



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES PRIMARIOS DE MATERIA ORGANICA PARTICULADA DE LA LAGUNA DE TERMINOS, CAMPECHE



**EXAMEN DE TESIS
FACULTAD DE QUIMICA**

**Tesis mancomunada que para obtener el título de Químico
Farmacéutico Biólogo presentan:**

Teresita Pinto Segura

Rosa Elena Ramírez Ballesteros

México, D. F. 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS
2. ANTECEDENTES SOBRE LAGUNAS COSTERAS
 - 2.a. Productividad primaria
 - 2.b. Formación del detritus
 - 2.c. Valor nutritivo del detritus
3. AREA DE ESTUDIO
4. TRABAJO EN EL CAMPO
5. MATERIAL Y METODOS
6. RESULTADOS Y DISCUSION
7. CONCLUSIONES
8. LITERATURA CITADA

1. INTRODUCCION

La celulosa es, de los materiales biológicos, el más ampliamente distribuido en la naturaleza. Constituye la tercera parte del peso seco de los vegetales y a diferencia de otros recursos orgánicos naturales, está continuamente renovándose mediante el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, a pesar de su disponibilidad y abundancia dentro de ecosistemas naturales, como las lagunas costeras no puede ser utilizada directamente como alimento por la mayoría de los organismos superiores que en ellas habitan, ya que generalmente se encuentra asociada mediante fuerzas físicas y químicas a otros compuestos, formando complejos de tipo lignocelulósicos que son difíciles de digerir (Maccubbin y Hodson, 1980). Así, la mayoría de los organismos necesitan esperar a que este material sea degradado por microorganismos que habitan en el ecosistema para poder usarlo como alimento. Esta actividad de los microorganismos es de gran importancia, pues constituye el principal mecanismo de aprovechamiento de este tipo de compuestos, iniciando la cadena ali-

menticia y porque es el principal eslabón entre la productividad primaria y secundaria de sistemas lagunares - estuáricos (Sorokin, 1971; Maccubin y Hodson, 1980).

La productividad primaria es un parámetro usualmente utilizado en investigaciones químicas de lagunas costeras como reflejo, tanto del nivel de fijación de carbono inorgánico, como del nivel de utilización de nutrientes en la misma. Está generalmente relacionada con la descripción cuantitativa de las principales fuentes de energía y de la eficiencia del flujo de ésta a través de los niveles tróficos de un ecosistema, por tanto, el entendimiento de la productividad depende del conocimiento de las fuentes de energía primaria y de las rutas o mecanismos de utilización en los que ésta se encuentra involucrada. De esto salta a la vista la importancia de evaluar el papel de la población bacteriana en la productividad primaria de ecosistemas acuáticos, ya que como componentes de ellos, llevan a cabo la degradación del material orgánico y la utilización de la energía involucrada para realizar procesos biosintéticos, mecanismos que inician la cadena detritívora (Sorokin, 1971).

En un sistema lagunar, los productores primarios que aportan mayor cantidad de materia orgánica son las macrofitas, las microalgas bénticas y el fitoplancton; de los cuales se sabe que las macrofitas en lo que a zonas tropicales se refiere, son los principales productores, puesto que de la degradación de sus residuos por la acción de microorganismos, resulta una producción de biomasa de dos a cinco veces mayor a la que presenta la producción fitoplanctónica (Sorokin, 1971; Seki, 1972). Las macrofitas incluyen pastos pantanosos, pastos marinos y manglares, cuya importancia como fuente de materia orgánica ha sido estudiada por varios autores, los que concuerdan que el principal aporte de manglares proviene de las hojas que caen al sistema lagunar.

Los niveles de degradación del tejido vegetal en ecosistemas estuarinos de Norteamérica y Japón, han sido estudiados en el laboratorio y en el campo bajo condiciones de aerobiosis, observando en general, que los componentes solubles son los que más rápidamente se degradan. Como resultado de esta degradación se liberan residuos de material fibroso, constituidos principalmente por lignina y celulosa (

Maccubbin y Hodson, 1980), los cuales sirven como sustrato para el desarrollo de microorganismos, mismos que constituyen una biomasa rica en protefna de alto valor nutritivo, que sirve de alimento para otros organismos que habitan en el sistema lagunar.

En las costas de la República Mexicana, existe un gran número de ecosistemas lagunares, entre los cuales está la Laguna de Términos, en Campeche, importante por su elevado potencial pesquero, por ser un habitat que aloja una gran cantidad de especies potencialmente importantes para la alimentación humana, y por ser una zona que ha sido poco afectada por las diversas actividades humanas. Por ello resulta objeto de interés para realizar estudios sobre valores básicos de los parámetros biológicos y físicoquímicos en su condición original y utilizarlos como patrón de comparación con otras lagunas costeras del Golfo, en donde la influencia de las actividades humanas es mayor.

El mejor conocimiento de los microorganismos que participan y de los factores que controlan la degradación de

la celulosa y lignina dentro de ecosistemas lagunares - estuarinos, puede contribuir a un mejor entendimiento del papel ecológico que desempeña la población bacteriana en dichos sistemas, lo que permitirá eventualmente, realizar estudios acerca del mecanismo bioquímico de la degradación e investigar su función dentro del ecosistema de cada uno de los productos intermediarios del proceso.

En base a estas consideraciones, el objeto de este trabajo es el de aislar de la Laguna de Términos, microorganismos heterótrofos capaces de degradar material orgánico principalmente de tipo lignocelulósico de origen vegetal demostrando su papel en la conversión del material orgánico refractario en detritus, fuente potencial de energía para especies consumidoras, así como determinar cuáles son las condiciones óptimas para la degradación.

2. ANTECEDENTES SOBRE LAGUNAS COSTERAS

Las lagunas costeras son zonas de depresión en la costa, que tienen comunicación continua o efímera con el mar y que están protegidas de éste por algún tipo de barrera física (Stevenson y Lankford, 1977). Son áreas de transición entre el medio ambiente marino y terrestre que ocupan alrededor del 13% de las costas del mundo, cuerpos de agua someros, de volumen y salinidad variables, con temperaturas generalmente elevadas y fondos fangosos ricos en minerales y material orgánico sedimentado y que se encuentran fuertemente influenciadas por procesos continentales, marinos y por actividades humanas (Mee, 1977).

Una laguna no es un sistema completamente cerrado con respecto al material particulado y disuelto que en ella existe, ya que recibe un aporte de nutrientes provenientes de reservorios continentales a través de ríos y corrientes subterráneas, marinos, a través de mareas y oleaje y aéreos. Por ello, los materiales que en ella se encuentran en suspen

sión y/o disueltos, son muy variables tanto en composición como en cantidad.

La materia particulada consiste de una fracción inorgánica formada principalmente por minerales y de una fracción orgánica, constituida principalmente por organismos vivos así como por materia orgánica en proceso de degradación.

El aporte de nutrientes hacia las lagunas es de importancia en la iniciación de ciclos biogeoquímicos que están asociados con la productividad primaria de las mismas y depende, tanto del reservorio externo de cada uno de los nutrientes y de la disponibilidad de mecanismos de transporte para acarrearlos hacia las lagunas, como de la velocidad de reciclamiento de éstos. Incluyen elementos mayores y elementos menores o traza que son también utilizados por los microorganismos marinos (Bowen, 1966).

Por el contrario, una carencia de entrada de agua de río o bien una disminución o falta de los reservorios continentales, puede ocasionar una baja en la productividad primaria del ecosistema lagunar (Tampi, 1969). El aporte de nutrientes hacia las lagunas costeras tropicales es elevado,

debido a los extensos períodos de lluvias a lo largo del año, lo que provoca un arrastre masivo de nutrientes de las tierras bajas que rodean la laguna hacia ella. De acuerdo con Collier y Hedgpeth (1950), algunas lagunas pueden recibir varias veces su propio volumen en forma de lluvia en un año, provocando que el arrastre o acarreo por agua de lluvia sea temporalmente la principal fuente de nutrientes, pero una vez que las condiciones climatológicas cambian, el río nuevamente asume el papel de principal aportador.

Una fuente cada vez más importante de nutrientes para muchas lagunas son los desechos domésticos, agrícolas e industriales; sin embargo, junto con los nutrientes que aportan, también introducen contaminantes químicos y biológicos que resultan tóxicos, dañando el equilibrio, debido a su largo tiempo de residencia en el sistema.

2.a. Productividad primaria

Como ya se mencionó, la productividad primaria es un parámetro usualmente utilizado en investigaciones químicas de lagunas costeras como reflejo, tanto del nivel de fijación de carbono inorgánico, como del nivel de utilización de nutrientes en la misma. En un sistema lagunar, los principales productores primarios que aportan gran cantidad de materia orgánica son:

1. Macrofitas: pastos pantanosos, pastos marinos, manglares y plantas terrestres.
2. Microalgas bénticas: diatomeas bénticas y epifíticas, algas filamentosas.
3. Fitoplancton.

La evidencia acumulada (Pomeroy, 1960; Shelskie y Odum, 1961; Teal, 1962; Healt, 1969; Odum, 1969, 1970; Day et al, 1977), sugiere que las macrofitas son los productores primarios más importantes en algunas lagunas costeras, con frecuencia en una relación de 3:1 respecto al fitoplancton (

Rschotskie, 1959; Pomeroy, 1960; Teal, 1962). De éstas, se ha estimado que la producción anual neta de los pastos pantanosos en lagunas costeras se encuentra dentro del rango de 500 - 2800 g/m²/año; para los pastos marinos Thalassia testudinum la producción es de 1500 g/m²/año (Zieman, 1968; Odum y Zieman, 1967).

La importancia de los manglares como fuente de material orgánico ha sido estudiada por Healk (1969), Healk y Odum (1970), Odum y Healk (1972), estudios en los que se observó que el principal aporte proviene de las hojas. Se ha estimado que el valor de la productividad primaria de manglares es de 450 - 990 g/m²/año (Lugo y Samuel, 1974). Se ha observado también, que en lagunas en las que existe un aporte por manglares, en las zonas aledañas a éstos, es en donde existe una mayor cantidad de material orgánico suspendido y sedimentado, comparado con el existente en otras áreas de la laguna, lo que indica su importante papel como fuente de materia orgánica.

Por muchos años, las aguas del océano y de sus costas se han clasificado en base a su productividad, la cual está

controlada por factores físicos como la luz y temperatura, factores geográficos y factores químicos como son la disponibilidad de nutrientes de tipo inorgánico, principalmente nitrógeno y fósforo y ciertos compuestos de naturaleza orgánica con actividad biológica, tales como tiamina, biotina, vitamina B₁₂ y ácido glicólico.

Existe considerable evidencia que sugiere que la producción primaria está químicamente limitada por la carencia de nutrientes inorgánicos susceptibles de ser utilizados (Spencer, 1971), por lo que se concluye que el reciclamiento de nutrientes por la degradación de la materia orgánica presente, juega un papel importante en la productividad primaria de ecosistemas acuáticos.

Como se mencionó anteriormente, los residuos de plantas vasculares son menos apetecibles para los herbívoros, probablemente debido a que están constituidos por una combinación de tejidos sumamente resistentes representados por celulosa, lignina y quitina (Zobell y Felthman, 1942; De la Cruz, 1975) que cubren a la planta y que son difíciles de digerir por la mayoría de los organismos, además de la pre-

sencia de altas concentraciones de compuestos tóxicos como taninos y sílice. Como resultado, existe una gran cantidad de materia orgánica acumulada en sedimentos y columna de agua que proviene del material vegetal muerto.

En el ecosistema lagunar solo algunos organismos como el caracol Melampus y el cangrejo Rhithropanopeus harrisi, son capaces de utilizar este material directamente como alimento; sin embargo, la mayoría no pueden aprovecharlo sino hasta que ha sido biodegradado, esto es, una vez que se han formado las partículas de detritus (Odum y Zieman, 1972).

Se ha definido el detritus orgánico como todo material biogénico en diferentes estados de degradación microbiana, el cual representa una fuente potencial de energía para las especies consumidoras (Darnell, 1967).

Existen tres fuentes principales de materia orgánica en una laguna:

1. La proveniente de excreciones de algunos organismos y que pueden en algunos casos actuar como controladores o reguladores ecológicos.
2. La formada durante la degradación de organismos muertos ya sea por autólisis o por acción microbiana (Hohnues,

1968)

3. La proveniente del continente, constituida por materiales húmicos y otros productos de descomposición vegetal, arrastrados hacia la zona costera por vientos y ríos.

En una laguna costera, la materia orgánica es degradada principalmente por bacterias y durante este proceso de mineralización se liberan: amonio, fosfatos, dióxido de carbono, sulfatos y otros productos tanto inorgánicos como orgánicos que son utilizados por otros organismos que habitan el sistema. Por el papel que juegan las bacterias en este proceso, son muy importantes en la productividad primaria de ecosistemas acuáticos (Zobell y Felthman, 1942).

En la interfase sedimento - agua, existe un gran número de bacterias capaces de utilizar como sustrato la materia orgánica en ella depositada y es por ello que en esta interfase es en donde ocurre en mayor proporción la regeneración de nutrientes (Hayes, 1964); Brewe y Pjaender, 1978; Anderson, 1939), ya que las bacterias oxidan la materia orgánica disponible y utilizan la energía involucrada para efectuar reac-

ciones de biosíntesis (Sorokin, 1971). Esto se evidencia en aguas de poca profundidad por el hecho de que continuamente se está liberando amonio de la interfase hacia la columna de agua, existiendo, además una relación lineal entre el nivel de amonio liberado y la temperatura del agua; lo cual refleja un control bacteriano del proceso de mineralización (Hale, 1975; Ockuda, 1960). Con respecto al intercambio de fósforo entre la interfase y la columna de agua, se sabe que en parte es controlado por la actividad microbiana.

La regeneración de nutrientes a partir de la degradación de la materia orgánica que permanece dentro de la laguna, permite que continúe la productividad del ecosistema, pues es el paso de iniciación de la cadena detritívora, ya que durante la degradación se liberan, además de compuestos orgánicos solubles (glucosa, proteínas, etc.), nutrientes inorgánicos, y biomasa microbiana de alto valor nutritivo a partir de material orgánico refractario relativamente pobre en sustancias aprovechables y de difícil utilización (Zobell y Felthman, 1942; Wond et al, 1960; Darnell, 1967). Así pues, este sistema de reciclamiento permite el continuo

uso de nutrientes dentro del ecosistema lagunar, lo que permite mantener un alto nivel de productividad primaria y secundaria.

2.b. Formación del detritus

El proceso de degradación de partículas de restos vegetales involucra: una degradación mecánica, una disolución química y una lisis enzimática por bacterias, hongos y diatomeas.

La degradación mecánica ocurre principalmente por la acción de olas y corrientes que disgregan el material, una vez que éste ha sido debilitado estructuralmente por la disolución química, la cual debe ocurrir primeramente a través de procesos de hidrólisis y oxidación, los que favorecen la colonización por bacterias y otros organismos involucrados en la degradación.

La descomposición del material por estos microorganismos, se evidencia primeramente por la ruptura de la pared

celular con la subsecuente liberación de los componentes celulares. Así, de la actividad microbiana sobre el material orgánico refractario, resulta una partícula que puede funcionar como almacén de energía y de nutrientes que está disponible para otros microorganismos y para especies consumidoras (Darnell, 1967).

Dicha partícula está constituida por una matriz orgánica, en la cual están embebidos los microorganismos en su mayoría bacterias, aunque existen pequeños zooflagelados, diatomeas, hongos y actinomicetos y en menor número algas unicelulares y ciliados (Odum y Zieman, 1972).

2.c. Valor nutritivo del detritus

El agregado que forma la partícula y los microorganismos hacen un sistema independiente, cuyo valor nutricional es más alto que el del tejido vascular del que se originó (William y Zieman, 1972; De la Cruz y Poe, 1975).

Algunos autores han postulado que la partícula de de-

tritius está formada principalmente por los componentes más abundantes de la estructura vegetal y por lo tanto debe ser rica en carbohidratos más que en nitrógeno (Darnell, 1964), lo que puede ser cierto en las partículas más grandes al inicio del proceso de degradación, pero al final, las partículas deben contener mucho material nitrogenado como resultado del crecimiento y acumulación de flora microbiana adsorbida en las partículas del material vegetal.

Existen varios estudios encaminados a evaluar el valor nutricional de las partículas de detritus y en ellos se indica que la fuente real de alimento para los consumidores de éste, lo constituyen principalmente los microorganismos y no los residuos de la macrovegetación que es relativamente pobre en nitrógeno en forma aprovechable (Fenchel et al, 1976; De la Cruz, 1975; Baylor et al, 1977). Ya que las partículas de detritus son una rica fuente de alimento para los organismos del ecosistema lagunar (Darnell, 1968, 1965, 1961, 1967), resulta importante estudiar los microorganismos asociados en el mecanismo de formación de éste a partir de macrofitas, principal fuente de materia orgánica, porque constituyen la primera etapa de la cadena detritívora. Esto

permitirá lograr un mejor entendimiento del flujo de energía y de la trama trófica dentro de ecosistemas lagunares - estuarinos.

3. AREA DE ESTUDIO

La Laguna de Términos, se encuentra localizada en el litoral del Golfo de México, entre los meridianos $91^{\circ}15'$ y $91^{\circ}51'$ de longitud oeste y los paralelos $18^{\circ}25'$ y $18^{\circ}50'$ de latitud norte, con una longitud de 70 km y 28 km de ancho, limitada al norte por la Isla del Carmen.

Tiene en general poca profundidad y se localiza en el límite de una zona de sedimentación de carbonato de calcio biogénico en la parte este y una zona de depositación de detritus terrígenos aportados por ríos y sus tributarios en la parte oeste. Se comunica con el mar por la boca de Ciudad del Carmen situada en la parte occidental y por la boca de Puerto Real en el extremo oriental (mapa 1).

El clima del área es tropical con una temperatura máxima de 36°C y una mínima de 17°C . La precipitación pluvial alcanza valores entre 120 y 200 cm anuales, alcanzando los máximos valores entre los meses de junio y noviembre. Los vientos dominantes presentan dirección noreste y sureste, sin embargo durante el invierno se presentan tormentas y hu

racanes donde predominan los vientos del cuadrante norte.

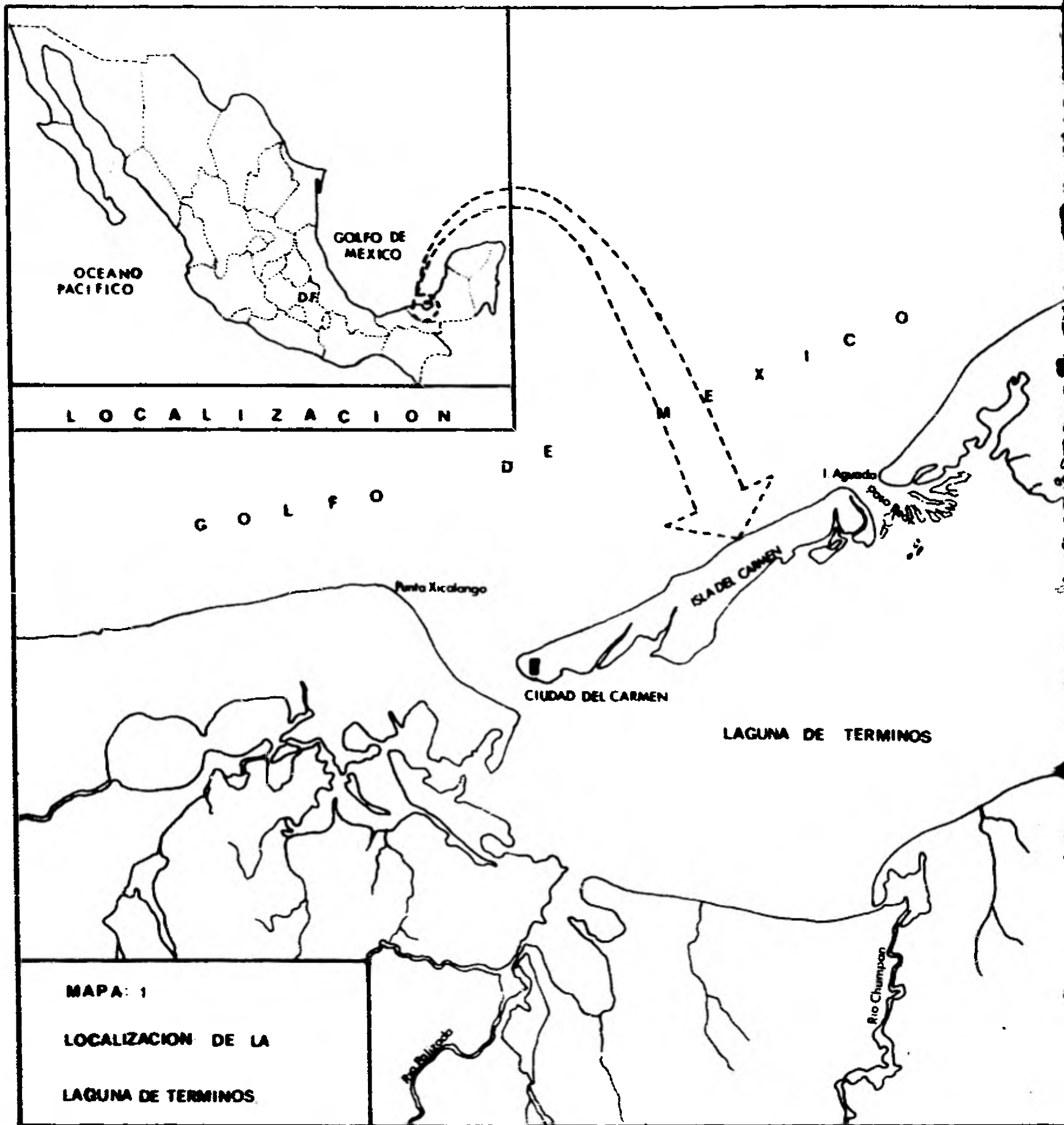
La marea puede ser diurna, semidiurna y mixta, con un rango de 0.62 m (Cruz - Orozco, 1980).

Tres grandes ríos descargan sus aguas en la Laguna de Términos; el Palizada, el Chumpán y el Candelaria, los que son distributarios del Río Usumacinta. Lo más sobresaliente de la circulación de sus aguas es el flujo neto de este a oeste originado por el avance de la marea en el mismo sentido y los vientos predominantes del este.

El agua presenta buena oxigenación, la salinidad disminuye hacia tierra firme, presentando valores más bajos en el área afectada por la descarga de ríos. Los valores de pH oscilan entre 7.8 y 8.10. La concentración de nutrientes presenta variaciones estacionales dentro del sistema, relacionándose su mayor abundancia principalmente con la regeneración interna de éstos por la degradación de la materia orgánica que en ella existe (Vazquez, 1974).

Es una área de balance energético de sistemas biológicos, en la que se transforma energía desde fuentes primarias que se conduce activamente a través de una trama trófica o se intercambia con ecosistemas vecinos mediante mecanismos

de exportación e importación, o que se almacena en los diferentes organismos que en ella habitar.



LOCALIZACION

GOLFO

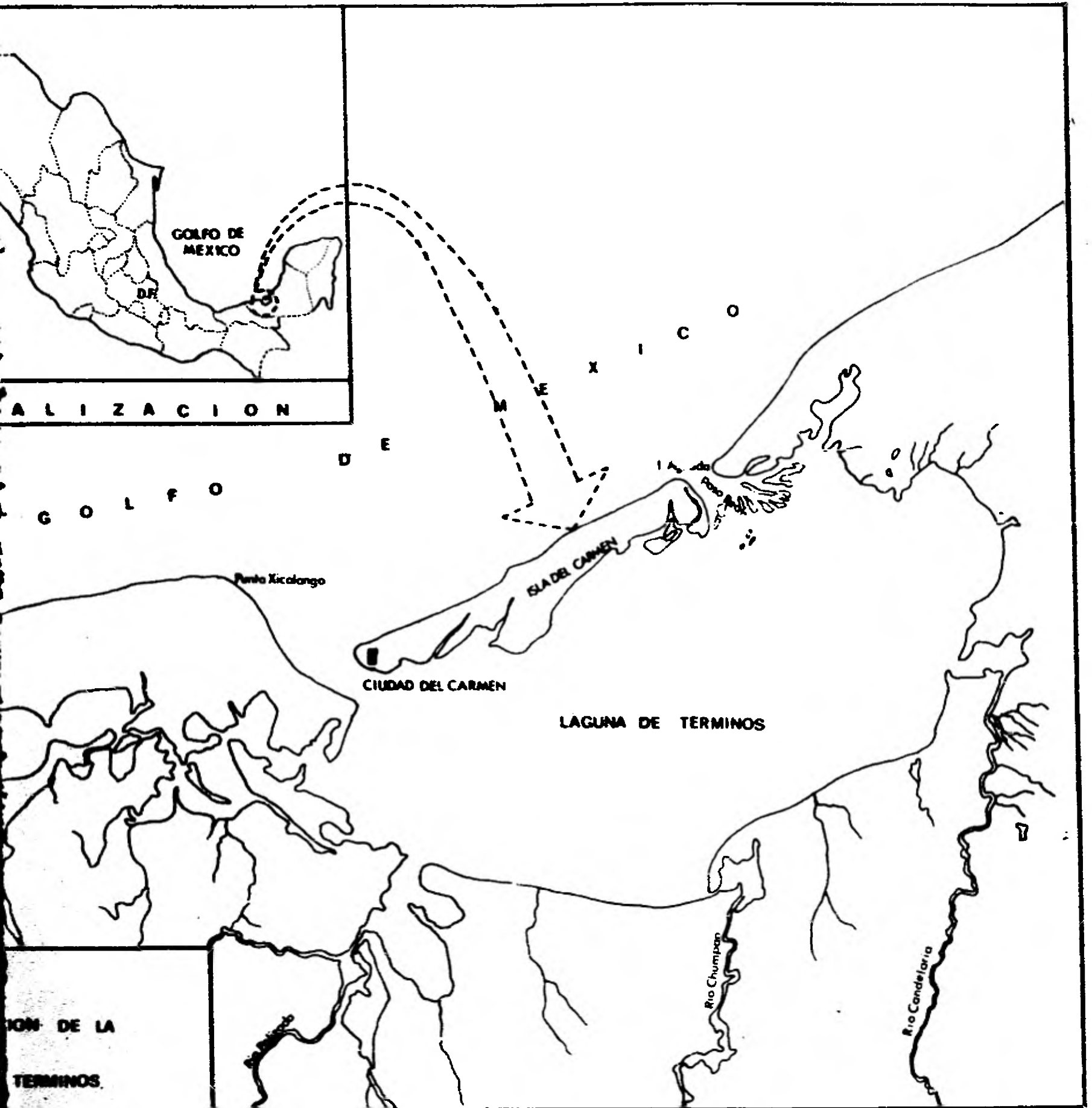
CIUDAD DEL CARMEN

LAGUNA DE TERMINOS

MAPA: 1

LOCALIZACION DE LA

LAGUNA DE TERMINOS

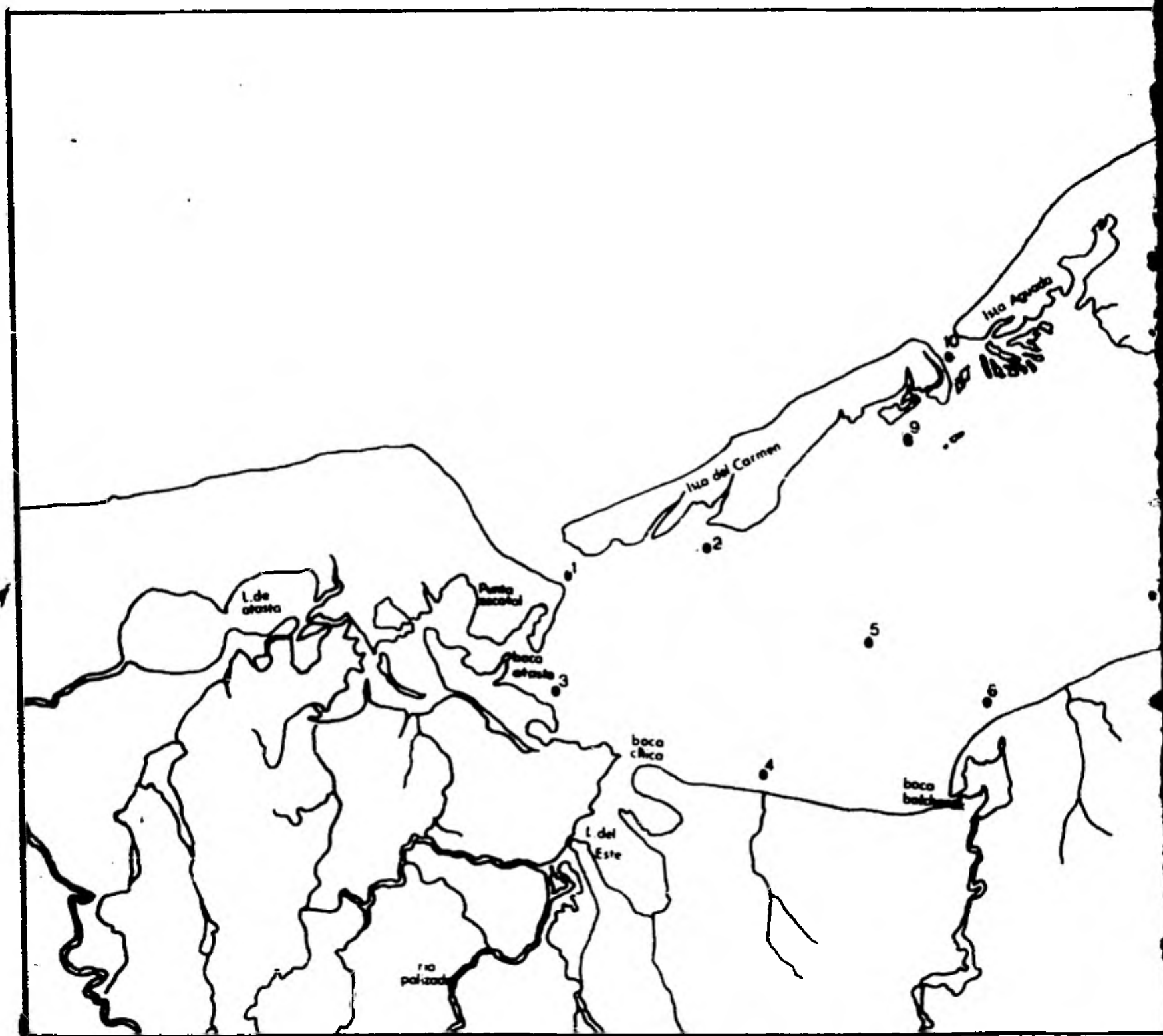


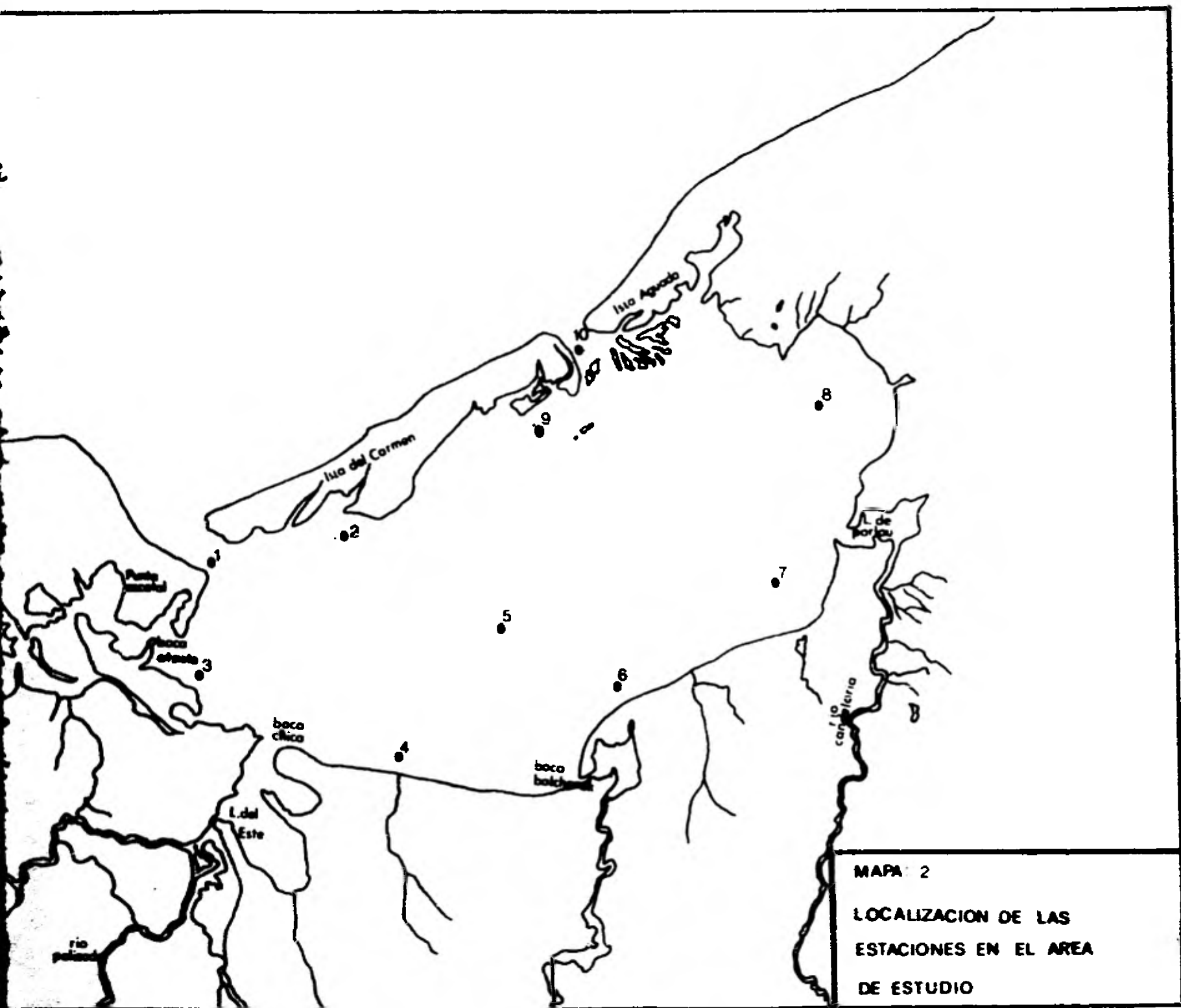
4. TRABAJO EN EL CAMPO

Se tomaron muestras de la columna de agua y de sedimento en diez estaciones diferentes (mapa 2), utilizando botellas Van-Dorn para coleccionar las muestras de agua y una draga Van-Veen para las muestras de sedimento.

Se tomaron aproximadamente cien mililitros de agua, los que se transfirieron a frascos estériles que contenían dos mililitros de glicerol (conservador), congelándose inmediatamente en hielo seco para así ser transportadas hasta el laboratorio.

De sedimento se tomaron aproximadamente cien centímetros cúbicos en forma estéril, y se trataron de igual forma.





MAPA 2

LOCALIZACION DE LAS
ESTACIONES EN EL AREA
DE ESTUDIO

5. MATERIAL Y METODOS

1. Medios de cultivo

- Medios para el aislamiento de microorganismos:

A.-	(NH ₄)SO ₄	0.14	g
	urea	0.03	"
	KH ₂ PO ₄	0.20	"
	NaCl	1.75	"
	hojas de mangle	1.00	"
	agua destilada	100	ml
B.-	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14	g
	urea	0.03	"
	KH ₂ PO ₄	0.20	"
	hoja de mangle	1.00	"
	agua de laguna	100	ml
C.-	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14	g
	urea	0.03	"
	KH ₂ PO ₄	0.20	"

	celulosa microcristalina	1.0	"
	agua destilada	50	ml
	agua de laguna	50	"
D.-	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.14	g
	urea	0.03	"
	KH_2PO_4	0.10	"
	celulosa microcristalina	1.0	"
	agua de laguna	100	ml

En todos los medios se ajustó el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio; se esterilizó en autoclave a una presión de 15 psi y una temperatura de 120° C durante 20 minutos. Se añadió la urea después de esterilizarla en sistema millipore, utilizando una membrana de 0.45 μ de poro. Las hojas de mangle se secaron en estufa y se molieron hasta obtener partículas finas. El agua de laguna se esterilizó por filtración en sistema millipore.

- Medios de cultivo para la caracterización:

E.- Agar almidón

Solución A:

triptona	5.0	g
ext. de levadura	5.0	"
fosfato dipotásico	5.0	"
agar	18.0	"
agua destilada	800	ml

Solución B:

almidón soluble	3.0	g
agua destilada	200	ml

Solubilizar por separado A y B, mezclar ambas. pH 7.0

F.- Agar nutritivo

peptona	5.0	g
ext. carne de res	3.0	"
agar	18.0	"
agua destilada	1000	ml

G.- Base caldo de púrpura de bromocresol *

peptona	10.0	g
NaCl	5.0	"
ext. de carne	1.0	"
púrpura bromocresol	0.015	"
agua destilada	1000	ml

* Este medio se usa para observar la fermentación de carbohidratos, que se agregan posteriormente a una concentración final de 1%.

H.- Caldo MR - VP

peptona	7.0	g
dextrosa	5.0	"
fosfato dipotásico	5.0	"
agua destilada	1000	ml
pH	6.8	

I.- Caldo nutritivo

peptona	5.0	g
ext. carne de res	3.0	"
agua destilada	1000	ml
pH	6.9	

J.- Gelatina nutritiva

peptona	5.0	g
ext. carne de res	3.0	"
gelatina	120.0	"
agua destilada	1000	ml
pH	6.8	

K.- Medio de indol - nitrito

peptona tripticasa	20	g
fosfato disódico	2.0	"
dextrosa	1.0	"
agar	1.0	"
nitrato de potasio	1.0	"
agua destilada	1000	ml
pH	7.2	

L.- Medio de SIM

peptona tripticasa	20	g
peptona tiotona	6.1	"
sulfato de hierro y amonio	0.2	"
tiosulfato de sodio	0.2	"
agar	3.5	"
agua destilada	1000	ml
pH	6.8	

M.- Medio de tioglicolato fluido

peptona de caseína	5.0	g
dextrosa anhidra	5.0	"
ext. de levadura	5.0	"

NaCl	2.5	"
L-cistina	0.5	"
tioglicolato de sodio	0.001	"
resazurina	0.001	"
agar	0.75	"
agua destilada	1000	ml
pH	7.1	

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a una temperatura de 120°C y una presión de 15 psi durante 15 minutos; se les adicionó 2.7% de NaCl y en aquéllos en los que su composición ya incluía NaCl, se ajustó su concentración a 2.7%.

- Medios para determinar el crecimiento con diferentes fuentes de carbono:

KH_2PO_4	0.2	g
urea	0.03	"
$(NH_4)_2SO_4$	0.14	"
agua de laguna	100	ml

La urea se añadió al medio después de esterilizarla en

sistema millipore con una membrana de 0.45μ de poro. El agua de la laguna fué filtrada en las mismas condiciones. Se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave a una presión de 15 psi y una temperatura de 120°C durante 20 minutos.

Como fuente de carbono se emplearon:

N.-	hojas secas y molidas de manglar	1	g
O.-	carboxi - metil - celulosa (C.M.C.)	1	g
P.-	celulosa microcristalina	1	g
Q.-	pectina	1	g
R.-	xilanos	1	g
S.-	Medio " F "		

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	"
KH_2PO_4	0.5	"
K_2HPO_4	0.5	"
CaCl_2	0.01	"
NaCl	6.0	"
glucosa	5.0	"
ext. levadura	3.0	"
agua destilada	1000	ml

Se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó en autoclave a una presión de 15 psi y una temperatura de 120°C durante 20 minutos.

- Medios para conservación de las cepas:

T.- Medio de papa - dextrosa - agar (Difco)

infusión de papa	200	g
bacto dextrosa	20	"
bacto agar	15	"
agua de laguna	100	ml

Se suspenden 39 gramos en un litro de agua; se hierve hasta la disolución completa y se esteriliza en autoclave a una presión de 15 psi y una temperatura de 120°C durante 15 minutos.

U.- Medio " z "

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.017	"
KH_2PO_4	0.05	"
CaCl_2	0.01	"
ext. levadura	0.30	"
glucosa	0.50	"

agua de laguna 100 ml

Se esterilizó en autoclave a una presión de 15 psi y una temperatura de 120°C durante 20 minutos.

2. Análisis Químicos

- Determinación de proteínas

Se determinaron por el método de Kjeldahl, en el que las proteínas y demás materiales orgánicos son oxidados por acción del ácido sulfúrico; el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio.

Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte se desprende amoníaco que se destila por arrastre de vapor y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado. Por ti tulación del ácido neutralizado se calcula la cantidad de a moníaco desprendido y así la cantidad de nitrógeno en la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25, nos da el porcentaje de proteína cruda.

Técnica de Macrokjeldahl.- aproximadamente un gramo de muestra problema, dializada y seca, se digiere con tres gra

mos de mezcla selénica y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado en un matraz Kjeldahl de 500 ml, hasta la total digestión de la materia orgánica; cuando la solución queda completamente cristalina, se enfría y diluye con 400 ml de agua destilada. Se añaden 5 gotas de fenolftaleína y aproximadamente 50 ml de la solución de hidróxido de sodio al 50%, haciéndola resbalar lentamente por las paredes del matraz de manera que se estratifiquen las dos soluciones, se conecta rápidamente el matraz al sistema de destilación.

Una vez conectado el matraz, se mezclan las dos soluciones e inmediatamente se calienta, el destilado se recibe en un matraz erlenmeyer de 500 ml, que contenga 50 ml de solución de ácido bórico al 4%, hasta un volumen de 200 ml, se titula el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N hasta alcanzar nuevamente el color amarillo.

Cálculos:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(\text{Vol. HCl gastado}) (\text{N de HCl}) (0.014) (100)}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ de proteína} = \text{porcentaje de nitrógeno} \times 6.25$$

3. Aislamiento de microorganismos

Matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de los diferentes medios de aislamiento mencionados en el inciso 1, fueron inoculados con 5 ml de una suspensión de las muestras tanto de agua de fondo y superficie, como del sedimento de las diferentes estaciones y se incubaron a 29°C y 37°C, con una agitación de 200 rpm.

Cada 120 horas se tomaron 5 ml de los matraces y se resembró en matraces con el mismo medio, conservando las condiciones originales. Después de la tercera resiembra, se tomó una muestra y se sembró en caja con medio de papa - dextrosa. Al cabo de 48 horas de incubación se estudiaron las diferentes cepas obtenidas, de las cuales se hicieron diluciones hasta de 10^{-5} sembrando en el mismo medio para así obtener colonias aisladas y observar sus características coloniales.

4. Pruebas para la identificación de los microorganismos

Para la identificación se hicieron las pruebas siguien-

tes: observación macroscópica de las colonias, tinción de Gram, observación de spora y cápsula, observación de forma y tamaño de las células, pleomorfismo, producción de pigmento y su difusión, crecimiento a 37°C, requerimiento de sodio (como cloruro), desarrollo en caldo, movilidad, producción de oxidasa, catalasa, reducción de nitratos a nitritos, producción de acetilmetilcarbinol, producción de ácido, formación de indol, producción de sulfuros, fermentación de glucosa y lactosa, hidrólisis de almidón y de gelatina.

4.1 Pruebas morfológicas y bioquímicas

Las observaciones se hicieron en colonias de 48 horas de desarrollo. Se observó el tamaño, forma, elevación, borde, superficie, consistencia, pigmentación y si el pigmento era o no difusible en el medio (Rodina, 1972).

Tinción de Gram.- se hicieron frotis de cada uno de los microorganismos y se realizó la tinción de Gram para observar microscópicamente la coloración que tomaban, su forma y su agrupación.

Tinción de spora.- se toma una asada del microorga-

nismo y se extiende sobre el portaobjetos. Se deja secar al aire, se cubre con fucsina fenicada durante dos minutos, se lava con agua corriente y se deja secar al aire. Se extiende una gota de tinta china sobre el portaobjetos y se deja secar al aire.

Además, los microorganismos se sometieron a un calentamiento y si lo resistían, indicaba presencia de espora. para esto, se prepararon tubos de agar nutritivo inclinado que se sembraron con los diferentes microorganismos. Se incubaron a 28°C hasta que se observó crecimiento (Rodina, 1972).

Todas las observaciones microscópicas se hicieron en un microscopio marca Rossbach, Kyowa bajo inmersión a 100x y con cultivos de 24 - 48 horas.

Observación al microscopio electrónico de barrido.- para determinar la forma y tamaño de las bacterias, se observaron en un microscopio electrónico de barrido, usándose cultivos de 48 horas en caldo nutritivo, los que se prepararon de la siguiente manera:

1. Se centrifugan 1.0 ml de cada uno de los cultivos a 2500 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.

Se resuspende el sedimento en una solución al 2.5% de glutaraldehído en caldo nutritivo, se deja reposar a temperatura ambiente durante cuatro horas. Se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se lava tres veces con 1.5 ml de solución salina al 2.7%.

2. Se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Para la deshidratación se resuspende el sedimento en 1.5 ml de solución etanólica al 40%, se deja reposar por 10 minutos. Se centrifuga y se desecha el sobrenadante. Se repite la operación con soluciones etanólicas de concentraciones crecientes: 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%. Finalmente se resuspende en 1.5 ml de acetona.

3. Se montan las muestras sobre cubreobjetos de vidrio adheridos con pintura de plata a portamuestras de aluminio. Las muestras se secan al aire. Se cubren con una capa de oro de 250^oÅ en una cubridora fina (Jeol Mod. 1101). Los especímenes se observan en un microscópio electrónico de barrido (Jeol Mol. JSM - 35) con 20 kv de aceleración en el haz electrónico.

Presencia de catalasa.- se observa en los casos positivos por un desprendimiento rápido de gas, al agregar una gota de agua oxigenada al 3%, sobre una asada de cultivo colocada sobre un portaobjetos (Rodina, 1972).

Producción de oxidasa.- se determinó la producción con el reactivo de dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%. Se agregan unas gotas sobre la colonia, un resultado positivo lo indica la presencia de un color rojo. El reactivo debe prepararse cada vez que se usa y debe reposar durante 15 minutos antes de ser utilizado (Rodina, 1972).

Movilidad, formación de indol y producción de sulfuros.- se utiliza el medio de SIM. Los tubos con este medio se inoculan por picadura en el centro hasta la mitad de la profundidad. Se incuban a 28°C durante 18 - 48 horas. La producción de sulfuros se indica por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación. La formación de indol se detecta con el reactivo de Erlich. Se agregan una a dos gotas del reactivo al cultivo, una coloración rosa indica la presencia de indol. La movilidad se observa por el crecimiento del microorganismo lejos de la línea de inoculación (Rodina, 1972).

Reducción de nitratos.- se determina en el medio de indol - nitrito. Para observar la presencia o acumulación de nitritos en el medio se agregan a 5 ml de cultivo 5 gotas de reactivo de ácido sulfanílico y otras tantas de alfa-naftilamina. En caso de que haya presencia de nitritos en el medio se observa un color rojo o rosa (Rodina, 1972).

Producción de acetil - metil - carbinol y producción de ácido.- se usa el medio de Vogues - Proskauer en donde se siembran las cepas, se incuba durante 48 horas a 28°C. La presencia de acetilmetilcarbinol se demuestra por la aparición de un color naranja a rojo después de agregar a 1.0 ml del cultivo, 0.6 ml de alfa-naftilamina al 5% en alcohol etílico absoluto y 0.2 ml de KOH al 40%. Para demostrar la presencia de ácido se adicionan 5 gotas de una solución de rojo de metilo a 5 ml de cultivo. Un resultado negativo lo da una coloración amarilla del medio, si se mantiene rojo, el resultado es positivo (Rodina, 1972).

Fermentación de carbohidratos.- se usa el medio de base de caldo de púrpura de bromocresol. Se preparan soluciones al 10% de glucosa y lactosa, las que se agregan al medio por separado, para tener una concentración final de 1%. El

indicador de la producción de ácido es el púrpura de bromocresol, el que en caso positivo se observa de color amarillo. Para observar la producción de gas se colocó en cada tubo de medio una campana de fermentación (Rodina, 1972).

Prueba de hidrólisis de almidón y gelatina.- la hidrólisis del almidón se realiza sobre agar almidón, se observa la zona de hidrólisis como una zona clara al agregar a las cajas de cultivo unas gotas de una solución iodo-iodurada que oscurece el resto del medio. La hidrólisis de la gelatina se realiza sobre cajas de gelatina nutritiva, la cual se observa como una zona licuificada del medio alrededor del inóculo.

5. Curva de crecimiento de los microorganismos midiendo la densidad óptica durante el tiempo de fermentación.

Siendo el objetivo de este trabajo obtener microorganismos que utilicen como sustrato partículas de material orgánico de origen vegetal, se procedió a cultivar en diferentes materiales celulósicos a fin de seleccionar los mejores.

Inóculo.- las diferentes cepas aisladas y purificadas se resembraron por la técnica de estría en cajas con papa - dextrosa - agar para obtener así mayor crecimiento y de ésta forma poder preparar una suspensión de células. Para prepararla se usó agua de laguna previamente esterilizada.

Cultivo.- se inocularon 5 ml de la suspensión en matracer erlenmeyer con capacidad de 250 ml conteniendo 100 ml de medio preparado con las diferentes fuentes de carbono (celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, pectina, xilanos, y hojas secas de mangle). Se incubaron a 37°C con una agitación de 200 rpm. A cada matraz se le tomó muestra antes y después de ser inoculado y también a intervalos durante 4 días.

Procesamiento de las muestras.- las muestras fueron filtradas en equipo millipore usando papel Whatman N°. 2. A cada muestra se le dió un lavado con agua de laguna previamente esterilizada, en un volumen igual al de la muestra original. Posteriormente se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos y se procedió a leer la D.O. del sobrenadante a 540 nm. de longitud de onda en un fotocolorímetro Bausch & Lomb, Spectronic 20.

En este paso el principal problema fué que las muestras se filtraban muy lentamente y como consecuencia, se formaba una capa de sustrato residual en el cual se quedaban atrapadas muchas células. Para solucionar este problema, las muestras fueron centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar las partículas gruesas de sustrato; entonces se lee directamente la D.O. del sobrenadante a 540 nm de longitud de onda. Se pudo comprobar que las células permanecen en el sobrenadante mediante observaciones al microscopio óptico.

Otro problema fué el hecho de que el sobrenadante al ser colorido, presentaba cierta absorbancia, la cual interfería en las lecturas y alteraba de esta forma los resultados. Para eliminar este problema, se corrió un matraz con el medio de cultivo y sin inocular, pero preparado e incubado de igual forma que los otros, el cual se utilizó como blanco.

6. Estandarización del inóculo

De cada una de las cepas se preparó una suspensión en agua estéril de laguna, usando la misma concentración de célu-

las de las diferentes cepas mediante el ajuste de las lecturas de D.O. a 540 nm en un fotocolorímetro Bausch & Lomb.

Para inocular los matraces preparados con 100 ml del medio " N " se usaron 5.0 ml de la suspensión. Las D.O. que se utilizaron en cada experimento se especifican en las leyendas de las figuras.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

Como el principal objetivo de este trabajo fué el de aislar de la Laguna de Términos microorganismos capaces de degradar material orgánico de origen vegetal, principalmente de tipo celulósico, el primer paso fué el de incubar las muestras de las diferentes estaciones (mapa 2) en medio salino con hojas de mangle o celulosa microcristalina como única fuente de carbono.

Como puede verse en la tabla 1., los matraces en los que se logró aislar organismos con un mayor crecimiento fué en los que se inocularon con las muestras de las estaciones 3, 4 y 6, principalmente de la interfase sedimento - agua y que contenían hoja de mangle como única fuente de carbono.

Para lograr aislar de dichas muestras, aquellos organismos que utilizan con mayor eficiencia la hoja, se procedió a realizar resiembras sucesivas en el medio líquido. Después de la tercera resiembra se sembraron en caja con agar-papa-dextrosa diferentes diluciones para lograr aislar mi-

T A B L A 1

N° DE ESTACION	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CRECIMIENTO RELATIVO EN PLACA DE MICROORGANISMOS AISLADOS EN MEDIO LIQUIDO UTILIZANDO COMO SUBSTRATO:	
		CELULOSA MICROCRISTALINA	HOJA DE MANGLE
1	superficie	-	+
	fondo	+	+
	interfase s-a	+	+
2	superficie	+	+
	fondo	+	+
	interfase s-a	++	++
3	superficie	++	+++
	fondo	++	++
	interfase s-a	+++	+++++
4	superficie	++	++
	fondo	+	++
	interfase s-a	+++	++++
5	superficie	+	-
	fondo	++	++
	interfase s-a	++	++
6	superficie	++	++
	fondo	++	++
	interfase s-a	+++	++++
7	superficie	+	+
	fondo	++	++
	interfase s-a	++	+++
8	superficie	+	+
	fondo	+	++
	interfase s-a	+	++
9	superficie	+	+
	fondo	-	+
	interfase s-a	+	+
10	superficie	-	+
	fondo	+	-
	interfase s-a	+	+

Incubadas durante 48 horas a 37°C.

microorganismos y poder así determinar las características coloniales y probar su actividad celulolítica. Para ello, se sembraron nuevamente en medio " B " con hoja de mangle como sustrato y simultáneamente en tubos con medio salino conteniendo una tira de papel filtro para observar la disgregación del mismo, lo que es indicador de la actividad celulolítica. De entre los diferentes organismos probados, tres fueron los que presentaron un crecimiento más rápido en hoja y los que desmenuzaron más rápidamente el papel, y por ello fueron seleccionados como organismos de prueba.

Se procedió entonces a determinar las características coloniales, así como a efectuar las pruebas bioquímicas y estudios al microscopio óptico y electrónico de barrido, que permitieran su caracterización.

Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3. En ellos se observa que los tres microorganismos son cocobacilos y que comparten entre sí características, con excepción del color de la colonia que forman en el medio sólido, el cual es distinto, al igual que la textura en el caso de la cepa **TEHM-C**, que a diferencia de las otras dos cepas, presenta

T A B L A 2

MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA INTERFASE SEDIMENTO-AGUA		
DENOMINACION	TIPO DE MICROORGANISMO	TIPO DE COLONIA
TEHn-A	Cocobacilo	Circular, convexa borde elevado, lisa, consistencia suave, pigmento naranja, diámetro mayor de 1 mm.
TEHn-B	Cocobacilo	Circular, convexa borde elevado, lisa, consistencia suave, pigmento amarillo, diámetro mayor de 1 mm.
TEHn-C	Cocobacilo	Circular, convexa borde elevado, rugosa, consistencia seca, pigmento crema, diámetro mayor de 1 mm.

Cultivo en agar papa - dextrosa durante 48 horas a 37°C.

T A B L A 3

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LOS MICROORGANISMOS			
PRUEBA	TEHn-A	TEHn-B	TEHn-C
Gram	Variable	Variable	Variable
Tamaño en μ	0.9-1.5x0.5	n	1.9x0.6
Forma al M.O.*	Cocobacilo	Cocobacilo	Cocobacilo
Forma al M.E.*	Cocobacilo	n	Cocobacilo
Pleomorfismo	+	-	-
Esporas	-	-	-
Cápsula	-	-	-
Movilidad	+	+	-
Crecimiento en caldo	E y S +	E y S +	E y S +
Crecimiento a 37°C	+	+	+
Requerimientos de sodio	+	+	+
Oxidasa	-	-	+
Catalasa	-	-	+
Reducción de nitratos	+	+	+
Voges - Poskaver	-	-	-
Bojo de metilo	+	+	+
Producción de indol	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-
Fermentación de glucosa	A +	A +	A +
Fermentación de lactosa	-	-	-
Hidrólisis de almidón	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+
Hidrólisis de papel	+	+	+

Incubados a 37°C; *M.O. microscopio óptico; *M.E. microscopio electrónico de barrido; E y S + enturbiamiento y formación de sedimento; A + formación de ácido; n - no se observó

una consistencia seca.

Al comparar los resultados de estas pruebas con el cuadro para la caracterización de organismos tipo del género Cellulomonas sp. mostrado en la tabla 4, podemos observar que las tres cepas comparten también características con este género.

A fin de ver la capacidad de las cepas aisladas para utilizar diferentes sustratos de tipo orgánico, se probó su capacidad para utilizar como fuente de carbono: pectina, xilanos, carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina que son representativos de los componentes de la hoja, así como en hojas de manglar, que es una de las principales fuentes de materia orgánica en las lagunas costeras. Los resultados del crecimiento midiendo la densidad óptica, se muestran en la tabla 5. En ellos se observa que el sustrato en el que hay mayor densidad óptica al final de la fermentación fué en la hoja de mangle, aunque utilizan también los otros sustratos lo hacen con menor eficiencia. Es notorio que el crecimiento de la cepa TEHn-A fué mayor que el de las cepas TEHn-B y TEHn-C.

T A B L A 4

PROPIEDADES BIOQUIMICAS Y MORFOLOGICAS DE <u>CELLULOMONAS</u> sp.	
Gram	Variable
Tamaño	0.5 x 0.7 - 2.0 μ -micras
Crecimiento en caldo	Moderado
Crecimiento a 37°C	+ (producción de pigmento amarillo)
Movilidad	Positiva
Hidrólisis de gelatina	Positiva
Hidrólisis de almidón	Positiva
Hidrólisis de papel	+ (fibras separadas por agitación)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974)
VIII Edición.

Como se observó que las células se quedaban atrapadas en el paquete que se formaba con el sustrato residual durante la filtración y esto provocaba lecturas de densidad óptica bajas, se repitió el experimento en iguales condiciones, pero las muestras en esta ocasión fueron centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos, a fin de que se formara el paquete con el sustrato residual y las células permanecieran en el sobrenadante. Esto se comprobó mediante observaciones al microscopio óptico. También, debido a que el sobrenadante presentaba coloración, se eliminó la interferencia de ésta, utilizando como blanco una muestra de un matraz sin inocular, pero preparado y sometido a las mismas condiciones de los matraces inoculados. Los resultados se muestran en la tabla 6. En ella se observa en general una densidad óptica mayor en los diferentes sustratos, en especial en la hoja de mangle, lo que indica que con este sistema se recuperan más células.

Con el fin de comprobar que la diferencia en densidad óptica observada en los diferentes medios se debía a una mayor capacidad de los organismos para utilizar la hoja como

T A B L A 5

CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS (D.O. 540 nm.) EN DIFERENTES SUBSTRATOS*					
CEPA	HOJA DE MANGLE	C.M.C.	CELULOSA MICROCRIS TALINA	XILANOS	PECTINA
TEHn-A	0.532	0.491	0.323	0.365	0.310
TEHn-B	0.483	0.313	0.296	0.263	0.193
TEHn-C	0.391	0.191	0.159	0.195	0.099
TEHn-ABC	0.613	0.510	0.391	0.302	0.340

* Los diferentes substratos se utilizaron al 1%, después de 200 horas de incubación se leyó la D.O. contra blanco de agua.

T A B L A 6

CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS (D.O. 540 nm.) EN DIFERENTES SUBSTRATOS *					
CEPA	HOJA DE MANGLE	C.M.C.	CELULOSA MICROCRISTALINA	XILANOS	PECTINA
TEHn-A	0.704	0.675	0.594	0.420	0.432
TEHn-B	0.691	0.433	0.478	0.382	0.212
TEHn-C	0.599	0.329	0.392	0.211	0.234
TEHn-ABC	0.801	0.693	0.582	0.416	0.394

* Los diferentes substratos se utilizaron al 1% , después de 200 horas de incubación se leyó la D.O. contra un blanco preparado según se indica en material y métodos.

sustrato y no a una diferencia en la concentración inicial de células, se realizó un experimento, ajustando la suspensión de células a 0.2 de densidad óptica, usando en todos los matraces el mismo volumen del inóculo en relación al volumen del medio.

Las lecturas de densidad óptica se hicieron a diferentes tiempos, a fin de comparar con mayor precisión el crecimiento de las tres cepas juntas y separadas y utilizando como blanco una muestra de medio sin inocular, pero mantenida en agitación constante. Los resultados se muestran en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5. En ellos se observa que las tres cepas crecen en todos los sustratos probados, pero la pectina es la que proporciona el menor crecimiento, siguiendo los xilanos, después la celulosa microcristalina y por último la carboximetilcelulosa.

Se observa también que la hoja es el sustrato mejor aprovechado puesto que la concentración inicial de células en los diferentes matraces fué la misma, por tanto el mayor nivel de crecimiento refleja que este material es la fuente de carbono mejor utilizada para el desarrollo de los microorganismos. Tanto en la hoja como en los diferentes sus

tratos, siempre la cepa TEHn-A es la que presenta mayor nivel de crecimiento como se observa claramente en la tabla 7., en la que se muestra el porciento de crecimiento a un tiempo dado para las diferentes cepas, considerando como 100% el máximo nivel de crecimiento alcanzado por la cepa TEHn-A en cada sustrato. La cepa TEHn-C Siempre crece en promedio, un 45% menos que la TEHn-A, y la TEHn-B, un 23.3% menos que la TEHn-A.

Aunque los tres microorganismos son capaces de crecer en cada uno de los sustratos por separado, el crecimiento es menor que el observado en la hoja. Esto puede ser el resultado de que la hoja dentro de su estructura presenta como componentes, celulosa, xilanos y pectina lo que la hace una fuente de carbono más heterogénea, y esto podría permitir que los microorganismos tengan la posibilidad de utilizar simultáneamente no sólo una fuente de carbono, sino las tres. Sin embargo, sería más lógico pensar que para un organismo cualquiera, le es más fácil utilizar un sustrato entre más simple sea, lo que implicaría que entonces se observara un mejor crecimiento en un sustrato de estructu-

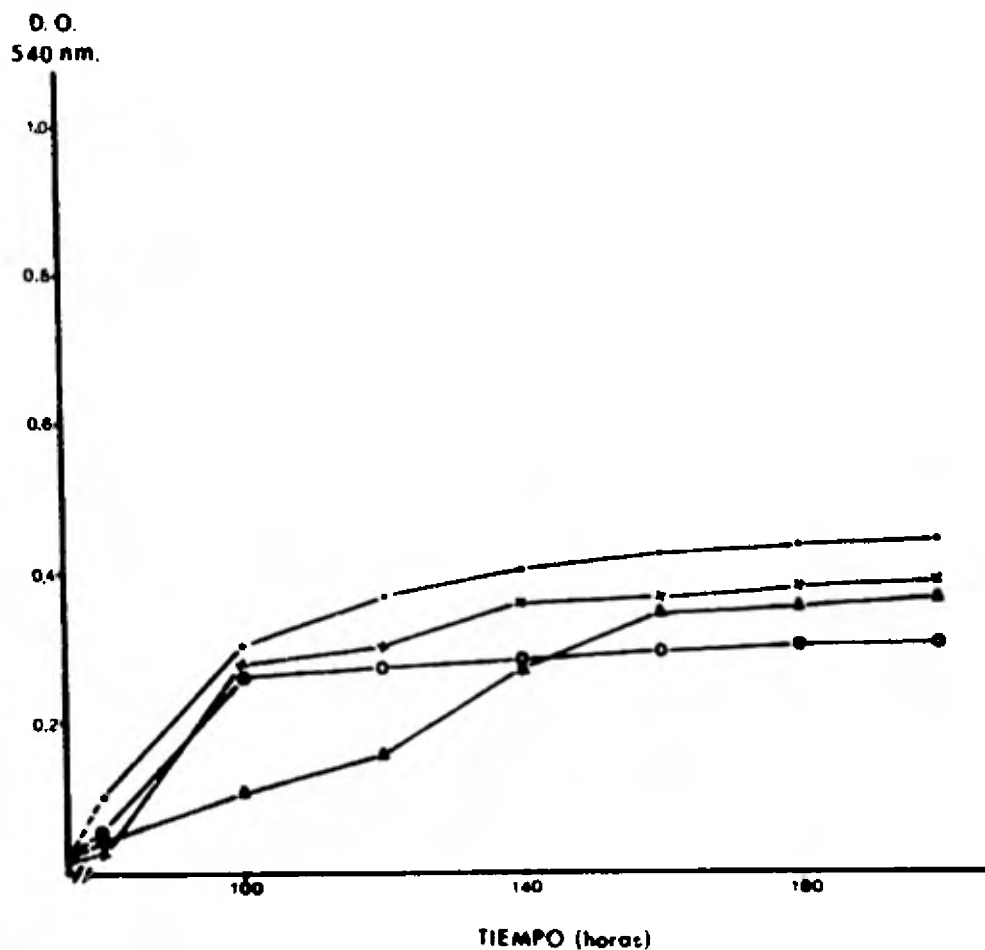


FIGURA 1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS UTILIZANDO PECTINA AL 1% EN EL MEDIO "Q".

(.) TEHn-A (o) TEHn-B (▲) TEHn-C
 (x) TEHn-ABC

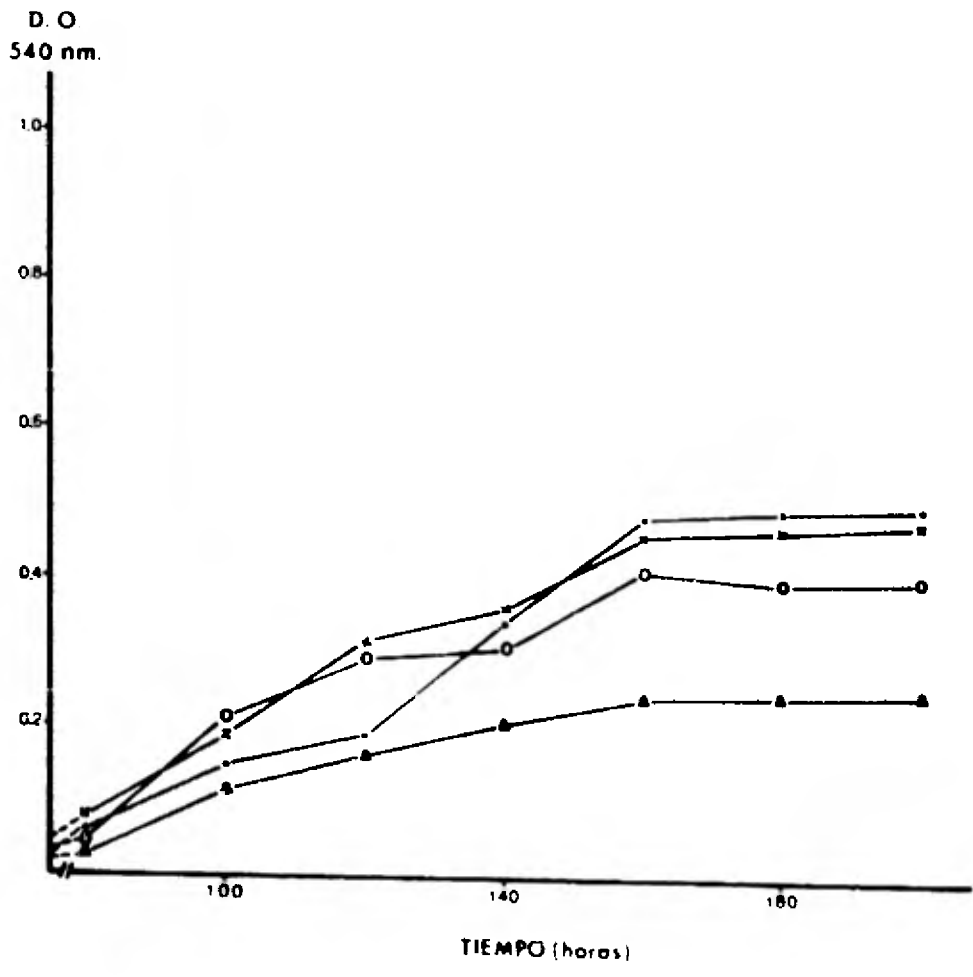


FIGURA 2. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS UTILIZANDO XILANOS AL 1% EN EL MEDIO "R".
 (·) TEHn-A (o) TEHn-B (▲) TEHn-C
 (x) TEHn-ABC

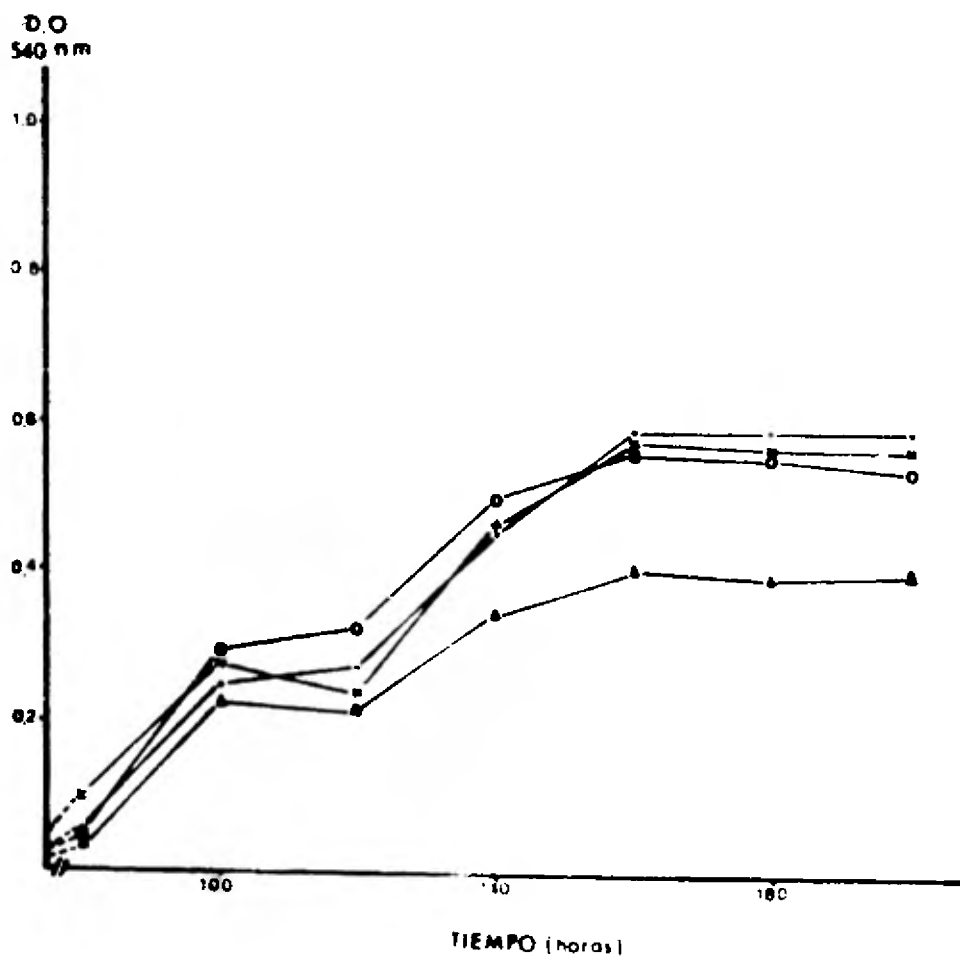


FIGURA 3. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS UTILIZANDO CELULOSA MICROCRISTALINA AL 1% EN EL MEDIO "P".

(•) TEHn-A (o) TEHn-B (▲) TEHn-C
 (×) TEHn-ABC

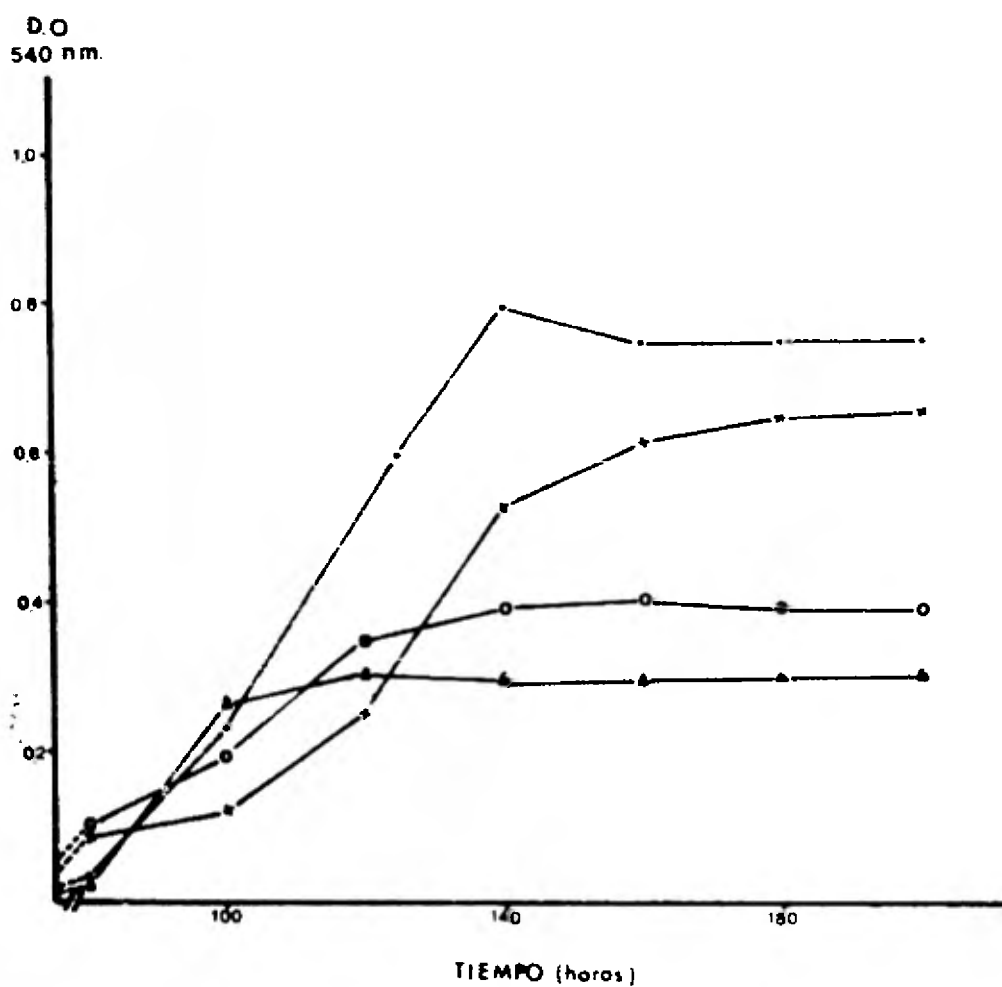


FIGURA 4.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS UTILIZANDO CARBOXIMETILCELULOSA AL 1% EN EL MEDIO "O".

(·) TEHn-A

(o) TEHn-B

(▲) TEHn-C

(x) TEHn-ABC

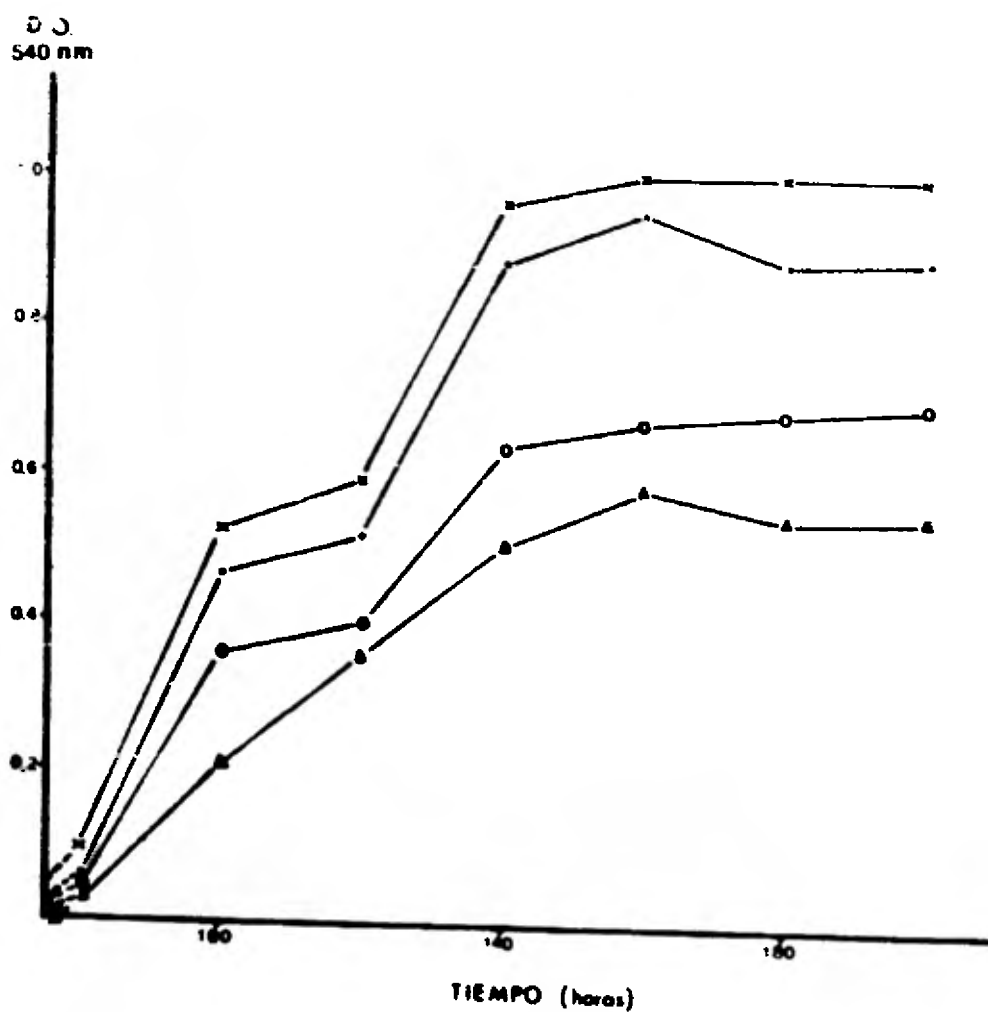


FIGURA 5.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS UTILIZANDO HOJA DE MANGLE AL 1% EN EL MEDIO "N".

(x) TEHn-A (o) TEHn-B (▲) TEHn-C
 (·) TEHn-ABC

T A B L A 7

PORCENTAJES RELATIVOS DE CRECIMIENTO EN LOS DIFERENTES SUBSTRATOS UTILIZANDO COMO 100% EL CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-A, EN CADA SUBSTRATO

CEPA	PORCIENTO DE CRECIMIENTO EN:				
	PECTINA	XILANOS	C.M.C.	MICROCRIS TALINA	HOJA DE MANGLE
TEHn-A	100	100	100	100	100
TEHn-B	69	81	39	69	74
TEHn-C	81	50	51	97	57
TEHn-ABC	87	96	82	98	95

En medio "B" después de 160 horas de crecimiento.

ra homogénea, como el caso de la pectina, xilanos o celulosa. El que esto no ocurra, posiblemente se deba a que al estar presentes los tres compuestos, actúen las enzimas en forma sinérgica y por ello haya mayor utilización de cada uno de los componentes, o quizás, a que alguno de los productos liberados durante la degradación de cualquiera de estos compuestos actúe como estimulador del sistema enzimático necesario para el aprovechamiento de los otros.

El porque al tener las tres cepas juntas no se observe un efecto aditivo en el crecimiento, sino que en general fué menor al de la cepa TEHn-A, puede indicar que los organismos utilizan los mismos compuestos y si alguno de ellos presentara un sistema enzimático más eficiente que el de los otros, le daría mayor ventaja sobre los otros dos microorganismos.

Aunque el crecimiento de la cepa TEHn-A siempre fué mayor al observado en TEHn-B y TEHn-C, se pensó que tal vez al cambiar las condiciones de fermentación, pH y salinidad, estos últimos dos microorganismos, pudieran presentar un mayor crecimiento en otras condiciones tal vez más favora-

bles para su desarrollo. Por lo tanto, el siguiente paso fué el estudiar el efecto de la concentración del inóculo en el crecimiento de las tres cepas, a fin de encontrar aquella con la cual la curva de crecimiento presentara un mayor crecimiento en el menor tiempo. Se prepararon inóculos según se indica en el capítulo anterior, ajustando la concentración de los mismos a 0.2, 0.4, 0.5 y 0.6 unidades de densidad óptica.

Los resultados se muestran en las figuras 6, 7, 8 y 9. En ellos se observa que los mejores niveles de crecimiento se obtienen con una concentración de inóculo de aproximadamente 0.6 unidades de densidad óptica. Sin embargo, la fase lag de la curva, siempre fué muy prolongada (60 - 80 horas).

Cabe mencionar que se estuvo utilizando hasta aquí el agar papa - dextrosa, por la posibilidad de aislar principalmente hongos, ya que según Fell, et al (1975), son los colonizadores más abundantes de la hoja durante su degradación, sin embargo una posibilidad de la prolongada fase lag podría deberse a que el medio de propagación para prepa

D.O.
540 nm.

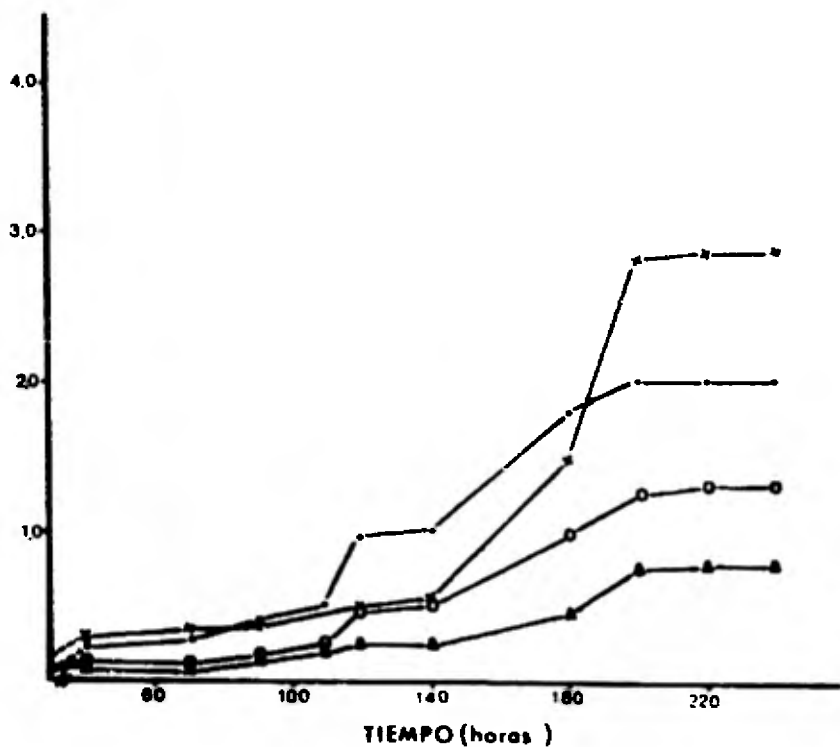


FIGURA 6.

CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-A EN MEDIO "N" PARA ESTANDARIZAR EL INOCULO.

(▲) 0.2 u.D.O.

(○) 0.4 u.D.O.

(•) 0.5 u.D.O.

(x) 0.6 u.D.O.

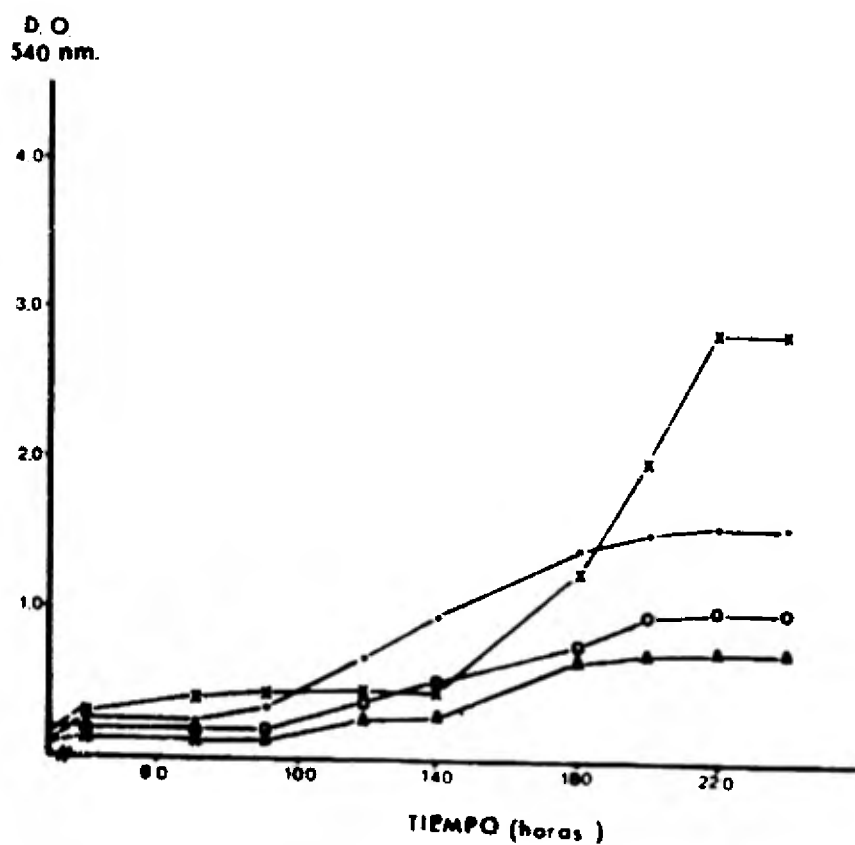


FIGURA 7. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-B EN MEDIO "N" PARA ESTANDARIZAR EL INOCULO.

- | | |
|----------------|----------------|
| (▲) 0.2 u.D.O. | (○) 0.4 u.D.O. |
| (.) 0.5 u.D.O. | (x) 0.6 u.D.O. |

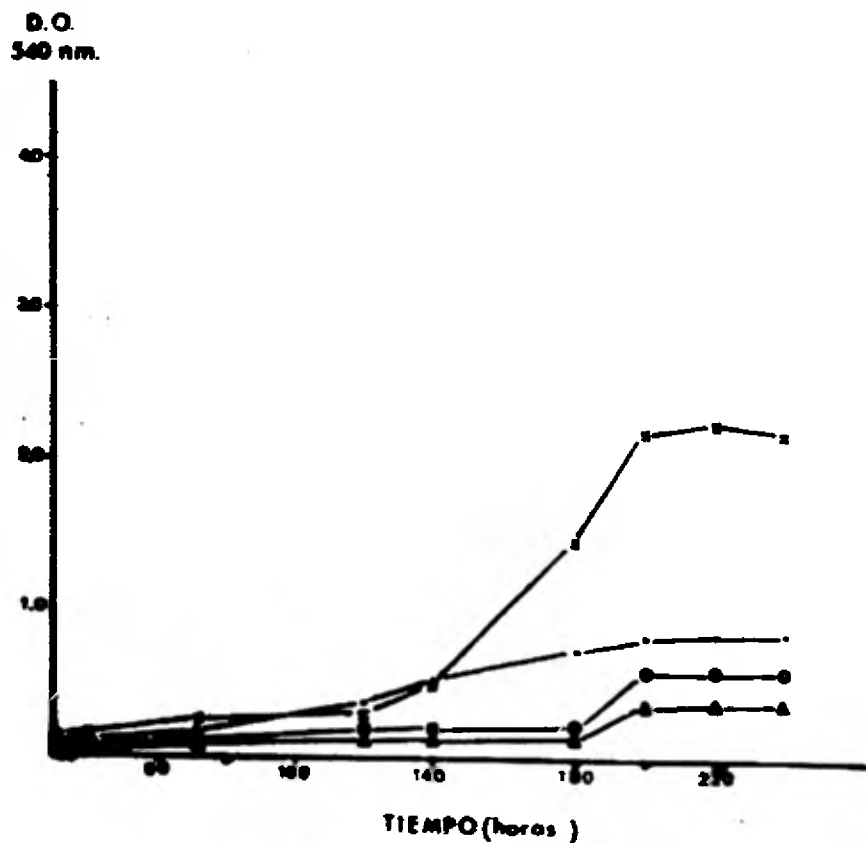


FIGURA 8. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-C EN MEDIO "H" PARA ESTANDARIZAR EL INOCULO.

(▲) 0.2 u.D.O.

(○) 0.4 u.D.O.

(·) 0.5 u.D.O.

(×) 0.6 u.D.O.

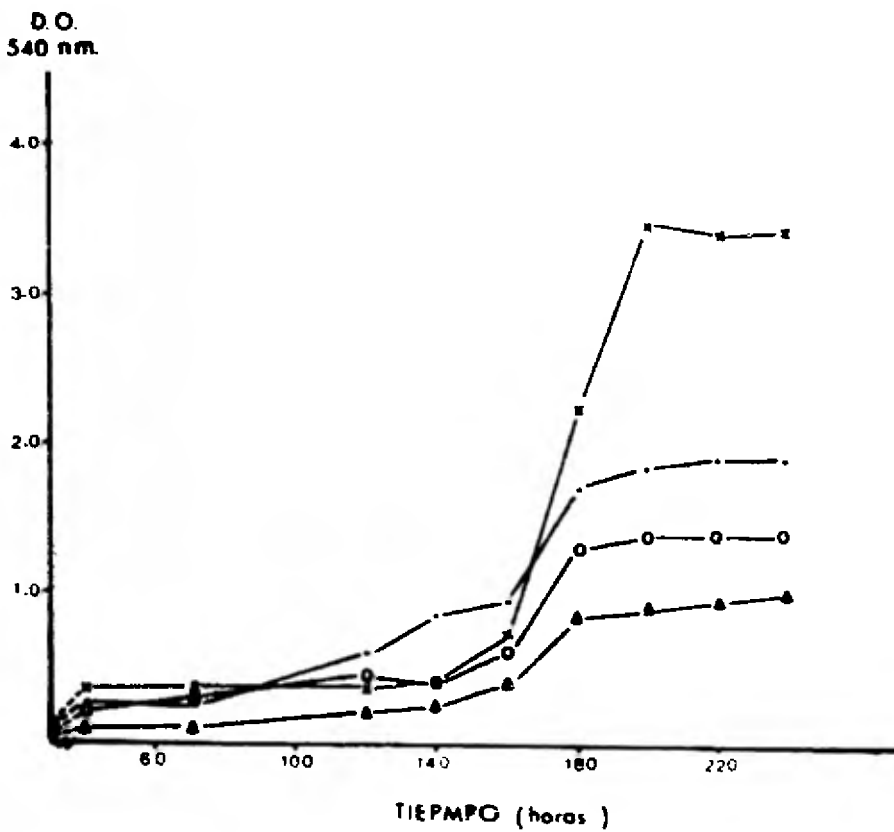


FIGURA 9. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-ABC EN MEDIO "N" PARA ESTANDARIZAR EL INOCULO.

(▲) 0.2 u.D.O.

(○) 0.4 u.D.O.

(·) 0.5 u.D.O.

(×) 0.6 u.D.O.

rar la suspensión del inóculo (agar papa - dextrosa), no fue el más apropiado debido a su composición y pH. Por esta razón, se procedió a probar el medio " U ", como medio de propagación, más adecuado para el desarrollo bacteriano debido a su composición, la que se indica en el capítulo anterior.

Se corrió un experimento con inóculo preparado a partir de células crecidas en el medio " U ", cuyos resultados se muestran en la figura 10. En ella se observa una reducción de la fase lag de la curva de crecimiento de aproximadamente 40 horas, lo que indica que al propagar las cepas en un medio más adecuado, éstas crecen más rápido en el medio líquido de fermentación. También se observa que el nivel de crecimiento de la cepa TEHn-A sigue siendo mayor que el de las cepas TEHn-B y TEHn-C, y que el crecimiento que alcanzan es similar al que se observa en los otros experimentos, por lo que se decidió utilizar el medio " U ", para propagar las cepas en los siguientes experimentos.

Para determinar las condiciones óptimas de degradación de la hoja, se procedió a probar la influencia de la salini-

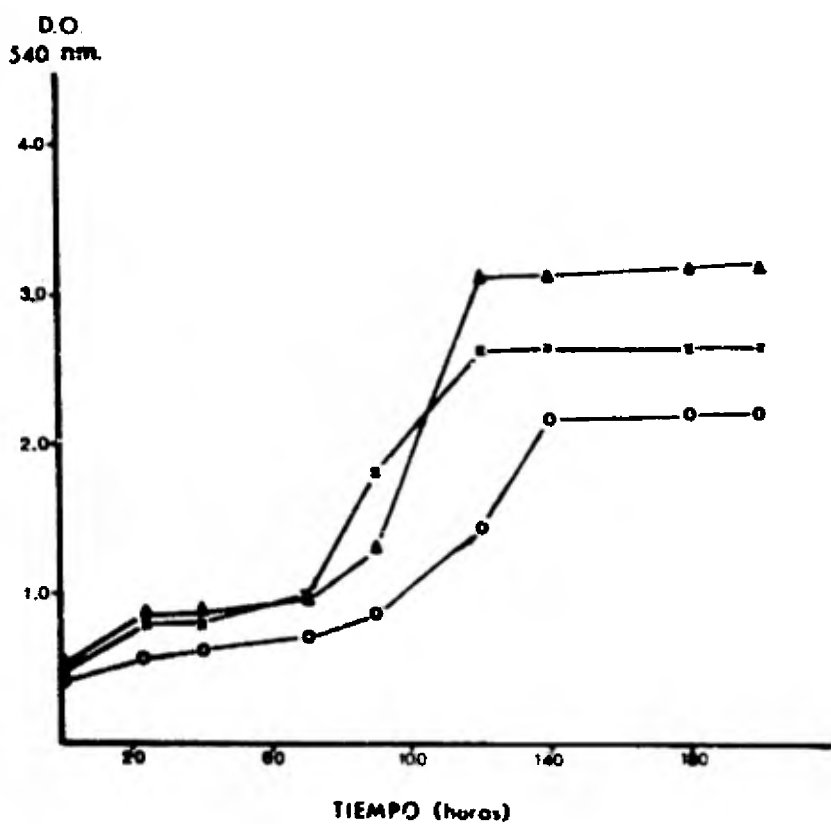


FIGURA 10.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS UTILIZANDO EL MEDIO "U" PARA PREPARAR EL INOCULO, INCUBADAS EN MEDIO "N".

(▲) TEHn-A

(x) TEHn-B

(●) TEHn-C

dad, por ser ésta un factor determinante en la distribución de los organismos en ambientes acuáticos, y porque dentro de la laguna es el parámetro que más varía, presentando valores más bajos a medida que se acerca a la línea de costa debido a la influencia de los ríos que descargan sus aguas en ella. Para ello, se corrió un experimento en el que se utilizó medio " N " preparado con agua de mar diluida hasta tener una salinidad de 7‰, 17‰, 27‰ y 35‰. Los resultados de crecimiento de las cepas TEHn-A, TEHn-B y TEHn-C, se pueden ver en las figuras 11, 12 y 13 respectivamente. En ellas se observa que la salinidad a la que la hoja es mejor aprovechada es de 27‰, salinidad que refleja un ambiente salobre.

El siguiente paso fué el de determinar a esta salinidad el pH óptimo para el crecimiento, utilizando el medio " N ", al que se le ajustó el pH a 5.0, 6.8, 7.8 y 9.0, después de esterilizar. La influencia del pH en la actividad metabólica es importante, pues influye en la actividad de las enzimas. Dentro de la laguna, puede ser un factor importante en la distribución de organismos principalmente en el sedimento,

en el cual puede alcanzar valores muy bajos, como resultado de la actividad microbiana, sin embargo, en la columna de agua, su valor permanece prácticamente constante. Los resultados del crecimiento de las tres cepas se muestran en las figuras 14, 15 y 16, en las cuales se observa que el pH más efectivo es el de 7.8.

El hecho de que se observe mejor crecimiento a una salinidad entre 27‰ y 17‰, se explica porque las cepas fueron aisladas de un área en donde, debido al flujo neto de las aguas de este a oeste originado por el avance de la marea en el mismo sentido y los vientos predominantes del este, éstas se combinan con las aguas dulces de los ríos vertidas principalmente en el area sur y oeste. Esto, entonces, provoca que los valores de salinidad en esta área, sean relativamente más bajos comparados con los que se tiene en la zona del noreste en la cual hay una marcada influencia marina.

Es lógico pensar que en una salinidad menor de 7‰ no haya crecimiento, por el hecho de que estos microorganismos por ser de origen marino, no sólomente tienen la capaci-

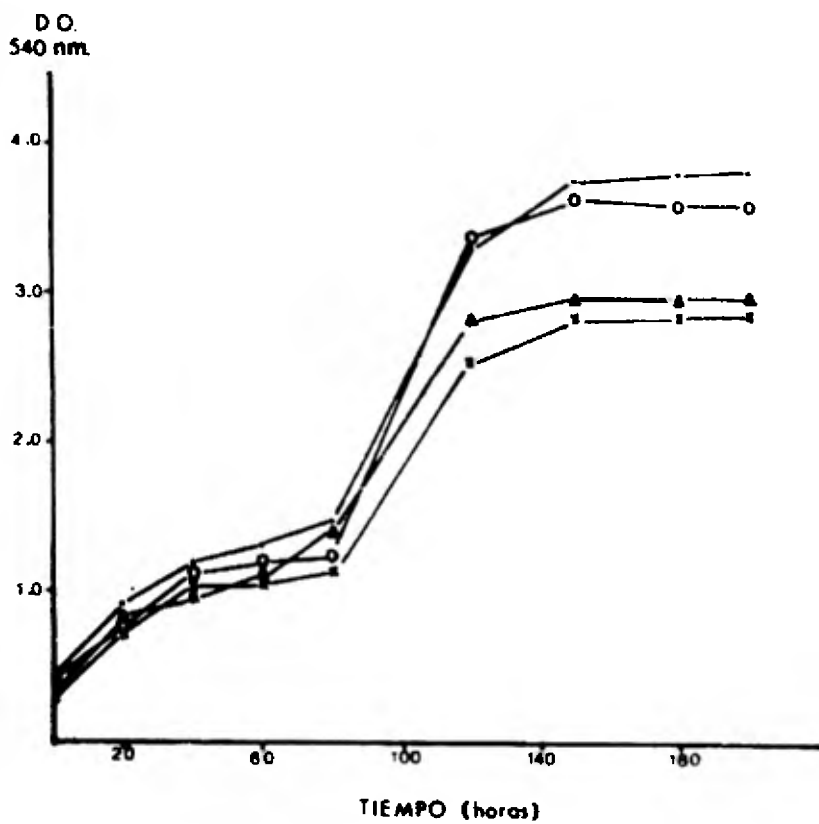


FIGURA 11. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEH_n-A EN MEDIO "N" A DIFERENTES SALINIDADES.

(▲) 7‰ (○) 17‰ (·) 27‰
 (x) 35‰

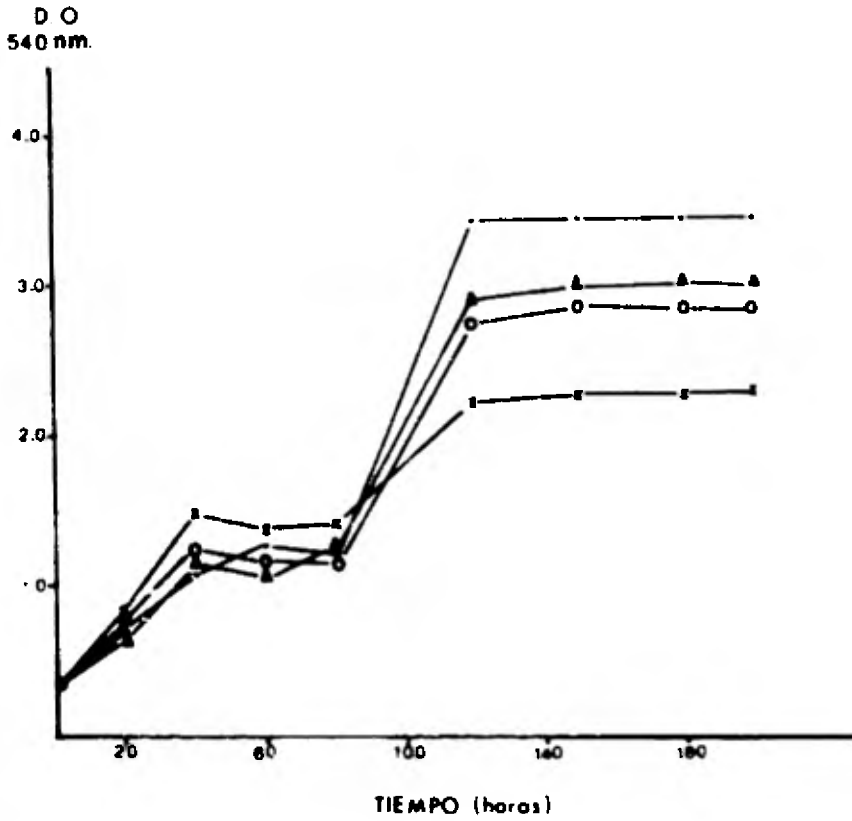


FIGURA 12. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEH_n-B EN MEDIO "N" A DIFERENTES SALINIDADES.

(o) 7‰ (▲) 17‰ (·) 27‰

(x) 35‰

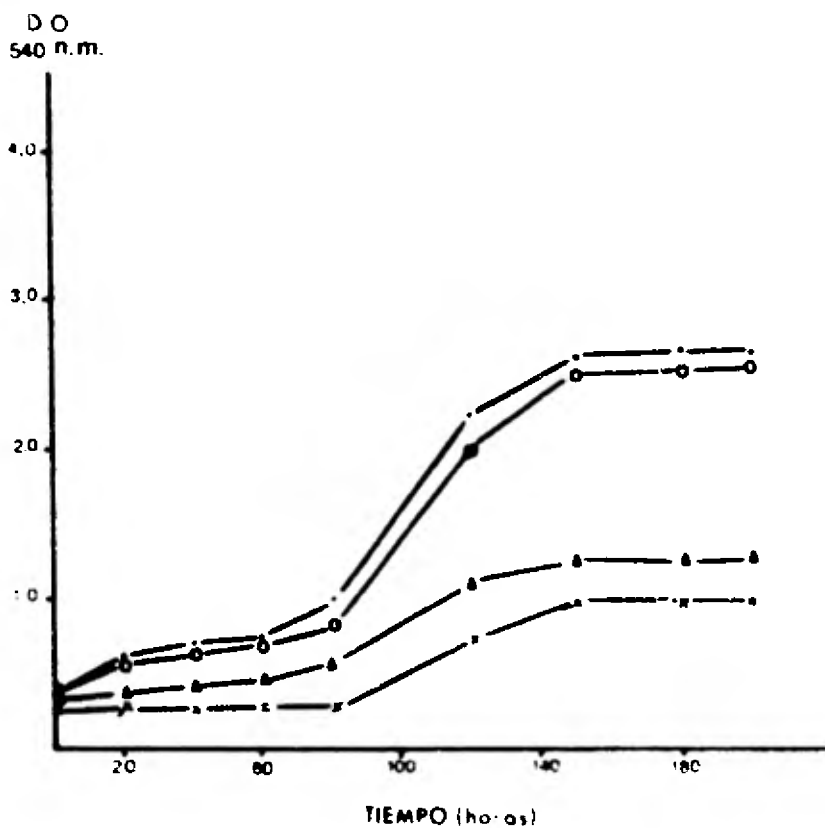


FIGURA 13. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-C EN MEDIO "N" A DIFERENTES SALINIDADES.

(▲) 7‰ (○) 17‰ (·) 27‰

(x) 35‰

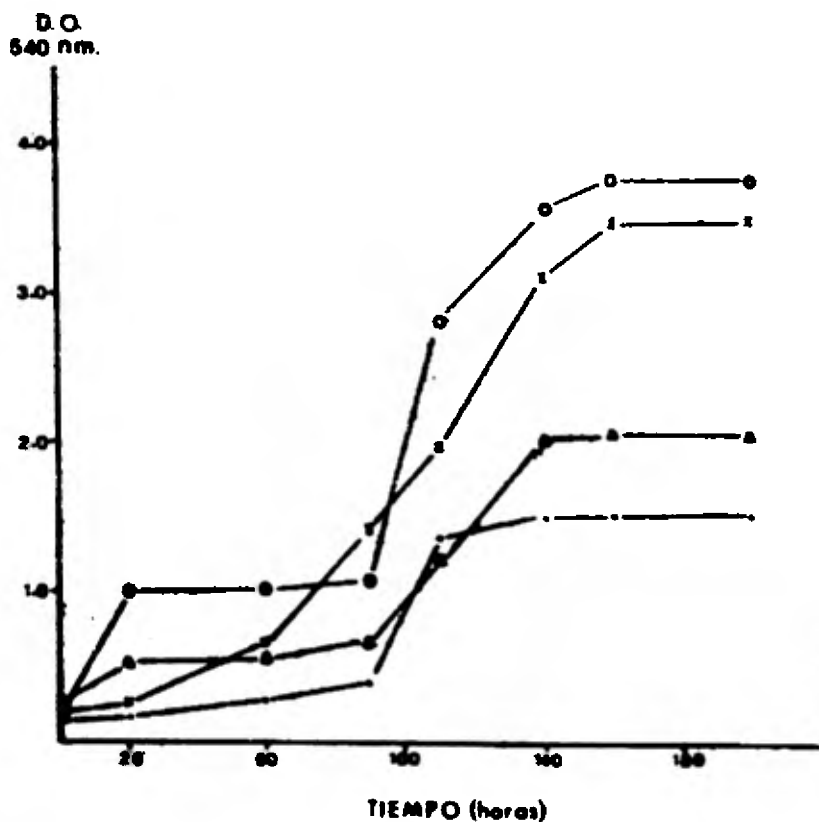


FIGURA 14. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-A EN MEDIO "N" A DIFERENTES pH.

(▲) 5.5 (×) 6.7 (○) 7.8
 (•) 9.0

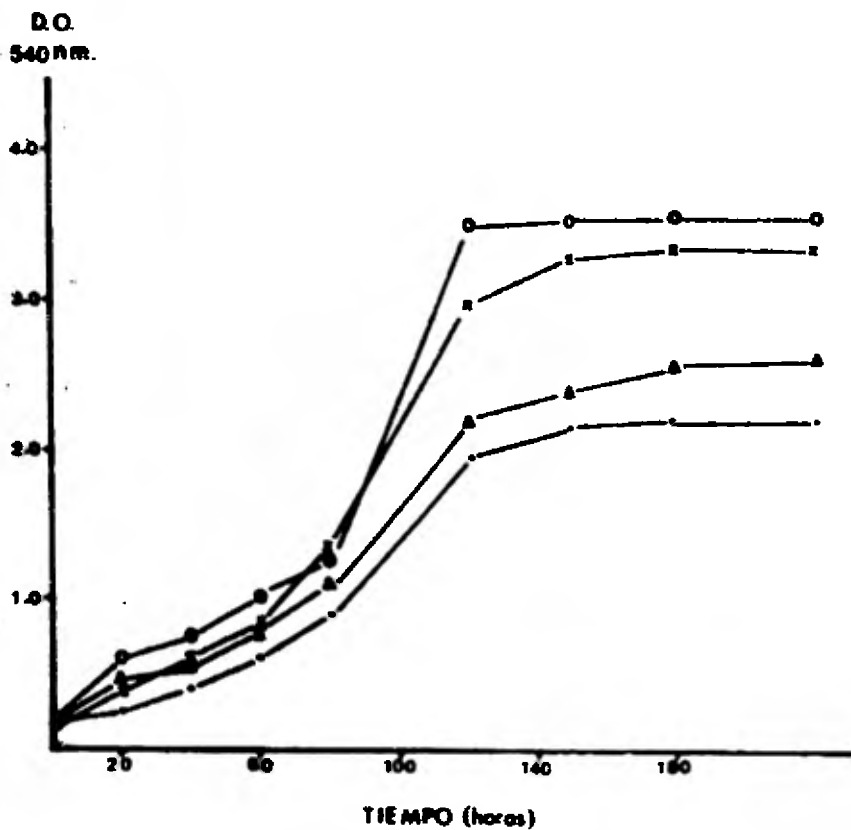


FIGURA 15. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEH_n-B EN MEDIO "N" A DIFERENTES pH.

(▲) 5.5 (x) 6.7 (o) 7.8
 (·) 9.0

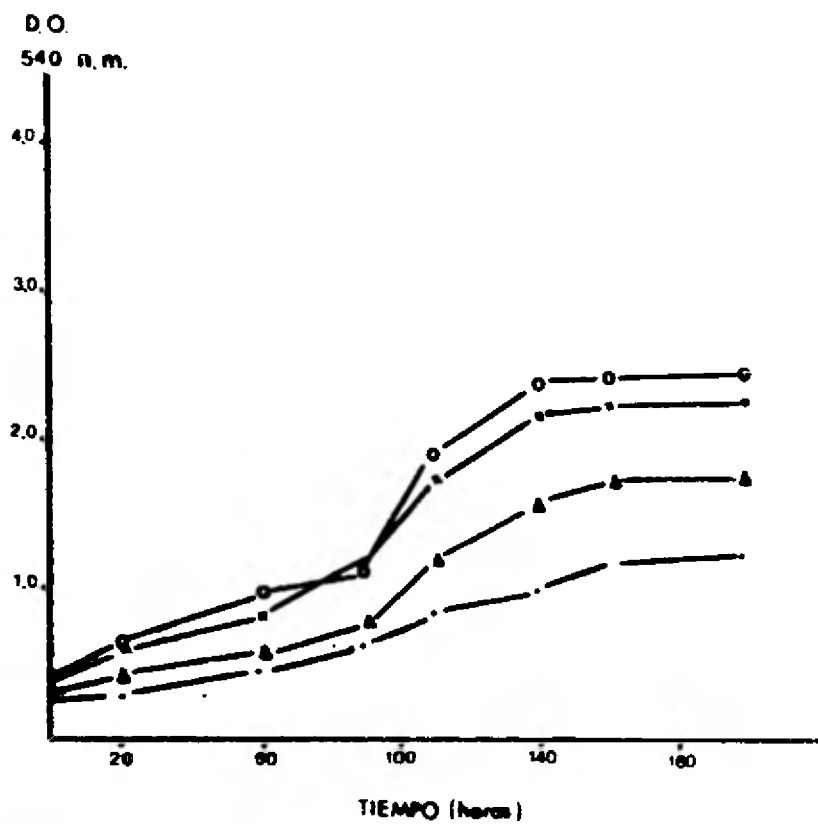


FIGURA 16.

CRECIMIENTO DE LA CEPA TEH_n-C EN MEDIO "N" A DIFERENTES pH.

(▲) 5.5 (x) 6.7 (o) 7.8

(·) 9.0

dad de funcionar y crecer en este habitat, sino que muchos muestran una adaptación obligada a la salinidad, puesto que las sales principalmente el cloruro de sodio, no solamente intervienen como reguladores de la presión osmótica, sino que posiblemente desempeñan un papel esencial en el funcionamiento de la membrana en el transporte de sustancias hacia el interior de la célula (Drapeau y MacLeod, 1963) y en reacciones de oxidación de ciertos sustratos (Colwell y Morita, 1974).

El pH en el que hubo mayor crecimiento fué el de 7.8, valor muy similar al valor promedio determinado para la columna de agua en la laguna, que es de 8.2 (Vazquez, 1978).

Puesto que la cepa TEHn-C, presenta un crecimiento menor que el de las cepas TEHn-A y TEHn-B, se decidió por el momento proseguir el estudio utilizando únicamente estas dos últimas cepas.

Con el fin de comprobar si un organismo aislado de agua dulce es capaz de llevar a cabo la degradación de la ho

ja en las mismas condiciones que un organismo de origen marino, se procedió a realizar un estudio comparativo entre el crecimiento de las cepas aisladas de la laguna (TEHn-A y TEHn-B) y la cepa 1025, aislada en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Se utilizaron para ello los medios "N" Y "S", cuya composición ya fué mencionada en el capítulo anterior, preparados con agua de salinidad de 17‰. Los resultados se muestran en la figura 17., en la que se observa que la cepa 1025 presenta un comportamiento similar frente a la hoja de mangle al que presentan las cepas aisladas de la laguna y que el nivel de crecimiento que ella alcanza utilizando la hoja como fuente de carbono, es semejante al que se observa cuando utiliza glucosa como sustrato, figura 18.

En base a esto podemos decir que en el sistema lagunar cerca de la zona donde los ríos vierten sus aguas, pueden existir microorganismos dulceacuícolas, los cuales pueden degradar la materia orgánica que se acumula en la laguna, por lo que pueden ser importantes en la conservación de la

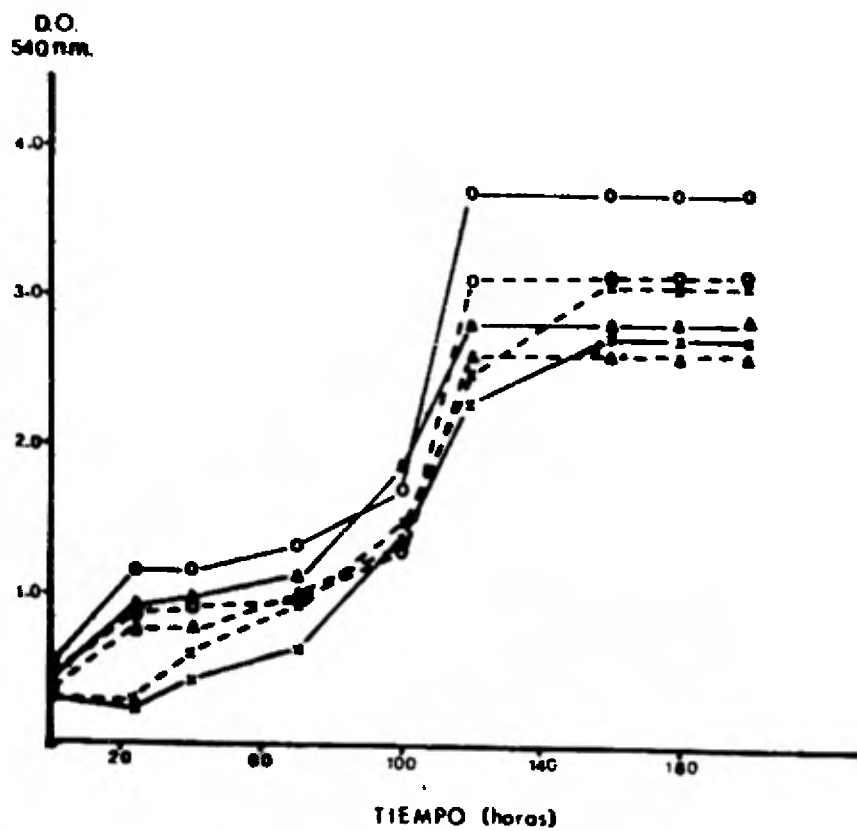


FIGURA 17. CRECIMIENTO COMPARATIVO ENTRE LAS CEPAS TEHn-A (o), TEHn-B (x) y 1025 (Δ) EN MEDIO "N" (—) Y EN MEDIO "S" (---).

productividad primaria del sistema lagunar. Sin embargo, hay que hacer notar que este microorganismo fué aislado en un medio que contenía 0.6% de cloruro de sodio, por lo que no podemos asegurar que organismos dulceacuícolas sobrevivan al entrar al sistema lagunar, pues deben de poder soportar el fuerte cambio de fuerza iónica que ocurre al mezclarse el agua dulce del río con el agua de la laguna, y de no ser así, podrían sufrir un choque osmótico, que provocaría su muerte.

Por último con el fin de comprobar el crecimiento por el enriquecimiento proteico de las partículas degradadas, se llevó a cabo un experimento en las condiciones que se determinaron óptimas para que los microorganismos lleven a cabo el aprovechamiento de la hoja.

Los resultados se muestran en las figuras 19 y 20. En ellos se observa que el aumento en la densidad óptica se correlaciona con un incremento en el contenido de proteína cruda en la hoja durante la fermentación, lo que refleja la formación de biomasa microbiana durante la degradación de esta materia orgánica, y consecuentemente un aumento en su

valor nutritivo.

Según datos reportados por Cundell, et al (1979), cuando realizaron experimentos in situ, incubando la hoja en la columna de agua, el incremento de nitrógeno proteico alcanza aproximadamente un 2.6%, valor un tanto más bajo que el determinado por nosotros que es en promedio de 3.5%. Probablemente esto se deba a que en la columna de agua, el número de microorganismos sea menor; sin embargo, sería más lógico que in situ, el incremento fuera mayor, por la sucesión que ocurre durante la colonización de la partícula, lo que abre la posibilidad de que los microorganismos incubados en el laboratorio, utilicen primero las fuentes de nitrógeno presentes en el medio, (sulfato de amonio y urea) y posteriormente las de la hoja, lo que hace que su desarrollo sea mayor.

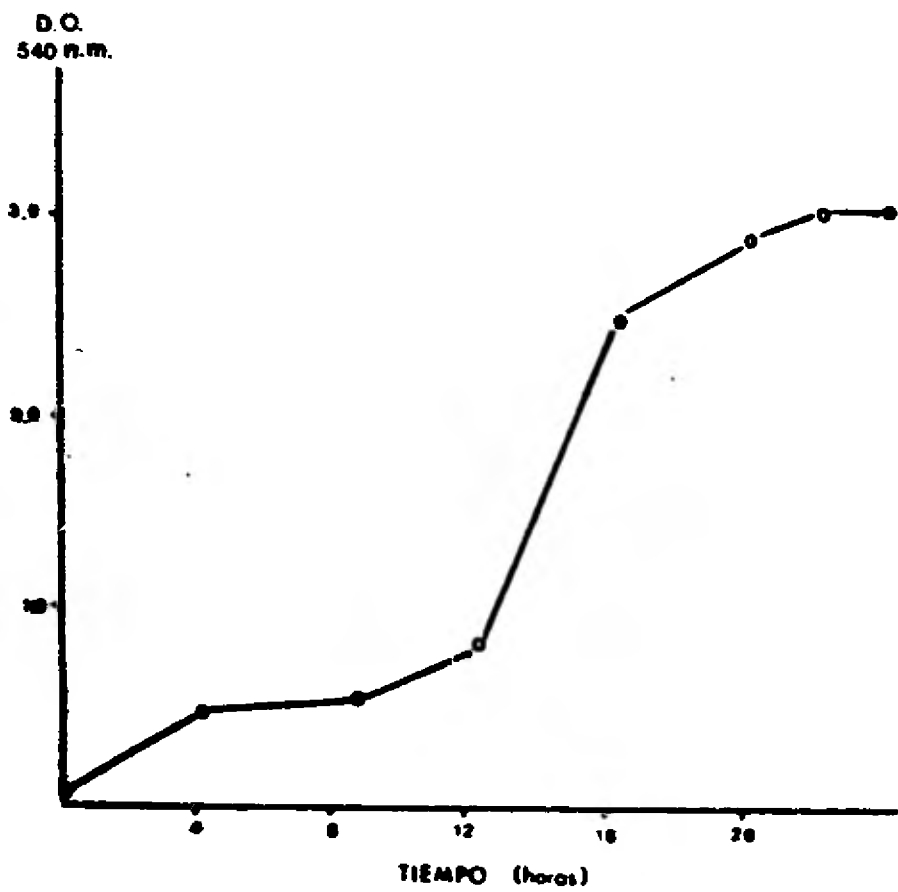


FIGURA 18. CRECIMIENTO DE LA CEPA 1025 EN MEDIO "S", CON GLUCOSA COMO SUSTRATO.

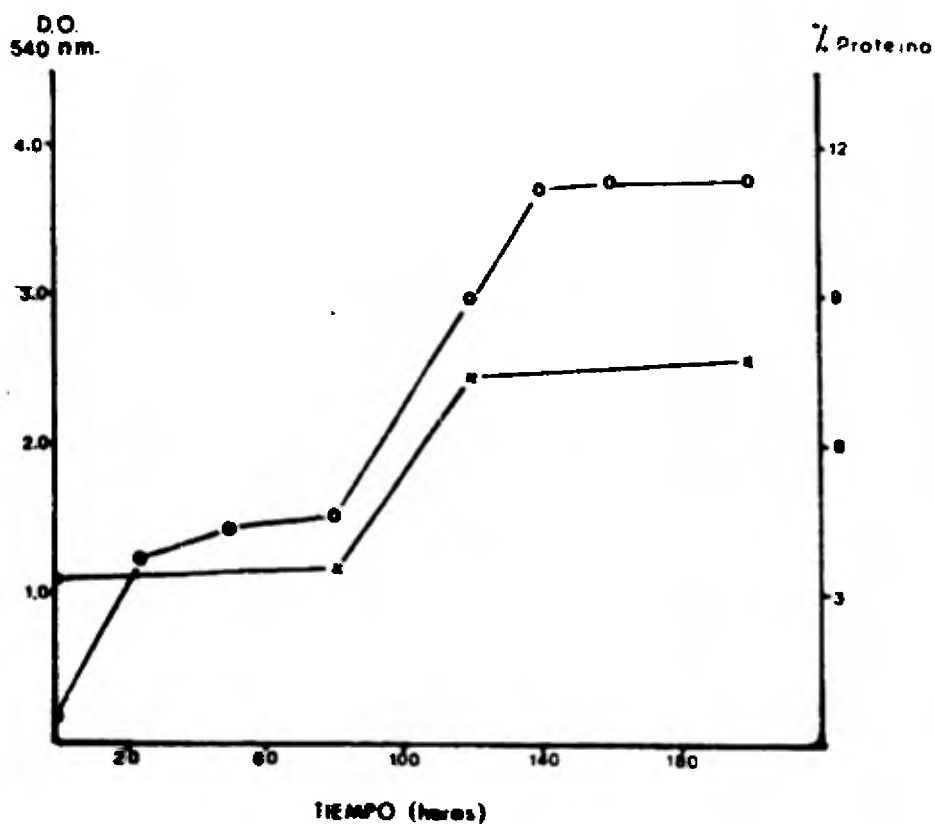


FIGURA 19. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-A EN MEDIO "N" (•) COMPARADO CON EL INCREMENTO EN PORCIENTO DE PROTEINA A LO LARGO DE LA FERMENTACION (x).

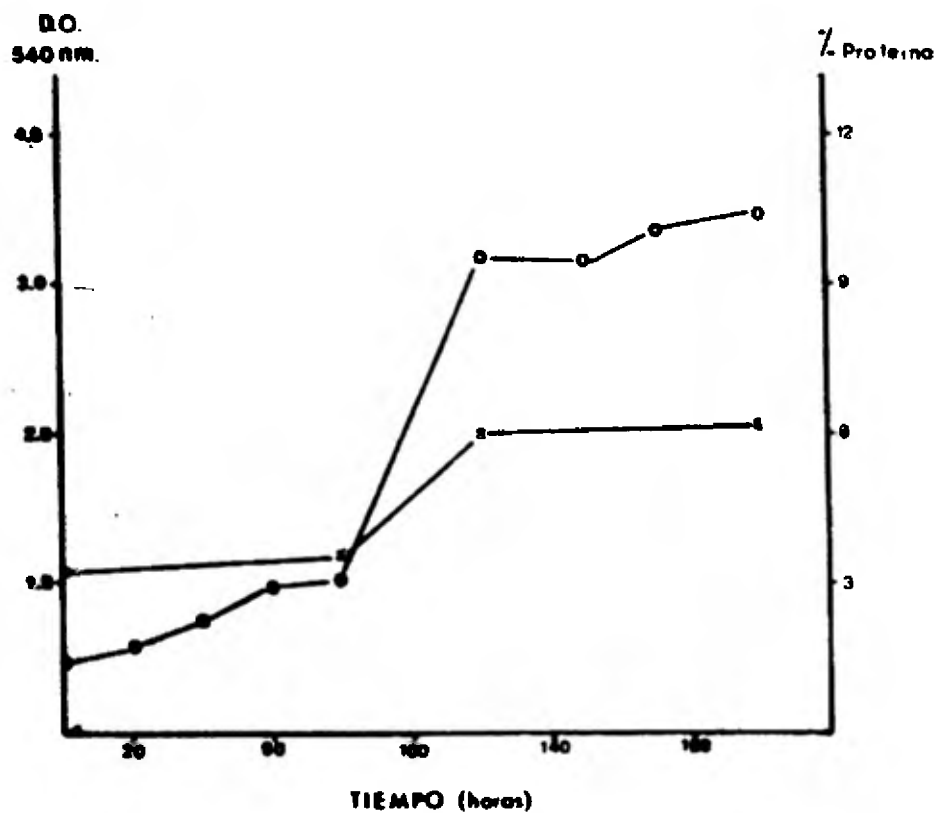


FIGURA 20. CRECIMIENTO DE LA CEPA TEHn-B EN MEDIO "M" (o) COMPARADO CON EL INCREMENTO EN PORCIENTO DE PROTEINA A LO LARGO DE LA FERMENTACION (x).

El que se hayan aislado un mayor número de microorganismos celulolíticos de las estaciones 3, 4 y 6, se explica por el hecho de que en el área que éstas comprenden, existe un gran aporte de material orgánico (disuelto y particulado) aportado por los ríos que vierten sus aguas en esta zona de la laguna, o bien por la gran cantidad de hojas de manglar que continuamente caen al sistema. El que el número de microorganismos celulolíticos aislados de las estaciones 8, 9 y 10 haya sido menor, es quizás porque en este sector de la laguna se depositan principalmente sedimentos arenosos, lo que marca una franca influencia marina. En la estación 5, zona sometida a grandes cambios debido a la hidrodinámica, la hacen una zona no muy favorable para el desarrollo microbiano; por último, en la estación 7, aunque se aislaron un mayor número de microorganismos que en las 4 últimas estaciones mencionadas, se observó un menor número que en las estaciones 3, 4 y 6, tal vez debido a que el material orgánico que en ella cae, es transportado hacia la región sureste debido al patrón natural de circulación, provocando que la población microbiana en esta zona sea menor.

Este material está disponible para ser utilizado por los microorganismos heterótrofos que habitan el ecosistema, constituyendo una fuente primaria de energía. Puesto que la gran mayoría de la materia orgánica depositada en el fondo es de origen vegetal, cuyos principales componentes son la celulosa y lignina, los microorganismos que la utilicen, deben tener la capacidad de hacerlo con cualquiera de estos materiales, y como se considera de menos difícil degradación la celulosa, es factible pensar que haya una mayor proporción de microorganismos celulolíticos; sin embargo, para poder asegurar esto debería hacerse una cuantificación de cada uno de los componentes de la hoja antes y después del desarrollo microbiano, para ver así, cuál es la cinética de degradación de esta materia orgánica.

Por otro lado, aunque sabemos que los microorganismos aislados son capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono a la hoja de mangle, la eficiencia de consumo observada puede no ser igual a la que se tiene en condiciones naturales, pues el simular un ambiente artificial en el laboratorio, provoca que la capacidad de los microorganismos

no sea la misma, debido a que en condiciones naturales existen parámetros físicos, químicos y/o biológicos, difíciles de determinar y de igualar in vitro; tales como la presencia de otros organismos o de sustancias en solución que funcionen como cofactores de crecimiento o como nutrientes, o bien, condiciones específicas de óxido reducción, que pueden influir en la actividad microbiana.

Aunque se comprobó que la actividad bacteriana sobre de las partículas de hoja da como resultado una partícula con mayor contenido proteico que la que le dió origen, es posible que en condiciones naturales el incremento sea mayor, porque la degradación sea continuada por otros microorganismos o bien por las diferentes condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la degradación del material. Al respecto, Candwell, et al (1979) proponen, que la cantidad y calidad de organismos colonizadores de la partícula orgánica, están en función de la profundidad a la cual se lleva a cabo la degradación dentro de la columna de agua.

Así, se puede pensar que las bacterias heterótrofas son

un importante factor ecológico, puesto que van a intervenir en la distribución de plantas y animales dentro del ecosistema, por ser fuente de alimento para unos y para otros funcionar como regeneradoras de nutrientes.

8. CONCLUSIONES

1. Se aislaron tres microorganismos con capacidad celulo-
lítica de la interfase sedimento - agua, en el sector
suroeste de la Laguna de Términos.
2. Los tres microorganismos comparten características con
el género Cellulomonas sp.
3. Aunque las tres cepas son capaces de crecer en medios
con diferentes fuentes de carbono (pectina, xilanos, ce-
lulosa microcristalina y carboximetilcelulosa), presen-
tan mayor crecimiento cuando utilizan la hoja de mangle.
4. Las condiciones óptimas para el crecimiento en hoja de
mangle son: temperatura de 37°C, salinidad de 17‰
y pH 7.8.
5. Su crecimiento sobre este material provoca un incremen-
to en el contenido de proteína y consecuentemente en el
valor nutritivo de la partícula.

9. LITERATURA CITADA

ADDAMS S. M. Y S.W. ANGELOVIC, 1970.

Assimilation of detritus and its associated bacteria by three species of estuarine animals.

Chesapeake Science, 11(4): 249-254

ANDERSON D.Q., 1939.

Distribution of organic matter in marine sediments and its availability to further decomposition.

J. Mar. Res., 2(3): 225-234

ARENAS-FUENTES, V. Y G.D. LA LANZA, 1978.

Importancia y mecanismos del intercambio químico agua-sedimento en una laguna litoral.

En prensa.

BAYLOR R.W. Y W.H. SUTCLIEFFE, Jr., 1963.

Dissolved organic matter in seawater as source of particulate food.

Limnol. Oceanog., 8(4): 369-371

BREWER, W.S. Y F.D. PFAENDER, 1978.

The distribution of selected organic molecule in freshwater sediment.

Water Res., 13: 237-240

BURKHOLDER, P.R. Y G.M. BURNSIDE, 1957.

Decomposition of marsh grass by aerobic marine bacteria.

Bull. Torrey Botan. Club., 34: 366-383

CASTELLEVI J., 1972.

Bacteriología marina In. Editor. Ecologia Marina

Fund. la Salle Ed. Dossat Cap. 7: 200-279

CONGDON R.A. Y A.S. McCOMB, 1981.

The vegetation of the Blackwood river estuary, south west
Australia.

J. Ecol., 69: 1-16

COLWELL R.R. Y R.Y. MORITA, 1974.

Effect of the ocean environment on microbial activities.

University Park Press.,

Proceedings of the second United States - Japan conference
on Marine Microbiology.

CRANWELL P.A., 1976.

Decomposition of aquatic biota and sediment formation: or-
ganic compounds in detritus resulting from microbial at-
tack on the alga Ceratium hirundinella.

Freshwater Biol., 6: 41-48

CUNDELL A.M., J.J. BROWN, R. STANDFORD Y R. MITCHELL, 1979.

Microbial degradation of Rhizophora mangle leaves immersed
in the sea.

Estuar. Coast. Scie., 9: 281-286

CRUZ-OROZCOR., 1980.

Estudio del sistema fluvio lagunar deltaico de la región de Campeche Tabasco; en particular de la Laguna de Términos y áreas adyacentes, para mejorar su uso y aprovechamiento.

Tercer reporte presentado a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

México, 62p.

DARNELL, R.M., 1967.

The organic detritus problem. In: Lauff (Ed.), Estuaries, Am. Assoc. Advac. Sci Public. 84: 374-375

DARNELL, R.M., 1967.

Organic detritus in relation to the estuarine ecosystem.

IN: Lauff (Ed.), Estuaries,

Am. Assoc. Advac. Sci Public. 83: 376-382

DE LA CRUZ, A., 1975.

Proximate nutritive value changes during decomposition of marsh plants.

Hydrobiol., 47(3-4): 475-480

DE LA CRUZ, A. Y W.E. POE, 1975.

Amino acid content of marsh plants.

Estuar. Coast. Mar. Scie. 3: 243-245

EDWARDS, R.R., 1978.

Ecology of a coastal lagoon complex in Mexico.

Estuar. Coast. Mar. Sci., 6: 75-92

EPPLEY, R.W., E.H. RENGER, W.G. HARRISON Y S.S. GULLEN, 1979.
Amonium distribution in sourhern California coastal waters
and its role in the growth of phytoplankton.
Limnol. Oceanogr., 24: 495-509

FENCHEL, T., 1970.
Studies on the descomposition of organic detritus derives
from the turtle grass T. Testudinum.
Limnol. Oceanogr., 15(1): 14-20

FRY B. Y P.L. PARKER, 1978.
Animal diet in Texas seagrass meadows: C¹³ evidence for the
importance of benthic plants.
Estuar. Coast. Sci., 8:499-509

HAINES, E.V. Y C.L. MONTAGUE, 1979.
Food sources of estuarine invertebrates analized using
C¹³/C¹² ratios.
Ecology, 60(1): 48-56

HARONL., STEVENSON E., MILLWOOE Y B.H. GERBEL. 1967.
Aerobic, heterotrophic bacterial populations in estuarine
water and sediments.
Contribution N°84 of Belle W. Baruch Library in Marine
Science, Vol I. Estuarine Microbial Ecology
Univ. South. Carolina Press, Columbia, South Carolina.

HANNASCH, H.E., K. EIMESSELLEN, CARL. Y A. FARMANFARMANAN,
1970. Growth of heterotrophic microorganism in seawater.
Science, 171: 672-279

- HARRISON P.G. Y K.H. MANN, 1975.
Detritus formation from eelgrass Zostera marina. The relative effects of fragmentation, leaching and decay.
Limnol. Oceanogr., 20(6): 924-934
- JOSSELYN N.M. Y MATHEISON C.A., 1980.
Seasonal influx and decomposition of autochthonous macrophyte litter in a north temperate estuary.
Hydrobiol., 71: 197-208
- KALLE, K., 1972.
Salinity. General introduction In: O. Kinne (Ed). Marine Ecology, VI(2): 683-688
- KISTALOS M. Y R.L. SEYMOUR, 1976.
Role of microbial enriched detritus in the nutrition of Gammarus minus (amphipoda).
Oikos, 27: 512-516
- KRUSCYNISKI, C.B., SUBRAHANYAM Y S.G. DRAKE, 1978.
Studies on the plant community of a North Florida salt marsh.
Part. II. Nutritive value and decomposition.
Bull. Mar. Scie., 73(4): 707-715
- LENZ, J., 1977.
On detritus as source for pelagic filter - feeders.
Mar. Biol., 41: 39-48

LISTON, S., 1968.

Distribution, taxonomy and function of heterotrophic bacteria on the sea floor.

Mar. Biol. Ins. Kyoto , 12: 97-104

MACUBBIN A. E. Y E. HODSON, 1980.

Mineralization of detrital lignocelluloses by salt marsh sediment microflora.

Appl. Environ. Microbiol., 40(4): 735-740

MANCILLA-PERAZA, Y M. VARGAS - FLORES, 1980.

Los primeros estudios sobre la circulación del flujo neto a través de la Laguna de Términos, Campeche

An. Centro Cienc. del Mar y Limnol.

Univ. Nal. Auton. México, 7(2): 130-140

MANN, H., 1972.

Detritus and its ecological role in aquatic ecosystems.

Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 29 Suppl: 358-383

MONTAGNA A. Y E. TUBER. 1971.

Decomposition of Spartina alterniflora in different seasons and habitats of a Northern Massachusetts salt marsh, and comparison with other atlantic regions.

Estuaries, 3(1): 61-64

ODUM E. Y E.H. HEALD, 1975.

The detritus based food web of an estuarine mangrove community. In: L.E. Roniss (Ed). Estuarine Research

(Vol 1) Chemistry, Biology and the estuarine system.

ODUM E Y J. HEALD, 1972.

Thropic analyses of an estuarine mangrove community.

Bull. Mar. Scie., 22(3): 671-738

ODUM E Y C. ZIEMAN Y J. HEALD, 1972.

The importance of vascular plant detritus to estuaries.

Proceedings of the Second Coastal Marsh and Estuary Management Symposium.

Batonrouge, La. L.S.U. Press.

OPPENHEIMER, C.H., 1968.

Bacterial activity in sediments of shallow marine bays.

Geochimic. Cosmochimi. Acta, 19: 244-260

PENHALE A., 1977.

Macrophyte-epiphyte biomass and productivity in an eelgrass (Zostera marina) community.

J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 26: 211-224

PHLEGER F.G. Y A. AYALA-CASTANARES, 1971.

Processes and history of Terminos Lagoon, Mexico.

Am. Assoc. Petro. Geol. Bull., 55(12): 2130-2140

QASIM S.Z. Y V.N. SANKARANKRAYAN, 1972.

Organic detritus of a tropical estuary.

Mar. Biol., 15: 193-199

RAINE R.C. Y W. PACTHING, 1977.

Aspects of carbon and nitrogen cycling in shallow marine environment.

Appl. Microbiol., 27(3): 159-165

RILEY A., 1959.

Organic aggregates in seawater and the dynamics of their formation and utilization.

Oceanog. Collection, 17: 371-380

RODINA, A.G., 1972.

Methods in aquatic Microbiology

University Park Press, N.Y.

SEKI, H., 1972.

Detritus and its role in aquatic ecosystems.

Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 29: 245-259

SOROKIN I. YU., 1972.

Bacterial populations as components of oceanic ecosystem.

Jour. Life Ocean. Coast. Waters, 11(2): 101-105

THEYR W, W. ENGEL Y W. LACROIX, 1977.

Seasonal distribution and changes in the nutritive quality of living, dead and detrital fractions of Zostera marina.

J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 30: 109-127

VARGAS F.M., 1971.

Las corrientes y el transporte neto de agua en la laguna de Términos, Camp.

Tesis profesional Fac. Ingeniería.

Univ. Nal. Auton. México.

VAZQUEZ-BOTELLO, 1978.

Variaciones de los parámetros hidrológicos en las épocas de

sequia y lluvias (mayo y noviembre, 1974) en la Laguna de Términos, Campeche, México.

An. Centro Cienc. del Mar y Limnol.

Univ. Auton. México, 5(1): 130-150

VOLKMAN M. Y C.H. OPPENHEIMER, 1962.

The microbial decomposition of organic carbon in surface sediments of marine bays of the central Texas Gulf coast.

Inst. Mar. Sci., 8: 80-96

VONBROCKEL, P. KOELLER, T. PARSONS Y M. TAKAHASHI, 1977.

The distribution of organic carbon in a marine planktonic food web following nutrient enrichment.

J. Exp. Biol. Ecol., 26:235-247

YANEZ -ARANCIBIA, A., 1977.

Estudio sobre la Laguna de Términos, Campeche, México.

An. Centro Cienc. del Mar y Limnol.

Univ. Auton. México, 4(1): 107-114

ZOBELL E. Y B. FELTHAM, 1942.

The bacterial flora of marine mud flat as an ecological factor.

Ecology, 23: 69-78