulación de PHB	AFHB		"
69	Degradación petróleo	DEPE		"
70	Producción de Levan	PRLE		"

Carta 2

1	Amilasa	AMIL		"
2	Gelatinasa	GELA		"
3	ADNasa	ADNA		"
4	Twen 80	TW80		"
5	Ureasa	URSA		Filtración
6	Catalasa	CATA		
7	Oxidasa	OXID		
8	Sal. 0 ppm	SALO		Autoclavado
9	Sal. 70 ppm	SA70		"
10	Sal. 120 ppm	SA120		"
11	Sal. 180 ppm	SA180		"
12	Temp. 4°C	TE4		"
13	Temp. 37°C	TE37		"
14	Temp. 41°C	TE41		"

PRUEBAS MORFOLÓGICAS

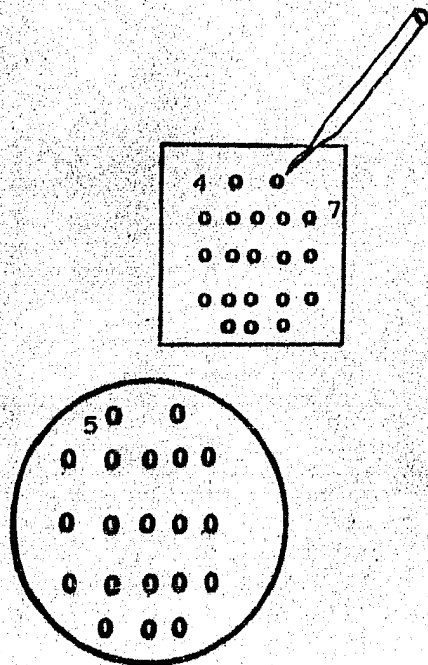
15	Color crema-blanco	CRBL		
16	Color naranja-rojo	ANRO		
17	Color amarillo-verde	AMVE		
18	Otro color	OTCO		
19	Pigmento difusible	PDIF		
20	Cocos	COCO		
21	Bacilos	BACI		
22	Espirales	ESPI		
23	Pleomorfismo	PLOM		

Número de la prueba	Nombre	Clave	Concentración	Esterilización
---------------------	--------	-------	---------------	----------------

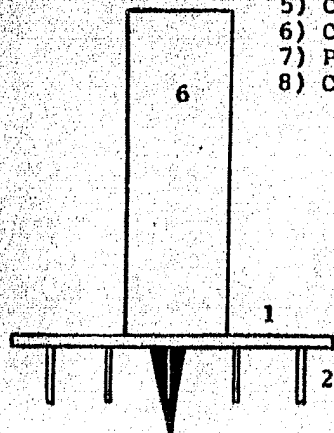
24	Espora deformante		EDEF	
25	" no deformante		ENDE	
26	1 a 2 celulas		12CE	
27	Cadenas		CADE	
28	Racimos		RACI	
29	Otro arreglo		OTAR	
30	Gram positivo		GP-OS	
31	Gram negativo		GN-EG	

32-74	ESPACIOS EN BLANCO			
75-78	NUMERO DE LA CEPA			
79-80	NUMERO DE LA CARTA			

1) Se llenan los pocitos de la placa de plexiglas con una suspensión altamente concentrada.



- 1) Placa de aluminio para los clavos.
- 2) Clavos inoculadores.
- 3) Clavo guía.
- 4) Placa de plexiglas contenedora de pocitos.
- 5) Caja de petri.
- 6) Cuerpo de aluminio del replicador.
- 7) Pocitos de cristal Pyrex.
- 8) Corredera.



Se coloca la placa de plexiglas sobre el inoculador al que se le colocaron los clavos ya estériles, se presiona el cuerpo hacia abajo para inocular los clavos, se desplaza la corredera hacia la derecha para inocular la caja petri.

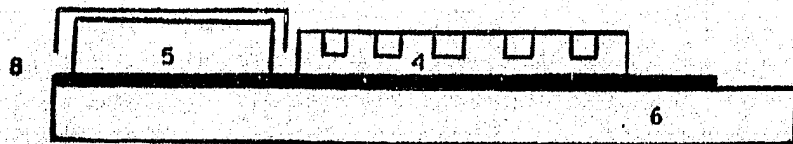


Fig. 3 REPLICADOR SEMIAUTOMATICO TIPO MULTI-POINT (TECNOLOGIA UNAM DESARROLLADO POR EL Dr. M.L. LIZARRAGA-PARTIDA).

2.2.4 Estudio matemático

El estudio matemático utilizado, esta basado en los lineamientos Adansonianos (Adanson, 1763) y desarrollados por Sneath et Sokal 1973 tales lineamientos son:

Recolecta de información

Codificación de resultados

Tratamiento matemático

Estudio crítico de resultados

2.2.4.1 Recolecta de la información: El análisis matemático se realizó en base a 101 pruebas de las cuales 17 fueron morfológicas, 25 fisiológicas y 59 nutricionales.

2.2.4.2 Codificación de resultados: Los resultados de las 101 pruebas fueron codificados en tarjetas IBM utilizando un criterio binario de POSITIVO si el carácter o respuesta estaba presente usando el número uno de la tarjeta, y NEGATIVO si el carácter o respuesta estaba ausente para ello perforando el número cero en la tarjeta. El total de respuestas de cada cepa fueron codificadas de la siguiente forma; 70 en la primera carta y 31 en la segunda, destinado en ambas cartas los números

76-78 para el número de control de la cepa y los números 79-80 para el número de la carta, de esta forma se tuvieron 2 cartas IBM para cada cepa.

2.2.4.3 Tratamiento matemático: Los resultados fueron tratados primero con el coeficiente de similitud de Sokal et Mitchner que de los existentes es uno de los más prácticos y de los más utilizados (Austin y Colwell, 1977).

$$S_{SM} = \frac{a + b}{a + b + c + d} \quad \text{CEPA "B"}$$

C	1	0
E	a	b
P	1	similitud + diferencia
A	c	d
"A"	0	diferencia similitud-

Tabla de frecuencias tomada de Sneath et Sokal 1973.

Con este coeficiente de similitud y con la ayuda del coeficiente de agregación taxonómica de la "Distancia Media no Ponderada" se construyó el Dendrograma correspondiente.

2.2.4.4 Estudio crítico de resultados: El dendrograma fué cortado para su análisis de acuerdo al punto de inflección de la curva No. de cepas VS. % de similitud (Verón, 1974).

2.2.5 Índices de evaluación del catabolismo potencial en las bacterias:

Se utilizaron los índices propuestos por Bianchi, 1971 (IMU) y por Lizárraga-Partida, 1979 (C.C. y A.A.).

- Índice medio de utilización (IMU): Este índice corresponde a la media de utilización de un sustrato, familia química o del total de sustratos probados:

$$IMU = \frac{\sum P}{N}$$

P = % de utilización de cada sustrato
N = núm. total de sustratos probados

- Índice de afinidad asimilatriz o desviación estándar (A.A.): Este índice nos da una idea de la especialización de las cepas al metabolizar ciertos compuestos, de tal forma que entre la A.A. sea más cercana al IMU la especialización será mayor, y cuando la C.C. sea próxima a cero la especialización será muy importante.

$$A.A. = \sqrt{\frac{\sum P^2}{N-1} - \frac{(\sum P)^2}{N}}$$

N-1 si la muestra es menor de 100 y N si es mayor

- Índice de capacidad tabólica (C.C.): Este índice la proporción de sustratos utilizados por lo menos por una cepa del grupo

$$C.C. = \left(\frac{\sum n_{p \neq 0}}{N} \right) 100$$

n P \neq 0 = número de porcentajes diferentes de cero

N = número total de substaros probados

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Como se hizo mención anteriormente los resultados expuestos son de las comunidades autóctonas del intestino así como de las aloctonas al mismo, dado que durante la disección y el sembrado se trabajó también el contenido intestinal.

El dendrograma de la figura 5 muestra a las 133 cepas trabajadas agrupándose en 16 fenones a diferentes niveles de similitud, todos los grupos de 3 o más cepas fueron considerados como FENON.

Analizaremos el dendrograma desde 2 puntos de vista, uno global o análisis de todas las cepas silvestres y otro el nivel de corte, que nos agrupa a solo 99 cepas en 16 grupos o fenones. Las tablas 4 y 5 contienen los porcentajes de las respuestas positivas a todas la pruebas realizadas.

3.1 Análisis global:

3.1.1 Caracteres morfofisiológicos: La forma bacilar fue la dominante con un 76%, las formas pleomórficas y

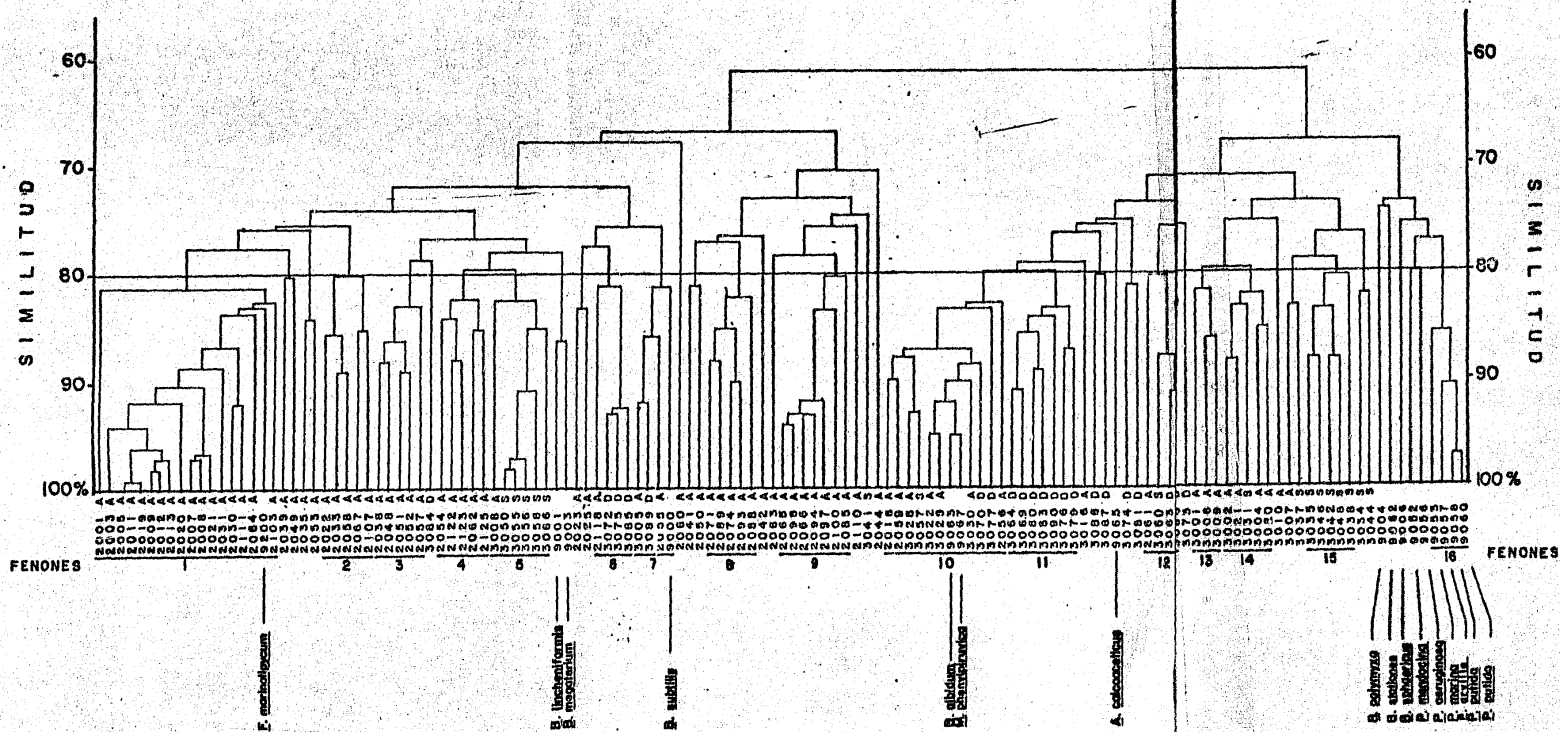


Figura B. Dendrograma de cepas aisladas de tracto intestinal de camaras según los coeficientes de Sokal et Michener y de la distancia media no ponderada.

- A = Cepa aislada de *P. aztecus*
- B = Cepa aislada de *P. suliferus*
- D = Cepa aislada de *P. duorarum*

	CEPILLO					FERNONES											
	TOTAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
No. de cepas	131	18	5	5	5	6	4	4	5	7	12	7	6	3	5	5	6
NUTRICIONALES:																	
<u>AZUCARES:</u>																	
L-arabinosa	53	94	80	100	100	100	100	100	0	100	0	0	25	0	0	20	56
ribose	61	94	60	100	100	100	100	100	40	100	0	14	0	100	20	60	100
xilosa	49	94	100	100	100	100	75	75	0	86	0	0	25	0	0	0	0
fructosa	70	94	100	100	100	82	100	100	100	100	100	0	0	67	60	40	100
galactosa	52	94	100	100	100	81	100	100	0	100	0	0	0	67	0	0	23
glucosa	62	94	100	100	100	100	100	100	60	57	8	14	100	0	60	20	100
manosa	47	94	100	100	100	67	100	100	0	100	8	0	0	0	0	20	23
rarnosa	42	100	60	100	60	50	75	100	0	100	0	0	25	0	0	20	0
cellobiosa	57	100	100	100	100	100	100	100	40	100	8	0	0	0	40	60	0
lactosa	47	100	100	40	100	100	0	0	0	43	0	0	25	67	0	0	25
maltoza	60	100	80	100	100	83	75	100	40	100	39	0	0	33	0	20	8
sacarosa	63	100	100	100	100	100	100	100	40	100	17	0	0	33	20	40	100
trehalosa	61	100	100	100	100	100	100	100	40	100	0	0	0	33	20	0	0
almidon	60	100	60	100	100	100	75	100	40	100	33	29	0	100	20	0	0
C.C.	100	100	100	100	100	100	100	92.8	57.1	100	50	21.4	35.7	57.1	50	37.1	50
I.M.U.	56.3	96.6	88.6	93.7	97.1	50.4	65.7	91.0	28.6	91.8	16.8	4	14.3	35.7	15.7	22.8	37.5
A.A.	7.9	3.7	17	16	10.7	15.6	37.2	27	30	18.3	27.2	8.8	27.2	28.1	19.5	24.6	43.6
<u>AC. GRASOS</u>																	
acetato	91	100	100	100	100	100	50	100	100	100	92	100	100	100	60	20	100
propionato	51	39	0	80	40	50	0	0	100	100	0	29	0	100	100	100	100
butirato	87	94	0	100	60	100	50	75	100	100	92	100	75	100	100	100	100
pelargonato	26	0	0	100	0	0	0	0	40	43	0	29	0	100	100	20	100
palmitato	16	72	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
C.C.	100	80	40	80	60	60	40	40	80	80	40	80	40	100	80	80	80
I.M.U.	54.2	61	24	76	40	50	20	35	68	68.6	36.8	51.6	35	100	72	48	24
A.A.	34.2	41.6	43.4	43.4	42.4	50	37.4	48.7	46	45.6	50.6	45.7	48.7	0	43.8	48	45
<u>AC. DICARBOXILICOS:</u>																	
oxalato	29	83	20	100	0	0	25	0	20	43	0	0	0	33	0	0	0
malonato	51	89	0	60	40	83	25	25	20	14	8	86	100	100	100	20	75
succinato	89	100	80	100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	100	100	20	100
maleato	33	83	20	100	40	83	0	75	0	0	0	14	0	0	0	20	0
C.C.	100	100	75	100	75	75	75	75	75	75	90	75	50	75	50	75	50
I.M.U.	50.5	88.8	30	90	45	66.5	37.5	50	33	39.2	25	50	50	58.2	50	15	43.7
A.A.	27.4	8	34.6	20	41.2	45	43.3	45.6	44.3	44.3	44.8	50.3	57.7	50	57.7	10	51.5
<u>HIPOXIACIDOS:</u>																	
lactato	59	100	100	100	60	100	0	75	20	100	17	0	25	67	20	0	100
<u>AC. ORGANICOS:</u>																	
citrato	84	100	100	100	100	100	100	100	100	100	52	86	0	100	60	20	100
piruvato	79	94	80	100	60	100	100	75	100	100	0	100	0	100	100	80	100
cetoglutarato	69	100	80	100	60	100	100	75	100	100	17	14	0	67	100	20	100
C.C.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66.6	100	0	100	100	100	100
I.M.U.	77.3	98	86.7	100	73.3	100	100	81.3	100	100	34.3	66.6	0	89	86.7	27	100
A.A.	7.6	3.5	11.5	0	23	0	0	14.4	0	0	48.9	46.1	0	19	23	12	0
<u>ALCOHOLES Y POLIALCOHOLES:</u>																	
glicerol	77	100	60	100	100	100	100	100	100	100	52	86	0	67	0	0	100
adonitol	34	83	40	40	40	100	0	100	0	0	25	0	0	0	0	0	0
inositol	55	100	100	100	60	100	25	100	40	100	25	29	0	0	39	0	0
manitol	74	100	100	100	100	100	100	100	68	100	67	0	0	33	0	0	50
sorbitol	58	100	100	100	80	82	0	100	60	100	0	14	0	0	0	20	0
metanol	28	100	0	60	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	60	0
etanol	28	83	0	0	0	50	0	75	0	14	8	0	0	100	100	0	100
propanol	37	100	20	0	0	83	25	50	0	0	0	0	0	67	60	60	0
butanol	44	100	0	80	20	0	0	0	20	86	0	14	0	100	40	80	0
dulcitol	38	100	0	80	80	83	25	50	20	29	0	0	0	0	0	0	0
C.C.	100	100	60	80	70	80	50	100	60	70	60	40	0	50	40	40	30
I.M.U.	47.3	96.6	42	66	48	69.9	27.8	75	30	52.9	23.3	14.4	0	16.7	24	18	23
A.A.	17.9	7.2	44.7	40	41.3	39.9	39.9	33.3	34.3	47.7	38	18.8	0	42.9	37.5	52.7	48

COMP. AROMATICOS:

fenol 16 67 0 20 0 0 0 75 0 14 0 0 0 0 0 0 50

AMINOACIDOS:

L-fenilalanina 41 94 20 60 80 100 0 75 0 0 0 14 100 67 20 0 100
 L-tirosina 66 94 40 60 100 100 25 100 0 14 50 100 100 100 100 20 100
 L-histidina 70 100 80 60 100 100 75 100 0 29 100 100 100 0 0 20 100
 L-triptofano 26 94 60 20 0 17 0 100 0 14 0 0 0 0 0 20 50
 L-alanina 96 100 100 100 100 100 100 100 100 83 86 100 100 100 100 75
 L-treonina 68 100 100 100 100 81 50 100 100 58 14 25 0 40 0 0
 L-valina 44 100 100 60 60 100 0 75 0 0 0 14 75 0 40 20 100
 L-leucina 61 89 80 80 100 100 0 0 0 0 67 100 100 33 100 0 100
 asparagina 89 100 100 100 100 100 100 75 100 100 100 100 75 100 100 100
 metionina 34 100 60 80 0 83 0 0 0 0 0 14 0 0 40 20 100
 L-glutamato 95 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100
 L-lisina 48 100 80 100 100 100 0 100 20 29 0 29 100 0 0 0 0
 L-arginina 96 100 60 100 100 100 100 100 100 100 86 100 100 100 100 100
 L-ornitina 81 94 100 100 100 100 100 100 100 86 100 71 100 33 20 0 100
 L-cisteina 16 28 0 20 0 0 0 0 0 60 85 0 14 0 0 0 0

C.C. 100 100 83.3 100 80 93.3 53.3 80 53.3 78 66.6 93.3 80 53.3 78 47 80
 I.H.U. 62 82.8 72 76 76 85.5 43.3 75 45.3 50.5 50.5 56.1 71.7 42.2 50.7 20 75
 A.A. 26.4 18.3 31.9 28.5 40.8 32 46.7 40 48.7 45.2 45.4 41.7 42.1 46.3 44 34 41

AMINAS Y COMPU-
 SITOS NITROGENADOS

etanol amina 84 94 100 100 80 100 75 100 100 100 57 75 100 100 20 100
 butil amina 36 22 40 100 80 100 0 0 0 0 43 75 67 40 40 100
 urea 46 100 100 60 60 17 75 75 20 0 83 14 0 0 0 0
 tiourea 36 83 100 20 0 17 0 0 0 14 0 0 14 0 0 0
 cianina 42 94 60 100 0 67 0 0 0 0 33 75 0 0 0 0
 cianina 47 100 100 60 60 17 75 100 20 0 83 43 0 0 0 0

C.C. 100 100 100 100 66.6 100 50 50 50 33.3 50 100 50 33.3 33.3 33.3 33.3
 I.H.U. 46.8 82.2 81.3 73.3 46.7 53 41.7 41.7 23.3 19 44.3 34 37.5 27.8 23.3 10 33.3
 A.A. 19.8 30.1 26.6 32.6 37.2 41.2 37.6 46.5 38.8 40 49 17.3 41 44.4 40.8 16.7 51.6

TOTALES:

C.C. 100 98.484.1 95.2 81 90.5 66.7 81 63.5 79.4 50.7 63.5 46 61.9 60.3 57.1 65
 I.H.U. 55.1 90.365 73.1 64.4 77.4 49.6 70.8 37.6 60.9 31.8 32.2 51.9 37.3 21 42.9
 A.A. 21.5 20 38.4 43.4 39.2 34.5 43.5 38.8 40.5 43.5 40 37.5 42.4 36.4 41 28.4 46.5

CRUDO EXTOC-I 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 25

TABLA 4

Frecuencia de utilización de los diferentes
 sustratos orgánicos (NUTRICIONALES).

CEPARIO
TOTAL

FRONTERAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
No. de cepas:	133	18	5	5	5	6	4	4	5	7	12	7	4	3	5	5	4

NOFISIOLÓGICAS:

Gran -	44	11	0	0	0	100	75	25	0	0	56	86	50	100	40	100	100
Gran +	56	89	100	100	100	0	25	75	100	100	42	14	50	0	40	0	0
Otro arreglo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Racimos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cedenas	3	0	0	0	20	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
1-2 células	97	100	100	100	80	100	100	100	100	86	100	100	100	100	100	100	100
Espora no deformante.	25	22	20	40	100	0	25	0	40	86	25	0	25	0	0	0	0
Espora deformante.	8	6	20	0	0	0	0	50	40	0	17	0	25	0	0	0	0
Pleomorfas	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Espirales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacilos	76	39	40	60	100	100	100	100	100	86	92	100	50	100	80	100	100
Cocos	17	61	60	40	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
Pigmento difusible	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otro color	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amarillo-verde	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	20	0
Maranja-rojo	2	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Creama-blanco	96	94	100	100	100	100	100	100	80	100	83	100	100	100	100	80	100
Oxidasa	51	11	0	0	40	83	100	23	100	14	75	14	50	33	60	100	23
Catalasa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ureasa	37	72	80	60	60	50	25	25	20	86	0	75	0	0	0	0	0
ADNasa	49	22	60	20	60	83	75	100	20	0	92	57	75	67	60	33	23
Gelatinasa	68	89	40	20	40	33	100	50	100	57	67	43	75	67	100	80	0
Tween 80	90	67	100	100	100	100	100	100	100	21	100	100	100	100	100	100	0
Amilasa	36	39	20	100	60	33	0	50	0	71	0	0	50	47	40	40	50
Lisina	34	11	0	80	40	83	25	75	0	57	8	29	25	33	80	20	23
P.H.B.	54	12	0	60	20	100	0	0	20	86	17	86	100	100	100	100	50
Fermentación de glucosa	78	61	75	100	100	83	100	100	20	100	100	71	25	100	60	100	0
Oxidación de glucosa	76	100	100	100	60	33	100	100	0	57	25	100	25	100	80	100	100
Respiración de nitratos	34	39	20	100	80	83	0	0	60	57	0	57	25	33	0	0	23
Reducción de nitritos	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
Reducción de nitratos	43	33	0	100	60	50	0	75	20	100	25	71	50	67	40	80	75
Prototrofia + vit. y a.a.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Prototrofia más vitamina	97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100
Prototrofia	97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100
Temp. 41°C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
37°C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4°C	72	89	60	100	100	100	75	75	0	14	100	100	100	33	40	0	100
Sal. 180 to.	42	89	80	20	100	83	0	0	20	14	8	14	75	0	0	0	50
120 to	75	100	100	40	100	100	100	75	100	57	50	71	100	100	80	0	50
70 to	85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	40	0	100
0 to	99	94	100	100	100	100	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	0

TABLA 5
PORCIENTOS A LAS RESPUESTAS POSITIVAS DE LAS PRUEBAS NOFISIOLÓGICAS

cocoides ocurrieron en un porcentaje bajo; la tinción Gram fué casi igual en porcentaje de positivos y negativos (56-44%) por lo que no se puede hablar de dominancia en este respecto.

En la producción de exoenzimas, la catalasa fué positiva para todas la cepas, y la lipasa (90%) y gelatinasa (68%) siguieron en importancia, estos resultados son lógicos de acuerdo al nicho ecológico que ocupan estas bacterias, es decir, con la producción de estas exoenzimas las bacterias pueden obtener -- fuentes de carbono y energía a partir de los alimentos consumidos por el camarón, y/o ayudar a la digestión del mismo. La población estudiada esta constituida principalmente por bacterias anaerobias facultativas, como lo demuestra la oxidación (100%) y la fermentación (78%) de la glucosa; en el metabolismo respiratorio, el nitrógeno es reducido al mínimo en condiciones de anaerobiosis, (34%) pero en presencia de oxígeno, solo se reduce del paso de nitratos a nitritos (43%) además, esta población es capaz de crecer sin necesidad de factores de crecimiento (prototroffias al 97% o más), el fenómeno 15.

Finalmente de acuerdo a los resultados de salinidad y temperaturas (Tabla 5), la población es Halotolerante y Euritérmica.

1.1.2 Caracteres nutricionales: El 98% de las cepas trabajadas fué capaz de crecer sobre petróleo crudo del pozo Ixtoc-I como único recurso de carbono y energía.

Los azúcares probados tuvieron un IMU de 55.1% y una A.A. de 9.4 lo cual nos indica la no especialización existente, teniendo un rango de utilización entre 35 y 59% para cada azúcar. Los ácidos grasos tuvieron un IMU de 45% y una A.A. de 34.3, estos datos reflejan la tendencia de las cepas hacia los ácidos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato, y poca afinidad por lo de cadena larga como el palmitato y el pelargonato, estos resultados son acordes con lo expuesto anteriormente por Colwell y Walker en 1977. La degradación de los ácidos grasos es de suma importancia en el intemperismo de los hidrocarburos (Higgins and Gilbert 1978).

Los ácidos dicarboxílicos, los ácidos orgánicos y los alcoholes y polialcoholes, fueron utilizados heterogeneamente sin especialización evidente (Tabla 4), el Lactato fué en general bien utilizado (62%), no así el Fenol (19%). De los aminoácidos probados, los más utilizados fueron la arginina, el glutámico y la alanina; en general los 15 aminoácidos tuvieron un IMU de 63.5% y una A.A. de 25.7, lo cual eviden--

cía una gran heterogenidad para utilizarlos que va desde un 17 hasta un 96%.

En el grupo de las aminas y compuestos nitrogenados (Tabla 4) existe una especialización para utilizar los diferentes compuestos, siendo la etanolamina el más utilizado y la tiourea la menos. En la Figura 6 se puede observar que los substratos más utilizados fueron la fructosa el acetato, succinato, citrato, - arginina y alanina y etanol-amina.

2. Análisis de fenones

El corte a 80% de similitud del dendrograma agrupa a 99 cepas de las 133 trabajadas en 16 fenones constituidos de la siguiente manera:

FENON	1	18 cepas	(2001-2103)
	2	5 cepas	(2022-2107)
	3	5 cepas	(2038-2057)
	4	5 cepas	(2054-2125)
	5	6 cepas	(3008-3066)
	6	4 cepas	(2118-3085)
	7	4 cepas	(3005-9000)
	8	5 cepas	(2071-2088)
	9	7 cepas	(2065-2085)
	10	12 cepas	(2016-2056)

20 30 40 50 60 70 80 90 100

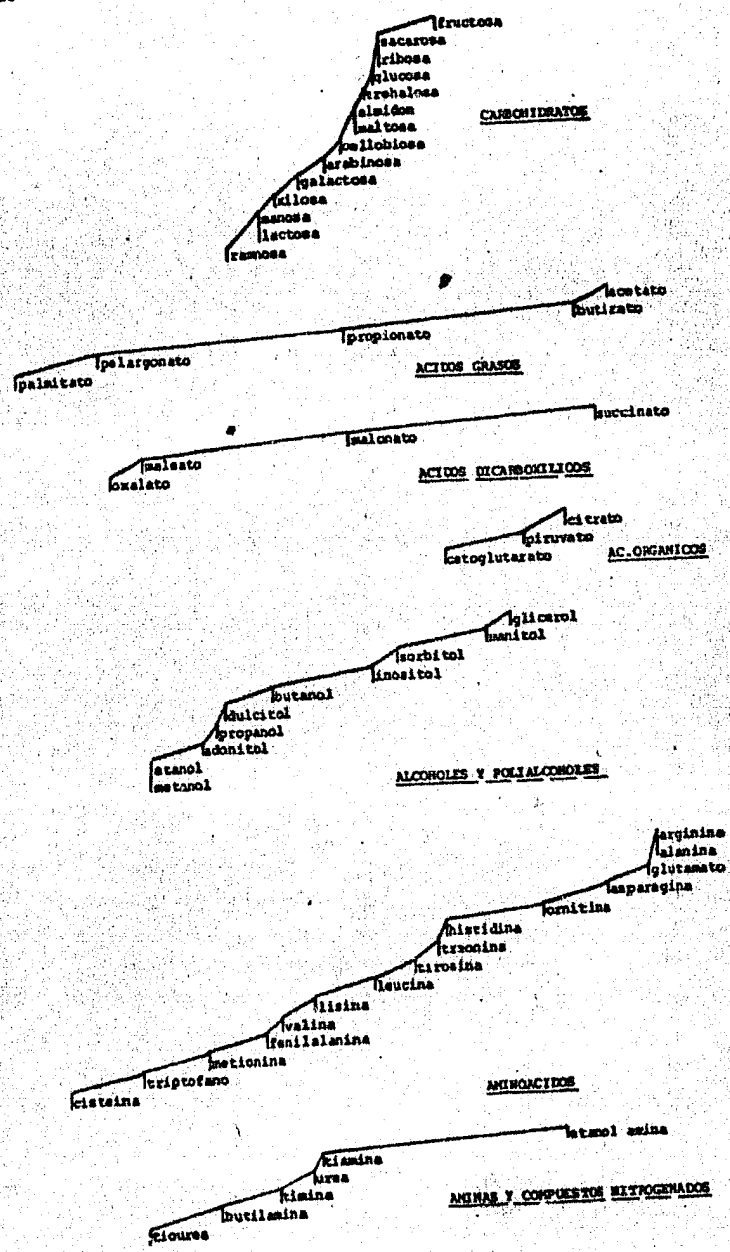


FIGURA 6 Tasa de utilización de compuestos orgánicos. se han excluido los hidroxilados y compuestos aromáticos por ser solo uno de cada uno.

FENON	11	7 cepas	(3064-3079)
	12	4 cepas	(2061-3065)
	13	3 cepas	(3001-3009)
	14	5 cepas	(3002-3020)
	15	5 cepas	(3035-3038)
	16	4 cepas	(9053-9060)

3.2.1 Descripción de fenones

FENON 1

Este fenón quedo constituido por 17 cepas aisladas - de P. aztecus y una cepa de colección Flavobacterium marinitopicum, todas ellas se unieron a 82.5% de similitud. (S_{SM})

Caracteres morfofisiológicos: -Positivos para el 90% o más de las cepas - las 3 prototroffias, oxidación de glucosa, catalasa, salinidades 0.70 y 120%, temperatura 37 y 41 °C, color crema blanco y el arreglo celular de 1 a 2 células. Otros porcentajes importantes fueron los de gelatinasa, salinidad 180‰, temperatura 4 °C, Gram positivo, todos ellos con 89% cada uno.

-Negativos o inferiores al 2% de las cepas: -pigmento difusible, formas espirales, pleomórficas, arreglos celulares en cadenas, racimos u otro arreglo.

Caracteres nutricionales: Este fenón tiene una -- gran potencialidad catabólica (C.C. 98.4) con un -- aprovechamiento individual por cepa de entre 51 a 60 substratos de los 63 probados, el IMU de 90.3% y la A.A. de 20 indican la gran capacidad de metabolizar cualquiera de los substratos probados.

- IMU's grandes con A.A. pequeños: Azucres (96.6-3.7), ácido dicarboxílicos (88.8-8), ácidos orgánicos (98-3.5), alcoholes y polialcoholes (96.67.2), aminoácidos (92.8-18.3). En todas las familias químicas citadas, el aprovechamiento de los substratos es heterogéneo excepto en los aminoácidos donde la cisteína solo es utilizada en un 28% de las cepas. Los resultados en la Tabla 4 denotan que el fenón es heterótrofo (in vitro) en una amplia gamma de substratos como única fuente de carbono y energía. La potencialidad hidrocarbonoclástica esta presente en todas las cepas del fenón.

FENON 2

Este fenón quedo establecido por 5 cepas de P. aztecus unidas a 80.1% de similitud.

Caracteres morfofisiológicos: Positivos para el 90% o más de las cepas: - Las prototrofias, oxidación de glucosa, lipasa, catalasa, salinidades 0.70 y

120%, temperaturas 37-41 °C, color crema blanco, arreglo celular de 1-2 células y Gram positivo. Ureasa y salinidad 180%, fueron también importantes con 80% cada una.

-Negativos o inferiores al 2% de las cepas: Reducción de nitratos, de nitritos, PHB, levan, oxidasa, pigmento difusible, formas espirales y pleomórficas, - arreglos en cadena racimos u otro arreglo.

Caracteres nutricionales: Individualmente cada cepa degrada entre 38 y 47 substratos de los probados, el fenón tiene un IMU de 65% y una A.A. de 38.4, lo que nos da una idea de amplia utilización pero con ciertas especializaciones en las familias químicas. La C.C. de 84.1 indica una buena proporción de substratos utilizados.

IMU's grandes con A.A. pequeños-azucares (88.6-17), ácido orgánico (86.7 4.5) aminas y compuestos nitrogenados (83.3-26.6). De los ácidos grasos solo 2 - fueron metabolizados, el acetato con 100% y el palmi_{ti}tato con 20%; en los dicarboxílicos hubo afinidad - por el succinato y de los alcoholes y polialcoholes - solo 6 fueron metabolizados, el mismo número fué uti_{li}zado en los aminoácidos. El rasgo hidrocarbonoclás_{ti}co esta presente en todas las cepas.

FENON 3

Este fenón quedo integrado por 5 cepas de P. aztecus unidas a 82.9% de similitud.

Caracteres morfofisiológicos: Positivos para el 90% o más: Las prototrofías, reducción de nitratos, respiración de nitratos, oxidación-fermentación de glucosa, amilasa, lipasa, catalasa, salinidad 0, 70‰, temperaturas 4, 37 y 41 °C, color crema-blanco, arreglo celular de 1-2 células y la tinción de Gram positiva.

Caracteres nutricionales: La C.C. de 95.2 hace ver una casi totalidad de aprovechamiento de los substratos, con un rango individual por cepa de entre 50 y 54 substratos, el IMU de 73.1 y la A.A. de 43.4 la poca especialización del fenón que puede considerarse con IMU's muy altos para todas las familias químicas.

De los aminoácidos excepto cisteína y triptofano, todos fueron bien metabolizados; en las aminas y compuestos nitrogenados la tiourea fué la única que no fué bien metabolizada; para los alcoholes y polialcoholes excepto el etanol, propanol y dulcitol, todos fueron bien metabolizados; de los ácidos grasos, el pelargonato contrariamente a los anteriores fenones fué asimilado por el 100% de las cepas.

-IMU's grandes con A.A. pequeños: azúcares (95.7-16), ácidos dicarboxílicos (90-20) y ácido orgánicos -- (100-0). El fenón también está constituido en su totalidad por cepas hidrocarbonoclasticas.

FENON 4

Integrado por 5 cepas de P. aztecus unidas a 82.3% de similitud.

Caracteres morfofisiológicos: Bacilos esporulados, Gram positivos, color crema-blanco, catalasa positiva, capaces de crecer sobre substratos orgánicos sin factores de crecimiento, fermentan la glucosa, presentan lipasa en 80%, capaces de crecer a las 3 temperaturas y las 4 salinidades probadas. Cada carácter con 100% de positividad.

Caracteres nutricionales: La C.C. de 81, el IMU de 66.4 y la A.A. de 39.2 denotan un potencial heterotrófico con poca especialización, individualmente cada cepa es capaz de degradar entre 35 y 50 substratos.

-IMU's grandes: azúcares (97.1), aminoácidos (76), ácidos orgánicos (73.3).

-IMU's bajos: Acido dicarboxílicos (45) alcoholes y polialcoholes (48) aminas y compuestos nitrogenados

(46.7), ácidos grasos (40). Este es un fenón morfológicamente bien definido y con poca especialización en sus características catabólicas, todas las cepas son hidrocarbonoclásticas.

FENON 5

Este fenón esta constituido por 5 cepas de P. setiferus y una de P. aztecus, todas se unieron a 82.3% de similitud. Los caracteres morfofisiológicos se dan a 100% de positividad.

Caracteres morfofisiológicos: Bacilos Gram negativos, catalasa positiva color crema-blanco, de 1-2 células, crecen sobre substratos orgánicos sin factores de crecimiento, contienen lipasas, PHB positivo, crecen a 0, 70 y 120% de salinidad y a temperaturas de 4, 37 y 41 °C.

Caracteres nutricionales: En este fenón, todas las familias químicas tienen un IMU superior al 50% lo cual indica un buen aprovechamiento en general de los substratos, aunque existe mayor afinidad por algunos, individualmente cada cepa utiliza entre 41 y 51 substratos.

-IMU's grandes: aminoácidos (85.5), ácido orgánico (100), azucares (90,4). La característica de degradar petróleo esta presente en todas las cepas del fenón.

FENON 6

Este fenón quedo constituido por 3 cepas de P. duorarum y una de P. aztecus unidas a 81.1% de similitud.

Características morfofisiológicas: Positivos para el 90% o más de las cepas: -Las prototrofías, oxidación-fermentación de la glucosa, lipasa, gelatinasa, catalasa, oxidasa, salinidades 0, 70 y 120%, temperaturas de 37 y 41° C, color crema-blanco, bacilos con arreglo celular de 1 a 2.

-Negativos o menor del 2% de las cepas: reducción de nitratos, respiración de nitratos, amilasa, salinidad 180%, pigmento difusible.

Caracteres nutricionales: La C.C. de 66.7, el IMU de 49.6 y la A.A. de 43.5 reflejan una potencialidad catabólica media. Este fenón solo aprovecha bien los azucares (85.7%) los ácidos orgánicos (100%) y los menos utilizados son los ácidos grasos (20%) y los alcohóles (27.5), los dicarboxílicos, los aminoácidos y las aminas son utilizados regularmente (Tabla 4) - todas las cepas son hidrocarbonoclasticas. /

FENON 7

Este fenón quedo integrado por 3 cepas salvajes, y

una de colección Bacillus subtilis, todas estas cepas se unieron a un nivel de similitud de 81.3%.

Características morfofisiológicas: Positivos para el 90% o más de las cepas: las prototofias, oxidación-fermentación de la glucosa, lipasa, ADNasa, catalasa, salinidad 70‰, temperaturas 37 y 41 ° C, color crema-blanco, bacilos con arreglo celular de 1-2.

-Negativos o menor del 2% de las cepas: Pigmento difusible, salinidad 180‰, PHB, reducción de nitritos y respiración de nitratos.

Caracteres nutricionales: Una C.C. de 81, un IMU de 70.8 y una A.A. de 38.8 revelan un aprovechamiento en general bueno con muy poca especialización, excepto en ácidos grasos y aminos y compuestos nitrogenados donde incluso el A.A. de las familias químicas es superior al IMU cada cepa de este fenón individualmente es capaz de aprovechar entre 42 y 52 de los substratos probados.

IMU's grandes - azucares (91), ácido orgánico (83.3), alcoholes y polialcoholes (75) y aminoácidos (75).

El 75% de este fenón es capaz de crecer sobre fenol como única fuente de carbono y energía, el 100% crece sobre crudo Ixtoc-I.

FENON 8

Este fenómeno está integrado por 5 cepas de P. aztecus que se unieron a un porcentaje de similitud de 82.1%.

Características morfofisiológicas: Bacilos, Gram positivo, de 1-2 células, catalasa positiva, oxidasa positiva, crecen sobre substratos orgánicos sin necesidad de factores de crecimiento, lipasa positiva, gelatinasa positiva, toleran salinidades de 0,70 y 120% y temperaturas de 37-41°C. Todos los caracteres anteriores fueron positivos al 100%.

Caracteres nutricionales: Un A.A. superior al IMU (40.5 37.6) y una C.C. de 63.5 reflejan una especialización hacia ciertos substratos (Ac. grasos y orgánicos) con un aprovechamiento individual por cepa de entre 22 y 34 substratos de los 63 probados, este fenómeno no utiliza, bien los azúcares (IMU- 28.6, A.A. = 30).

-IMU's menores a sus A.A.: aminas y compuestos nitrogenados, aminoácidos, alcoholes y polialcoholes, ácidos dicarboxílicos y azúcares. El rasgo hidrocarboclastico está presente en todas las cepas.

FENON 9

Este fenómeno está compuesto por 7 cepas de P. aztecus a una similitud de 80.2%.

Caracteres morfofisiológicos: Positivos para el 90% o más de las cepas: Las prototroías, reducción de nitratos, fermentación de glucosa, catalasa, salinidades 0 y 70%, temperaturas de 37 y 41° C, color crema-blanco, Gram positivo. Otros porcentajes importantes fueron el PHB, la ureasa, bacilos, esporulados, arreglo de 1-2 células, cada uno de estos caracteres posee el 86% de las cepas del fenón.

-Negativos o inferiores del 2% de las cepas: reducción de nitritos, y ADNasa.

Caracteres nutricionales: En general el fenón aprovecha regular los substratos probados, con menos afinidad por las aminas (IMU=19), las cepas individualmente consumen entre 37 y 44 de los substratos. En este fenón la C.C. es de 79.4, el IMU de 60.7 y la A.A. de 43:5.

IMU's grandes: azucares (90.6), ácidos orgánicos (100), ácidos grasos (68.8). El 14% del fenón crece sobre fenol como fuente de carbon y energía, el 100% utiliza el crudo Ixtoc-I.

FENON 10

Este fenón constituye una mezcla de cepas, donde de las 12 que lo integran, 2 son de colección Brevibac-

terium albidum y Moraxella phenylpiruvica, todas las demás fueron aisladas de las 3 especies de camarón, y se unieron a 82.2% de similitud.

Características morfofisiológicas: Positivas para el 90% o más de las cepas: Las prototofias, fermentación de glucosa, lipasa, ADNasa, catalasa, salinidades de 0 y 70‰, temperaturas de 4, 37 y 41° C, bacilos con arreglo celular de 1-2 células.

-Negativos o menores del 2% de las cepas: reducción de nitratos y de nitritos, amilasa, ureasa, pigmento difusible.

Caracteres nutricionales: Una C.C. de 50.7, una A.A. mayor que el IMU (40 31.8) reflejan claramente una especialización hacia ciertos compuestos dentro de cada familia química y en general hacia los aminoácidos (IMU = 50.5). El único azúcar bien aprovechado fué la fructosa (100) de los ácidos grasos el acetato y butirato (92% c/u), de los alcoholes el glicerol (100) y de las amins la etanolamina con un 100% de utilización. Individualmente cada cepa utiliza entre 16 y 24 de los substratos probados, el potencial hidrocarbonoclástico esta presente en todas las cepas del fenón.

FENON 11

El fenón esta constituido por 7 cepas de P. duorarum a un porcentaje de similitud de 83.2

Caracteres morfofisiológicos: Positivos para el 90% o más: Las prototrofías, oxidación de la glucosa, ge latinasa, catalasa, salinidades de 0, 70‰, temperaturas de 4, 37 y 41° C, color crema-blanco, bacilos - de arreglo celular de 1-2. Otros porcentajes importantes fueron el PHB, Gram negativos, con el 86% cada uno.

-Negativos o inferiores del 2%: Respiración de nitratos, amilasa, ureasa, y pigmento difusible.

Características nutricionales: Este fenón tiene un potencial heterotrofico bjaio, con afinidad hacia los ácidos orgánicos (IMU= 66.6) y los aminoácidos (IMU= 56.1) y con muy poca afinidad por los azucares (IMU= 4) los alcoholes (IMU+ 11.4). Las cepas de este fenón individualmente utilizaron entre 18 y 24 substratos de los probados, el carácter hidrocarbonoclástico esta presente en todas las cepas del fenón.

FENON 12

Este fenón posee 4 cepas que son una mezcla de las 3 especies de camarón, la unión de las cepas ocurrió a un nivel de similitud de 80.2%.

Características morfofisiológicas: Positivas para el 90% o más: Las prototrofías, PHB, lipasa, catalasa, salinidades de 0, 70 y 120‰, temperaturas de 4, 37 y 41 °C, color crema-blanco, arreglo celular de 1-2 células.

Características nutricionales: La C.C. de 46, el IMU de 32.2 y una A.A. de 42.4, muestran que el fenón tiene una clara preferencia en sus hábitos nutricionales, encaminada hacia los aminoácidos (IMU 71.7).

De los azúcares probados, solo la glucosa fué bien metabolizada por todas las cepas; de los ácidos grasos solo el acetato mientras que de los dicarboxílicos el malonato y el succinato; en los ácidos orgánicos y en los alcoholes, ninguno fué utilizado. Individualmente cada cepa utiliza entre 22 y 24 substratos. El potencial hidrocarbonoclastico estuvo presente en todas las cepas del fenón.

FENON 13

El fenón esta constituido por 3 cepas de P. aztecus a un nivel de similitud de 81.6%

Caracteres morfofisiológicos: Bacilos de 1-2 células, Gram negativos, no esporulados, color crema-blanco, catalasa positiva, lipasa positiva, oxidan y fermentan.

tan la glucosa, PHB positivo, crecen sobre substratos orgánicos sin necesidad de factores de crecimiento, toleran salinidades de 0-120‰ y temperatura de 37-41° C. Todos al 100% de positividad.

Caracteres nutricionales: Este fenón posee un potencial heterotrófico regular con mayor afinidad por los ácidos grasos, los ácidos orgánicos y los dicarboxílicos; de los azúcares probados solo la ribosa y el almidón fueron bien metabolizados, de los alcoholes el etanol y el butanol en tanto de los aminoácidos - la tirosina, alanina, asparagina, glutamato y arginina fueron bien metabolizados. Cada cepa del fenón metabolizó entre 30 y 32 substratos de los probados, y todas las cepas presentaron la característica hidrocarbonoclástica.

FENON 14

Este fenón quedó constituido por 5 cepas, pertenecientes a P. aztecus y P. setiferus las cuales se unieron a 82% de similitud.

Caracteres morfofisiológicos: Positivos para el 90% o más de las cepas: Las prototrofias, PHB, lipasa, -gelatinasa, catalasa, salinidad de 0‰, temperaturas de 37 y 41° C, color crema-blanco, arreglo de 1-2 células.

Otros porcentajes importantes fueron la oxidación de glucosa, producción de levan, salinidad 120‰, forma bacilar, cada uno de estos con el 80% de las cepas.

-Negativos: Reducción de nitritos, respiración de nitratos, ureasa salinidad de 180‰, y pigmento difusible.

Caracteres nutricionales: Este fenón tiene afinidad por los ácidos grasos, ácidos orgánicos y aminoácidos; no metaboliza bien ninguno de los azúcares probados, de los alcoholes solo el etanol fue bien aprovechado y de las aminas la etanol amina fue bien metabolizada. Individualmente cada cepa del fenón metaboliza entre 22 y 31 substratos. Todas las cepas son hidrocarbonoclásticas.

FENON 15

Este fenón contiene 5 cepas de P. setiferus unidas - al 80.3% de similitud. Los caracteres morfofisiológicos se dan a 100% de positividad.

Caracteres morfofisiológicos: Bacilos de 1-2 células, Gram negativos, no esporulados, catalasa y oxidasa - positivas, oxidan y fermentan la glucosa PHB positivo, crecen sobre salinidad 0‰ y a temperaturas de 37-41° C, este fenón solo crece con factores de creci

miento (vitaminas y aminoácidos). Otros porcentajes importantes: Reducción de nitratos, gelatinasa, color crema-blanco, cada uno con el 80% de las cepas.

Caracteres nutricionales: Es este un fenón particularmente interesante ya que solo creció bien en 4 substratos (propionato, butirato, alanina y arginina), en todos los demás el porcentaje de aprovechamiento estuvo entre 0 y 80% de las cepas, individualmente cada cepa utilizó entre 11 y 24 substratos, el potencial hidrocarbonoclástico esta presente en todas las cepas del fenón, sin embargo no se puede inferir que este sea el más especializado del grupo hasta no haber probado nuevamente los substratos, pero agregando los factores de crecimiento que requiere en el medio.

FENON 16

Este fenón quedó integrado por 4 cepas de colección pertenecientes al grupo de las Pseudomonas, P. marina, P. putida (P_pG_1), P. arvilla y P_pS 126 o P. putida, todas ellas se unieron a un porcentaje de similitud de 85.6%, solo una presente la característica hidrocarbonoclástica, pero esto puede ser atribuido a que la lectura del medio no se efectuó a su debido tiempo, es decir no fue a 2 meses sino a 15 días de sembrado.

Caracteres morfofisiológicos: Bacilos Gram negativos, de 1-2 células, color crema-blanco, catalasa positiva, crecen sobre substratos orgánicos sin necesidad de factores de crecimiento, oxidan la glucosa pero no la fermentan, crecen a temperaturas de 4, 37 y 41°C y sobre concentraciones de sal de 70%. Cada carácter con 100% de positivos.

Caracteres nutricionales: El fenón presento una C.C. de 65 lo cual indica que los substratos fueron aprovechados regularmente por las cepas, tienen preferencia por los aminoácidos (IMU-75), los ácidos orgánicos (IMU 100) y los ácidos grasos (IMU = 80).

Aprovecharon bien 4 de los azúcares, ribosa, fructuosa, glucosa y sacarosa; el succinato fue utilizado al 100% de las cepas; de los alcoholes el etanol y el glicerol fueron bien aprovechados (100%), de las aminas, la etanolamina y la butilamina fueron asimiladas por el 100% de las cepas. Un rasgo importante del fenón lo constituye el hecho de que el 50% fue capaz de crecer sobre fenol como fuente de carbono y energía.

3.2.2 Discusión de fenones

En relación a la procedencia de las bacterias que integran los fenones, se observa que P. aztecus, P. duorarum y P. setiferus poseen grupos bacterianos particulares (Tabla 6), pero además existen grupos de bacterias que se encuentran indistintamente en cualquiera de los 3 peneidos, este hecho puede ser explicado en función de la existencia de bacterias autóctonas del intestino, pero también de alóctonas a él, es decir este último grupo estaría constituido por las bacterias del agua y de los sedimentos donde vive el camarón y que consecuentemente sería ingeridas por este.

La mayor distribución de la microflora de P. aztecus en los fenones, puede ser atribuida a que el número de cepas trabajadas de esta especie fué mayor que el de P. setiferus y de P. duorarum, sin embargo en cuanto a P. aztecus únicamente, se observa una gran heterogeneidad de la población que constituye su microflora, en función de su distribución en 12 de los 16 fenones trabajados, además de que en la composición morfológica de su población presenta formas bacilares, cocoides y pleomórficas. (Tabla 7).

Un rasgo distintivo entre P. aztecus y las otras 2

FENONES	E S P E C I E S	MEZCLA
1	<u>P. aztecus</u>	
2	<u>P. aztecus</u>	
3	<u>P. aztecus</u>	
4	<u>P. aztecus</u>	
5	_____	X
6	_____	X
7	_____	X
8	<u>P. aztecus</u>	
9	<u>P. aztecus</u>	
10	_____	X
11	<u>P. duorarum</u>	
12	_____	X
13	<u>P. aztecus</u>	
14	_____	X
15	<u>P. setiferus</u>	
16	COLECCION	

TABLA 6 Distribución de los fenones por especie de camarón trabajada.

FENON	No. de cepa	Aislada de:	Estacion	Forma
	2001	<u>P. aztecus</u>	10	esporulado +
	2003	"	10	coco +
	2005	"	10	"
	2011	"	10	"
	2019	"	10	"
	2009	"	10	"
	2012	"	10	"
	2013	"	10	"
	2020	"	10	"
1	2007	"	10	esporulado +
	2008	"	10	"
	2021	"	10	"
	2031	"	10	bacilo -
	2030	"	10	coco +
	2111	"	5	"
	2064	"	32	"
	9200	Colección	--	----
	2103	<u>P. aztecus</u>	5	esporulado +
	2022	<u>P. aztecus</u>	10	coco +
	2033	"	10	"
2	2058	"	32	"
	2067	"	5	esporulado +
	2107	"	5	"
	2038	<u>P. aztecus</u>	32	esporulado +
	2048	"	32	"
3	2051	"	32	"
	2052	"	32	coco +
	2057	"	32	"
	2054	<u>P. aztecus</u>	32	esporulado +
	2122	"	5	"
4	2123	"	5	"
	2062	"	32	"
	2125	"	5	"
	3008	<u>P. aztecus</u>	10	bacilo -
	3050	<u>setiferus</u>	7	"
	3055	"	7	"
5	3056	"	7	"
	3058	"	7	"
	3066	<u>duorarum</u>	10	"
	2118	<u>P. aztecus</u>	5	esporulado +
	3072	<u>duorarum</u>	10	bacilo -
6	3075	"	10	"
	3085	"	10	"

Tabla 7

Información ecológica de los fenones

sigue...

7	3005	<u>P.aztecus</u>	10	bacilo -
	3089	<u>duorarum</u>	10	bacilo +
	2055	<u>P.aztecus</u>	32	bacilo +
	5000	colección	--	-----
8	2071	<u>P. aztecus</u>	5	esporulado +
	2089	"	5	"
	2074	"	5	"
	2093	"	5	"
	2088	"	5	bacilo +
9	2065	"	32	esporulado +
	2098	"	5	"
	2066	"	5	"
	2094	"	5	"
	2097	"	5	"
	2100	"	5	coco +
	2085	"	5	esporulado +
10	2016	<u>P.aztecus</u>	10	esporulado +
	2059	"	32	"
	3028	"	10	bacilo -
	3057	<u>setiferus</u>	7	"
	3022	<u>aztecus</u>	10	"
	3029	"	10	"
	9063	colección		-----
	9067	colección		-----
	3030	<u>aztecus</u>	10	bacilo -
	3070	<u>duorarum</u>	10	pleomorfismo +
3077	"	10	bacilo - +	
2056	<u>aztecus</u>	32	esporulado +	
11	3064	<u>P. duorarum</u>	10	bacilo -
	3069	"	10	"
	3080	"	10	"
	3083	"	10	"
	3090	"	10	"
	3076	"	10	"
	3079	"	10	"
12	2061	<u>P.aztecus</u>	32	esporulado +
	3060	<u>setiferus</u>	32	"
	3063	<u>duorarum</u>	32	pleomorfismo -
	3065	"	32	"
13	3001	<u>P.aztecus</u>	10	bacilo -
	3006	"	10	"
	3009	"	10	"

sigue.....

	3002	<u>P. aztecus</u>	10	bacilo +
	3021	"	10	"
14	3031	<u>setiferus</u>	7	bacilo -
	3004	<u>aztecus</u>	10	pleomorfismo -
	3020	"	10	bacilo -
	3035	<u>P. setiferus</u>	7	bacilo -
	3046	"	7	"
15	3042	"	7	"
	3048	"	7	"
	3038	"	7	"
	9053	colección		
	9057	colección		
16	9058	colección		
	9060	colección		

Tabla 5

Información ecológica de los fenones

especies trabajadas, es que presenta una microflora predominantemente anaerobia facultativa Gram positiva, y esporulada, en tanto las otras 2 especies contienen microflora no esporuladas y además Gram negativos.

El rasgo de halotolerancia en cepas de la microflora de los peneidos estudiados, coincide con lo anteriormente expuesto para microfloras de peces por otros autores (Liston, 1956; Simidu et al., 1969). En general y de acuerdo al IMU, los fenones se pueden clasificar arbitrariamente en 3 niveles de heterotrofia, AMPLIA de 65 a 100%, REGULAR de 40 a 65% y RESTRINGIDA de 20 a 40% (Tabla 8). Entre 11 y 60 substratos son utilizados por el total de la población, siendo el fenón 1 el que utiliza el mayor número de estos y el fenón 15 el que utiliza el menor número. Es interesante que un fenón en cuanto más especializado resulta ser, no utiliza los azúcares.

De acuerdo a lo descrito por Bensoussan et al., 1979, de que en un medio rico en nutrientes (como el intestino) las cepas se adaptan a utilizar solo ciertos substratos, en tanto en un medio pobre en nutrientes (como el agua y los sedimentos donde habita el camarón) las bacterias utilizan una gran va-

riedad de substratos, y utilizando el criterio de heterotrofia restringida, podemos suponer que tal vez los fenones 8, 11 y 15 seán autóctonos de sus respectivas especies (Tabla 7), en tanto los otros tal vez seán alóctonos al intestino, es que solo se encuentren de paso en el mismo o como alimento al ser absorbidas junto con los sedimentos estando estas adheridas a ellos (Moriarty, 19-77).

Todos los fenones de P. aztecus excepto el 13 están dentro del bloque de los fenones de potencial heterotrófico amplio, mientras que el 11 y 15 de P. duorarum y P. setiferus respectivamente entran en el bloque de los fenones de relativa menor heterotrofia. El potencial hidrocarbonoclástico presente en todo el cepario trabajado, puede ser explicado en función del método de aislamiento utilizado (materiales y métodos), que no permitió la presencia de cepas que utilizarán los metabolitos de las verdaderas hidrocarbonoclásticas; con respecto a la proporción de hidrocarbonoclásticas en el grupo de las heterotrofas en el tracto intestinal, la metodología aplicada no permitió conocerla, y debe considerarse importante este índice para estimar el papel desempeñado por esta flora en el intestino, es decir, si su presencia en el intestino es un hecho fortuito -

al momento de la disección por haberlas ingerido el camarón, o verdaderamente están ahí por necesidad - creada por el hidrocarburo presente en el ambiente del camarón; asimismo, en este trabajo no se estimó la tasa de degradación de hidrocarburos en las cepas estudiadas, pero debe investigarse para poder visualizar la magnitud del papel que juegan los camarones en la biodegradación de ecosistemas contaminados con hidrocarburos fósiles.

Otro punto relevante de este campo es el tratar de extender este tipo de estudios hacia el mayor número de invertebrados marinos, además se debe profundizar también en la extensión de la degradación llevada a cabo por estas microfloras para de esta manera integrar el conocimiento de las potencialidades hidrocarbonoclasticas en los invertebrados y en el futuro poder considerarlos como un factor más en la biodegradación de los hidrocarburos. Posiblemente el enfoque más importante desde el punto de vista - comercial, es el de investigar que metabolitos de estas bacterias pueden ser aprovechados por el hombre, p. ej. vitaminas, proteínas sus emulsificantes que usan para la biodegradación etc.

A pesar que en este trabajo no se pudo caracterizar

taxonómicamente a las cepas trabajadas, constituye un importante adelanto en el campo de la biodegradación de hidrocarburos puesto que abre nuevos horizontes a investigar.

4. CONCLUSIONES

A través de este estudio se pone de manifiesto la existencia de bacterias hidrocarbonoclásticas en el tracto intestinal de los camarones.

Dada la característica hidrocarbonoclástica de todas las bacterias trabajadas, se puede pensar que estas actúan de 2 formas, una que proporcionan nutrientes al organismo que las contiene (camarón) mediante la biodegradación de los hidrocarburos, y/o que sirven para "limpiar" el alimento ingerido por el organismo y dejarlo libre del hidrocarburo, siendo de esta forma asimilable por el camarón. Esto solo se podrá corroborar con estudios especializados sobre el tema.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos ubicar 3 niveles de potencial heterotrófico en los peneidos estudiados: AMPLIO, REGULAR y RESTRINGIDO, lo cual está haciendo que los nutrientes sean aprovechados diferencialmente por la microflora y que este aprovechamiento pueda redundar directamente en la microflora y/o en ayuda del camarón.

Dada la abundancia y distribución de las bacterias aisladas de P. aztecus se puede hablar de un Ecotipo bacteriano para esta especie de peneido, tal sería: dominancia de bacilos esporulados Gram positivos de arreglo celular de 1-2, anaerobios facultativos, crecen sin necesidad de factores de creci

miento, halotolerantes y euritérmicos con un potencial heterotrófico AMPLIO. Acerca de la agrupación de las cepas por especie de peneido, los resultados sugieren la presencia de una microflora particular para cada camarón, pero que además poseen bacterias que no son específicas del tracto intestinal, pudiendo explicarse su presencia por los conceptos de alocto y autóctono.

Las morfologías encontradas para P. setiferus y P. duorarum son diferentes a las reportadas por Williams y Horace en 1952, asimismo, los resultados expuestos para P. aztecus difieren de los reportados por Bianchi y Bianchi en 1980 para P. monodon en tanto su flora es Gram negativo y no puede crecer a bajas temperaturas y en ausencia de sal.

Con respecto a la formación de 16 fenones en solo 133 cepas trabajadas, se observa que la población reunida es diversa y que además para ubicarlas mejor, se deben utilizar un mayor número de cepas de referencia sí es el caso de que parezcan a las ya descritas por otros autores, de no ser así se debe continuar con la taxonomía de esta población, es decir, efectuar hibridaciones de ácidos nucleicos y porcentaje de guanidina-citosina para poder llegar a géneros y especies.

Aparentemente, el sitio de captura de los camarones no muestra influencia en el agrupamiento de los grupos bacterianos encontrados. Se puso de relieve que los grupos trabajados -

utilizan preferentemente los azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y polialcoholes y los aminoácidos.

El metabolismo del nitrógeno es muy restringido, y la producción de exoenzimas es importante en lipasas y gelatinasa.

Se recomienda continuar con este tipo de estudios para tener una visión más amplia del panorama y poder profundizar sobre algún aspecto en particular.

En la producción de exoenzimas, catalasa y lipasa fueron homogéneamente altas (90% ó más) para todos los fenones y consecuentemente para las 3 microfloras de las especies de cámara trabajadas, en orden de importancia siguió la gelatinasa (68%) que se distribuyó heterogéneamente en la población total y aún en los fenones de la especie P. aztecus donde adquiere valores desde un 10% hasta un 100%.

La capacidad de degradar el Twen 80 y la Gelatina, son aspectos reelevantes en el nicho ecológico que ocupan las bacterias estudiadas, han sido reportados anteriormente para copépodos y peces (Sochard et al, 1979; Bianchi y Bianchi, 1980).

En el metabolismo respiratorio (Tabla 5), el nitrógeno solo es reducido al máximo en anaerobiosis, en tanto en presencia de oxígeno solo es utilizado en el paso de nitratos a nitritos. Por lo que respecta a la fermentación de la glucosa, - excepto el fenón 8 y 13, la respuesta fué de más del 60% pa-

ra todos los demás fenones, lo cual nos hace ver que en todos los fenones y por ende en las tres especies de camarón estudiadas, la microflora es predominantemente anaerobia facultativa, resultados acordes con Williams y Horace en 1952 para P. setiferus y P. duorarum.

En el aspecto de la temperatura y la salinidad, la población tolera desde 4 °C y desde 0‰, aunque es importante hacer notar que los fenones 8 y 15 no crecen a 4 °C y que los fenones 6, 7, 13, 14 y 15 no crecen en 180‰.

Esta característica hace que la microflora hidrocarbonoclástica de Penaeus aztecus sea aparentemente diferente a lo reportado por otros autores para peces (Bianchi y Bianchi, 1980), isópodos (Sochard et al, 1979) y copépodos (Oliver et al, 1981), los cuales poseen una microflora heterótrofa predominantemente no esporulada Gram negativa, destacando Vibrio y Pseudomonas.

Williams y Horace (1952) reportan como flora heterótrofa normal de P. setiferus y P. duorarum las formas cocoides y las esporuladas, además reportan no encontrar diferencia entre las especies de camarones trabajadas, en este estudio no se reportan ni cocos ni esporulados para estas especies, sin embargo si se encuentra diferencia entre las dos especies de camarones en cuanto a los fenones formados, estas diferencias en resultados se deben atribuir a el grupo de bacterias hi--

drocarbonoclasticas con que se trabaja, que aunque también -
son heterótrofas, son un grupo más restringido.

Con respecto al lugar de captura de los camarones en relación
a la cercanía a las fuentes de contaminación de hidrocarburos
(Fig. 1) no se nota una clara influencia en la forma de agru-
pación de las cepas en los distintos fenones, sin embargo es
to no niega la posibilidad de una presión de selección ejer-
cida por las fuentes contaminantes de hidrocarburos hacia -
las microfloras de los organismos que vien cerca de ellas.

5. A P E N D I C E

AGUA DE MAR (Lyman & Fleming, 1940):

Esta solución es empleada en casi todos los medios utilizados, incluyendo los de dilución; se utiliza para proporcionar salinidad a las bacterias trabajadas y porque es un medio químicamente definido, la siguiente fórmula es 5 veces concentrada por lo que al usarla se debe diluir a razón de 200 ml en cada litro que se prepare, la concentración final del medio será de 20‰.

NaCl	1.175 Kg
Mg Cl ₂	248 g
NaSO ₄	195 g
Ca Cl ₂	30 g
K Cl	33 g
Na HCO ₃	9.6 g
KBr	4.8 g
H ₃ BO ₃	1.3 g
SrCl.6H ₂ O	1.2 g
NaF	15 g
NH ₄ Cl	36 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
H ₂ O destilada	20 l

MEDIO ZOBELL (Tipo 2216 E); Oppenheimer-Zobell, 1952.

Este medio fue diseñado especialmente para trabajar con bac-

terias marinas, por lo que en este estudio fué utilizado para el aislamiento, la conservación de las cepas y aún para pruebas fisiológicas como temperaturas y salinidades:

Bacto-Peptona (Difco)	5 g
Extracto de Levaduras (Difco)	1 g
Cloruro Ferrico ()	1 ml
Agua Destilada	800 ml
Agua de Mar	200 ml

Ajustar pH 7,5-7,6

Agar Bacteriológico	15 g
---------------------	------

Este medio se esteriliza durante 20 minutos a 121° C y se vierte en cajas de petri.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS:

CATALASA:

La presencia de esta enzima es detectada con la adición de peróxido de hidrógeno (Agua oxigenada) sobre la colonia bacteriana, el desdoblamiento del peróxido en agua y oxígeno producirá burbujas que se consideran como respuesta positiva en caso contrario es negativa la respuesta.

OXIDASA: Kovacs 1956.

Esta prueba detecta la presencia de Citocromo C en la cepa bacteriana; se debe utilizar asa de platino para transportar

la cepa a un disco de papel filtro que se ha mojado previamente con el reactivo de Kovacs, si se vira el color a morado se considera respuesta positiva, de lo contrario es negativa.

TINCION DE GRAM (Park, 1980)

Violeta gram: Solución alcoholica saturada de cristal violeta.

..... 114 ml

Agua destilada, 1 l

Lugol: Yodo 1 g
Yoduro de potasio 2 g
Agua destilada 300 ml

Safranina: Solución alcoholica saturada 10 ml
Agua destilada 90 ml

Se tiñe primero con violeta durante 1 minuto y se lava, se fija con lugol también 1 minuto y se vuelve a lavar, se decolora con alcohol 96° de 30 a 45 segundos y se lava nuevamente; finalmente se contrasta con safranina durante medio minuto y se vuelve a lavar. Las bacterias teñidas de violeta son positivas, las que presenten un color en el rango de rojo-naranja son negativas.

TEMPERATURAS:

En esta prueba se utiliza el medio ZoBell como base y el faq

tor a probar que es la temperatura, solo se varia a la que uno desee.

SALINIDADES:

En esta prueba también se utiliza el medio de ZoBell pero el agua de mar sintética se sustituye por agua destilada para la concentración de 0%, o por sal de mar no tratada para las concentraciones de 70, 120 y 180.

OXIDACION-FERMENTACION DE GLUCOSA (Hugh et Leifson, 1953)

Bacto-casitona (Difco)	.1 %
Extracto de levadura	.01%
Sulfato de amonio	.05%
Buffer tris-HCl	.05%
Rojo de fenol	.001%
Agua destilada	800 ml
Agua de mar	200 ml
Glucosa	entre .5 y 1%

pH 7.5

Para la fermentación de la glucosa, se vierte el medio en am polletas y se cubre con un tapón de parafina, en el caso de la oxidación, también se vierte en ampolletas, se inocula pe ro no se cubre con el tapón de parafina.

AMILASA (Stainer et al, 1966)

Esta prueba detecta la presencia de enzimas que degradan el almidón:

Agar nutritivo	23 g
Almidón soluble	1.5 g
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5-7.6

Se esteriliza el medio a 121° durante 20 minutos el almidón - se agrega hasta que ya se esterilizo el medio y se agrega - con un Swinex de .22 el medio se reparte en cajas de petri.

La respuesta positiva se observa al agregar lugol sobre la caja y formarse un halo transparente alrededor de las colo--nias, el caso contrario es una respuesta negativa.

ADNasa: (Jeffries et al, 1957)

Para detectar la presencia de esta enzima se utiliza:

Agar para prueba de ADNasa (Difco)	42 g
Agua de mar sintética	200 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5-7.6

Después de incubar, las cajas se recubre con HCl 1N y si hay formación de un halo transparente alrededor de la colonia, - la respuesta se considera positiva, en caso contrario es ne- gativa. El medio se esteriliza a 121° C durante 15 minutos.

GELATINASA (Frazier, 1926)

Esta prueba la presencia de exoenzimas proteolíticas:

Agar nutritivo	23 g
Gelatina	4 g
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5-7.6

El medio se esteriliza a 121° C durante 15 minutos y se vierte en cajas de petri; se considera respuesta positiva si al agregar Cloruro Mercurico (fórmula abajo) se forma un halo transparente alrededor de la colonia:

Cloruro mercurico	15 g
HCl concentrado	20 ml
Agua destilada	100 ml

TWEN 80: (Sierra 1957)

Esta prueba detecta exoenzimas lipídicas mediante la forma--ción de un halo blanco de cristales de calcio alrededor de la colonia:

Agar nutritivo	23 g
Twen 80	10 ml
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5-7.6

UREASA: (Roland et al, 1947)

La detección de este exoenzima se logra viendo si el medio -
abajo descrito vira de rojo a morado.

KH_2PO_4	1 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Urea	20 g
Alcohol de 96° C	10 ml
Rojo de Fenol al 1%	.25 ml
Agua destilada	1 ml

pH 6.7

REDUCCION DE NO_3 Y DE NO_2 : (ZoBell, 1932)

Caldo nutritivo	8 g
KNO_3	1 g
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5-7.6

El medio se esteriliza por espacio de 20 minutos a 121° C, se
esteriliza una vez que fué vertido en frascos pildoreros de
5 mililitros a razón de † 2 ml c/u. A los frasquitos inocu-
lados se le agregan unas cuantas gotas del reactivo de Griess
A y del "B", si aparece una coloración rojiza o marrón la re-
ducción a nitritos es positiva; si no hay cambio en la colo-

ración se añaden unos cuantos granos de polvo de Zinc, si se torna rojo indica que los NO_3 no fueron atacados, pero si no cambia de color, es indicativo de una reducción más allá de nitritos.

REACTIVO DE GRIESS A

Acido Sulfanílico 8 g
Acido Acetico 1 l

REACTIVO DE GRIESS B

Naftilamina 5 g
Acido Acetico 1 l

PRODUCCION DE GAS NITROGENO: (ZoBell, 1932)

Esta prueba detecta el metabolismo anaerobio de los NO_3 hasta la formación de N_2 y se considera positiva si el tapón de parafina aplicado a la ampollita después de la inoculación, es expulsado por presión al cabo de 15 días:

KNO_3	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glicerol	10 g
Bacto Agar (Difco)	1 g
Agua de mar	100 ml
Agua destilada	800 ml

pH 7.5

El medio se reparte en ampollitas a razón de $\frac{1}{2}$ 2 ml c/u y se esteriliza durante 20 minutos a 121°C .

ACUMULACION DE PHB (Stanier et al., 1966)

Esta prueba detecta la acumulación del poli-beta-hidroxibutirato en el interior de la célula, y esto se observa en contraste de fase como gránulos oscuros en comparación con el resto del citoplasma:

DL-B-Hidroxibutirato	2 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.1 g
Na_2HPO_4	13 g
KH_2PO_4	4.5 g
FeCl_3 ()	.5 ml
NaCl	10 g
Succinato de sodio	1 g
Agua destilada	100 ml
pH 7.5	

El medio se distribuye en pildoreros de 5 ml a razón de 2 ml c/u, se esteriliza durante 20 minutos a 121° C.

PRODUCCION DE LEVAN (Fuchs, 1956)

Esta prueba detecta la capacidad de la bacteria de producir el polisacarido de levan mediante el aspecto baboso de la colonia:

Agar nutritivo	23 g
Sacarosa	40 g

Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml

Esterilizada a 121° C durante 20 minutos.

PRUEBAS NUTRICIONALES

MEDIO DE BASE

Este medio fue utilizado como base para probar los diferentes substratos excepto la degradación de petróleo y las prototrofías

FeCl ₃	1 ml
Buffer Tris-HCl	10 ml
Agua de mar artificial	200 ml
Agua destilada	800 ml
Agar bacteriológico	15 g
pH 7.5-7.6	

Se esteriliza durante 20 minutos a 121° C, se deja enfriar un poco y se le agrega el substrato correspondiente ya sea por filtración o de forma directa. El substrato debe ser disuelto y a Ph ajustado de 7.5-7.6.

Las cajas inoculadas se incuban durante 15 días antes de leerlas, la incubación es a 25° C.

DEGRADACION DE CRUDO IXTOC-I

Este medio fué utilizado para la selección de las cepas hidrocobonoclasticas de la microflora intestinal y como una prueba más del conjunto de pruebas nutricionales.

Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml
Cloruro férrico	1 ml
Buffer Tris-HCl	10 ml

pH 7.5-7.6

El medio sin esterilizar se reparte en pildoreros de 10 ml con 50 ul de petróleo Ixtoc-I, se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. El medio ya inoculado se incuba durante 2 meses a 25°C.

PROTOTROFIA (Marty, 1978)

Acetato	1 g
Succinato	1 g
L-Prolina	.5 g
Glicerina	1 g
Piruvato	1 g
Bacto-Agar (Difco)	10 g
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml
pH 7.5	
Buffer Tris-HCl	10 ml

PROTOTROFIA MAS VITAMINAS

Al medio antes descrito se agregan 2 ml del siguiente complejo vitamínico:

Vitamina B 12	.5 mg
Biotina	5 mg
Acido fólico	50 mg
Acido p-aminobenzoico	50 mg
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	50 mg
Tiamina	50 mg
Tiourea	50 mg
Pantotenato de calcio	500 mg
Meso-inositol	500 mg
Agua destilada	1 l

PROTOTROFIA MAS VITAMINAS MAS AMINOACIDOS

Al medio inmediato anterior descrito se le agregan .050 g/l de los siguientes aminoácidos:

L-Cisteína	L-Asparagina	L-Arginina	Lisina
L-alanina	L-glutamato	Leucina	L-metionina
L-prolina	L-aspartato	Glicina	

A los tres medios de prototrofia se les esteriliza a 121° C durante 20 minutos y se reparte en cajas de petri, si la ce-

pa crece en el medio de prototrofia, se infiere que no necesita de factores de crecimiento, si no crece en el primero - pero si en el segundo, se infiere que necesita de vitaminas para desarrollarse en el medio de cultivo; y si no crece en ninguno de los dos primeros medios de prototrofia, y si crece en el tercero, se infiere que requiere de vitaminas y de aminoácidos para su desarrollo.

RESUMEN

Se analizaron 117 cepas aisladas de tracto intestinal de 3 especies de peneidos, mediante taxonomía numérica utilizando -- 16 cepas de colección obtenidas de la ATCC y otros.

El análisis estuvo basado en 101 pruebas taxonómicas divididas en morfológicas, fisiológicas y nutricionales, los datos fueron tratados por el coeficiente de Sokal et Mitchner y el de la distancia media no ponderada, los resultados fueron representados ~~gráficamente~~ en un dendrograma.

El dendrograma obtenido muestra al cepario trabajado agrupándose heterogéneamente en 16 ~~fenones~~, diferentes básicamente en su nivel heterótrofo, el rasgo de degradación de hidrocarburos está presente en toda la población así como la característica de anaerobiosis facultativa.

La morfología de la población está formada por cocos y -- bacilos no encontrando formas espirales probablemente debido al medio utilizado. Se presume la existencia de bacterias halóctonas y autóctonas al intestino de los peneidos estudiados y se encontraron diferencias con las microfloras ya descritas para otros invertebrados.

Este trabajo describe el potencial heterótrofo de la población estudiada y propone un Ecotipo para Penaeus aztecus. Se -- propone la continuación de este estudio a niveles más amplios y profundos.

6. BIBLIOGRAFIA

Adanson, M. (1763) Familles des plantes. Vol. 1 Vincent Ed., Paris, CCC-XXXV + 100 p.

Ahern, D.F., Meyers, S.P. & P.G. Standard. (1971). The Role of Yeasts in the Decomposition of Oils in Marine Environments. Developmental Industrial Microbiology 12: 126-134.

Atlas, R.M. (1977). Stimulated Petroleum Biodegradation. Critical Review in Microbiology 5: 371-386.

Atlas, R.M. (1981). Fate of Oil From Two Major Oil Spills: Role of Microbial Degradation in Removing Oil From the Amoco Cadiz and Ixtoc-I Spills. Environment International 5: 33-38.

Atlas, R.M. (1981). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiological Reviews 45(1): 180-209.

Atlas, R.M. & Bartha, R. (1972). Degradation and Mineralization of Petroleum on Sea Water: Limitation by Nitrogen and Phosphorus. Biotechnology and Bioengineering 14: 309-318.

Atlas, R.M., Boehm P.D., and Calder J.A., 1981., Chemical and Biological Weathering of Oil, from the Amoco Cadiz Spillage, within the Littoral Zone. Estuarine, Coastal and Shelf Science 12-589-608.

Atlas R.M., Roubal, G. Bronner, A. & Haines, J. (1980). Microbial Degradation of Hydrocarbons in Mousse from Ixtoc-I in; Proceedings of a Symposium of Preliminary Results from the September 1979 Researcher/Pierce Ixtoc-I Cruise. Key Biscayne, Florida, June 9-10, 1980.

Austin, B., and R.R. Colwell (1977) Evaluation of some coefficients for use in numerical taxonomy of microorganisms. Int. J. Syst. Bacteriol., 27 (3): 204-210.

Austin, B., Colwell, R.R., Walker, J.D & Calomiris, J.J. (1977). The Application of Numerical Taxonomy to the Study of Petroleum Degrading Bacteria Isolated from the Aquatic Environment. Development. In Industrial Microbiology 18: 685-695.

Austin, B., Calomiris, J.J., Walker, J.D. & Colwell, R.R. (1977). Numerical Taxonomy and Ecology of Petroleum-Degrading Bacteria-Environmental Microbiology 34: 60-68.

Bartha, R. & Atlas, R.M. (1977). The Microbiology of Aquatic Oil Spills Advanced Applied Microbiology 22: 225-265.

- Bensoussan, M. (sous presse) Bacteriologie des eaux et des sédiments profonds en Atlantique intertropical-est. 2. Potentialités cataboliques des populations bactériennes. In: Géochimie organique des sédiments marins profonds. Orgon 3-Sénégal-Cap-Vert. Ed. CNRS.
- Bensoussan M.G., Scoditti P.M. et Bianchi A.J.M. 1979, Etude comparative des potentialités cataboliques de microflores entériques d'échinodermes et de bactéries du sédiment superficiel prélevées en milieu abyssal. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 289 Série D. 437-440.
- Bianchi, A. (1971). Ecologie et Taxonomie des Bactéries heterotrophes aérobies des sédiments marins. Leur participation à la dégradation des matières organiques. These Doct. D'Etat. Université d'Aix-Marseille II. 221 p. anexe 70 p.
- Bianchi M. et Bianchi A., 1980., Potentialités cataboliques et identification des populations bactériennes du tractus digestif d'un Dicentrarchus labrax (Serranidae) de mer Méditerranée "Vie Marine" vol. 2 2-8.
- Bianchi, A. et M. Bianchi (1980). Rapport de la Mission Ecotron Tahiti (C.O.P.) Marseille, 58 p.
- Bianchi A.J.M., Scoditti P.M., Bensoussan M.G., 1979., Distribution des populations bactériennes hétérotrophes et les tractus digestifs animaux benthiques recueillis dans la faille Vema et les plaines abyssales du Demerara et de Gambie. "Vie Marine" Vol. 1 7-12.
- Blumer, M. and Clark, R.C., (1970). Hydrocarbon Pollution of Edible Shellfish by an Oil Spill. Marine Biology, 5: 195-202.
- Botello, V.A. (1975) Utilización y degradación del petróleo crudo por 2 especies de camarón: Penaeus duorarum y Penaeus aztecus. Ann. Inst. Ciencias del Mar y Limnol. Vol. 2 (1) 67-72.
- Botello, V.A., (1978). Presencia de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos del Golfo de México. Rev. Biol. Trop., 26 (supl. 1): 135-151.
- Botello, V.A. y Soto, L.A. (1981). Cuantificación de Hidrocarburos Fósiles y Metales Pesados en Sedimentos y Organismos Marinos (Camarón, Moluscos y Peces) de la Sonda de Campeche. Informe final Presentado al Programa Coordinado de Estudios Ecológicos de la Sonda de Campeche. UNAM/ICML. 66 p.

- Boyle P.J. and Mitchell R., 1981. External Microflora of a Marine Wood-Boring Isopod. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 42(4) 720-729.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (Eds.) (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. Eight Edition.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. & Van Baalen, C. (1980). Oxidation of naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. Journal of General Microbiology., 116: 495-500.
- Colwell, R.R., & Walker, J.D. (1977). Ecological Aspects of Microbial Degradation of Petroleum in the Marine Environment. Critical Reviews in Microbiology 5: 423-445.
- Colwell, R.R., Wicks T.C. and Tubiash H.S., , A comparative Study of the Bacterial Flora of the Homolymph of Callinectes sapidus: Most Probable Numbers. Applied Microbiology Vol 29(3) 388-392.
- Colwell, R., & Wiebe, W. (1970). "Core" Characteristics for Use in Classifying Aerobics, Heterotrophic Bacteria by Numerical Taxonomy. Bulletin of the Georgia Academy of Science 28: 175-185.
- Ducluzeau, R. et Rabaud, P. (1979). Ecologie microbienne du tube digestif. INRA et MASSON Paris, 96 p.
- Frazier, W.C. (1926). A Method for the Detection of Changes in Gelatin-Due to Bacteria. Journal of Infectologic Disease 39: 302.
- Fuchs, A. (1956). Synthesis of Levan by Pseudomonad. Nature 178: 921
- Cherna, R.L., Pienta, P., Jomg, S., Hsu, D., Matt, H.D. Gant, M.J. and Piper, J. (Eds) (1980). The American Type Culture Collection. Catalogue of Strains I.
- Higgins, I.J. & Gilbert, P.D. (1978). The Biodegradation of Hydrocarbons in: Chater, KNA. & Somerville, H.J. (Eds) The Oil Industry and Microbial Ecosystems Heyden & Son, Ltd. Ed. London: 81
- Hug, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by various Gram-negative Bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

- Jeffries, C., Holtman, D. and Guse, D. (1957). Rapid Method for Determining the Activity of Microorganisms on Nucleic Acids. *Journal of Bacteriology* 73: 590-591.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. *Nature, London.*, 178: 703.
- Muñoz, R.J. 1983. Taxonomía de Bacterias Hidrocarbonoclasticas de Agua y Sedimentos en la Sonda de Campeche. Tesis profesional. UNAM Fac. de Ciencias 109 p.
- Ohwada K., Tabor P.S. and Colwell R.R. 1980, Species Composition and Barotolerance of Gut Microflora of Deep-Sea Benthic Macrofauna Collected at Various Depths in the Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 40(4) 746-755.
- Lee, R.F., R. Saverherber and A.A. Benson, (1972). Petroleum Hydrocarbons: uptake and discharge by the Marine Mussel *Mytilus edulis* *Science, N.Y.*, 177: 344-346.
- Lellouch, J. et P. Lazar (1974). Méthodes statistiques en expérimentation biologique. Flammarion Médecine-Sciences. Paris 279 p.
- Liston, J. (1965). Qualitative variation in the bacteria flora of Flat-fish. *J. Gen. Microbiol.* 15: 305-314.
- Lizárraga-Partida, M.L. (1979) Pseudomonades du Milieu Marin, Taxonomic-Poliphásique et Ecologie. Tesis Doctoral. Université de Provence Aix-Marseille. 177 p.
- Lizárraga-Partida, M.L.; Bianchi, A.J.M. (1978). Bacterial Flagellation a Deep Sea Water-Sediment Interface. *Journal du Recherche Oceanographique* 3:(4): 9-11.
- Lizárraga-Partida, M.L., Porrás-Aguirre, J., Izquierdo-Vicuña, F.B. (1983). Tasa Bacteriana hidrocarbonoclastica-heterótrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la Sonda de Campeche. *Ann. Inst. Ciencias del Mar y Limnol.* Vol. 10(1) en prensa.
- Lizárraga-Partida, M.L., Rodríguez, S.H., y Romero, J.J.M. (1982). Effects of the Ixtoc-I Blowout on Heterotrophic Bacteria. *Marine Pollution Bulletin* 13(2): 67-70.
- Lockhart, W.R. and Liston, J. (1970). Methods for Numerical Taxonomy. *American Society for Microbiology* 62 p.

- Lyman, J. & Fleming, K.H. (1940). Composition of Sea Water. *Journal of Marine Research*. 3: 134-136.
- Marty, D., (1978). Etude Taxonomique et Ecologique des Populations Bacteriennes Coryneformes Isoless de Divers Biotopes du Milieu Marin. Tesis Doctoral. 3er Ciclo. Université de Provence, 101 p.
- Mills, A., Brevil, C., and Colwell, R.R. (1978) Enumeration of Petroleum Degrading Marine and Estuarine Microorganism by The Most-Probable Number Method. *Canadian Journal of Microbiology*. 25: 552-557.
- Mironov, O.G. (1968). Hydrocarbon pollution of the Sea and its influence on Marine Organism. *Helgolander Wiss. Meeresunters*. 17: 335-339.
- Moriarty, D.J.W. (1977). Quantification of Carbon, Nitrogen and Bacterial Biomass in the Food of Some Penaeid Prawns. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 28: 113-118.
- North, W.J., Neushul, Jr. M. and Clendenning, K.A. (1965). Successive Biological changes observed in a Marine caye exposed to a Large Spillage of Mineral Oil. in: *Comm. Int. Explor. Sci. Mu Mediter. Symp. Proc. on Pollution on Marine Microorganisms, Prod. Petrol., Monaco*, 335-354.
- Oliver, J.D. and Edward S. (1982). Intestinal microflora of Deepsea animals: a taxonomic study. *Deep Sea Research Vol. 29(6A)* 785-794.
- Oliver, J.D. (1982). Taxonomic Scheme for the Identification on Marine Bacteria. *Deep-Sea Research* 29 (6A): 795-798.
- Oppenheimer, C. (1980). Oil Ecology in: Geyer, R. (ed): *Marine Environmental Pollution 1. Hydrocarbons*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam: 21-36.
- Oppenheimer, C.M. & ZoBell, C.E. (1952). The Growth and Viability of Sixty Three Species of Marine Bacteria as Influenced by Hydrostatic Pressure. *Journal of Marine Research* 11: 10-18.
- Roland, F., Bourdon, D. & Sztrum, S. (1947). Differentiation Rapide des-Enterobacteriaceae sans action Sur le Lactose. *Ann. Institute Pasteur (Paris)* 73: 914.
- Schwarz, J.R., Yayanos, A.A., and Colwell R.R., 1976., Metabolic Activities of the intestinal Microflora of a Deep-Sea invertebrate *Applied and Environmental Microbiology Vol. 31* (1): 46-48.

- Sierra, G. (1957). A Simple Method for the Detection of Lipolytic Microorganisms and Some Observations on the Influence of Contact Between the Cells and Fatty Acid Substances. *Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology* 23: 15
- Simidu, U., Kaneko, E. et Aiso, K. (1969). Microflora of Fresh and stored flatfish Kareinus bicoloratus. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35: 77-82.
- Smith, J.E. (1968). *Torrey Canyon Pollution and Marine Life*. Cambridge University Press, London, 196 p.
- Sneath, P.H.A. (1957). The application of Computers to Taxonomy. *Journal of General Microbiology* 17: 201-226.
- Sneath, P.H. & Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Ed. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sochard, M.R., Wilson, D.F., Austin, B., Colwell, R.R. (1979). Bacteria-Associated with the Surface and Gut of Marine Copepods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:(4): 750-759.
- Soto, L. (1979). Decapod crustacean Shelf fauna of Campeche Bank: Fishery aspects and Ecology. in: *Proceedings of Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 33th annual session*, 66-81.
- Soto, L., Gracia, A. & Botello, A.V. (1980). Study of the Penaeid Shrimp Population in Relation to Petroleum Hydrocarbons in Campeche Bank. *Proceedings of the 33th Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 81-100.
- Stainer, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M. (1966). The Aerobic Pseudomonads: A Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology* 43 159-271.
- Straughan, D. (1971). "What has been the Effect of the Spill on the Ecology in the Santa Barbara Channel Oil Spill 1969-1970, Vol. I Allan Hancock Foundation, University of Southern California, Los Angeles, California.
- Thibault, P., M. Piéchaud et M. Véron (1963). Matériel et méthodes utilisés en Bactériologie. 1-109. in: *Traité de Biologie appliquée* H.R. Olivier Direct. Tome II. Diagnostics microbiologiques. Librairie Maloine, S.A. Paris.

- Tubiah H.S., Sizemore R.K., and Colwell R.R. 1975. Bacterial Flora of the Hemolymph of the Blue Crab, Callinectes sapidus: Most Probable Number Applied Microbiology vol 29 (3): 388-392.
- Vanderzant, C., Judkins, P.W., Nikelson, R., and Fitzhugh, H.A. Jr. (1972) Numerical Taxonomy of Corineform Bacteria Isolated from Pond Reared Shrimp (Penaeus aztecus) and Pond Water. American Society for Microbiology 23: (1): 38-45.
- Véron, M. (1969). Taxonomie Numerique et Clasiffication des Bacteries. Bulletin Institute Pasteur 67: 1959-1968.
- Véron, M. (1974). Sur un Critere de Calcul du Meilleur Niveau de Coupe d'un Dendrogramme de Classification Hiérarchique. Annals du Microbiologie Institute Pasteur 125B
- Walker J.D., Austin, H.F. and Colwell, R.R. (1975). Utilization of Mixed hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. 21: 27-39.
- Walker, D.F. & Colwell, R.R. (1976). Long-Chain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum. Canadian Journal of Microbiology 22 (6): 886-891.
- Williams O.B. and Rees B.H., 1952., The bacteriology of Gulf coast shrimp III The Intestinal Flora. The Texas Journal of Science No. 1 marzo 55-58.
- ZoBell, C. (1932). Factors Influencing the Reaction of Nitrate and Nitrite by Bacteria in Semi-Solid Media. Journal of Bacteriology 24 273-278.
- ZoBell, C. (1946). Action of Microorganisms on Hydrocarbons, Bacteriological Reviews. 10: 1-49.