

298

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PRODUCCION DE VITAMINA B 12 POR BACTERIAS
DEGRADADORAS DE PETROLEO CRUDO.

TESIS

Que para obtener el
título de B I O L O G O
presenta:
Abel V. Aldana Godínez.

México, D.F.

FALLA DE ORIGEN

1989.



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.

I N D I C E

	Pág.
Resumen.....	1
1 Introducción.....	3
1.1 Objetivos.....	7
2 Material y Método.....	8
2.1 Cepas de colección.	
2.1.1 Origen.....	8
2.1.2 Características.....	8
2.1.3 Selección de Cepas a trabajar.....	10
2.1.4 Confirmación de pureza de las cepas.....	10
2.1.5 Mantenimiento de las cepas.....	11
2.2 Desarrollo del Método para evaluar la presencia de la vitamina B 12 en muestras biológicas.	
2.2.1 Generalidades.....	12
2.2.2 Descripción del Método.....	12
2.2.3 Cepa de Bioensayo.....	13
2.2.4 Medio de Bioensayo.....	14
2.2.5 Inóculo.....	14
2.2.6 Curva patrón.....	15
2.3 Método para evaluar la potencialidad de poder producir vitamina B 12 por bacterias degradado- ras de petróleo.	
2.3.1 Generalidades.....	18
2.3.2 Cepa control.....	19
2.3.3 Modificación del Método.....	19
2.4 Prueba de estabilidad en la degradación de petróleo.	
2.4.1 Generalidades.....	20
2.4.2 Ensayos en diferentes recipientes.....	21
2.4.2.1 Frascos "Pildoreros".....	23
2.4.2.2 Frascos "Tinteros".....	23

2.4.2.3	En Matraz.	
	Inoculación.....	23
	Incubación.....	24
	Elaboración de Curva de crecimiento...	24
2.5	Ensayo de crecimiento en fermentador.	
2.5.1	Medio de Cultivo.....	25
2.5.2	Inoculación.....	25
2.5.3	Condiciones de cultivo.....	26
2.5.4	Obtención de muestras para determinaciones biológicas.....	27
2.5.5	Estimación de Curva de crecimiento.....	27
2.5.6	Valoración de vitamina B 12 extra e intracelular.....	27
3	Resultados y Discusión.	
3.1	Análisis Global.....	29
3.2	Porcentaje de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo y productoras de Vit.B 12....	30
3.2.1	Observaciones.....	36
3.3	Comparación de la estabilidad degradativa de petróleo crudo en diferentes recipientes.....	39
3.3.1	Selección del cultivo bacteriano mas apropiado para prueba en fermentador.....	42
3.4	Respuesta de crecimiento del cultivo bacteriano en el fermentador.....	44
3.5	Producción de Vitamina B 12 en el Fermentador..	48
3.6	Importancia de la existencia de bacterias degradadoras de Petróleo.....	54
	Conclusiones.....	60
	Apéndice 1	62
	Apéndice 2	71
	Apéndice 3	76
	Bibliografía.....	77

RESUMEN

Se evaluó la potencialidad de producir vitamina B 12 a 68 bacterias marinas degradadoras de petróleo, 37 se obtuvieron del tracto digestivo de 3 diferentes especies de camarones Penaeus aztecus, Penaeus duorarum y Penaeus setiferus, y 31 cepas bacterianas fueron obtenidas de muestras de agua y de sedimento del área de las plataformas marinas de explotación petrolera ubicadas en el Golfo de México.

Mediante el método de difusión en placa, se evaluó la concentración y producción de vitamina B 12 utilizando a una cepa mutante de Escherichia coli ATCC 14169 que es auxótrofa a la vitamina B 12.

Los resultados que se obtuvieron indicaron que el 62 % del total de las cepas examinadas provenientes de los intestinos de camarones tuvieron la capacidad potencial de producir vitamina B 12, mientras que de las bacterias obtenidas de las muestras de agua y sedimento de las zona de plataformas tuvieron un 51 % la capacidad de producir la vitamina. Estos porcentajes indican la importancia que tienen estos microorganismos en el medio ambiente marino, al aportar una vitamina indispensable para el adecuado crecimiento y desarrollo de muchos organismos, así como para empezar a considerar a los

microorganismos marinos como una posible alternativa en la biotecnología, para la producción de algún metabolito en el cual se utilice el petróleo crudo como única fuente de carbono y energía.

También se efectuaron ensayos para determinar la capacidad de utilización de hidrocarburos en recipientes de diferentes capacidades y conteniendo diferentes volúmenes de medio de cultivo. Para ello se realizaron algunas pruebas de crecimiento y degradación de petróleo en frascos "pildoreos", "tinteros" y en matraces de Erlenmeyer. En base a los resultados obtenidos se eligió a un cultivo mixto para hacerlo crecer bajo condiciones controladas en un pequeño fermentador de 1250 ml. de capacidad, el cual tenía petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, bajo estas condiciones se determinó el crecimiento de los microorganismos y la producción de vitamina B 12.

1 INTRODUCCION.

Las actividades relacionadas a la exploración, explotación y transporte de petróleo en el Golfo de México, junto con los derrames accidentales del mismo, han incrementado la concentración de hidrocarburos en el agua, el sedimento y en los organismos marinos, lo cual puede afectar el crecimiento y el comportamiento de las comunidades biológicas presentes en el área (National Research Council, 1985).

Estudios realizados en el Golfo de México indican, sin embargo, que existe una rápida recuperación del ecosistema, ya que no se han observado efectos negativos serios sobre la biomasa o composición de especies, además se ha determinado que existe una intensa degradación de los hidrocarburos presentes (Botello, 1979; Soto, 1981; Líceá et al., 1982).

Durante el proceso de transformación y mineralización del petróleo en el mar, participan una serie de factores físicos, químicos y biológicos como son: la evaporación, la dilución, la sedimentación, la fotoxidación y la degradación de hidrocarburos por microorganismos (Atlas, 1977 ; 1981a).

Se ha demostrado también que en la biodegradación de hidrocarburos las poblaciones bacterianas, son de gran importancia debido a su abundancia y amplia distribución en el medio marino (Higgins, 1978 ; Gunkel, 1980, Atlas, 1981a).

Porras-Aguirre (1984) e Izquierdo-Vicuña (1985), han realizado estudios de la presencia y distribución de las bacterias degradadoras de petróleo en la Sonda de Campeche y encontrarón que éstas se localizan tanto en columna de agua como en el sedimento, así como en el contenido intestinal de los camarones Penaeus aztecus, Penaeus duorarum y Penaeus setiferus que habitan en dicha área.

De igual manera se ha observado, que el número de bacterias degradadoras de petróleo, se incrementa a medida que aumenta la concentración de hidrocarburos en el ambiente marino, fenómeno que se ha utilizado para detectar el grado de afectación de una zona por los hidrocarburos, al detectar el aumento de la población de bacterias degradadoras de petróleo en relación al resto de las bacterias heterótrofas (Lizarraga-Partida, 1983).

Algunos experimentos de laboratorio demostraron que los camarones al ser sometidos a una dieta de alimentos mezclados con petróleo crudo, presentaban la capacidad de degradar ciertos hidrocarburos (Botello, 1975). En estudios posteriores se observó la presencia de bacterias degradadoras de petróleo en el tracto intestinal de los camarones del área de la Sonda de Campeche, lo que podría explicar la capacidad observada en los camarones para degradar ciertos hidrocarburos.

Estas bacterias obtenidas de camarones tienen además, una capacidad metabólica muy elevada que les permite aprovechar una gran variedad de compuestos químicos. Ver Apéndice 1 .(Porras-Aguirre, 1984).

La amplia distribución que presentan las bacterias degradadoras de petróleo, junto con su capacidad de utilizar a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, han motivado a realizar diversas investigaciones que tienen como finalidad la utilización de dichas bacterias para la degradación del petróleo crudo liberado en derrames accidentales y con ello tratar de limpiar las zonas marinas que se encuentran contaminadas. (Ballerini, et al. 1986; Sirvins y Tramier, 1985).

Otros estudios han sido dirigidos hacia la utilización de dichas bacterias, para que aprovechen a los hidrocarburos como su única fuente de carbono y energía, para la producción de metabolitos importantes como son aminoácidos, antibióticos, vitaminas y otras sustancias (Humprey, 1967; Abbott, 1971; Fukui, 1980).

Aunque existe una amplia variedad de metabolitos que potencialmente podrían ser producidos por estas bacterias, existen algunos, como es el caso de la vitamina B 12 , que resulta ser interesante de estudiar por su importancia ecológica y por su valor comercial. (Bruno, 1978; Carlucci, 1970; Catell, 1973; Friedmann, 1970; Florent, 1979). Ver Apéndice 3.

Dado que la idea de producir vitamina B 12 por bacterias degradadoras de hidrocarburos, utilizando el petróleo crudo recuperado de los derrames accidentales como fuente de carbono y energía, resulta un proyecto muy ambicioso para ser realizado en un solo trabajo personal; la presente investigación fue limitada a la realización de un estudio preliminar que nos permita determinar la factibilidad de este proceso.

1.1 Objetivos.

Ante las consideraciones antes expuestas, los objetivos del presente trabajo son:

- Implementar un método para determinar la producción de vitamina B 12 por bacterias degradadoras de petróleo, tanto en cultivos puros como mixtos.
- Determinar el porcentaje de bacterias degradadoras de petróleo que tengan la potencialidad de producir vitamina B 12.
- Realizar algunas observaciones en cuanto a la estabilidad en la capacidad degradadora de petróleo de diversos cultivos bacterianos, al desarrollarse en diferentes volúmenes de medio de cultivo.
- Estimar la importancia ecológica de las bacterias degradadoras de petróleo, en base a su distribución, capacidad metabólica y su posible utilización biotecnológica.

2 MATERIAL Y METODO.

2.1 Cepas de colección.

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo, pertenecen a la colección del laboratorio de Microbiología Marina del ICMyL* (UNAM).

2.1.1 Origen.

Dichas cepas fueron colectadas, seleccionadas y revisadas en estudios previos (Porrás-Aguirre, 1984; Izquierdo Vicuña, 1985). Las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de agua y sedimento de la Sonda de Campeche en el Golfo de México del área cercana a las plataformas denominadas Akal J y Abkatum Alfa, así como del contenido intestinal de camarones de importancia comercial Penaeus aztecus, Penaeus duorarum y Penaeus setiferus, capturados en la Sonda de Campeche. (Fig. 1).

2.1.2 Características.

Cada una de las cepas bacterianas tiene un número de identificación de acuerdo a su procedencia (Tabla 1).

Las características morfológicas, fisiológicas y nutricionales de cada una de las cepas manejadas en este trabajo, se encuentran en el Apéndice 1.

* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

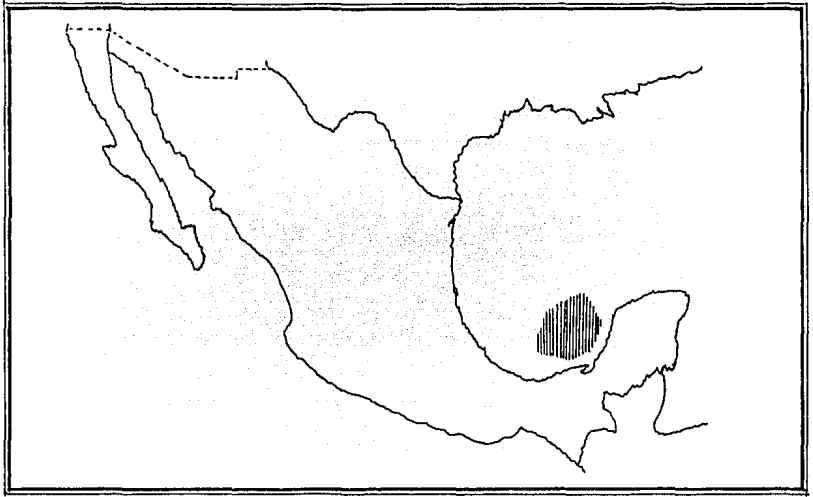


Fig.1 Localización de la área denominada Sonda de Campeche.

2.1.3 Selección de las cepas a trabajar.

Del total de cepas bacterianas presentes en la colección del Lab. de Microbiología, se seleccionaron a 96 cepas bacterianas, las cuales teóricamente eran degradadoras de petróleo, de estas posteriormente se escogieron a aquellas cepas que a pesar de haber estado almacenadas por un largo período de tiempo, conservaban la característica de utilizar el petróleo crudo obtenido del Ixtoc 1, como única fuente de carbono y energía. También se considero en la selección de bacterias, el tener cepas representantes de diferentes zonas y ambientes, para con ello tener una mejor visión de la distribución de la característica de la producción de vitamina B 12.

La forma en que se verificó la capacidad de utilización del petróleo por las 96 cepas examinadas, se basó en la técnica descrita por Izquierdo-Vicuña (1985), y reproducida en el Apéndice 2.

2.1.4 Confirmación de la pureza de las cepas.

Una vez comprobada la capacidad degradadora de las cepas bacterianas se procedió a efectuar algunas pruebas para verificar la originalidad y pureza de las mismas.

Las pruebas que se consideraron fueron :

- Color de la colonia.
- Forma y el arreglo celular.
- Características de Esporulación.
- Prueba de Oxidasa.
- Reacción de catalasa.
- Coloración de Gram.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los establecidos originalmente (Ver Apéndice 1). Las cepas bacterianas que no correspondían a la descripción original se descartaron.

2.1.5 Mantenimiento de las cepas.

Las cepas puras se conservaron por duplicado mediante siembra en frascos pildoreros conteniendo medio sólido peptonado tipo Zobell (Oppenheimer-Zobell, 1952), después de sembrar a cada una de las cepas se incubaron a 28 °C durante 48 horas posteriormente cada uno de los cultivos se cubrieron con aceite mineral estéril y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 °C.

2.2 Desarrollo del Método para evaluar la Vitamina B 12 en muestras biológicas.

2.2.1 Generalidades.

La técnica empleada para determinar la producción de vitamina B 12 en la presente investigación fue basada en un ensayo microbiológico; el cual comprende la utilización de un microorganismo auxótrofo a la vitamina B 12, es decir empleando un microorganismo incapaz de sintetizar por el mismo la vitamina y que por lo tanto requiere de fuentes exógenas de suministro (Hoff-Jorgensen, 1954; Strohecker, 1966).

2.2.2 Descripción del Método.

El método empleado es conocido como "difusión en placa" y su principio se basa en preparar placas de agar en cajas de Petri con un medio base rico en aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas pero exento de vitamina B 12 . Antes de que solidifique el medio, las placas son inoculadas con el microorganismo auxótrofo (Nathan, 1963).

Una vez sólidas las placas, se ponen sobre ellas de 5 a 6 pequeños discos de papel filtro de 0.7 mm. de diámetro, con 0.1 ml. de la muestra por analizar. Las placas son incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas., despues de lo cual se procede a su examinación.

En caso de que las pruebas sean positivas se observara la aparición de una zona o halo de crecimiento de la cepa auxótrofa alrededor de los filtros donde existe cierta cantidad de vitamina B 12.

El diámetro de los halos de crecimiento es proporcional a la cantidad de vitamina B 12 presente en la muestra.

2.2.3 Cepa de Bioensayo

El presente estudio se utilizó a Escherichia coli ATCC 14169, que es una cepa mutante y que es auxótrófa a la la vitamina B 12. (Obtenida a traves de el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Maryland, E.U.).

2.2.4 Medio de Bioensayo.

El medio de cultivo para el ensayo de vitamina B 12, recomendado por la ATCC es el medio 62 (ver Apéndice 2), sin embargo por problemas técnicos fue necesario utilizar inicialmente el medio propuesto por Burkholder (1951), el cual posteriormente fue modificado para utilizar el medio 8.

2.2.5 Inóculo.

La preparación del inóculo de la cepa mutante de E. coli. auxótrofa a la vitamina B 12, se hizo en tubos conteniendo 10 ml. del medio B 12 Inoculum Broth, en el cual existe un excelente crecimiento de la cepa mutante después de incubarlo durante 24 horas a 28 °C.

Una vez obtenido un adecuado desarrollo, las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a 2500 rpm. durante 10 min. desechando el sobrenadante y resuspendiendo las células en solución salina isotónica, repitiendo el proceso de "lavado" en dos ocasiones. El procedimiento de inoculación consistió en adicionar 10 ml. de la suspensión celular en solución salina isotónica, dentro del medio de bioensayo antes que éste solidifique, agitando ligeramente el matraz con el medio de bioensayo para homogenizar la suspensión bacteriana. Por último se vacía el

medio de bioensayo en cajas petri y una vez secas podrán mantenerse en refrigeración hasta el momento de ser utilizados.

2.2.6 Curva Patrón.

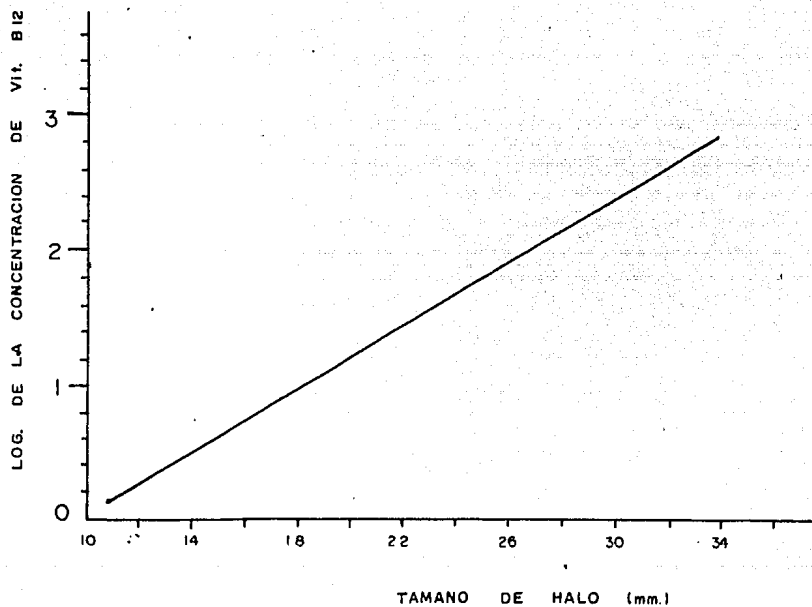
Para determinar la concentración de vitamina B₁₂ fue indispensable realizar una curva patrón, para lo cual se hicieron diluciones de cianocobalamina cristalina en agua destilada y desionizada, hasta la obtención de concentraciones de 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, y 1000 ng/ml. de la vitamina.

Se valoró la cantidad de vitamina obtenida en el bioensayo con la técnica descrita anteriormente, para lo cual se utilizaron $n=3$ de las diluciones por triplicado. Se midieron los halos de crecimiento con el promedio de las tres réplicas hechas se elaboró una curva patrón, Figura 2.

La determinación de la cantidad de vitamina en las muestras analizadas se efectuó por interpolación del promedio del diametro obtenido.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño de los halos de crecimiento, es proporcional a la cantidad de vitamina presente en las muestras.

Fig. 2. Curva patrón de la relación entre el diametro del halo de crecimiento de la cepa auxótrofa a la vitamina y la concentración de la vitamina B 12.



Análisis de la Curva Patrón de Vitamina B 12.

La realización de las curvas patrón de vitamina B 12 empleando la técnica de difusión en placa, utilizando una cepa de Escherichia coli ATCC 14169 auxótrofa a la vitamina B 12, requirió una gran cantidad de cuidados, determinantes para el grado de respuesta y confiabilidad de la misma (Nathan, 1963; Voigt, 1978; 1979) asimismo fue necesario realizar una curva patrón para cada valoración de la concentración probable en las diferentes muestras para analizar (Hoff-Jorgensen, 1954 ; Florent, 1979), ya que la respuesta de dicha cepa en forma de halos de crecimiento varía según las condiciones en las que la prueba se realice.

2.3 Método para evaluar la potencialidad de producir vitamina B 12 por bacterias degradadoras de petróleo.

2.3.1 Generalidades.

La técnica empleada para la selección de cepas productoras de vitamina B 12, se basó en el método descrito por Prescott (1959).

La base teórica de éste método, consiste en hacer crecer las cepas bacterianas a investigar, sobre cajas de petri conteniendo un medio de cultivo para su adecuado crecimiento (Zobell, apéndice 2). Las bacterias se siembran de forma puntual de manera que puedan probarse de 5 a 6 cepas por caja de petri. Se incuban durante 48 horas a 28 °C. Una vez obtenido el crecimiento, se ponen a secar a 50 °C en un horno durante un par de horas.

Por otro lado se prepara el medio de bioensayo (medio 8, Apéndice 2) el cual se inocula previamente con la cepa auxótrofa a la vitamina.

Antes que solidifique el medio de bioensayo, este se vacía sobre las cajas que previamente se pusieron a secar en el horno, de tal forma que se obtengan cajas con dos capas de

agar; se incuban a temperatura ambiente durante 48 horas, formandose evidentes halos de crecimiento alrededor de las colonias que pueden producir vitamina B 12.

2.3.2 Cepa control.

Para esta prueba se contó con una cepa control o de referencia que funcionó como control positivo, Bacillus megaterium ATCC 10778 que es una bacteria que produce vitamina B 12 y riboflavina.

2.3.3 Modificación del Método.

Dado que al llevar a cabo el método antes expuesto se presentaron una variedad de dificultades para su realización e interpretación de los resultados que se obtuvieron, fue necesario realizar modificaciones al método originalmente desarrollado.

Con las observaciones realizadas sobre el crecimiento de las cepas degradadoras de petróleo, se estableció que no era necesario utilizar el medio base para el crecimiento de las cepas a probar y que estas podían sembrarse directamente sobre el medio de bioensayo inoculado con la cepa auxótrofa a la vitamina B 12.

En las placas de agar se sembraron de 5 a 6 cepas degradadoras de petróleo de manera puntual sobre la superficie del medio de bioensayo, se incubaron a 28 °C durante 48 horas, obteniéndose el crecimiento en forma de colonias aisladas. Posteriormente las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas, después de lo cual se observó la formación de halos de crecimiento alrededor de las colonias bacterianas productoras de vitamina B 12.

2.4 Prueba de estabilidad en la degradación de petróleo.

2.4.1 Generalidades.

Durante el desarrollo de la presente investigación, se contempló la posibilidad de hacer algunas observaciones sobre la persistencia de la actividad degradadora de petróleo de algunas bacterias, al hacerlas crecer en recipientes con diferentes volúmenes de medio de cultivo pero con condiciones generales semejantes en cuanto a sus nutrimentos.

Las cepas utilizadas para esta prueba fueron elegidas al azar; de forma semejante se intento hacer cultivos mixtos, para determinar si se favorecía o no la degradación del

petróleo crudo, así como la capacidad de producir vitamina B 12.

De una muestra reciente de intestino de camarón proveniente de la Sonda de Campeche, se seleccionó un cultivo mixto de bacterias degradadoras el cual mostró una emulsificación del petróleo denominada "mousse de chocolat" al desarrollarse en agua de mar artificial con petróleo crudo del Ixtoc 1, empleado como única fuente de carbono y energía.

Este cultivo fue elegido porque presenta el tipo de degradación que se reporta en condiciones naturales en el mar abierto (Atlas, 1980; Sirvins, 1985) y fue denominado "cultivo mixto natural", al cual no se le hicieron todas las pruebas efectuadas para las demás cepas bacterianas.

2.4.2 Ensayos en diferentes recipientes.

El tipo de recipientes empleados en este ensayo fuerón:

- Frasco "pildorero" de vidrio con 10 ml. de medio de cultivo.
- Frasco "tintero" de vidrio con 90 a 100 ml. de medio de cultivo.
- Matraz Erlenmeyer de vidrio, con 250 a 500 ml. de medio de cultivo.

El procedimiento para la realización de este ensayo fue el siguiente. Por la cantidad de requerimientos, tipo de recipiente y facilidad de manejo, se empezó a trabajar con los recipientes de menor volumen de medio de cultivo (frascos pildoreros) se continuo con los de mayor volumen y finalmente se realizaron ensayos en el fermentador en el que se tuvo mejor control de las variables temperatura, pH, agitación y aereación.

2.4.2.1 Frascos "Pildoreros"

La técnica para determinar la utilización de petróleo en los frascos "pildoreros", así como la descripción de la composición del medio de cultivo, condiciones de cultivo y estimación de la degradación, se encuentra en el Apéndice 2.

2.4.2.2 Frascos "Tinteros".

En el caso de los frascos "tinteros", se utilizó el mismo medio de cultivo probado en los frascos "pildoreros". Sin embargo el volumen de trabajo fue 10 veces mayor ya que en este caso fue de 100 ml. y se inocularon con 5 ml. de una suspensión de bacterias previamente crecidas en cajas petri que contenían medio Zobell.

Las condiciones de cultivo consistió en introducir a los frascos en una ciclotérmica manteniendo la temperatura a 25°C y la agitación a 250 rpm.

2.4.2.3 En Matraz.

. Inoculación.

Los matraces se inocularon con bacterias degradadoras de petróleo, que previamente fueron cultivadas por 24 horas en cajas de petri con medio peptonado Zobell (Oppenheimer-Zobell, 1952), después se resuspendieron en 50 ml. de medio mineral diluido (Lyman y Fleming, 1940) e introducidas en el matraz que contenía el petróleo crudo proveniente del Ixtoc 1 en medio mineral diluido al 20 % (Ver Apéndice 2).

. Incubación.

Los matraces inoculados fueron cubiertos con papel aluminio e introducidos en una estufa ciclotérmica manteniéndola a 25 °C y con una agitación de 250 rpm.

. Elaboración de curvas de crecimiento.

Para la realización de una curva de crecimiento se procedió a cuantificar el número de bacterias degradadoras de petróleo.

Esta determinación se realizó por el método de conteo en placa, mediante la obtención inicial de muestras de 10 ml. de la cual se obtuvo una submuestra de un mililitro., con el cual se realizaron diluciones en serie 1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10000 utilizándose tubos con medio mineral diluido. De cada dilución se obtuvo una alícuota de 0.1 ml. la cual fue sembrada por duplicado en cajas petri conteniendo medio peptonado Zobell.

Las cajas sembradas se incubaron durante 48 horas a 26°C. Una vez obtenido el crecimiento se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) con lo que se determinó el número de bacterias por ml, presente en cada muestra.

2.5 Ensayo de crecimiento en fermentador.

Con el cultivo que mostró una mayor estabilidad de comportamiento en cuanto a degradación y producción de vitamina B 12 en las condiciones de crecimiento en frasco "pildorero", "tintero", y matraz, se procedió a realizar un ensayo de crecimiento en un fermentador pequeño.

2.5.1 Medio de cultivo.

El medio de cultivo preparado para el crecimiento bacteriano en el fermentador (ver Apéndice 2) fue especialmente elaborado para favorecer el desarrollo sobre el petróleo crudo y producir vitamina B 12. Este medio fue elaborado en base a los ensayos realizados en los otros recipientes y en estudios similares de fermentación con cepas degradadoras de petróleo crudo (Horowitz, 1975 ; Boyles, 1984).

2.5.2 Inoculación.

El cultivo bacteriano se desarrolló inicialmente en en cajas de petri de la misma manera y bajo circunstancias similares al inóculo que se preparó para matraz.

Una vez obtenido un crecimiento masivo sobre las cajas, se procedió a extraer de cuatro cajas de petri la mayor masa bacteriana posible utilizando un asa de siembra para resuspender la masa celular en un pequeño matraz con 50 ml. de medio mineral diluido. Por último con ayuda de una jeringa estéril se inoculó el fermentador con 20 ml. de la suspensión bacteriana.

2.5.3 Condiciones de cultivo.

El ensayo fue realizado en un fermentador pequeño con capacidad de dos litros marca Biolafit bajo las siguientes condiciones:

Aereación	Aprox. 5 lt/hr.
Agitación	250 rpm.
Temperatura	30 C
pH	7.5

El fermentador fue manejado con un volumen de trabajo de 1250 ml. de medio de cultivo, el recipiente fue cubierto con papel aluminio para evitar la inactivación de la vitamina B 12 causada por la luz.

El ensayo fue realizado en tres ocasiones para determinar el grado de estabilidad de crecimiento.

2.5.4 Obtención de muestras para determinaciones biológicas.

Para evaluar la cantidad de vitamina B 12 producida extracelular e intracelularmente, así como para realizar una curva de crecimiento se tomaron muestras de 10 ml. del cultivo cada 24 horas.

2.5.5 Estimación de curva de crecimiento.

Se determinó el desarrollo bacteriano en el fermentador por medio de curvas de crecimiento empleando el procedimiento anteriormente mencionado de siembra en placa con formación de unidades formadoras de colonias (UFC).

2.5.6 Valoración de vitamina B 12 extra e intracelular.

Para la determinación de la vitamina B 12 producida tanto en el interior celular como en el sobrenadante de cultivo, se efectuó una separación células-sobrenadante, centrifugando la muestra obtenida a 5000 rpm durante 15 minutos.

Las células se lavaron dos veces con medio mineral diluido y centrifugadas en las mismas condiciones.

Tanto las células como el sobrenadante se tratarán con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.08M (pH=5.6), conteniendo 0.01 % de KCN y se procesarán en baño maria con agua en ebullición durante 20 minutos. En todo el proceso los tubos se cubrirán con papel aluminio.

La valoración de la cantidad de vitamina B 12, se efectuó con el método de difusión en placa mencionado anteriormente.

3 RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1 Análisis Global.

Inicialmente en el presente estudio se había considerado trabajar con un total de 96 cepas bacterianas capaces de utilizar el petróleo crudo del Ixtoc 1, como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, después de establecer el criterio de seleccionar solo a las bacterias que aun mantenían la capacidad de utilizar los hidrocarburos, el número de cepas a trabajar disminuyó a 68; lo cual significó que durante el almacenamiento cerca del 30 % de las cepas perdió esta capacidad. No se conocen las razones por las que se produjo este fenómeno pero puede deberse a que el método de conservación en el medio de cultivo en el cual no existen hidrocarburos, provoca que a falta de estos no se induzca una adecuada actividad enzimática que permita aprovecharlos y se pierda la información genética indispensable para utilizar los hidrocarburos, como podrían ser la pérdida de plásmidos que se ha demostrado son importantes para favorecer la capacidad biodegradativa en algunos microorganismos (Higgins, 1978; Grady, 1985).

3.2 Porcentaje de Bacterias potencialmente degradadoras de petróleo y productoras de vitamina B 12.

En la Tabla 1, se puede observar al total de cepas trabajadas, lugar de origen y su capacidad de producir vitamina B 12 . Puede observarse que no se puede hacer una comparación adecuada entre las cepas bacterianas aisladas del contenido intestinal de diferentes especies de camarones, ya que el número de bacterias de cada uno es muy diferente, debido a la selección inicial de estudiar solo a las cepas que tenían la capacidad de utilizar el petróleo crudo.

Conforme a los datos presentados en la Tabla 2, podemos observar que tanto las cepas provenientes de las plataformas petroleras como las de camarones, presentarán mas de un 50 % la capacidad potencial de producir la vitamina B 12. Este porcentaje fue de entre 51 % para bacterias de las plataformas y 62 % para las bacterias obtenidas de camarones presentándose aproximadamente una diferencia del 10 % entre uno y otro, lo cual indica una ligera ventaja en cuanto a la capacidad de producir vitamina por parte de las cepas provenientes del intestino de camarón.

Sin embargo, puede decirse que la capacidad para utilizar los hidrocarburos se encuentra mas desarrollada en aquellas

TABLA 1. Potencialidad de degradación de petróleo y producción de vitamina B 12 de las cepas estudiadas.

ORIGEN	CEPAS	D.P.	P.V.	ORIGEN	CEPAS	D.P.	P.V.
Plataforma Akal J (sedimento)	1114	+	-	Camarón <u>Penaeus aztecus</u>	2001	+	+
	1116	+	+		2003	+	-
	1118	+	+		2005	+	-
	1128	+	+		2008	+	+
Plataforma Akal J (agua)	1301	+	-		2011	+	+
	1302	+	-		2013	+	-
	1309	+	-		2016	+	+
	1317	+	-		2022	+	-
	1322	+	-		2023	+	+
	1324	+	-		2035	+	+
	1325	+	+		Camarón <u>Penaeus aztecus</u>	2042	+
	1329	+	+	2044		+	+
Plataforma Abkatum A (agua)	1838	+	+	2050		+	+
	1839	+	+	2051		+	+
	1848	+	-	2053	+	-	
	1849	+	-	2054	+	-	
	1851	+	+	Camarón <u>Penaeus aztecus</u>	2067	+	-
	1855	+	+		2074	+	+
	1856	+	+		2089	+	+
1866	+	-	2093		+	+	
Plataforma Abkatum A (sedimento)	1939	+	-		2094	+	+
	1947	+	+		2097	+	-
	1950	+	+	2100	+	-	
	1952	+	+	2107	+	-	
	1954	+	+	2111	+	-	
	1959	+	-	2122	+	-	
	1961	+	-	2123	+	+	
	1964	+	+	Camarón <u>Penaeus aztecus</u>	3016	+	+
	1965	+	+		3020	+	-
	1968	+	+		3022	+	+
	1973	+	-		3028	+	+
					3029	+	+
				3030	+	+	
			Camarón <u>Penaeus setiferus</u>	3056	+	-	
				3060	+	+	
			Camarón <u>Penaeus duorarum</u>	3070	+	+	
		3084		+	+		

NOTA: D.P. = Degradación de Petróleo crudo.
P.V. = Producción de Vitamina B 12.
+ = Respuesta Positiva.
- = Respuesta Negativa.

TABLA 2. Porcentaje de degradación de petróleo y producción de vitamina B 12, de acuerdo al origen de las cepas estudiadas.

Origen de las cepas	Nº de cepas con capacidad de degradar el petróleo.	Nº de cepas degradadoras de petróleo y con potencialidad de producir Vit.B 12.
<i>Penaeus aztecus</i>	3 3	2 0
<i>Penaeus setiferus</i>	2	1
<i>Penaeus duorarum</i>	2	2
Total de cepas de intestino de camarón.	3 7	2 3 (62.16%)
Plataformas (sedimento)	1 5	1 0
Plataformas (agua)	1 6	6
Total de cepas de Plataformas.	3 1	1 6 (51.61%)
Total de cepas investigadas.	6 8 (100 %)	3 9 (57.35%)

bacterias que se encuentran en el sedimento, que de las que se encuentran en la columna de agua, ya que se puede decir se debe a que tienen mas establecida la capacidad de utilizar los hidrocarburos, por estar en un contacto continuo con ellos (Tabla 2).

Del total de cepas estudiadas con capacidad de degradar a los hidrocarburos el 57.35 % presentó la característica de producir potencialmente la vitamina B 12, lo cual nos da una idea sobre la importancia que tienen en el medio ambiente marino; ya que ademas de contribuir a la transformación y mineralización de los hidrocarburos, pueden aportar metabolitos como la vitamin B 12 que tiene una gran importancia en los diferentes niveles tróficos de la cadena alimenticia del ambiente marino.

Algunas investigaciones han demostrado, que existe una gran variabilidad en las bacterias en cuanto a su capacidad de producción o requerimiento de la vitamina B 12. En general se ha encontrado, bajas proporciones de bacterias que requieren de ella y se ha observado una población mayor de bacterias productoras. Berland (1976), encontró que de 232 cepas de bacterias estudiadas el 3.5 % necesitaban vitamina B 12, mientras que un 26 % pueden producirla; por otro

lado Starr (1957), estableció que de 34 cepas marinas, el 70 % mostraba la capacidad de producir la vitamina B 12 utilizando la cepa mutante de Escherichia coli 113-3 como base para el bioensayo, mientras que las mismas cepas mostraban una actividad del 30 % cuando empleaba para su determinación, a Euglena gracilis Z. Otro caso fue el reportado por Ericson (1953), el cual informó que el 70 % de bacterias que se desarrollaban sobre macroalgas son capaces de producir la vitamina B 12.

De igual forma existen una diversidad de organismos que la requieren como es el caso de algunos miembros del fitoplancton (Carlucci, 1970), especialmente una diversidad de diatomeas en las que se piensa que sus crecimientos explosivos están determinados por la presencia de la vitamina B 12 (Fiala, 1982; 1984).

Por otro lado es importante establecer que la cantidad de vitamina presente en el ambiente marino son muy bajas, a nivel de nanogramos por litro, por ejemplo Bruno, en 1978 encontró concentraciones desde no detectables, hasta 10.6 ng/l, mientras que Catell, 1973 encontró que podían existir desde 0.8 ng/l en la superficie, incrementándose a 12.5 ng/l a los 5 metros y hasta 10 ng/l entre los 20 y 50 metros de

profundidad. La información anterior da una idea de los bajos niveles de producción en condiciones naturales y de la diversidad de factores que pueden influir en las concentraciones finales de vitamina B 12 en el ambiente marino.

Algunas de las cuales son presencia de organismos productores o de consumidores de la vitamina, presencia que a su vez podría estar determinado por la época del año (Cowey, 1956), por la presencia de inhibidores de la actividad de la vitamina B 12 (Carlucci, 1970), por la presencia de materia particulada y suspendida que favorece el crecimiento de microorganismos (Burkholder, 1956), por la cantidad y lugar en que se encuentren los microorganismos productores (Catell, 1973 ; Lovell, 1981), así como por una amplia diversidad de factores.

En relación con los resultados obtenidos en la presente investigación se puede decir que el porcentaje de bacterias con capacidad de producir la vitamina B 12 es relativamente alto, mientras que el número de bacterias que la requieren y que no son capaces de producirla es muy bajo.

Lo anterior concuerda con lo establecido por algunos investigadores con relación a que los microorganismos y en especial las bacterias, son los seres vivos que pueden sintetizar la vitamina B 12 (Perlman, 1959; Friedman, 1970; Florent, 1979 ; Skeggs, 1981). Algunos solo lo sintetizan para satisfacer solo sus necesidades y otros tendrán la capacidad de producir mayores cantidades que pueden ser liberadas cuando la célula productora muere o que tenga la posibilidad de liberarla a través de su membrana celular durante su crecimiento.

3.2.1 Observaciones.

Si revisamos la composición del medio de cultivo utilizado en el bioensayo, podremos observar que no existe ninguna fuente de suministro de vitamina B 12, lo cual hace que la cepa auxótrofa a la vitamina B 12 presente en el medio de bioensayo no se desarrolle, en comparación a las cepas estudiadas a las cuales se evalúa si producen vitamina B 12,

las cuales son sembradas sobre el medio de cultivo de prueba.

El simple hecho de crecer indica que no requieren de vitamina B 12 o que al menos producen lo que necesitan.

Sí además de crecer sobre las placas de ensayo, favorecen el crecimiento de la Escherichia coli la cual necesita de la vitamina para crecer, indicará que produce mas cantidad que las demas y que de alguna forma es liberada del interior de la célula, ya sea por muerte de la célula o que se libere por otro mecanismo.

Existieron 4 cepas que no se desarrollaron sobre el medio de bioensayo, las cuales tal vez requieren vitamina B12 o algun otro compuesto que no estuvo presente en el medio de cultivo.

Asimismo pudo observarse en un caso, que mientras una cepa daba respuesta positiva a la producción de vitamina B 12, con la formación de un halo de crecimiento correspondiente al desarrollo de la E. coli dos cepas cercanas a ella, las cepas 2111 y 2122, inhibían parcialmente el halo de crecimiento, esto probablemente se debio a la liberación de alguna sustancia de tipo antibiótico, que tambien se ha probado pueden ser producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos (Kvasnikov, et. al. 1975), sin embargo esto último

TABLA 3. Observación de degradación de petróleo y producción de vitamina B 12 en diferentes volúmenes de medio de cultivo.

C E P A S	Degradación de petróleo en			Producción de vitamina B 12 en		
	10 ml.	100 ml.	500 ml.	Prueba de Placa	Células	Sobrenadante
1324	+	-	-	-	-	-
1325	+	-	-	+	-	-
1317	+	-	-	-	-	-
1118	+	+	-	+	+	-
2011	+	-	-	+	-	-
2067	+	+	-	-	-	-
2022	+	-	-	-	-	-
1302	+	-	-	-	-	-
1322	+	+	+	+	+	-
2100	+	-	-	-	-	-
2111	+	+	-	-	-	-
3064	-	+	-	+	-	-
2020	-	-	-	+	-	-
* 2050	+	-	-	+	-	-
3022	+	-	-	+	-	-
* 2022	+	-	-	-	-	-
2050	+	-	-	+	-	-
Cultivo mixto natural	+	+	+	+	+	-

NOTA: + = Respuesta positiva.

- = Respuesta negativa.

* = Cultivos mixtos.

Las pruebas de degradación de petróleo en frasco de 10 ml. y de producción de vit.B 12 en placa son pruebas realizadas a cada cepa.

no se comprobó en el presente estudio por lo que marca una pauta para estudios posteriores.

3.3 Comparación de la estabilidad degradativa de petróleo crudo en diferentes recipientes.

En relación a la actividad degradadora de las cepas inicialmente seleccionadas, como se muestra en la Tabla 3, el comportamiento de degradación de petróleo varía con respecto a los diferentes volúmenes de los recipientes utilizados para efectuar la prueba de degradación.

Se observó que aunque inicialmente mostraban una adecuada actividad degradadora en pequeños frascos con 10 ml. de medio, al ir aumentando el tamaño de recipientes y el volumen de trabajo a 100 ml, el comportamiento de crecimiento y degradación en muchos casos se perdía o no se inducía adecuadamente. Quizá aunque proporcionalmente se dio un inóculo similar en los diferentes recipientes se necesito un inóculo mayor al proporcionado o un mayor tiempo y condiciones específicas para la inducción de la actividad degradativa. Aquí es necesario mencionar que el comportamiento de la transformación del petróleo por biodegradación cuando se presentaba en frascos de 100 ml, vario algunas

veces con respecto al observado en frascos pildoreros, mientras que en estos últimos de 10 ml. se observó el crecimiento de la cepa bacteriana en forma de turbidez y con la transformación del petróleo en partículas de menor tamaño; en frascos tinteros mostraba diferentes comportamientos, el cual iba desde la formación de algunos tipos de "natas" o películas de crecimiento, así como la formación de pequeñas "pelotitas" de petróleo como resultado de un tipo de agregación del petróleo y por último la emulsificación del mismo con el establecimiento de una suspensión petróleo-agua, que se denomina "mousse de chocolat". Este último comportamiento es el comunmente observado en mar cuando existen derrames accidentales y comienza a darse el proceso de biodegradación (Atlas, 1980 ; Sirvins, 1985).

Aunque se consideró como prueba negativa de degradación aquella en que no se observaba crecimiento bacteriano con turbidez del medio y desaparición o transformación del petróleo, es posible que se estuviera dando cierta transformación del petróleo; aunque esta no haya sido evidente como cuando se utilizó el "cultivo mixto natural".

Como se observa en la tabla 3, al ensayarse algunas combinaciones bacterianas (cultivos mixtos), a partir de

cepas puras, para determinar si así se favorecía la degradación del petróleo, se observó que las combinaciones realizadas no fueron adecuadas, ya que no se observó ni degradación, ni crecimiento. El hecho de que no hayan podido desarrollarse sobre el petróleo crudo, indica que existió alguna condición desfavorable que no permitió su crecimiento o que existió un antagonismo entre las cepas utilizadas.

Crecimiento en Matraz.

Como puede verse en la Tabla 3, existe un cultivo (integrado por 6 cepas bacterianas) al que se le denominó "cultivo mixto natural" el cual mostró un comportamiento de rápido desarrollo y estabilidad en su forma de crecimiento en el medio de cultivo con petróleo crudo, cuando se desarrolló en frasco "pildorero" y "tintero", razón por la cual se eligió para hacerlo crecer en matraz. Este cultivo dentro del matraz mostró un rápido crecimiento como puede verse en la Figura 3, en donde puede notarse que durante el tiempo observado todavía continuaba en la etapa de crecimiento razón por la cual en ensayos posteriores se efectuó durante más tiempo, en esta prueba no se observó una etapa de adaptación.

3.3.1 Selección del cultivo bacteriano mas apropiado para prueba en Fermentador.

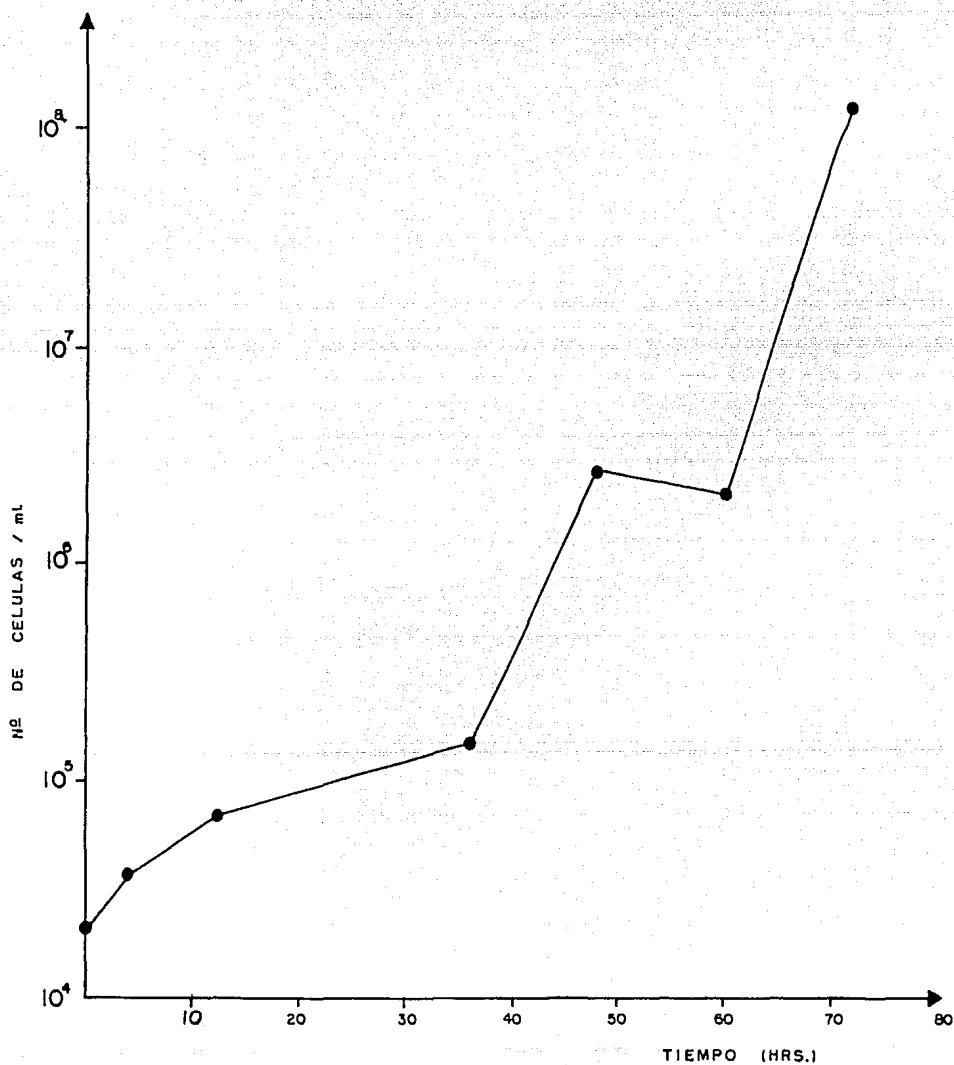
En esta misma tabla 3, se puede observar que el "cultivo mixto natural" que mostró una estabilidad de degradación en el transcurso de los ensayos efectuados en los diferentes recipientes de cultivo.

Dicho cultivo, siguió utilizandose ya que ademas de efectuar una impactante tasa de degradación "aparente", mostró también una producción de vitamina B 12, lo cual hizo a este cultivo especialmente interesante.

Aquí se utiliza el término "aparente", porque la determinación de la degradación solo fue cualitativa, ya que no fue posible realizar en ninguno de los ensayos una estimación del tipo y cantidad de los hidrocarburos utilizados. En donde el análisis por cromatografía de gases hubiera sido una buena opción para ello.

El "cultivo mixto natural", en base a sus características en la forma de degradación y su capacidad de producir la vitamina B 12, fue seleccionado para observar el comportamiento del crecimiento de las bacteria degradadoras dentro del fermentador y determinar la producción de la vitamina B 12.

Fig. 3. Curva de crecimiento del "Cultivo Mixto Natural" desarrollado en matraz con 500 ml. de medio de cultivo.



3.4 Respuesta de crecimiento del cultivo bacteriano en el Fermentador.

El ensayo de crecimiento en el fermentador se repitió tres ocasiones, el número de bacterias presentes, las variaciones en el pH y la temperatura se encuentran en la tabla 4.

El comportamiento del crecimiento de las tres ocasiones esta representada en la Figura 4, donde se observan las curvas de crecimiento que corresponden a la 1^a, 2^a y 3^a fermentaciones respectivamente. Al comparar las mencionadas curvas de crecimiento podemos notar que presentaron una gran similitud en su comportamiento, lo cual nos indicó el grado de la estabilidad de desarrollo de los microorganismos en el fermentador.

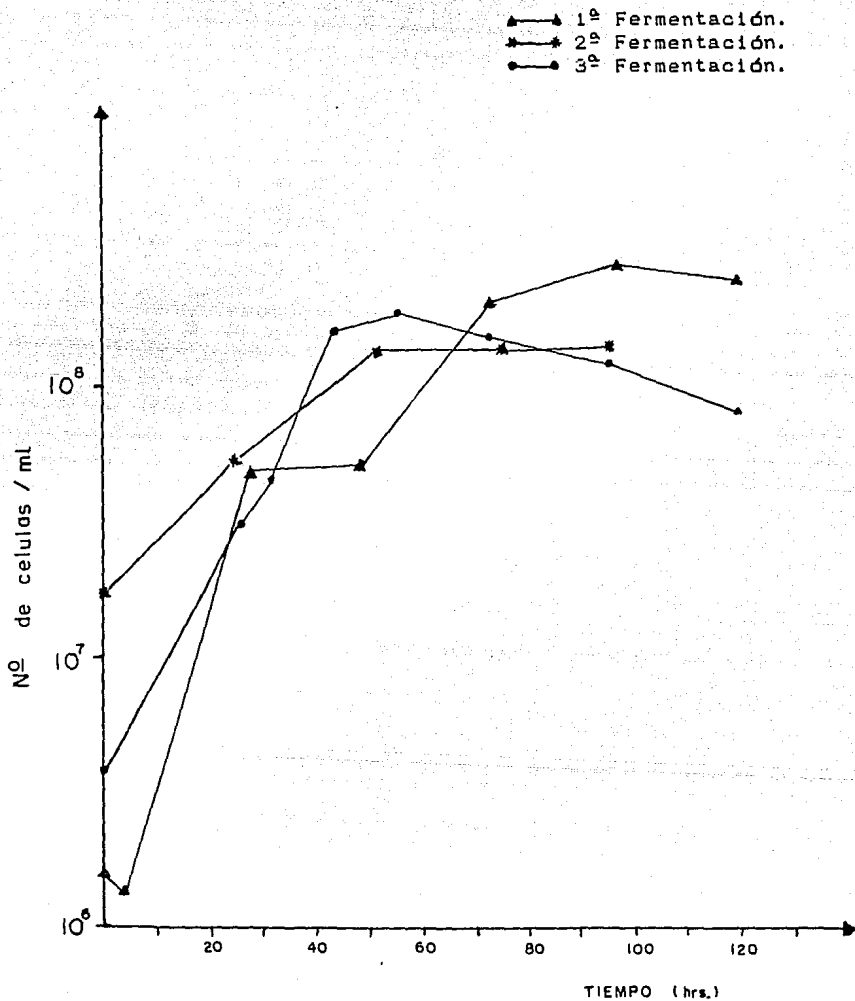
En las mismas curvas de crecimiento es posible observar que no existen fases prolongadas de adaptación, de tal forma que crecen rápidamente, aquí el inóculo introducido tuvo un importante papel en el crecimiento dentro del fermentador.

Las observaciones en cuanto a la forma de degradación, nos indicaron que el comportamiento del cultivo bacteriano

TABLA 4. Concentración de bacterias, condiciones de pH y temperatura en tres replicas del "cultivo mixto natural" durante el crecimiento en un fermentador.

FERMENTACION I				
Muestra	Tiempo (Hrs.)	Nº de Células (UFC)	p H	Temp.
1	0	2.0 X 10 ⁶	7.6	3 0 °C
2	3	1.2 X 10 ⁶	7.6	3 0 °C
3	2 3	-----	7.5	3 1 °C
4	2 7	6.78 X 10 ⁷	7.5	3 1 °C
5	4 8	7.19 X 10 ⁷	7.4	3 2 °C
6	7 2	3.06 X 10 ⁸	7.3	3 3 °C
7	9 6	4.57 X 10 ⁸	7.0	3 2 °C
8	1 1 9	4.03 X 10 ⁸	7.0	3 1 °C
FERMENTACION II				
Muestra	Tiempo (Hrs.)	Nº de Células (UFC)	p H	Temp.
1	0	2.38 X 10 ⁷	7.5	3 2 °C
2	2 4	7.25 X 10 ⁷	7.3	3 1 °C
3	5 1	1.36 X 10 ⁸	6.8	3 1 °C
4	7 4	1.74 X 10 ⁸	6.5	3 0 °C
5	9 6	1.55 X 10 ⁸	6.5	3 0 °C
FERMENTACION III				
Muestra	Tiempo (Hrs.)	Nº de Células (UFC)	p H	Temp.
1	0	5.79 X 10 ⁶	7.5	2 9 °C
2	2 5	5.0 X 10 ⁷	7.5	3 0 °C
3	3 1	6.8 X 10 ⁷	7.4	3 0 °C
4	4 4	2.18 X 10 ⁸	7.0	3 0 °C
5	5 5	2.8 X 10 ⁸	6.1	3 2 °C
6	7 2	1.7 X 10 ⁸	6.1	3 1 °C
7	9 5	1.18 X 10 ⁸	6.4	3 1 °C
8	1 2 0	9.2 X 10 ⁷	6.4	3 0 °C

Fig. 4. Distribución del crecimiento del "Cultivo Mixto Natural", en tres replicadas realizadas en el Fermentador.



"mixto natural" fue muy semejante durante todos los ensayos efectuados en diferentes recipientes, observándose en todos los casos una emulsificación con aspecto chocolatoso despues de haber transcurrido algunas horas de crecimiento.

En la misma Tabla 4, se observa que el pH sufrió en la 2^a y 3^a fermentaciones una baja de cerca de una unidad, es decir de pH= 7.5 a pH= 6.4, lo cual supone la acidificación del medio como resultado de la actividad microbiana sobre el petróleo. Esto a su vez si ocurre en el ambiente natural marino podría provocar daño a microorganismos que sean sensibles a cambios de pH.

Por su parte la temperatura dentro del fermentador tendió a elevarse (por la actividad metabólica de los microorganismos) sin embargo mediante los dispositivos del fermentador se mantuvo controlada entre 30 a 32 °C. Sin embargo en condiciones naturales y tomando en cuenta la extensión del área donde se efectúa la degradación del petróleo y dependiendo de las condiciones ambientales estas elevaciones de la temperatura no serían considerables.

La consistencia del medio de cultivo al final de la fermentación se mantuvo con una apariencia chocolatosa, que fue el resultado de la emulsificación del petróleo

(Bartha y Atlas, 1977). Esta condición mostro ser muy semejante a obtenida en estudios similares de fermentación en el que se empleo petróleo crudo y ademas se utilizarón cultivos mixtos. (Boyles, 1984; Berwick, 1984).

3.5 Producción de Vitamina B 12 en Fermentador.

En cuanto a la producción de vitamina B 12 realizada en el fermentador, se observó una mayor concentración en el interior celular que en el medio de cultivo, Tabla 5 , lo cual concuerda con algunos estudios realizados por Fujii, 1966 ; Fukui, 1967 ; Kamikubo, 1978 .

Las cantidades de vitamina producida en el fermentador por el "cultivo mixto natural" oscilarón de 3 a 6 ng/ml, en el sobrenadante del medio de cultivo, mientras que en el interior celular la cantidad de vitamina fluctúa de aproximadamente 5 a 10 ng/ml. Si sumamos la producción del interior y exterior celular la cantidad total de vitamina producida fue de 16 ng/ml (ver Tabla 5), esta cantidad es superior a la concentración encontrada de la vitamina B 12 disuelta en el mar, pero a la vez es muy baja si se compara con la cantidad de vitamina producida por microorganismos mejorados y empleados en la producción industrial de la vitamina B 12, que por ejemplo

TABLA 5. Crecimiento y producción de vitamina por el "Cultivo mixto natural" al desarrollarlo en el Fermentador.

Muestra	Tiempo (Hrs.)	Nº de Células	Concentración de Vitamina B 12 en ng/ml en		
			sobrenadante	células	Total
1 ^a	0	5.79×10^6	4.16	5.11	9.27
2 ^a	25	5.0×10^7	*	6.95	6.95
3 ^a	31	6.8×10^7	*	6.95	6.95
4 ^a	44	2.18×10^8	*	5.66	5.66
5 ^a	55	2.8×10^8	3.39	6.27	9.66
6 ^a	72	1.7×10^8	5.66	9.46	15.12
7 ^a	95	1.18×10^8	5.43	10.48	15.91
8 ^a	120	9.2×10^7	5.11	10.06	15.17

Nota: En donde esta el símbolo * no se detecto vit. B 12.

en Merck and Co., Inc. en 1971 producía hasta 60 mg/l (Florent, 1979).

Se observó cierta fluctuación en la producción de la vitamina B 12 durante el desarrollo de la fermentación, (ver Figura 5) que pudo deberse al aumento de número de alguna de las cepas que componen el cultivo mixto.

Investigaciones anteriores muestran algunos intentos realizados para producir vitamina B 12, empleando hidrocarburos puros o una mezcla de los mismos (Fukui, 1967; Abbott, 1971; Morikawa, 1971). Sin embargo al parecer no se había contemplado la posibilidad de utilizar al petróleo crudo como fuente de carbón y energía, para fermentaciones que pretendan producir vitamina B 12.

En algunos estudios trabajarán con microorganismos fotosintéticos de Rhodospseudomonas spheroides creciéndose sobre hidrocarburos y llegando a obtener una producción de hasta 23 μ g/g en de la vitamina B 12 (Morikawa, 1971). Otros estudios emplearán diferentes especies de Pseudomonas, sobre n-parafinas para producir la mencionada vitamina (Morikawa, 1969).

Asimismo se ha llegado a producir hasta 0.6 mg/l, por el desarrollo de una Corynebacterium en Alquenos (Fujii,

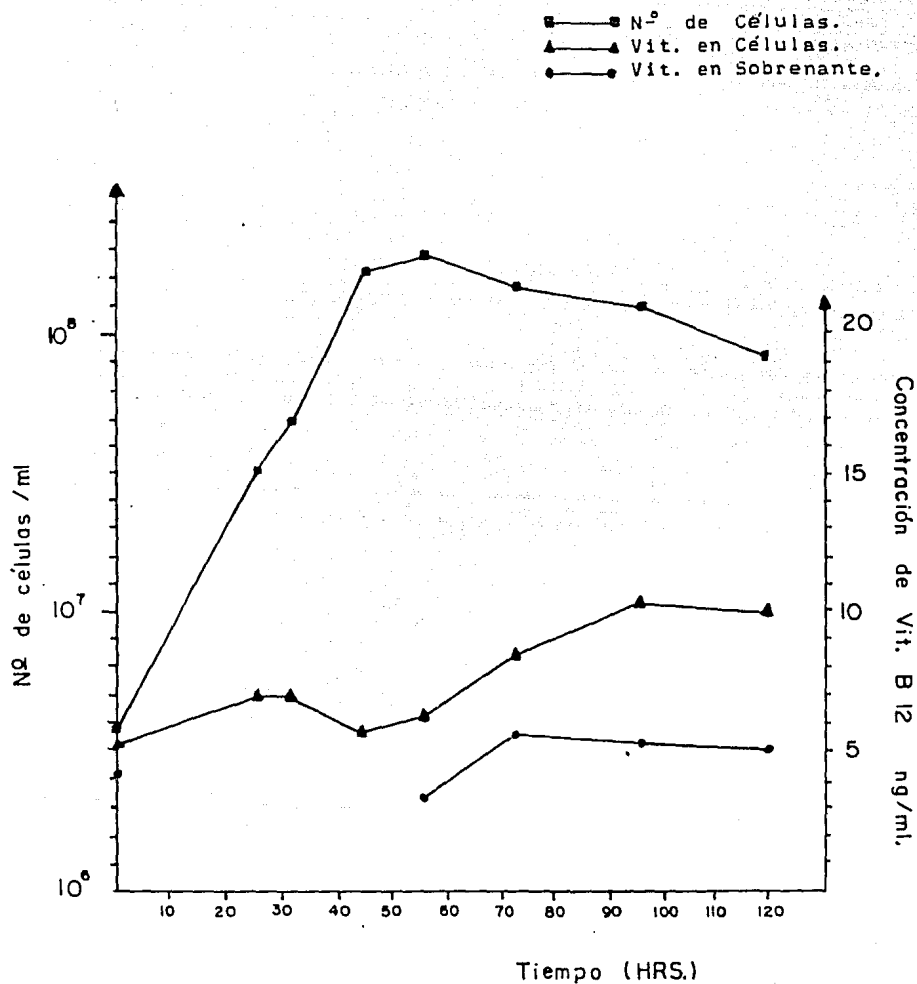
1967), otros estudios revelan producciones de Vitamina B 12 que van desde 2.5 a 212 $\mu\text{g/l}$ de medio de cultivo, fluctuaciones que dependen tanto del microorganismo como de la fuente de carbono utilizado, en dichos estudios se ensayaron desde hidrocarburos puros hasta mezclas de parafinas (Kamikubo, 1979).

En algunos de los estudios ya mencionados tambien se ha observado que los microorganismos que utilizan a los hidrocarburos, producen mayor cantidad de vitamina B 12 cuando se desarrollan en un medio con una mezcla de hidrocarburos, que con un medio con hidrocarburos puros, y en estos dos últimos medios producen mas que cuando se desarrollan en medio con carbohidratos (Fujii, 1966 ; Kamikubo, 1978).

Con base en lo anterior se puede observar que los rendimientos de vitamina B 12 del presente estudio, han sido mas bajos que los encontrados con microorganismos mejorados genéticamente y que ademas emplean otras fuentes de carbono.

Por otro lado se observó que en este estudio la vitamina B 12 producida se encontraba tanto en el interior celular como en el sobrenadante de cultivo, aunque en algunas de las muestras no se detectó vitamina en el sobrenadante de cultivo (ver Figura 5), la cual quizá fue utilizado

Fig. 5. Representación del crecimiento y producción de vitamina B 12 extracelular e intracelular del "Cultivo Mixto Natural" durante la tercera réplica en el Fermentador



por alguna de las cepas que componen el mismo "cultivo mixto natural" para estimular su desarrollo.

Finalmente se hizo una comparación entre la capacidad de producir vitamina B 12 con los datos que se tienen sobre diversas capacidades metabólicas y características fisiológicas que se obtuvieron en estudios previos (y que se encuentran en el Apéndice 1), para determinar si existía algún tipo de relación entre alguna característica fisiológica y la capacidad de producir vitamina B 12. De este análisis no se encontró ninguna relación entre las las características con que se contaba.

3.6 Importancia de la existencia de bacterias degradadoras de Petróleo.

La amplia distribución y su potencial metabólico, hacen a las bacterias degradadoras de petróleo, microorganismos importantes para la transformación de los hidrocarburos y incorporación de los mismos al medio ambiente ya que estos son transformados por las bacterias una vez que entran en sus rutas metabólicas, utilizandolos como fuente de carbono y energía. De igual forma como resultado de dicha actividad metabólica se pueden producir metabolitos o sustancias, las cuales favorecen su crecimiento, le sirven como defensa, son eliminadas al exterior de la célula como desechos o para que puedan ser utilizados por otros organismos.

Como puede apreciarse en el Apéndice 1, los microorganismos degradadores de petróleo, no solo tienen la capacidad de utilizar los hidrocarburos sino que estudios de taxonomía numérica que se han hecho (Muñoz-Rubio, 1983; Porras-Aguirre, 1984 ; Carballo-Cruz, 1985 ; Izquierdo-Vicuña, 1985) se demuestra que pueden asimilar diversas fuentes de carbono, vivir bajo diversas condiciones y producir diversas sustancias, lo cual deberá de ser considerado para llevar a cabo estudios en que se puedan aprovechar estas capacidades.

Estas bacterias de igual forma ayudan a limpiar áreas que continuamente están expuestas tanto a residuos como a grandes cantidades de petróleo crudo o sus derivados y como se mencionó anteriormente reciclan esta compleja fuente de carbono.

La existencia de bacterias degradadoras de petróleo en el intestino de camarones del área de la Sonda de Campeche, podría explicar las observaciones referentes a la capacidad encontrada en algunos camarones de utilizar o degradar ciertas fracciones de hidrocarburos (Botello, 1976).

Estas observaciones junto a las encontradas por otros autores Lizárraga-Partida, Porras Aguirre y Colwell R. (en preparación) indican que la característica de presentar bacterias con capacidad de degradar los hidrocarburos está ampliamente difundida en otros organismos como peces, holotúridos y cangrejos, fenómeno que da una idea, de la importancia que tienen estos microorganismos y su actividad en el medio ambiente marino.

La presencia de bacterias degradadoras de petróleo en el intestino de diversos organismos marinos, no asegura que los organismos no sean afectados por los hidrocarburos, ya que es conocido que las mencionadas bacterias utilizan

preferentemente hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular, mientras que los aromáticos y los de elevado peso molecular son mas difíciles de ser degradados (Berwick, 1984) y son los que frecuentemente se encuentran asociados a los tejidos de los organismos expuestos al petróleo crudo (Lee, 1980).

Otra característica importante de los microorganismos degradadores es la diversidad de los mismos (Atlas, 1981), asimismo se ha demostrado que los cultivos mixtos son mucho mas efectivos para utilizar una mayor proporción de hidrocarburos que los cultivos puros, ya que las diferentes cepas bacterianas suelen tener variables capacidades de degradación, así como diversas posibilidades en liberar sustancias distintas durante la transformación de los hidrocarburos, sustancias que a su vez puedan favorecer el desarrollo de otros microorganismos del mismo cultivo y con esto se efectue mas rápido el proceso de degradación (Berwick, 1984 ; Grady, 1985). En el caso del "cultivo mixto natural" manejado en este trabajo parece que actuó favorablemente la combinación, no así para los otros cultivos mixtos (combinando los cultivos puros al azar) en los cuales no se obtuvo crecimiento.

Por otro lado la existencia de bacterias intestinales que tienen la capacidad de síntesis de Vitamina B 12 en peces cultivados en estanques y que tienen valor comercial ha reducido la necesidad de suministrar la vitamina en su dieta y con ello reducir el costo de producción (Lovell, 1981). Aquí se da otra línea de investigación en el cual se permitiría desarrollar cepas bacterianas que tuvieran ciertas características metabólicas con la producción de sustancias deseadas, bacterias que podrían ser incorporadas a la flora intestinal de los organismos que necesiten las sustancias y con ello evitar incorporar esta sustancia a la dieta y reducir el costo en la alimentación.

Como ya se mencionó en el ambiente marino, la proporción de bacterias con capacidad de producir vitamina B 12, varía ampliamente dependiendo del lugar, temporada del año, así como de los métodos empleados para valorar esta capacidad (Starr, et al., 1957; Schever, 1981).

De igual manera la cantidad de vitamina B 12 presente en el agua, dependerá de una serie de factores como pueden ser la presencia de ciertas algas productoras o consumidoras, las que a su vez en muchos casos dependeran de la época del año.

La existencia de ciertos inhibidores o inactivadores de la actividad de la vitamina B 12 también influirá en la cantidad de vitamina disponible en el ecosistema (Cariucci, 1974; Cariucci, et al., 1970).

Por último es importante resaltar que en los últimos años se ha empezado a vislumbrar el ambiente marino como una rica fuente potencial de una gran variedad de metabolitos, sustancias químicas, medicinales, alimenticias y energéticas que podran ser obtenidas a través del desarrollo de nuevas tecnologías como es la ingeniería Genética, que inclusive se esta aplicando a microorganismos degradadores de hidrocarburos manejando los plásmidos que les confieren su actividad degradativa para el uso industrial (Chakrabarty, 1985) inclusive las cepas manejadas en el presente trabajo dada su diversidad de asimilar diversas fuentes de carbono, así como la capacidad de producir diversas enzimas pudieran ser utilizadas en trabajos posteriores para aprovechar estas capacidades.

Por último con el creciente desarrollo de la denominada Biotecnología Marina (Colwell, 1983 ; Tucker, 1985), se pretende aprovechar y cuidar los recursos biológicos marinos

en países industrializados, razón por la cual es necesario tratar de realizar investigaciones en este sentido en nuestro país para así obtener y preservar adecuadamente la diversidad de recursos biológicos con que contamos.

CONCLUSIONES.

El porcentaje de bacterias degradadoras de petróleo crudo que tienen la capacidad de producir la vitamina B 12 es importante, ya que mas del 50 % de las bacterias examinadas que provienen del área de plataformas marinas de explotación petrolera así como de las que obtuvieron del tracto intestinal de camarones pueden producirla.

Potencialmente es posible producir vitamina B 12 a partir de petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, aunque en el presente estudio los rendimientos fuerón bajos, se podría intentar mejorar los rendimientos a través del manejo de técnicas de mutagénesis o de ingeniería genética.

La capacidad de degradación de petróleo por las bacterias estudiadas bajo condiciones diferentes de cultivo (en particular se probó diferentes volúmenes del recipiente) no se mantiene constante cuando los cultivos son puros o se hace una mezcla de cepas bacterianas al azar. Mientras que cuando se empleó a un cultivo mixto formado de manera natural, este sí mantuvo estabilidad en su comportamiento en la forma de degradación en los diferentes volúmenes de cultivo probados.

Es posible cultivar una mezcla de bacterias degradadoras de petróleo en el fermentador y conservar el comportamiento en la capacidad degradativa, así como en su capacidad de producir la vitamina B 12.

Las bacterias degradadoras de petróleo son parte importante en la eliminación de los hidrocarburos presentes en el ambiente marino y considerando los resultados encontrados en este y en estudios previos, estas contribuyen con la producción de sustancias indispensables para otros organismos de manera directa o indirecta, debido a su gran potencial metabólico.

Por último puede decirse que es indispensable desarrollar investigaciones de tipo biotecnológico que permitan aprovechar y/o conservar los recursos biológicos para utilizar racionalmente los recursos de que disponemos.

APENDICE 1

CLAVE ESPECIFICACION

DEGP Degradación de petróleo crudo Ixtoc 1
 PVIT Producción de vitamina B 12

CARACTERES MORFOLOGICOS

CRBL Colonia color crema-blanco
 ANRO Colonia color anaranjado-rojo
 AMVE Colonia color amarillo-verde
 OTCD Colonia con otro color diferente a los anteriores
 PDIF Producción de pigmento difusible

Forma y arreglo celular

COCO Cocos
 BACI Bacilos
 ESPI Espirilos
 PLOM Pleomórficos
 EDEF Espora deformante
 ENDE Espora no deformante
 12CE Arreglo de 1 a 2 células
 CADE Arreglo en cadenas
 RACI Arreglo en racimos
 OTAR Otro arreglo

CARACTERES FISIOLOGICOS

GPOS Gram positivo
 GNEG Gram negativo
 CATA Catalasa
 OXID Oxidasa
 PROT Prototrofia
 PRVI Prototrofia + Vitaminas
 PRVA Prototrofia + Vitaminas + Aminoácidos
 RNOS Reducción de Nitratos
 RNIS Reducción de Nitritos
 RENS Desnitrificación
 OGLU Oxidación de glucosa
 APHB Acumulación de PHB
 GACI Acidificación de la glucosa
 GALC Alcalinización de la glucosa
 FGLU Fermentación de la glucosa
 PRLE Producción de Levan

AMIL	Amilasa
GELA	Gelatinasa
ADNA	ADNasa
TW80	Tween 80
URSA	Ureasa
SALO	Salinidad 0 o/oo
SA70	Salinidad 70 o/oo
SI20	Salinidad 120 o/oo
SI80	Salinidad 180 o/oo
TEM4	Temperatura 4 C
TE37	Temperatura 37 C
TE41	Temperatura 41 C

CARACTERES NUTRICIONALES

Asimilación de azúcares

LARA	L-Arabinosa
RIBO	Ribosa
XILO	D-Xilosa
FRUC	D-Fructuosa
GALA	D-Galactosa
GLUC	D-Glucosa
MAND	D-Manosa
RHAM	L-Ramnosa
CELO	Celobiosa
LATO	Lactosa
MALT	Maltosa
SACA	Sacarosa
TREA	Trealosa
AMID	Almidón
AGLU	N-acetilglucosamina

Asimilación de grasas

ACET	Acetato de amonio
PROP	Propionato
BUTY	Butirato
IBUT	Isobutirato
VALE	Valerato
IVAL	Isovalerato
KPRO	Caproato
EPTA	Heptanoato
KPRI	Caprilato
PLAR	Pelargonato
KPRA	Caprato
PALM	Palmitato

Utilización de ácidos carboxílicos

OXAL	Oxalato de amonio
MALO	Malonato
SUCI	Succinato
MALE	Maleato
FUMA	Fumarato
GTAR	Glutarato
ADIP	Adipato
PIME	Pimelato
AZEL	Azelato
SEBA	Sebacato

Utilización de Hidroxiácidos

LMAL	L-Malato.
DTAR	D-Tartrato
LTAR	L-Tartrato
MTAR	Meso Tartrato
LATA	Lactato
GLYC	Glicolato
GLCE	Glicerato
CITR	Citrato
PYRU	Piruvato
CGTA	Alfa-cetoglutarato
LEVU	Levulinato
ITAC	Itaconato

Utilización de alcoholes y glicoles

ECOL	Etilenglicol
PCOL	Propilenglicol
GLOL	Glicerol
ADOL	Adonitol
MIOL	Meso-inositol
MAOL	Manitol
SOOL	Sorbitol
MEOL	Metanol
ETOL	Etanol
PROL	Propanol
IPOL	Isopropanol
BUOL	Butanol
IBOL	Isobutanol
DUOL	Dulcitol

Compuestos Aromáticos no Nitrogenados

DMDL	d-Mandelato
PHBZ	P-Hidroxibenzoato
FTAL	Ftalato
QINA	Quinato
FENO	Fenol

Aminoácidos.

LPRO	L-Prolina
LFAL	L-Fenilalanina
LTYR	L-Tirosina
LHIS	L-Histidina
LTRY	L-Triptofano
LALA	L-Alanina
LTHR	L-Treonina
LVAL	L-Valina
LLEU	L-Leucina
LGLU	L-Glutamato
LLYS	L-Lisina
LARG	L-Arginina
LORN	L-Órnitina
AGIN	Asparagina
MTIO	Metionina
CTEI	L-Cisteina

Aminas y Compuestos Nitrogenados

ETNH	Etanolamina
BUTH	Butilamina
HINH	Histamina
PUTR	Putresina
TIAM	Tiamina
ACAM	Acetamina
SARC	Sarcosina
BTAI	Betaina
HIPU	Hipurato
TYMI	Timina
UREA	Urea
TIDU	Tiourea

CARACTERES
MORFOLOGICOS

CARACTERES
FISIOLOGICOS

AZUCARES

DPCAADPCBEPEE1CROGGCOPPPRRRAGGFAGATUSSSSTTLXFGGMLMS
EVRNMTDOASLDN2AATPNAXRRRNNEPAAGRMEDWRAA11EEEEIRALAHAAA
GIBRVCICCP0EDCDCAOETIQVVOINHCLLLILN8SL728M34RLULUNATLC
PTLOEOF0IIMFEEEEIRSGADT!ASSSBICUELA0A0000471A0CACOMOTA

1114	x	x		x	x	xxxxxxx	xxx	x	xxx	xxxxxxx		xx	xx		
1116	xxx		x	x		xx	xxxxxxx	x	xxxx	xxxxxxxxxx		xxxxxxx			
1118	xxx		x	x		xx	xxxxxxx	xx	xxxx	xxx	xxx	xxx	x		
1128	xxx		x	x		xxxxxxx	xx	xxx	xxxxxxxxxx		xx	x	x		
1301	x	x		x	x	xx	xxxx	x	x	xx	xxx	xx	x		
1302	x	x		x	x	xxxxxxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxxxx	xxx	x	x	
1309	x	x		x	x	x	xxxxxx	xxx	x	xx	xx	xxx	x	xxxx	x
1317	x	x		x	x	xx	xxxx		x	x	x	xx	xxx	xxxxx	x
1322	x	x		x	x	xxxxxxx	xxx	x	xxx	xx		xx	xxx		
1324	x					xxxx	xxx	xx	xxx	xx	xxx		xxx	x	x
1325	xxx		x	x		xxxxxxx	xxx	x	xxxx	xx		xx	xxxx		
1329	xx					xxxx	xxx	x	xxx	xx		xx	xxxx		
1838	xxx		x	x		x	x	xx	xxx	xx	xxx	xx	xx		
1839	xxx		x	x		x	x	xx	xx	xxxxxx		xx			
1848	x	x		x	x	xxxxxxxxxxx		x	x	x	xxxxxxxxxx		xxxxxx		
1849	x	x		x	x	xxxxxxxxxx	x	xx	xx	xxxxxxxxxxxxxxxx		xxxxxxxx			
1851	xxx		x	x		x	xxxxx	x	xxxxxx	xxx	xxx	x	xxx	xxx	
1855	x	x		x	x	xx	xxxx	x	x	xxxxxx	xxx	xxxxxxxxxxxxxxxx			
1856	xxx		x	x		x	xxxxxx	x	xxxxxx	xxx	xxx		x	x	
1866	x	x		x	x	x	x	xxx	xx	x	xxx	xxx	xxxxxxxxxxxxxxxx		
1939	x	x		x	x	xxxxxxx		x	xxxxxx	xxxxxxx		xxxxxxxxxx			
1947	xxx		x	x		xxxxxxxxxx		xxxxxxx	xxx	xx					
1950	xxx		x	x		xxxxxx		x	x	x	xxx	xxx			
1952	xxx		x	x		xxxxxx		xx	x	x	xxx	xxx			
1954	xxx		x	x		xxxxxxxxxxx		x	x	x	xxxxxxxxxxx		x	xxxx	
1959	x	x		x	x	xxxxxx		x	xxxxxx	xxx	xxxxxxxxxxxxxxxx				
1961	x	x		x	x	xxxxxxxxxx		xx	xxxx	xxxxxxxxxxxxxxxx		xxxx			
1964	xxx		x	x		xxxxxxxxxxx		xxxxxxx	xxx	xxx	xxxxxxx				
1965	xxx		x	x		xxxxxxxxxx		xxx	xxx	xxxx	xxx		x	x	
1968	xxx		x	x		xx	xxxxxx		x	x	xxx	xxxxxx			
1973	x	x		x	x	xxx	xxxxx		xxx	xxx	xxxx	xx			

NOTA; x = respuesta positiva.

A Z U C A R E S	GRASAS	ACIDOS CARBOXI- LICOS	HIDROXI- ACIDOS	ALCOHOLES Y GLICOLAS	COMP. AROM. NO NITRO GENA- DUS
--------------------------------------	--------	-----------------------------	--------------------	----------------------------	---

TAAAPBIVIKEKPKPOMSMFGAPASLDLMLGGCPCLIEPGAMMSMEPIIDDPFQF
 RMGCRUBAVPPPLPAXAUAUTDI ZEMTTTALLIYGETCCLDIAOETRPBUMHTIE
 EILEOTULARTRARLALCLMAIMEBAAAATYCTRTVA00000000000000DBANN
 ADUTPYTELOAIRAMLOIEARPELALRRRACERUAUCLLLLLLLLLLLLLLLLLLZLAO

1114	XXXXXXXXXX	XX	XXXXXXXXXX	XXX	XXXX	XX	XX	XX	X	X	X	
1116	XXXXXXXXXX	XX	XX	XXXXXXXXXX	XXX	XXX	XX		XX	X	X	
1118	XXXXXXXXXX	XX	XX	X	XXXXX	X	XXX		XX	X	X	
1128	X	XXXXXXXXXX	XX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXX		XXXXX			
1301	XXXXXXXXXX	X	XX	X	XXXX	XX	XXXX	X	XX	XX	XXXXXXXX	
1302	XXXXXXXXXX	XX	XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXX	X	XXX		XXXXX			
1309	XXXXXXXXXX	XX	X	XXXXXXX	XX	XXX	X	X	XX		X	
1317	XXXXXXXXXX	X	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXX	X	XX			X	X	X	
1322	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XX	XXXX	X	XX			XXX	X	X	
1324	XXXX	X	XX	XX	X	XXXXXXXX	XX	XXXX	X	XX	XX	
1325	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	X	XXXXXXXX	XX	XXXXXX	X	XX	XX			X	
1329	XXXXXXXXXXXX	XX	X	XXXXXXX	XX	XXXX	X	X		XX		
1838	XXX	XX	X									
1839						X						
1848	XXXXXXXXXX	X	XXXX	XXXXXXXXXX	XXXX	XXXXXXXXXXXX						
1849	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXX	XXX	XX				X	X	
1851	X											
1855	XXXXXXXXXXXX	X	XXXXXX	XXXXXXXXXXXX		XX	XX		X	X	XX	
1856	XXX	XX	X					X				
1866	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	X	X	X	XXXX	X	XXX	X	XXX	X	X
1939	XXXXXXXXXXXX	X	XXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	X	XX					XX	
1947	XXXXXXXXXXXX	X	XX	XXX	X	X	XX	XX	X			
1950	XXXXXXXXXXXX	X	XXX	XXX	XXX	XXXXXXXXXXXX	X	X				
1952	XXXXXXXXXXXX	X	XX	X	X	X	XXX	XX	X		X	
1954	XXXXXXXXXXXX	X	XX	XX	XXX	XXXXXXXXXXXX	X	XX				
1959	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	X	XXXX	X	XXXX	X	X		
1961	XXXXXXXXXXXX	X	XX	XXX	XXXXXXXXXXXX	XX	X			XXXXXXXX		
1964	X	XXXXXXXXXXXX	X	XX	XX	XXX	XXXXXX	XXXX	X	XX		
1965		XXXX	X	X	X	X	XXX	XX	X		X	
1968	XXXX	XXX	XX	XX	X	X	XXXXXXXX	X				
1973		X	X	X	X	X	XXXX	X	X	X		

NOTA; x = respuesta positiva.

AMINOACIDOS

AMINAS Y
COMPUESTOS
NITROGENADOS

LLLLLLLLLLLLLLAMCEBHPTASBHTUT
PFTHTATVLGLAOGTTUIUCATIYRI
RAYIRLHAELYRRI IENTNTAARAPMED
OLRSYARLUUSGNNOIHHHRMMCIVIAU

1114	xxxx xx xxxxxx	x xxx
1116	x xxx xxxxxxxx	x x xx x
1118	xxx x xxx xx	x
1128	xxxxxxxxxxxxxxxx	x xx xxx
1301	xxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxx
1302	xxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxx x
1309	xxxxxxxxxxxxxxxx	xx xx x
1317	xxxxxx xxxxxxxx	x x xxxxxx
1322	xxxxxxxxxxxxxxxx	x xxx x x
1324	xxxxxxxxxxxxxx	x x xx
1325	xxxxxxxxxxxxxx xx	x x xxxx
1329	xxxxxxxxxxxxxxxx	xxxx x x
1838	xxx xx	x x
1839	x	
1848	xxx x xxx xxx	x x
1849	xxxx x xxxxxxxx	xxxx xxxx
1851	xxx x x	x x
1855	xxx x xxxxxx	x xx x xxx
1856	x x x xxx	x x
1866	xxx xxxxx x x	x xxxx
1939	xxxx xxxxxxxxxxxx	x xxxxxxxx
1947	x xx x xxxxxxxx	xx x xxxx
1950	xxxx xxxxxxxxxxxx	x x xxxxx
1952	xxxx xxxxxxxxxxxx	x x xxxxx
1954	xxxx xxxxxx xxx	x x x
1959	xxxx xxxxxxxxxxxx	x xx xxxxx
1961	xxxx x xxxxxxxx	x x xxxxx
1964	xxxx xxxxx x x	x x x
1965	x x xxxxxxxxxxxx	x x xxx
1968	xxxx xxxxxxxxxxxx	xx x xxxx
1973	x xx xxxxx x x	xxx

NOTA: x = Respuesta positiva.

DPCAA0PCBEPEE1CRUGGC0PPRRROAPAGATUSSTTTLRXFGGMRLMSTAA
 EVRNMTDOASLDN2AATPNAXRRRNNEGPRMEDWRAA1EEEE1IRALAEHAAARMC
 G1BRVC1CCPOEDCDCAQETIQVVO1NLHL1LN8SL78M34RBLULUNALTLCIE
 PTLOE0FO1MFEEEI RSGADT I ASSSUBELAA0A000471A00CAC0M00TAADT

2001	xxx	x	xx	x	xxxxx	xx	xx	xxxxxxxx	x	xxxxxxxxxxxx					
2003	x	x	x	x	x	xxx	x	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2005	x	x	x	x	x	xxx	xx	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2008	xxx	x	x	x	x	xxxxx	xx	xx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2011	xxx	x	x	x	x	xxx	xx	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2013	x	x	x	x	x	xxx	x	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2016	xxx	x	xx	x	xxxxx		xx	xx	xxx	x	xx				
2022	x	x	x	x	x	xxx		xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx							
2023	xxx	x	x	x	x	xxxxx		xxx	xx	xxxxxxxxxxx	xx	x			
2035	xxx	x	xx	x	xxxxx		xxxx	xxxxxx	x		x	x			
2042	xxx	x	x	x	xxxxxx		xxx	x	x	xxxxxxxxx	x	xx	xx		
2044	xxx	x	xx	x	xxxxx		xxx	x	x	xxxxx	x		xxx		
2050	xxx	x	x	x	x	xxxxx	xxx	x	xx	xxxx	x	x	xxxx	x	
2051	xxx	x	xx	x	x	xxxxx	xx	xxx	xxxx	xxxxxxxxxxxxxx	xxxxx				
2053	x	x	x	x	x	x	xxx	x	x	xxxxxxxxxxx	x	x	xxxxx	x	
2054	x	x	x	xx	x	x	xxx	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxx					
2067	x	x	x	x	x	x	xxx	xx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2074	xxx	x	x	x	x	xxxxxx		x	x	xxx	xx	x	xx		
2089	xxx	x	xx	x	x	xxxxxx	x	x	x	xx	xx	x	x	xxx	x
2093	xxx	x	xx	x	x	xxxxxx		x	x	xx	xx	x	x		
2094	x	x	x	xx	x	xxxxxxx	xxxxx	xxx	xxxxxxxx	xxx	xxxxx				
2097	xxx	x	xx	x	x	xxxxx	x	xxxxx	xxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxx				
2100	x	x	x	x	x	x	xxxxx	x	x	xxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxx				
2107	x	x	x	xx	x	x	xxx	xx	xxxxxxxx	xxx	xxxxx	xx	xx	x	
2111	x	x	x	x	x	x	xxx	x	xx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx					
2122	x	x	x	x	x	xxxxxxx	xx	xxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
2123	xxx	x	xx	x	x	xxxxx	x	x	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx						
3016	xxx	x	x	x	xxxxxx	xx	xx	xx	xxxx	xx	x	x	x		
3020	x	x	x	x	xxxxxx	x	xxx	xx	xxx						
3022	xxx	x	x	x	xxxxxx		xxx	xx	xxx		x		x		
3028	xxx	x	x	x	xxxxxx		xxx	xx	xxx				xx		
3029	xxx	x	x	xx	xxx		xxx	xx	xxx				x		
3030	xx	x	x	x	xxxxxx		x	xxx	xx	xxx			x		
3056	x	x	x	x	xxxxxxx	x	xx	xx	xxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxx					
3060	xxx	x	x	x	x	xxx	x	xxxxxx	xxx		x		x		
3070	xxx	x	x	x	xxxxxx		xxx	xx	xxx		x	x	x	x	
3084	xxx	x	x	x	xxxxxx	xxx	xx	x	xxxxxxxx	xx	x	xxxx			

NOTA; x = Respuesta positiva.

PBPPOMSLCPCGAMMSMEPBDFLLLLLLLLLAMLCCCCEBUTTT
 RULAXAUAAYGLDIAOETRUUEFTHTATVLGTGLAOTTUR IYI
 DTALALCLTTRT0000000000NAYIRLHAEIILYRRENTEOMA
 PYRML0IEARUALLLLLLLLLLL0LRSYARLUNOUSGNIHHAUM

```

2001  x  xxxxxx xx xxxx xxxxxxxxxxxxxx xxxxxx x  xxxx
2003  xx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxx
2005  x  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxx
2008  x  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxx
2011  x  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxx
2013  x  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxx
2016  x  xx  x xxxxxx          xx x  x x xx x  x  x
2022  x  xxxxxxxxxxxxxx  x  x  xxx x  x  xx x  xxxxx
2023  x  x x xxx x  xx          x  xx  x  x  xx x  x  xx
2035  x  x  xx xxxxxxxx  xxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxxx
2042  xxx xxx  xxxxx  x  x          xx  x  xx  x  x
2044  xxx x  xxxxxxx  xxx  xx  xxxxx  x  xxxxxxx  xx
2050  xxx  xxxxxxxx  xxx          xx  xx  xx  x  xx
2051  xxx x  xxxxxxxx  xxxxx  xx x  xx xxxxxxxx  xx  xx
2053          xxxxxxxxxxxx  xxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx x  xxxxx
2054  xx  xx  xxxxxxxxxxx  x  xx  xx  xx  xxxxx  xx  x
2067  x  x  xxxxx  xxx          x  xxxxx  xx  x  x  xx  x
2074  xx  x  xxxxx          xx  x  x  xxxxx
2089  xxx  x  xxxxx  xxx          xx  x  x  xxxxx
2093  xx  x  xxxxx  xx          xx  x  x  xxx  x
2094  xx  x  xxxxxxx  xxx  x          xx  x  x  xxxxx
2097  xx  x  xxxxxxx  xxx          xx  x  xxxxx  x
2100  xx  x  x  xxxxxx  xxx  xx  x  xx  x  x  xxxxx  x
2107          x  xxxxx  xxx          xxxxxxxxxxxx  x  xxxxxxx
2111  xx  x  xxxxxxxxxxxxxx  xxx  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx  xxxxx
2122  xx  xxxxxxxxxxxxxxxx  x  xxx  xxxxx  xxxxx  xxx  x
2123          xxxxxxxx  xxx  x  xxx  xxxxx  xxxxx  xxx  x
3016  xxx  x  xxxxx          x  x  xx  xx  xx  x  xx  x
3020  xxx  xx  xx          xx  xx  x  xxxxxx  x  x
3022  x  x  x  x  x  x          xx  xx  x  x  xx  x  x  x
3028  x  x  xx  xxxxx          xx  x  xx  x  xx  x  x  x
3029  x  x  x  x          x  xx  xx  x  xx  x  x
3030  x  x  x  xx  x          x  xx  xx  x  xx  x
3056  xx  xxxxxxxxxxxxxxxx  xx  x  xxx  xxxxxx  xxxxx  xx
3060  x  xx          xxx  x  xxx  xxxxx  xx  x
3070  x  x  x  x  x          x  xx  x  x  xx  x  x  x
3084  xxx  xxxxxxxxxxxxxx  xxx  xxx  xxx  xxxxxx  xxx  xx

```

APENDICE 2.

Método para determinar la capacidad de utilizar el petróleo crudo del pozo Ixtoc 1 por bacterias marinas.

Se prepara el siguiente medio de cultivo.

Fe Cl ₂	(1.2 %)	1 ml.
TRIS-HCl	(pH= 7.5)	10 ml.
Medio Mineral diluido		1000 ml.
Petróleo crudo Ixtoc 1		0.5 %

Una vez preparado el medio de cultivo conteniendo los tres primeros elementos se reparte en pequeños frascos denominados "pildoreros" a razón de 10 ml. por frasco y se le añade 50 μ l de petróleo crudo con ayuda de una micropipeta, después de lo cual se tapan y se esterilizan a 121°C durante 20 min. Se procede a sembrar con 0.5 ml. de una suspensión bacteriana concentrada y se incuban 2 meses a temperatura del laboratorio.

Lectura. Se agitan fuertemente los frascos junto con un blanco no sembrado, se dejan reposar un momento y a continuación se agitan suavemente para observar la formación de micelas, capas de crecimiento y/o desaparición de la película de petróleo, en cuyo caso la prueba será positiva.

Medio 62. Recomendado por ATCC.

Para el desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 14169.

Peptona de caseína	6.0	gr.
K_2HPO_4	0.2	gr.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0	mg.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	gr.
L-Asparagina	0.15	gr.
Cianocobalamina	400.0	mcg.
Agua destilada	1000.0	ml.
Agar Bacteriológico	15.0	gr.
pH = 7.2		
Incubar a 26 °C		

Medio propuesto por Burkholder (1951).

K_2HPO_4	7.0	gr.
KH_2PO_4	3.0	gr.
Na citrato $\cdot 3H_2O$	0.5	gr.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	gr.
$(NH_4)_2 SO_4$	1.0	gr.
Arginina	100.0	mg.
Asparagina	4.0	gr.
Ac. L-glutámico.	100.0	mg.
Glicina	100.0	mg.
Histidina	100.0	mg.
Prolina	100.0	mg.
Triptofano	100.0	mg.
Dextrosa	10.0	gr.
Agar bacteriológico	15.0	gr.
Agua destilada	1000.0	ml.
Ajustar el pH = 7.2		
Esterilizar 15 lb/15 min.		
Nota: Cuando se empleaba como medio de bioensayo se agregaba 0.0005 gr/l de $CoCl$.		

Medio 8 (modificado del de Burkholder).

K_2HPO_4	7.0	gr.
KH_2PO_4	3.0	gr.
Na citrato $\cdot 3H_2O$	0.5	gr.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	gr.
$(NH_4)_2 SO_4$	1.0	gr.
Dextrosa	10.0	gr.
Co Cl	0.0005	gr.
Agua destilada	1000.0	ml.
Agar bacteriológico	15.0	gr.
Ajustar pH = 7.2		
Esterilizar 15 lb/15 min.		

Medio Zobell (Oppenheimer-Zobell, 1952).

Bacto Peptona	5.0	gr.
Extracto de Levadura	1.0	gr.
FeCl ₃ (1.2 %)	1.0	ml.
Agua destilada	800.0	ml.
Medio mineral cocentrado.	200.0	ml.
Ajustar el pH = 7.5		
Agar Bacteriológico	15.0	gr.
Esterilizar en autoclave a 121 °C		20 min.

Bacto B 12 Inoculum Broth USP.

Tomato Juice	100	ml.
Proteose Peptone N- 3	7.5	gr.
Bacto-Yeast Extract	7.5	gr.
Bacto-Dextrose	10.0	gr.
Sorbitan Monooleate Complex	0.1	gr.
Monopotassium Phosphate	2.0	gr.

Medio Mineral Concentrado (Agua de mar artificial).
Lyman y Fleming, 1940.

Acido bórico	H_3BO_3	1.30	gr.
Bicarbonato de Sodio	$NaHCO_3$	9.60	gr.
Bromuro de potasio	KBr	4.80	gr.
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	30.0	gr.
Cloruro de estroncio dihidratado	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	1.20	gr.
Cloruro de magnesio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	248.0	gr.
Cloruro de potasio	KCl	33.0	gr.
Cloruro de sodio	NaCl	1175.0	gr.
Fluoruro de sodio	NaF	0.15	gr.
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	4.50	gr.
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	36.0	gr.
Sulfato de sodio	Na_2SO_4	195.0	gr.

Todo lo anterior se disuelve en un recipiente con 20 litros de agua destilada.

Medio Mineral diluido al 20 %

Cloruro férrico (1.2 gr/l) 1 ml.

Medio mineral concentrado 200 ml.

Agua destilada 800 ml.

Ajustar pH a 7.5

Esterilizar a 121 C 20 min.

Condiciones para el crecimiento en el Fermentador.

Agua de mar artificial (Medio mineral concentrado)	20	%
Petróleo crudo Ixtoc I	5	%
Agua destilada	80	%
CoCl	0.005	gr/lt
5,6 dimetilbenzimidazole	0.002	gr/lt
Urea	0.1	gr/lt
Cloruro férrico	1.0	ml/lt
Capacidad del fermentador (Volumen de trabajo)	1250	ml.
Esterilización a 110 °C	por 45	min.

Apéndice 3.

La vitamina B 12 o cianocobalamina es la mas potente de las vitaminas conocidas, tiene una importancia notable en el desarrollo normal de ciertas actividades, es un factor de crecimiento esencial para muchos organismos como por ejemplo gallinas, cerdos, corderos, etc. Es importante en el desarrollo normal de ciertas actividades como son: prevenir las lesiones correspondientes a la médula espinal, transforma el ácido fólico en folínico (que es un compuesto metabólicamente activo), interviene en la metilación de la colina, en la formación de acidos nucleicos, en la union de algunos aminoácidos, ademas de ser necesaria para la maduración normal y desarrollo de los eritrocitos.

Los componentes de la vitamina B 12 activa han sido demostrados ser esenciales para estimular el desarrollo de varios organismos marinos, por lo cual se propone que componentes activos de la vitamina B 12 juegan un papel vital en la economía de los océanos, en la producción explosiva de algas y en las sucesiones poblacionales.

En el ser humano adulto, la necesidad diaria mínima de vitamina B 12 es del orden de 0.1 μ g. Mientras que la sangre humana normal contiene 0.0002 μ g por mililitro. Por otro lado se sabe que la cianocobalamina en el cuerpo humano y en los alimentos no existe como tal, sino en formas coenzimáticas metabólicamente activas y muchas veces tambien en forma de conjugados con aminoácidos. Las formas estables pueden no ser metabólicamente activas. Asimismo se conoce que la coenzima B 12 puede ser transformada a cianocobalamina con el cianuro de potasio.

Algo que es fundamental saber es que ni los vegetales ni los animales tienen la capacidad de sintetizar la vitamina B 12, solo lo pueden hacer los microorganismos.

Se han reconocido una gran variedad de microorganismos productores de vitamina B 12, entre los que se mencionan Actinomicetes (Nocardia, Streptomyces, etc.), generos de bacterias como Aerobacter, Bacillus, Clostridium, Flavobacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Pseudomonas, etc.

En México existe un incremento continuo en la demanda de vitamina, principalmente para la industrias farmacéutica y la alimentaria. La mayor parte de la demanda se satisface por importación de "polvo de fermentación" que es un producto intermedio en la producción industrial de vitamina B 12, el cual es completamente procesado en nuestro país para obtener la vitamina B 12 en forma cristalina.

B i b l i o g r a f í a .

- Abbot, B.J., y W.E. Gledhill. 1971 . The extracellular accumulation of metabolic products by hydrocarbon-degrading microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 14, 249-388.
- Atlas, R.M., y R. Bartha. 1973 . Stimulated Biodegradation of Oil Slicks Using oleophilic fertilizers. *Environmental Science & Technology*. 7(6): 538-541.
- Atlas, R.M. 1977 . Stimulated Petroleum Biodegradation. *Critical Review in Microbiology*. 5 : 371-386.
- Atlas, R.M., G.Bronner. y A.E. Haines. 1980. Microbial Degradation of Hydrocarbons in Mousse from Ixtoc-1 in : Proceedings of a Symposium of preliminary Results from the September 1979 Researcher/Pierce Ixtoc-1 Cruise. Key Biscayne, Florida, June 9-10, 1980.
- Atlas, R.M., 1981a . Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiological Reviews*, 45 (1) : 180 - 209.
- Atlas, R.M., 1981b . Fate of oil from two major oil Spills: Role of Microbial Degradation in Removing oil from the Amoco Cadiz and Ixtoc-1 Spills. *Environments International*. 5 : 33 -38.

- Ballerini, D., M. Dorbon, C. Gatellier. y J.P. Vandecasteele. 1986. Petrole et Biotechnologies. Biofutur. 27-47.
- Bartha, R. y R.M. Atlas. 1977. The Microbiology of Aquatic Oil Spills. Adv. Appl. Microbiol., 22 : 225 - 266.
- Berland, B.R., D.J. Bonin., J.P. Durbec., y S.Y. Maestrini. 1976. Bactéries hétérotrophes aérobies prélevées devant le delta du Rhône. IV. Besoins en vitamines et libération de ces substances. Hydrobiologia. 50 (2) : 167-172.
- Berwick, P.G. 1984. Physical and Chemical Conditions for Oil Degradation. Biotechnology and Bioengineering 26 : 1294 - 1305.
- Botello, V.A. 1975. Utilización y degradación del Petróleo crudo por 2 especies de camarón : Penaeus duorarum y Penaeus aztecus. Inst. Ciencias del Mar y Limnol. 2 (1) : 67 - 72.
- Botello, V. A., 1979. Presencia e importancia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente marino: Nota Científica. Ann. Centro de Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. Mexico, 6 (1) : 1 - 6.
- Boyles, D. T. 1984. Biodegradation of Topped Kuwait Crude. Biotechnology Letters, 6 (1) : 31 - 36.
- Bruno, S.F. y R.D. Staker. 1978. Seasonal vitamin B 12 and phytoplankton distribution near Napeague Bay, New York (Block Island Sound). Limnol. Oceanogr. 23 (5): 1045 - 1051.
- Burkholder, P. R. 1951. Determination of vitamin B 12 with a mutant strain of Escherichia coli. Science. 114, 459 -460.
- Burkholder, P. R. y L. M. Burkholder. 1956. Vitamin B 12 Suspended Solids and Marsh Muds Collected along the Coast of Georgia. Limnology and Oceanography 1 (1) : 202 -208.
- Carballo-Cruz, R. 1985. Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la Laguna de Términos. Tesis profesional. Facultad de Química. Univ. Nal. Autón. de México. 145 pp.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Carlucci, A.F., y P. M. Bows. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *J. Phycol.* 6, 343 - 400.
- Catell, S. A. 1973 . The seasonal cycle of vitamin B 12 in the Strait of Georgia British Columbia. *Journal of Fisheries research board of Canada.* 30 (2): 215-222.
- Chakrabarty, A. M. 1985 : Genetically manipulated micro-organisms and their products on the oil service industries. *Trends in Biotechnology.* 3 (2): 32-38.
- Colwell, R. R. 1983 .Biotechnology in the Marine Sciences *Science.* 222, 19 - 24.
- Cowey, C. B. 1956 . A preliminary investigation of the variation of vitamin B 12 in oceanic and coastal waters. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 35, 609-620.
- Einsele, A., y A. Flechter. 1971 . Liquid and Solid Hydrocarbons. *Advances in Biochemical Engineering* 1, 169-194.
- Fiala, M. 1982. Vitamine B 12 et phytoplancton au niveau de la thermocline en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta,* 5 (3): 339-347.
- Fiala, M. y L. Oriol. 1984. Vitamine B 12 et phytoplancton dans l'Océan Antarctique. Distribution et approche expérimentale. *Marine Biology.* 79 : 325-332.
- Florent, J. y Ninet, L. 1979. Vitamin B 12. In: *Microbial Technology.* Cap. 15. pp. 497 - 519. Academic Press, New York.
- Friedmann, H.C. and L. M. Cagen. 1970. Microbial Biosynthesis of B 12 - Like compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 24 : 159 - 208.
- Fujii, K., S. Shimizu y S. Fukui, 1966. Studies on the Formation of Vitamins and their Functions in Hydrocarbon Fermentation. (I) Production of vitamin B 12 using several kinds of bacteria in hidocarbon media. *J. Ferment. Technol.* 44 : 185 - 191.

- Fukui, S., S. Schimizu, y K. Fujii. 1967. Studies on the Formation of vitamins and their functions in Hydrocarbon Fermentation. (II) The forms of vitamin B 12 produced by several kinds of bacteria grown in hydrocarbon media. *J. Ferment. Technol.* 45 : 530 - 540.
- Fukui, S. y A. Tanaka. 1980 . Production of Useful Compounds from Alkane media in Japan. *Advances in Biochemical Engineering.* 17 : 1 - 35.
- Grady, L. 1985 . Biodegradation : Its Measurement and Microbiological Basis. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 660 - 674.
- Gunkel, W y G. Gassmann. 1980 . Oil, oil dispersants and related substances in the marine environment. *Helgolander Meeresuntersuchungen.* 33 : 164 - 181.
- Higgins, I.J. y P.D. Gilbert. 1978 . The biodegradation of hidrocarbons. En: Chater, K.N.A. y H.J. Somerville (eds) *The Oil Industry and Microbial Ecosystems.* Heyden & Son, Ltd. Londres : 81 - 117.
- Hoff-Jorgensen, E. 1954 . Microbiological assay of vitamin B 12 En: *Vitamin Assay - Tested Methods. Methods of Biochemical Analysis.* Vol. 1 pp. 81-113.
- Horowitz, A., D.Gutnick., y E. Rosenberg. 1975. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Applied Microbiology,* 30 (1): 10 -19.
- Humprey, A. E. 1967. A critical Review of Hydrocarbon Fermentations and their Industrial Utilization. *Biotechnology and Bioengineering.* 9, 3 - 24.
- Izquierdo-Vicuña, F.B. 1985 . Caracterización de bacterias hidrocarbonoclasticas de las plataformas de explotación petrolera de la Sonda de Campeche. Tesis de Maestría. Inst. de Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. de México, 150 pp.
- Kamikubo, T., M. Hayashi., N. Nishio., y S. Nagai. 1978. Utilization of nonsugar for vitamin B 12 production *Appl. Environ Microbiol.* 35 (5) : 971 - 973.

- Kvasnikov, E. I., B.E. Aizenman, E.F. Solomko, E.A. Kiprinova., y O. I. Boiko. 1975 . Growth and Production of antibiotics by bacteria of the genus *Pseudomonas* in medium containing Low-Molecular-Weight n- Alkanes. *Microbiology*. 44 (1): 45 - 49.
- Lee, W. Y., A. Morris y D. Boatwright. 1980 . Mexican Oil Spill: A toxicity Study of Oil Accommodated in Seawater on Marine Invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. 11: 234 - 237.
- Licea, S., R.Luna., P. Torres y C. Trejo. 1982 . Evaluación de los posibles efectos del derrame del pozo Ixtoc-1 sobre las comunidades del fitoplancton y la productividad primaria. Programa Coordinado de Estudios Ecológicos en la Sonda de Campeche. Informe Final.
- Lizarraga-Partida, M.L., H. Rodriguez-Santiago y J.M. Romero-Jarero. 1982 .Effects of the Ixtoc-1 blowout on heterotrophic bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 13 (2) : 67 - 70.
- Lizarraga-Partida, M.L., J. Porrás-Aguirre y F.B. Izquierdo-Vicuña. 1983 .Tasa bacteriana Hidrocarbonoclastica /Heterótrofas, como índice del impacto ambiental por petróleo crudo en la Sonda de Campeche. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*, 10 (1) : 177 - 186.
- Lovell, T. 1981 . Intestinal Synthesis of Nutrients in Fish. *Aquaculture*. 7 (3) : 34 - 35.
- Lyman, J. y R. H. Fleming. 1940 .Composition of sea water. *Journal of Marine Research*, 3 : 134 - 146.
- Mckenzie, P. y D.E. Hughes. 1976 . Microbial degradation of Oil and Petrochemicals in the Sea.p. 91-107. In: F.A. Skinner and J.A. Carr (Eds.) *Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food*. The Society for Applied Bacteriology. Symposium Series. N 4. (Gran Bretaña), 210 pp.
- Morikawa, H. y T. Kamikubo.1969. Utilization of n-Paraffins and Vitamin B 12 Production by Several Kinds of Bacteria. *Journal of Fermentation Technology*. 47 (8) : 470 - 477.

- Morikawa, H., M. Hayashi y T. Kamikubo. 1971 . Utilization of Hydrocarbons and Vitamin B 12 production by Rhodopseudomonas spheroides. Journal of Ferment Technology. 49 (9) : 803 - 808.
- Muñoz-Rubio, J., 1983. Taxonomía de bacterias hidrocarbono-clásticas de agua y sedimento en la Sonda de Campeche. Tesis profesional. Fac. de Ciencias. Univ. Nal. Autón. México, 109 pp.
- Nathan, G.H. 1963 . Vitamin B 12 and Congeners. En : Kavanagh, F . (Edit). Analytical Microbiology. pp.527 - 550. Academic Press. New York.
- National Research Council 1985 . Oil in the Sea: Inputs Fates and Effects. National Academy Press. Washington D.C. 601 pp.
- Oppenheimer, C.H. y C. E. Zobell, 1952 . The grow and viability of sixty-three species of marine bacteria as influence by hidrostatic pressure. Journal of Marine Research. 11 : 10 - 18.
- Perlman, D. 1959 . Microbial Synthesis of Cobamides. Adv. Appl. Microbiol. 1 , 87-112.
- Porrás-Aguirre, J., 1984 . Bacterias Hidrocarbono-clásticas del tracto intestinal de los peneidos :Penaeus aztecuz, Penaeus duorarum y Penaeus setiferus. Tesis profesional. Fac. de Ciencias, Univ. Nal. Aut. de México. 85 pp.
- Prescott, S.C. 1959 . The production of Vitamin B 12. En : Industrial Microbiology. McGraw Hill Book Co. 3- edition. 482 - 496.
- Roque-Carballo, C., 1985. Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la Laguna de Términos a la Sonda de Campeche. Tesis profesional. Fac. de Química. Univ. Nal. Autón. México. 145 pp.
- Schever, P. J. 1981 . V. Ecology of some growth factors in Plankton, Macroalgae, Sediment, and Seawater. In. Marine Natural Products Chemical and Biological Perspectives. Vol. IV. Academic Press. pp. 168 -172.

- Sirvins, A. y B. Tramier. 1985 . La biodegradación de los hidrocarburos. Mundo Científico 6 (54) : 46 - 54.
- Skeggs, H.R. 1981 . Vitamins. In : Briton M. Milley and Warren Listky. Industrial Microbiology. Chapter 3, pp. 47-54. Mc Graw Hill Book Co.
- Soto, L. 1981 : Cosideraciones de los efectos de los hidrocarburos fosiles sobre la población de camarones peneidos en el Banco de Campeche. En: Cuantificación de hidrocarburos fósiles y metales pesados en sedimentos y organismos marinos de la Sonda de Campeche. Informe final. A.V. Botello. Programa coordinado de estudios ecológicos en la Sonda de Campeche.
- Soto, L.A. y A. Gracia 1986 : Evaluación de los efectos de los hidrocarburos fósiles sobre las poblaciones de camarones peneidos en el Banco de Campeche. Sometida a los An. Cienc. del Mar y Limnol. Univ.Nal. Autón. México.
- Starr, T. J., M. E. Jones y D. Martínez. 1957 . The production of Vitamin B 12-Active substances by Marine Bacteria. Limnol. Oceanogr., 2 (2), 114-119.
- Strohecker, R., Henning, H. M. 1966 . Vitamin B 12. In : Vitamin Assay Tested Methods. Veriang Chemif-Kimsm-Weinhetim/Bergstr.
- Tanaka, A., Y. Ohya, S. Shimizu, and S. Fukui. 1974. Production of Vitamina B 12 by methenol-asimilating bacteria. J. Ferment. Technol. 52 : 921 - 924.
- Tucker, J. B. 1985 . Biotechnology Goes to Sea. High Technology. 5 : 34 - 44.
- Voigt, M.N., R.R. Eitenmiller y G.O. Ware. 1978 .Vitamin assay by microbial and protozoan organisms : response to vitamin concentration, incubation time and assay vessel size. Journal of Food Science. 43 (5) : 1418 - 1423.
- Voigt, M. N., R.R. Eitenmiller and G.O. Ware. 1979 .Vitamin analysis by microbial and protozoan organisms : response to food preservatives and neutralization salts. Journal of Food Science. 44, 723 - 728.