

51
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD
HIDROCARBONOCLASTICA POR BACTERIAS EN
AGUA DEL GOLFO DE TEHUANTEPEC, MEXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

SILVIA FUENTES GARCIA



MEXICO, D. F.



AGOSTO 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Dedico con cariño esta tesis...

A mis papás Pablo Fuentes Aldama y Juana García Mendoza, por darme amor, comprensión, apoyo e impulso para hacer una carrera universitaria.

A mis hermanos Alfredo, Yolanda, Salvador, Miguel, Antonio, Martín y Angeles, por su apoyo y ejemplo para seguir adelante.

Especialmente a mi hermana Yolanda porque en todo momento me ha brindado su apoyo.

A la memoria de mi abuelita Petrita, a quien siempre estaré recordando.

A mis sobrinos Alfredo, Marselita, Erik, Gaby, Alex, Sams, Noelia, Nubecita y a mi gordito José Mar, porque cada uno es muy especial para mí.

A TI Gaby por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jorge Romero Jarero por haber dirigido mi trabajo de tesis y por legarme sus conocimientos en el área de la Investigación.

A la M. en C. Irma Wong Chang por la asesoría brindada para la realización de éste trabajo, por compartir sus conocimientos y su experiencia, así como por brindarme su amistad.

A la M. en C. Nery Becerra Tapia por sus consejos y su amistad.

A mi amiga y futura bióloga Karla por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Victor y al M. en C. Bruno por su enseñanza y amistad, durante el crucero.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones para el mejoramiento del trabajo.

Al equipo de trabajo del Lab. de Físicoquímica Marina del ICM y L, UNAM por facilitarme los datos de parámetros físicoquímicos.

A toda la tripulación del Buque Oceanográfico "El Puma" de la UNAM, ya que hicieron posible que este estudio se realizara.

INDICE

I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	11
III AREA DE ESTUDIO	12
IV MATERIAL Y METODOS	14
V RESULTADOS	19
VI DISCUSION	44
VIII CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	54
APENDICE	60

RESUMEN

El área de estudio comprendió 20 estaciones de trabajo en el Golfo de Tehuantepec, México, durante julio de 1992, en la Campaña Oceanográfica FICUIMBI II, llevada a cabo a bordo del Buque oceanográfico "EL Puma" de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se realizaron 20 muestreos en agua superficial y de fondo para determinar la densidad bacteriana heterótrofa aerobia, crecimiento en aminoácidos, actividad hidrocarbonoclastica y relación entre concentración bacteriana y varios parámetros fisicoquímicos (salinidad, pH, concentración de oxígeno, nitritos, nitratos, amonio y fosfatos), así como distancia a la costa de cada muestreo.

Los resultados obtenidos con respecto a las bacterias del área, éstas no presentaron actividad degradadora de petróleo crudo (btoc I) y si una total capacidad de crecimiento en aminoácidos, por otro lado no se encontró una relación significativa entre concentración bacteriana y los parámetros fisicoquímicos, al igual que con la distancia a la costa.

I INTRODUCCION

Las bacterias desempeñan un papel importante en el ambiente marino, ya que están consideradas como uno de los principales agentes responsables del flujo de energía tanto heterotrófica como autotrófica en el sistema marino, de los procesos de mineralización o sea la conversión de elementos orgánicos a inorgánicos, de la formación de depósitos minerales y de nutrientes necesarios para otros organismos (Dawes, 1986). Las bacterias marinas con base en su tipo de metabolismo se dividen en :

- a) Autótrofas, obtienen su energía de la luz solar (fotótrofas) o por exudación de compuestos nitrogenados o sulfurosos (quimioautótrofos), son capaces de sintetizar sus propios alimentos a partir de compuestos inorgánicos.
- b) Heterótrofas, obtienen su energía de la descomposición de materia orgánica, requieren de los nutrientes que ésta presenta ya que no pueden formar sus propios alimentos (saprófitas y parásitas) (Dawes, 1986). Dentro de las saprófitas marinas hay una parte de ellas que tiene la capacidad de alimentarse del petróleo, éste representa un origen de carbón para formación de material celular y una fuente de obtención de energía, a éste grupo de bacterias se les denomina hidrocarbonoclasticas o degradadores de petróleo.

I. 1 DEGRADACION DEL PETROLEO

El petróleo está formado por más del 98 % de hidrocarburos, estos contienen carbón e hidrógeno; el 2% restante son derivados de hidrocarburos que contienen oxígeno, azufre, nitrógeno o una combinación de estos. Estos componentes del petróleo se agrupan en 4 clases (Nelson-Smith, 1973):

- a) Parafinas (alcanos), compuestos estables, saturados, con ramas rectas o en cadena.
Su fórmula $C_n H_{2n + 2}$.

- b) Nafténos (cicloparafinas) , saturados, las terminaciones de las cadenas estan unidas formando anillos; algunos anillos pueden reemplazarse por grupos alquilo. Con fórmula $C_n H_{2n}$.
- c) Aromáticos, compuestos cíclicos, insaturados, basados en un anillo de benceno, algunos hidrógenos pueden reemplazarse por grupos alquilo. Tiene 6 hidrógenos menos por anillo.
- d) Olefinas (alquenos), compuestos insaturados, no cíclicos, con 2 o pocos hidrógenos por cada carbono, estos no se encuentran en el petróleo crudo.

El petróleo puede ser transformado o degradado por agentes físicos, químicos y biológicos, (Fig. 1). Dentro de los biológicos se encuentran microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (Zobell, 1971). Las bacterias pueden metabolizar casi todo tipo de material orgánico natural y una gran variedad de origen sintético. De acuerdo con Gunkel (1968) el carbono es uno de los factores limitantes más importantes para el crecimiento bacteriano en el mar, normalmente el carbono se encuentra en una concentración menor a 2 mg/litro; los hidrocarburos pueden ser una fuente principal o extra de carbono. Söhngen en 1913 reporta por primera vez que las bacterias son capaces de degradar el petróleo, parece ser que donde quiera que haya un derrame de petróleo las bacterias pueden degradarlo, mientras estan presentes en el medio. Se conocen más de 100 especies de bacterias capaces de oxidar hidrocarburos y productos del petróleo, pertenecientes a diversos géneros entre los que se encuentran *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, etc., (Zobell, 1946; Voroshilova y Dienova, 1950).

Bajo condiciones favorables las bacterias hidrocarbonocísticas degradan prácticamente cualquier hidrocarburo, desde metano hasta residuos pesados. Las parafinas son degradadas más facilmente, los formados por 10-16 carbonos son rápidamente degradados y los compuestos aromáticos son fuentes aceptables de carbono y energía; aunque los más pesados son más difíciles de atacar por su mayor dificultad de dispersión. Stone,

Frenske y White (1942) reportan que un organismo adaptado para degradar sólo parafina, puede continuar su crecimiento sin resistencia utilizando un aromático semejante al naftaleno. Cuando las bacterias crecen en un hidrocarburo puro, cerca de una tercera parte del carbono se usa en fabricar nuevas células y el resto sirve para obtención de energía metabólica (Zobell, 1959).

AGENTES PARTICIPANTES EN LA DEGRADACION DEL PETROLEO

La participación de agentes físicos y químicos ayudan a la transformación del petróleo, favoreciendo con esto la intervención de los agentes biológicos, que de acuerdo a ciertas condiciones ambientales podran actuar en favor de la degradación del hidrocarburo (Fig. 1).

A) DISPERSANTES MECANICOS

El petróleo derramado en el mar tiende naturalmente a extenderse sobre la superficie del agua hasta formar una capa delgada (Berridge *et al.* 1968), este proceso es inversamente proporcional a la viscosidad del hidrocarburo, la cual hace decrecer la tasa de extensión (Fay, 1969), sin embargo existe dispersión mecánica por viento, oleaje, mareas y corrientes, siendo estos dispersantes más importantes que la sola tendencia natural de dispersión.

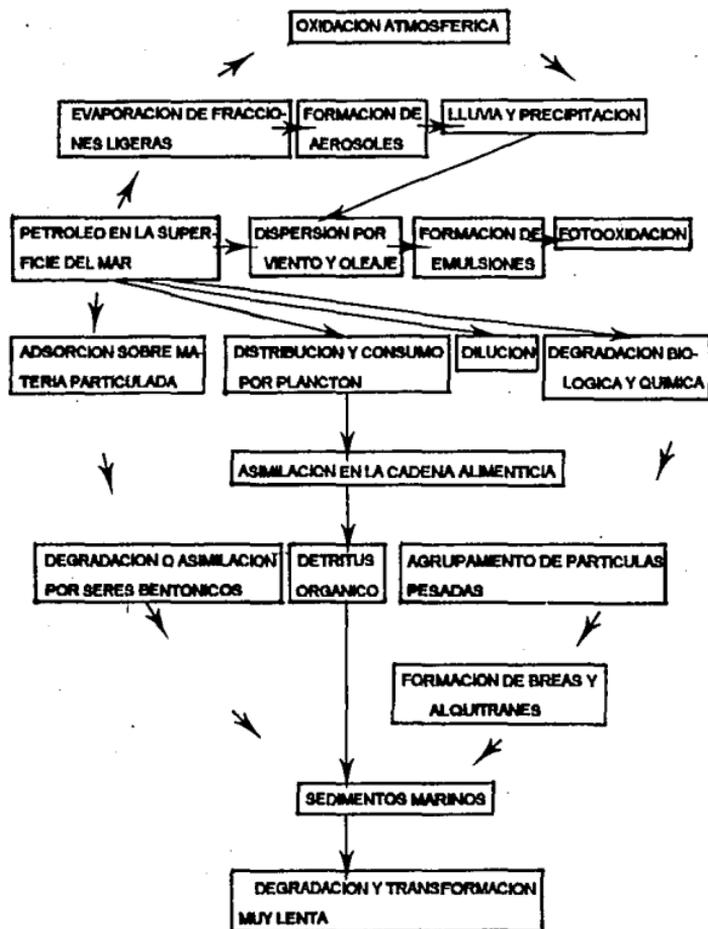


Figura 1. PRINCIPALES PROCESOS QUE TRANSFORMAN O DEGRADAN EL PETRÓLEO EN EL AGUA DE MAR (Botello, 1979).

B) SOLUBILIDAD

Existe cierta solubilidad de algunos hidrocarburos en el agua de mar, principalmente parafinas y aromáticos de peso molecular bajo. Parker, Freearge y Hatchard (1971), reportaron que la solubilidad de parafinas de cadenas rectas de peso molecular bajo disminuye un potencial de 10 por cada dos átomos de carbono adicionales, de 100 ppm en compuestos de 6 carbonos a 0.001 ppm en los que tienen 16 carbonos.

C) EVAPORACION

Esta se lleva a cabo rápidamente en compuestos con puntos de ebullición bajos, generalmente de bajo peso molecular, continuando sucesivamente con las fracciones con puntos de ebullición más altos (Berridge *et al.* 1968).

D) FOTOOXIDACION

Este proceso también interviene en la transformación de los componentes del petróleo, como las parafinas y los aromáticos. La fotooxidación es rápida a longitudes de onda más cortas que 300 nm. Bajo luz natural y longitudes de onda de 300 - 350 nm la tasa de fotooxidación es más lenta (Parker *et al.* 1971). Muchos de los productos de la oxidación son solubles en agua. Este proceso es catalizado por algunos metales presentes en el petróleo crudo, como el vanadio y es inhibido por compuestos de azufre (Dood, 1971).

1.2 FACTORES FISICOS Y QUIMICOS QUE AFECTAN LA DEGRADACION DEL PETROLEO POR BACTERIAS MARINAS

OXIGENO

La mayoría de las bacterias necesitan de oxígeno disuelto para degradar completamente el petróleo, la cantidad requerida depende del tipo de hidrocarburo a degradar (Tabla 1). De acuerdo con Floodgate (1979) y Zobell (1964) la demanda teórica de oxígeno es de 1 g para oxidar 3.5 g de petróleo. Este elemento es importante, debido a que las vías principales para degradar tanto hidrocarburos saturados como aromáticos involucran oxigenasas y oxígeno molecular. El agua de mar contiene sobre 15 mg de oxígeno por litro, siendo más alta su concentración en aguas costeras templadas. La fotosíntesis adiciona 5 $\mu\text{g/L/día}$ (Stemann, 1960).

Tabla 1. CANTIDADES DE OXIGENO (mg) REQUERIDO PARA OXIDAR 1 mg DE HIDROCARBURO A DIOXIDO DE CARBONO Y AGUA (PROKOP, 1966)

Hidrocarburo	O (mg)
etano	1.3
hexano	3.53
benzono	3.08
tolueno	3.13
xileno	3.17
naftaleno	3.00
octano	3.5

Investigadores como Bailey *et al.* (1973) y Ward *et al.* (1980) apoyan el hecho de que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos es muy poco común en la naturaleza, sin embargo varios autores sugieren que el nitrato y sulfato pueden funcionar como aceptores de electrones

durante la respiración anaerobia de hidrocarburos (Bailey *et al.* 1973; Brown *et al.* 1969 a y b; Pierce *et al.* 1975; Zobell *et al.* 1966).

NITROGENO, AZUFRE, FOSFORO Y FIERRO

Algunas bacterias pueden usar el nitrato, de éste se requieren 4 mg para oxidar completamente 1 mg de petróleo mineral; las capas superiores del agua marina contienen un máximo de 0.1 mg/L (Zobell, 1964).

También se ha reportado la oxidación de hidrocarburos por sulfatorreducción bajo condiciones anaeróbicas, sin embargo esta actividad es baja (Novelli y Zobell, 1944; Rosenfield, 1947). Zobell y Prokop (1966) encuentran que *Desulfovibrio* y *Desulfomaculum* pueden degradar petróleo bajo condiciones anaeróbicas. Atlas (1981) dice que en ambientes anaeróbicos la biodegradación es lenta y pueden permanecer indefinidamente contaminados.

Izyrova (1952) reportó un incremento de 4-10 veces la tasa de degradación anaeróbica con la adición de nitrato y fosfato; Johnstone (1970) encuentra también que el nitrato es un requisito importante y que la carencia de éste y de fósforo limitan a las bacterias anaeróbicas. Atlas y Bartha (1973 b) encontraron un fertilizante de nitrógeno oleofílico (urea parafinizada) y fósforo (octilfosfato) que supera la carencia de estos elementos en el agua de mar y estimula la biodegradación de petróleo. Bergstein y Vestal (1978) reportaron que fertilizantes oleofílicos ayudan a aumentar la biodegradación de crudo en derrames sobre aguas oligotróficas, sin la adición del nitrógeno y fósforo tal actividad se ve limitada. Sin embargo Le Petit *et al.* (1976) reporta que altas concentraciones de fósforo inhiben el crecimiento bacteriano. Dibble y Bartha (1979) reportan que adicionar octato férrico o quelato de hierro a una mezcla de urea parafinizada y octilfosfato, es un tratamiento adecuado para estimular la biodegradación.

TEMPERATURA

La temperatura es un factor importante que afecta el proceso de degradación de hidrocarburos por bacterias. Esta descomposición puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas (Atlas, 1981) y depende grandemente de la composición del petróleo (Atlas, 1975). Ludzack y Kinkad (1956) incubaron 100 mg de aceite de motor en 1 litro de agua oxigenada, obteniendo como resultado que a 25° C se degradó el 50 % en los primeros 15 días, a ésta temperatura después de 6 semanas el 80 % se destruyó. A 10° C se degradó del 20-30 % y a 5° C no hubo cambio aparente. Pipel (1968) puntualiza que no ocurre degradación en las regiones polares, sin embargo Zobell (1973) y Traxler (1973) reportaron biodegradación a una temperatura de 0 °C. Byrom y Beestall (1971) sugieren que ciertas bacterias pueden oxidar hidrocarburos a -2° C (punto de congelación del agua de mar). Gunkel (1967) informó de una baja utilización de petróleo a bajas temperaturas. Otro caso se da en el extremo opuesto, Klug y Markovetz (1967 a, b) y Mateles *et al.* (1967) encontraron degradación a 70 °C.

Así mismo, los cambios estacionales de la comunidad microbiana pueden también influir en la tasa de degradación de hidrocarburos a una determinada temperatura. Atlas y Bertha (1973 a) encontraron un mayor número de microorganismos capaces de degradar petróleo y una tasa de degradación significativamente mayor a 5 °C durante el invierno que en el verano.

Los efectos de la temperatura sobre la degradación dependen de los hidrocarburos presentes en la mezcla de petróleo. Bajas temperaturas retardan la tasa de volatilización de hidrocarburos de peso molecular bajo, algunos de los cuales son tóxicos para los microorganismos hidrocarbonoclasticos; se ha comprobado que la presencia de estos componentes tóxicos retardan la biodegradación del petróleo a temperaturas bajas. A 20 °C se observa que el petróleo ligero tiene grandes pérdidas de hidrocarburos por volatilización,

haciéndolo más susceptible a la biodegradación en comparación con petróleo más pesado; esto hace que la tasa de mineralización para el petróleo más pesado sea significativamente más baja que para el petróleo más ligero (Atlas y Bartha, 1972). Así mismo otros investigadores encontraron que el hielo restringe grandemente la pérdida de hidrocarburos ligeros y que la biodegradación de petróleo sobre hielo es imposible (Atlas, 1977; Atlas et al. 1978).

Ward y Brock (1976) estudiaron los efectos de factores ambientales sobre la tasa de oxidación de hidrocarburos en lagos templados, encontrando que los biodegradadores permanecen todo el año, pero hubo variaciones estacionales en las tasas de oxidación, las cuales estaban relacionadas con la temperatura. Durante el invierno, primavera y otoño, la temperatura fué el factor limitante.

SALINIDAD

Ward y Brock (1976) realizaron experimentos de biodegradación en ambientes hipersalinos, concluyeron que la tasa metabólica se reduce grandemente en salinidades extremas y pone en duda si en verdad ocurre biodegradación en ambientes hipersalinos.

PROFUNDIDAD

La utilización de materia orgánica por bacterias en mar profundo está grandemente restringida (Jannasch, 1971) y al parecer sucede lo mismo con los hidrocarburos. Se ha reportado que la tasa de degradación de hidrocarburos bajo presiones altas es significativamente menor que a presión atmosférica. Esto indica que el petróleo presente en el fondo del océano puede permanecer por largo tiempo (Schwarz et al. 1974, 1975).

El aporte de petróleo en el mar puede provenir de varias fuentes ya sea de derrames

naturales en el océano o por aporte de la actividad humana, por lo tanto, la presencia de bacterias degradadoras de petróleo en el ambiente indican el grado de afectación del área por hidrocarburos. Pfaender y Buckley (1984) han revisado gran parte de los estudios relacionados con bacterias degradadoras de petróleo y concluyeron que su número y tasa poblacional (con las bacterias totales o con las heterótrofas viables) se incrementa en áreas contaminadas con petróleo, por lo cual, la relación de bacterias degradadoras de petróleo con bacterias heterótrofas viables se usa como un índice estimable de derrames de petróleo en el medio marino, y para determinar el grado de afectación del área por petróleo, se ha elaborado una escala en base al porcentaje de bacterias hidrocarbonocásticas (Lizárraga *et al.* 1990) (Tabla 2).

Tabla 2. ESCALA CUALITATIVA PARA CLASIFICAR AREAS IMPACTADAS POR APORTES DE HIDROCARBUROS FOSILES (Lizárraga *et al.*, 1993)

CLASIFICACION	% HIDROCARBONOCLASTICAS
AREA MUY AFECTADA	50% EN ADELANTE
AREA AFECTADA	6 AL 49%
AREA POCO AFECTADA	1 AL 5%
AREA NO AFECTADA	MEJOR AL 1%

II OBJETIVOS

- 1.- Cuantificar la población bacteriana heterótrofa de agua superficial y de fondo del Golfo de Tehuantepec, México.
- 2.- Cuantificar la población de bacterias hidrocarbonocústicas de agua superficial y de fondo del Golfo de Tehuantepec.
- 3.- Correlacionar los resultados del conteo de heterótrofas aerobias con los parámetros fisicoquímicos de salinidad, pH, oxígeno disuelto y nutrientes cuantificados.
- 4.- Comprobar si algunos aminoácidos presentes en el agua de mar tienen algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano.

III AREA DE ESTUDIO

El Golfo de Tehuantepec se encuentra situado entre Puerto Angel, Oaxaca y la Barra del Río Suchiate, Chiapas, en el Océano Pacífico, (Fig. 2) (Secretaría de Marina, 1980).

En esta zona la circulación de masas de agua es dominada por la Corriente de California y la Corriente Norecuatorial, como parte del gran giro anticiclónico del Pacífico Norte (Wyrki, 1968 en Pedraza, 1991), con lo anterior y debido a que su plataforma y talud continentales presentan una forma de V, proporcionan una mayor renovación de masas de agua (Munk, 1955 en Pedraza, 1991). El Golfo de Tehuantepec se caracteriza por los Nortes o Tehuanos, de octubre a marzo; estos vientos forman un área de surgencias cerca de las costas de Oaxaca y Chiapas en donde las aguas profundas con alto contenido de micronutrientes y bajas concentraciones de oxígeno alcanzan la superficie (Vázquez, 1989), mezclando las aguas superficiales con la capa inferior que contiene aguas ecuatoriales, cuyo origen es de la zona tropical del Pacífico Centro y que se sitúa entre los 50 y 500 m de profundidad (Secretaría de Marina, 1980). La región del Golfo de Tehuantepec se encuentra dentro de la zona tropical, siendo el clima por lo general húmedo con abundantes lluvias, presentándose la mayor precipitación en el mes de junio y hacia finales del otoño, variando desde 800 hasta 1600 mm anuales (Turner, 1992).

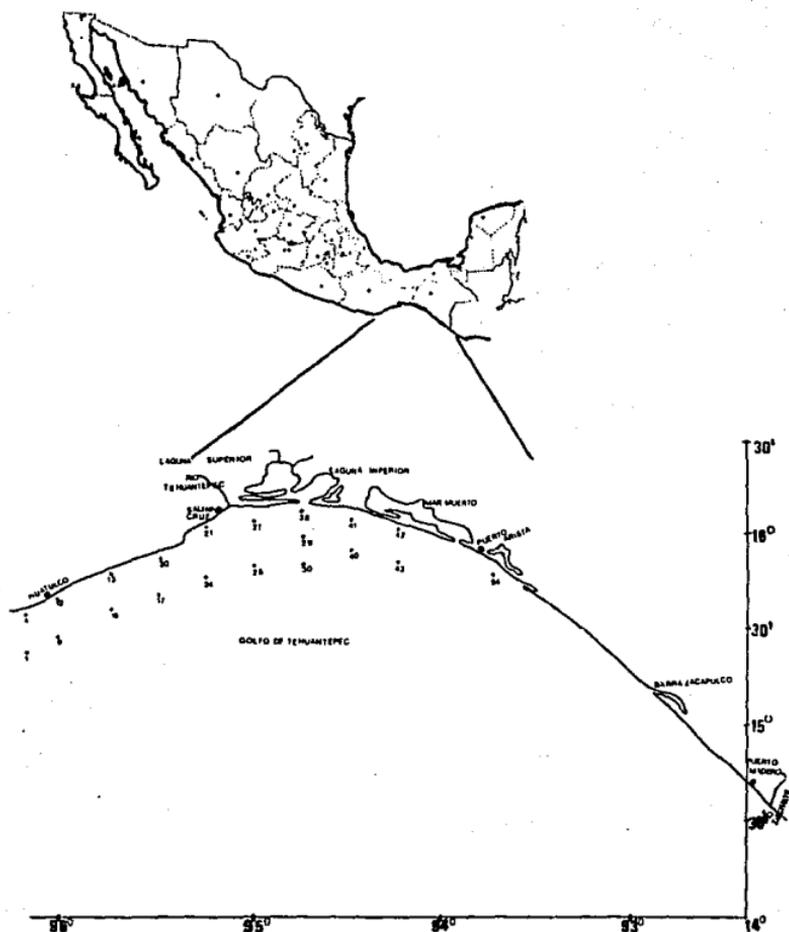


FIGURE 2. ESTACIONES MUESTREADAS EN EL GOLFO DE TEHUANTEPEC, EN LA CAMPAÑA OCEANOGRÁFICA POLIBENTIL.

IV MATERIAL Y METODOS

El material biológico del presente estudio se colectó durante la Campaña Oceanográfica FIQUIMBI II efectuada del 21 al 29 de Julio de 1982, en el Golfo de Tehuantepec, México; a bordo del buque oceanográfico "El Puma" de la UNAM.

OBTENCION DE MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de agua superficial y de fondo en 20 estaciones (Fig. 2), éstas fueron colectadas con bolsas bacteriológicas Niskin (Niskin, 1962) y procesadas inmediatamente, en condiciones estériles se efectuaron diluciones decimales en serie de tres (1:10, 1:100, 1:1000) con medio mineral diluido para obtener tres concentraciones diferentes de bacterias (Fig. 3).

IV. 1 BACTERIAS HETEROTROFAS

Para la selección y conteo en placa de bacterias heterótrofas por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), de cada dilución se tomaron 0.1 ml y se sembró por duplicado en cajas con medio peptonado Zobell 2216-E (Oppenheimer y Zobell, 1952), incubándose a 30 °C. Las lecturas se realizaron a 48 y 72 horas después.

Posteriormente en el Laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, se procedió al aislamiento y purificación de las cepas bacterianas. Esto se llevó a cabo por el método de resiembrado en placa. Del cultivo original se tomó al azar con una asa de siembra una muestra de cada colonia bacteriana que se visualizó diferente, esto se hizo para cada estación y se sembró por estirpe en cajas con medio Zobell, a partir de este nuevo cultivo se inició el proceso de resiembrado para separar los distintos tipos de bacterias que

puieran estar presentes en la colonia. Se tomó con el asa una pequeña cantidad de la colonia y se diluyó en caldo Zobell previamente preparado y esterilizado, se toma una muestra de este caldo y se siembra por estria en otra placa de Zobell, se debe estriar muy bien para lograr separar cada célula bacteriana, pueden realizarse una o más diluciones, dependiendo del grado de separación de las células; se incuba a 35 °C por 24 horas, después de este tiempo se selecciona una colonia y se hacen observaciones morfológicas en vivo al microscopio óptico, para saber si el cultivo es puro, es recomendable hacer las observaciones morfológicas sobre cultivos nuevos y no refrigerados porque a bajas temperaturas las células bacterianas tienden a deformarse y hacer con esto más difícil su correcta caracterización. Las cepas puras se conservan en frascos pildoreros con tapón de rosca que contienen 10 ml de medio Zobell inclinado, cuando la cepa ha crecido bien, se llena el frasco con aceite mineral estéril, para evitar que el cultivo se seque; y se guardan en el refrigerador.

Para los caracteres morfológicos se tomaron en cuenta:

- Forma celular (bacilos, cocos, bacilococos, etc.)
- Agrupación celular (cadenas, duplos, tetradas, etc.)
- Color de la colonia
- Presencia o ausencia de espora
- Espora deformante o no
- Tipo de Gram

Los datos de Salinidad, Ph, Oxígeno disuelto, NO₂, NO₃, NH₃ y PO₄, fueron proporcionados por el personal del Laboratorio de Fisicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM, quienes participaron en la Campaña Oceanográfica FIQUIMBI II junto con nuestro equipo de trabajo.

IV. 2 BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS

En frascos pildoreros con tapón de rosca conteniendo 10 ml de medio mineral (Lyman y Fleming, 1940) enriquecido con fósforo y nitrógeno y 50 µl de petróleo crudo Ixtoc I, se inoculó 0.1 ml de la muestra original y se incubó a temperatura ambiente, para el posterior conteo de bacterias por el método de Número Más Probable (NMP) (Mills, 1978), la revisión de estos frascos se realizó 3, 6 y 12 meses después.

IV. 3 PRUEBA CON AMINOACIDOS

Esta prueba se realizó con 62 cepas bacterianas, obtenidas de la Campaña Oceanográfica FIQUIMBI II.

Cada cepa pura se sembró en caldo Zobeil y se incubó a 35° C por 48 hrs. Se prepararon piezas de microtitulación con medio base más un aminoácido, a las cuales se les inoculó 50 µl del cultivo bacteriano y se incubaron a 30° C. El control fue el medio base sin aminoácido. Los aminoácidos empleados fueron Arginina, Asparagina, Acido Glutámico, Cisteína, Leucina, Lisina, Metionina, Ornitina, Treonina y Valina. Los resultados positivos son aquellos en donde hubo crecimiento. A las lecturas obtenidas se les aplicaron las siguientes dos pruebas:

Índice Medio de Utilización (IMU) (Blanchi, 1971)

Este se refiere al promedio del uso de un sustrato, de una familia química o del total de sustratos probados y se obtiene de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$IMU = P/N$$

P= Porcentaje de utilización para cada sustrato.

N= Número total de sustratos probados.

Índice de Capacidad Catabólica (C.C.) (Lizárraga-Parfida, 1979)

Indica la proporción de sustratos que son utilizados por los cepas o al menos una cepa de un grupo dado; si el valor obtenido es cercano a cero, se tiene que la utilización de ese sustrato o sustratos es específica, la expresión matemática es:

$$C.C. = (nP/N) \cdot 100$$

n= Número de porcentajes

P= Porcentajes mayores que cero

N= Número de sustratos probados de una familia química

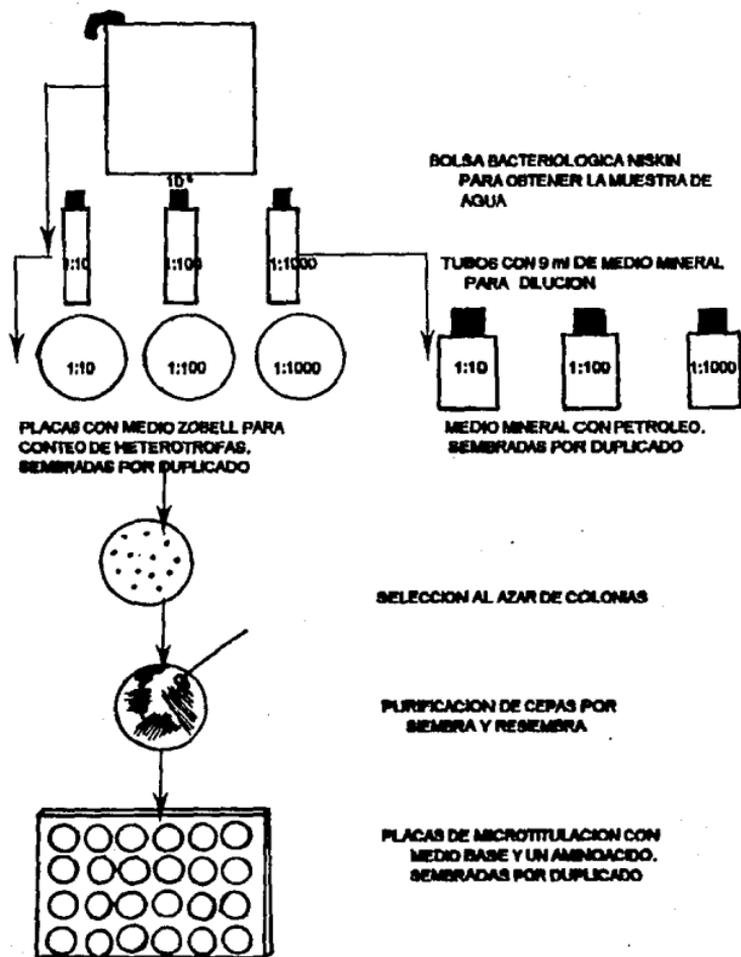


Figura 3. METODOLOGIA

V RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos del procesamiento de 20 muestras colectadas durante el crucero FIQUIMBI II a lo largo del Golfo de Tehuantepec, México, en la época de verano de 1992.

BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS

Los frascos pildoreros conteniendo el medio para las bacterias degradadoras de petróleo, después de 3, 6 y 12 meses de incubación no presentaron ningún cambio al compararlo con el control, por lo tanto se deduce que las bacterias inoculadas no llevaron a cabo el proceso de degradación; cuando este ocurre se forma una emulsión agua-petróleo adquiriendo una coloración café (como mousse de chocolate), debido a la particulación del petróleo (Fig. 4).

BACTERIAS HETEROTROFAS

La población bacteriana se obtuvo por medio del conteo en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), el cual nos proporciona el número de bacterias viables por mililitro (Tabla 3). Encontrándose que la población más alta correspondió al agua superficial (2 530 UFC/ml) y el más bajo (10 UFC/ml) a agua superficial y de fondo; el promedio fué de 462.2 UFC/ml.

Las altas poblaciones tanto de fondo como superficie corresponden al área cercana a la desembocadura del Sistema Lagunar del Golfo de Tehuantepec (Laguna Superior, Laguna Inferior y Mar Muerto) (Fig. 5)

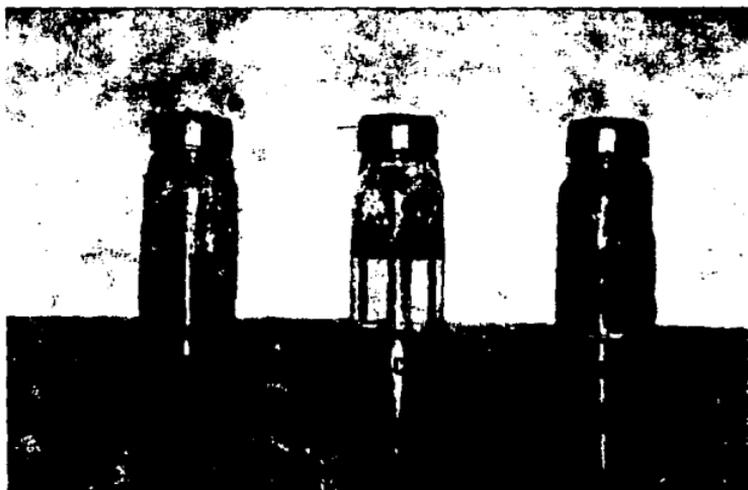


Figura 4. FRASCOS CON MEDIO MINERAL CON PETROLEO, A Y B MUESTRA QUE HAY DEGRADACION DE PETROLEO, C ES EL MEDIO CONTROL.

Table 3. NUMERO POBLACIONAL DE BACTERIAS HETEROTROFAS EN EL GOLFO DE TEHUANTEPEC, MEXICO, DURANTE EL PERIODO DEL 22 AL 29 DE JULIO DE 1992.

ESTACION	LATITUD	LONGITUD	PROFUNDIDAD	No. BACTERIA/ml
1	15° 16' N	96° 09' O	SUPERFICIE	20
4	15° 30' N	96° 10' O	SUPERFICIE	50
4	"	"	FONDO	20
9	15° 31' N	96° 02' O	SUPERFICIE	10
12	15° 44' N	96° 02' O	SUPERFICIE	20
12	"	"	FONDO	10
13	15° 51' N	96° 44' O	SUPERFICIE	20
13	"	"	FONDO	50
16	15° 41' N	96° 43' O	SUPERFICIE	10
17			SUPERFICIE	770
20	15° 54' N	96° 29' O	SUPERFICIE	50
20	"	"	FONDO	320
21	16° 03' N	96° 14' O	FONDO	2080
24	15° 50' N	96° 14' O	SUPERFICIE	10
24	"	"	FONDO	150
25			SUPERFICIE	880
25			FONDO	480
27	16° 07' N	94° 58' O	SUPERFICIE	10
28	16° 08' N	94° 45' O	FONDO	60
29	16° 02' N	94° 44' O	SUPERFICIE	60
29	"	"	FONDO	INCONTABLE
30	15° 30' N	94° 45' O	SUPERFICIE	2530
30	"	"	FONDO	1170
40	15° 09' N	94° 30' O	SUPERFICIE	2900
41	15° 07' N	94° 30' O	SUPERFICIE	180
42	15° 03' N	94° 15' O	SUPERFICIE	70
43	15° 54' N	94° 14' O	SUPERFICIE	780
54	15° 50' N	93° 45' O	SUPERFICIE	180

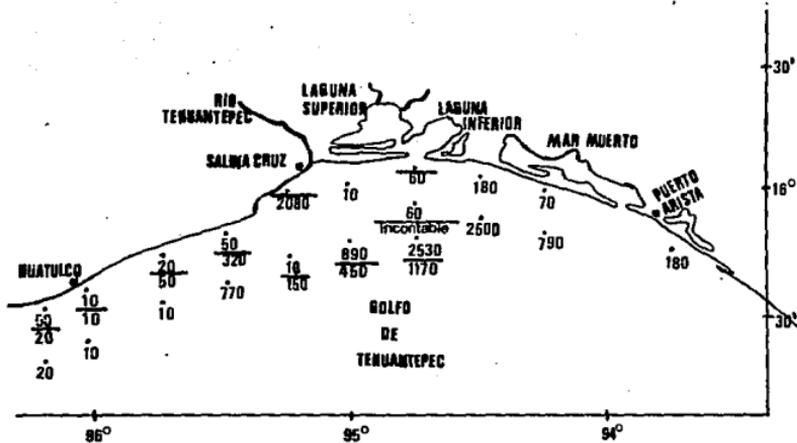


Figure 5. DENSIDAD BACTERIANA (UFC/ml) POR ESTACION SUPERFICIE

FONDO

La relación de densidad bacteriana con los datos de salinidad, Ph, Oxígeno disuelto, NO₂, NO₃, NH₃, PO₄ y distancia del muestreo a la costa, dada en millas náuticas (m n); se observan en las figuras 6 a 13, con dos gráficas (a y b) que corresponden a superficie y profundidad respectivamente; así mismo se incluye el valor del índice de Correlación Linear. Los datos de los parámetros físicoquímicos se encuentran en el Apéndice.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

Se aislaron y purificaron 62 cepas silvestres del Golfo de Tehuantepec, México, las cuales de acuerdo a las observaciones realizadas tienen las siguientes características morfológicas:

TIPO DE GRAM

El 100 % de las bacterias presentó un Gram negativo.

FORMA CELULAR

La forma celular predominante fué la bacilar con una frecuencia del 93.5 %, para cocos de 4.8 % y 1.6 para cocobacilos. También se observó que las formas bacilares presentaron deformaciones cuando se mantenían a bajas temperaturas (4° C).

AGRUPACION CELULAR

El 100 % de las formas bacilares se encontraban individuales o bien en cadenas de 1-9 células, los cocos en tetradas o en pares y los cocobacilos sólo individuales.

ESPORA

Se observó que el 53 % de los bacilos presentaron espora, la cual fué no deformante.

MOVILIDAD

El 79 % de las cepas presentaron movilidad, restringiéndose únicamente a las formas bacilares.

COLOR DE LA COLONIA

El 77.4 % presentaron color de la colonia blanco, el 17.7 % color transparente y el 4.8 % color amarillo, este último lo presentaron únicamente los cocos.

De acuerdo a estas características morfológicas se formaron 10 grupos diferentes:

Grupo 1.- Bacilos delgados, cadenas de 1-5 células, con espora no deformante, móviles, colonia color blanco, Gram negativo.

Grupo 2.- Bacilos delgados, de 1-5 células, sin espora, móviles, colonia blanca, Gram negativo.

Grupo 3.- Bacilos delgados, de 1-4 células, sin espora, móviles, colonia transparente, Gram negativo.

Grupo 4.- Bacilos delgados, de 1-4 células, sin espora, inmóviles, colonia transparente, Gram negativo.

Grupo 5.- Bacilos delgados, de 1-5 células, sin espora inmóviles, colonia blanca, Gram negativo.

Grupo 6.- Bacilos gordos, de 1-4 células, sin espora, inmóviles, colonia blanca, Gram negativo.

Grupo 7.- Bacilos gordos, de 1-8 células, sin espora, móviles, colonia blanca, Gram negativo.

Grupo 8.- Cocobacilos, 1 célula, sin espora, inmóviles, color amarillo, Gram negativo.

Grupo 9.- Diplococos, sin espora, inmóviles, colonia amarilla, Gram negativo.

Grupo 10.- Cocos, tetradas, sin espora, inmóviles, colonia amarilla, Gram negativo.

INHIBICION O CRECIMIENTO BACTERIANO POR AMINOACIDOS.

Se probó el crecimiento de las 62 cepas silvestres obtenidas, en 10 aminoácidos: arginina, L-asparagina, L-cisteína, L-glutamato, L-leucina, L-lisina, metionina, ornitina, L-treonina

y L-valina. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas después del sembrado, se tomaron como positivos aquellos cultivos que presentaron crecimiento de colonias.

Se encontró que los aminoácidos empleados no inhiben el crecimiento bacteriano, ya que todas las cepas presentaron crecimiento positivo (Tabla 4), esto hace suponer que las bacterias pueden crecer y utilizar los aminoácidos que se emplearon.

Los resultados obtenidos para los índices Medio de Utilización fue del 100 % y para la Capacidad catabólica fué de 1, para los aminoácidos empleados.

Tabla 4. CRECIMIENTO BACTERIANO EN 10 AMINOACIDOS.

CEPA	BASE	ARG	L-ASP	L-CIS	L-GLU	L-LEU	L-LIS	MET	ORN	L-TRE	L-VAL
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
155	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
162gb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
210-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
210-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
210-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
217	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
224	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
247	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
254-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
254-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
269t	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
263g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
264	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
300-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
300-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
310	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
317 ch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
324-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
324-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
355	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
365	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
364	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
425	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
431	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
432	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
436	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
436-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
436-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
447 ch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

454op.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
454 t	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
462	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
478-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
478-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
495 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
502	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
508	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
517	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
525 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
540 b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
541 ch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
547 at	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
564 at	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
568-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
568-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
569 ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
575	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
591-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
591-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
591-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
598-b2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
608 a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
607 ch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
613 gt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
630 ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
637 att	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
643 ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

⬆= CRECIMIENTO POSITIVO

FIG. 6a EFECTO DE LA DISTANCIA A LA COSTA SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

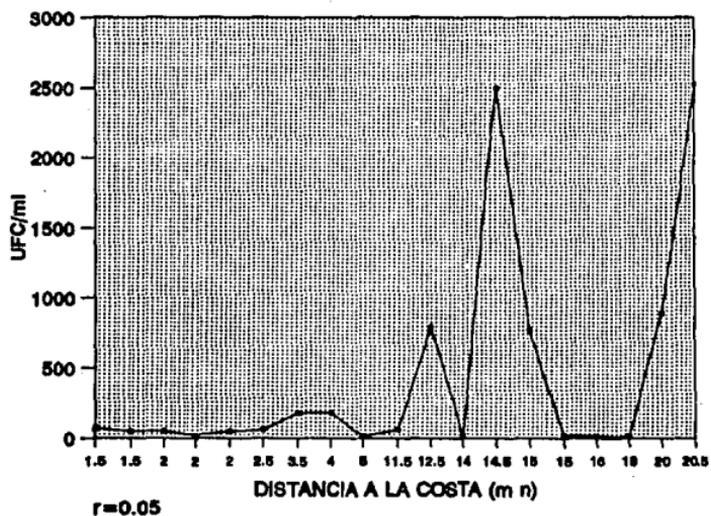


FIG. 6b EFECTO DE LA DISTANCIA A LA COSTA SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

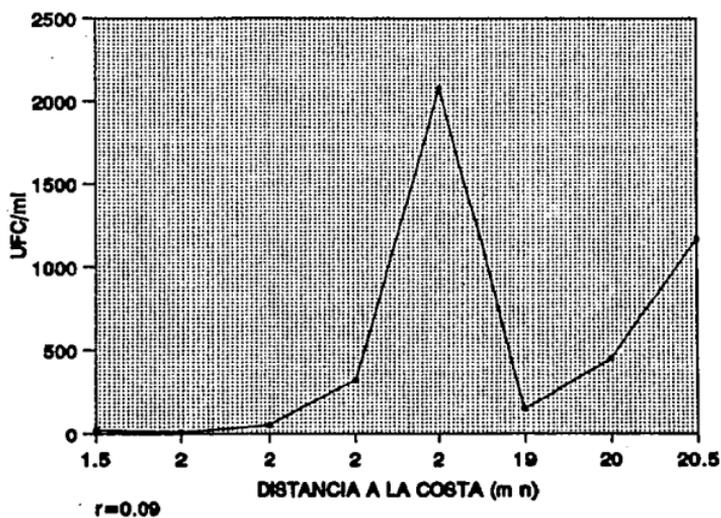


FIG. 7a EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

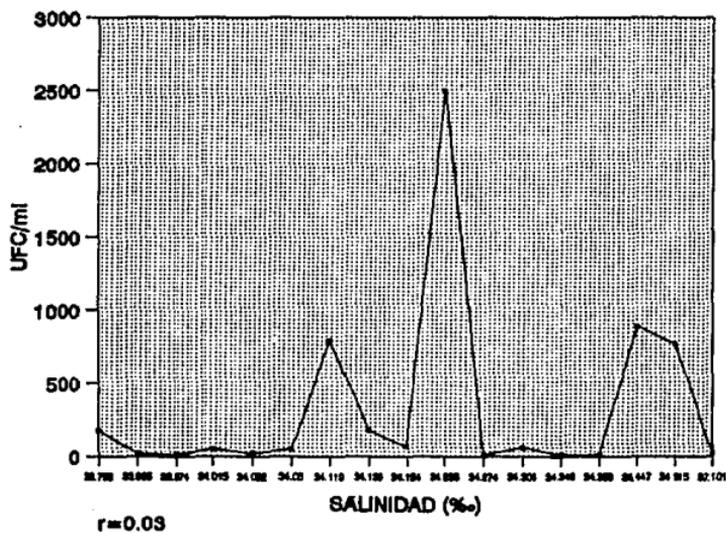


FIG. 7b EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

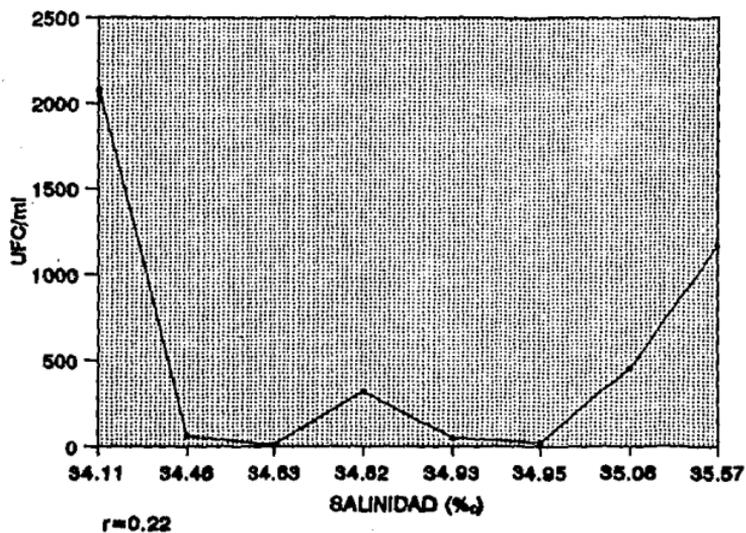


FIG. 8a EFECTO DEL Ph SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

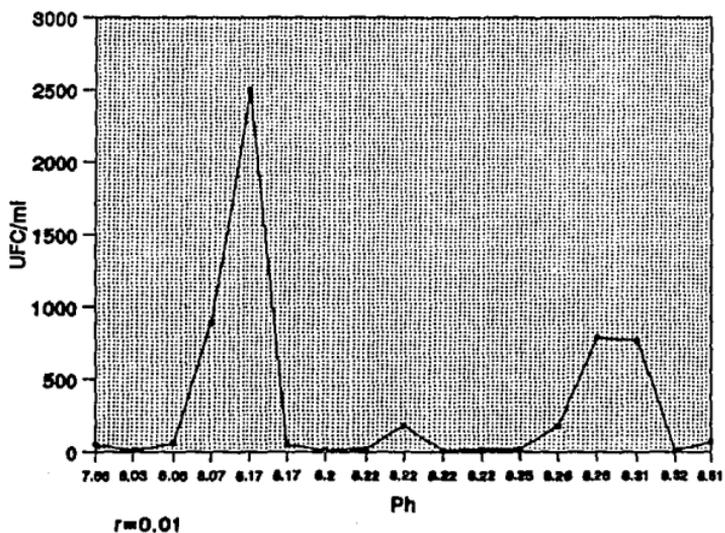


FIG. 8b EFECTO DEL Ph SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA
EN AGUA PROFUNDA

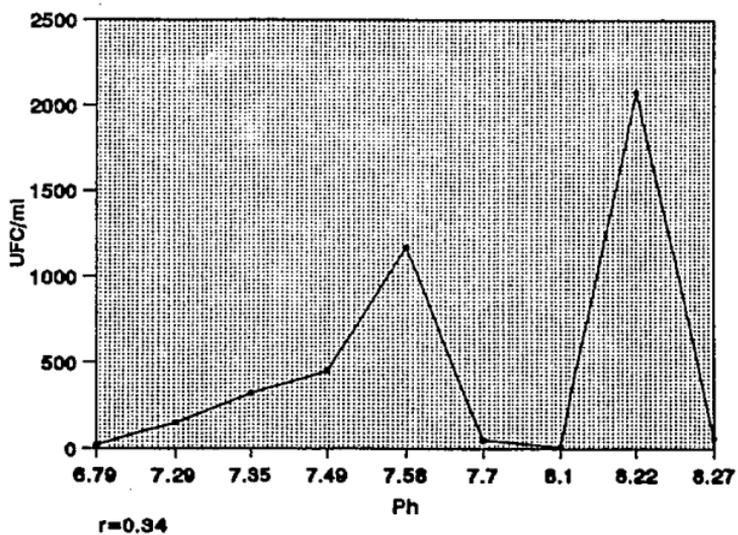


FIG. 8a EFECTO DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

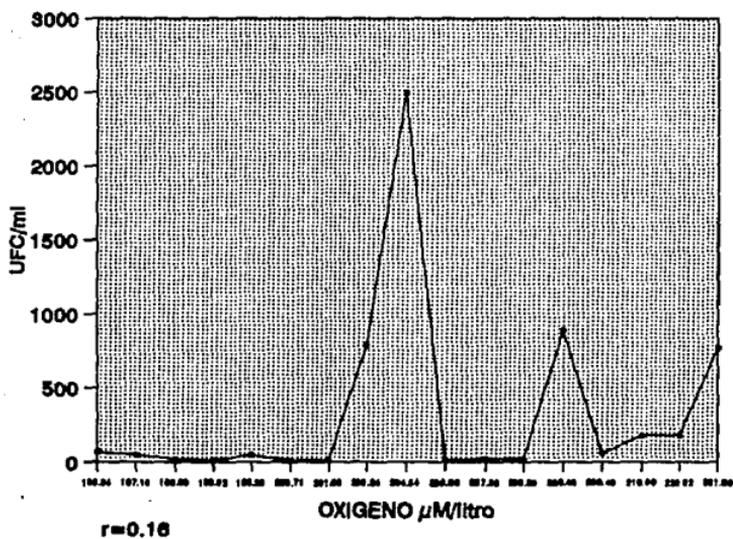


FIG. 96 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

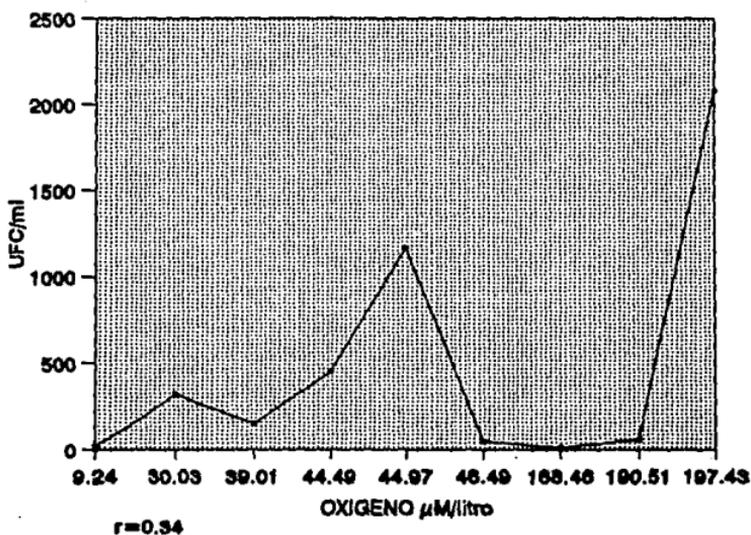


FIG. 10a EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NO₂ SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

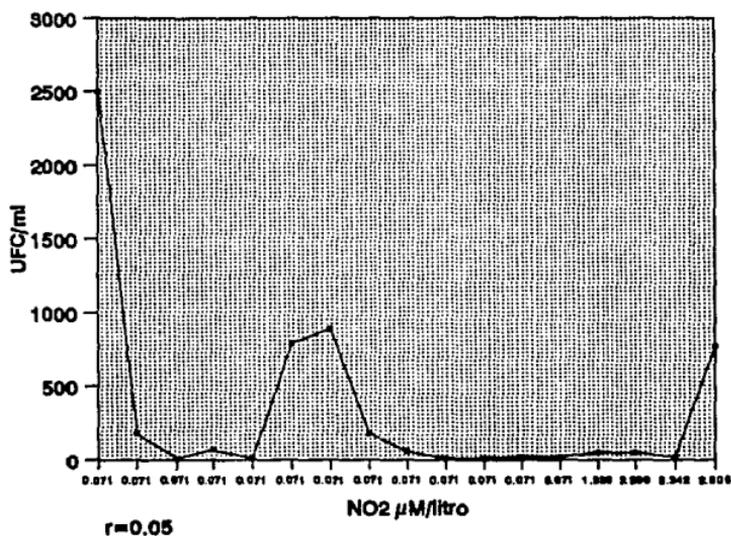


FIG. 10b EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NO₂ SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

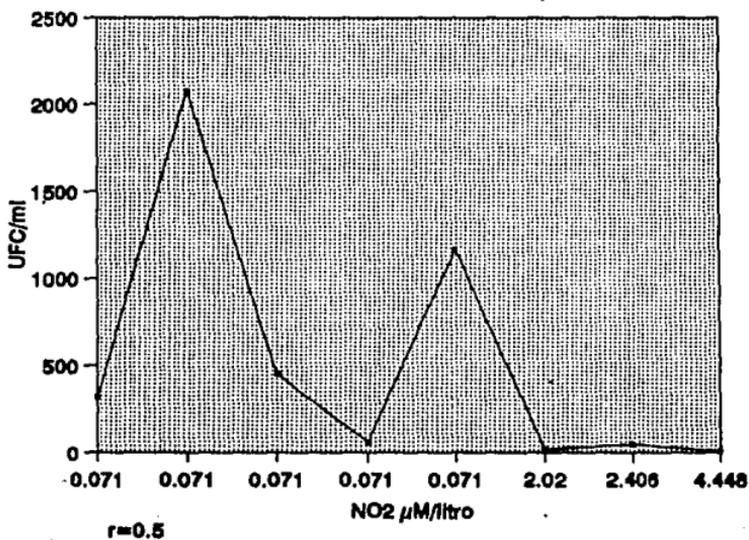


FIG. 11a EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NOS SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

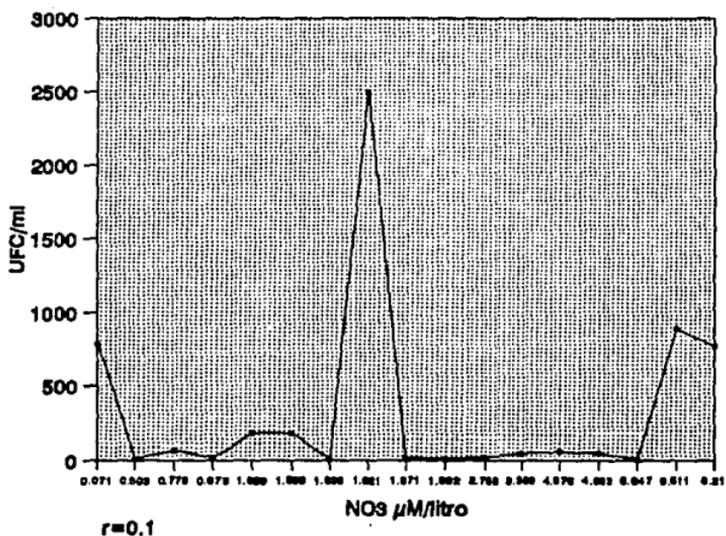


FIG. 11b EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NO₃ SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

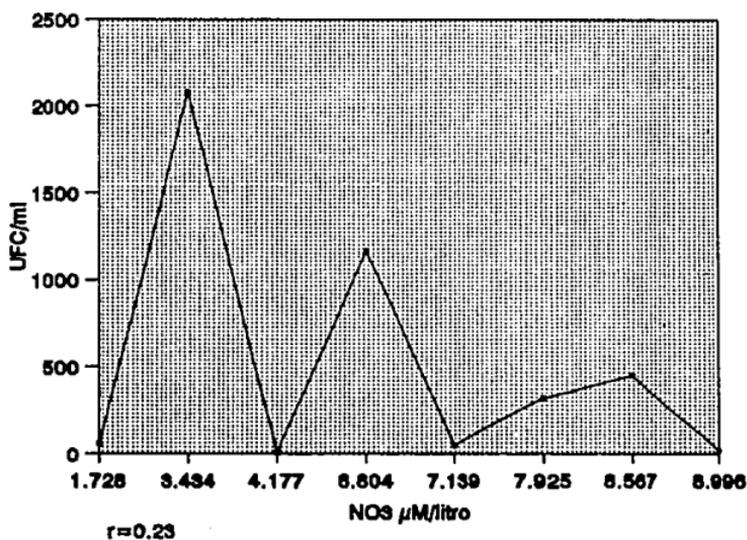


FIG. 12b EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NH3 SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA

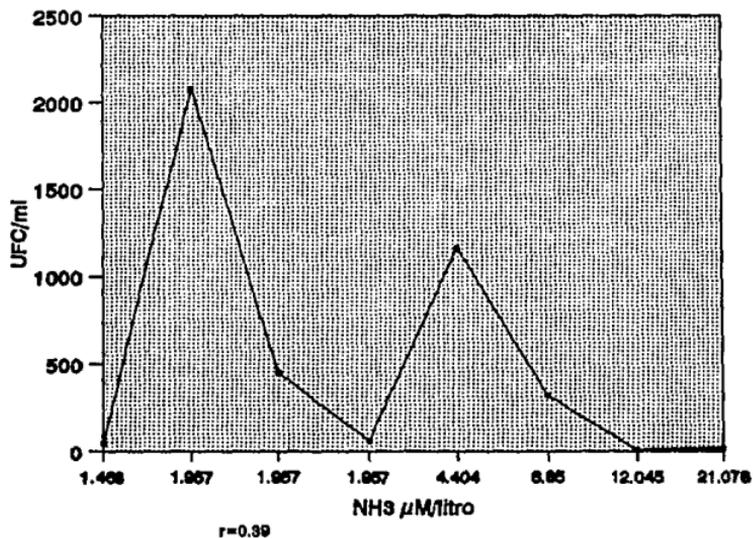


FIG. 13a EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PO4 SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA SUPERFICIAL

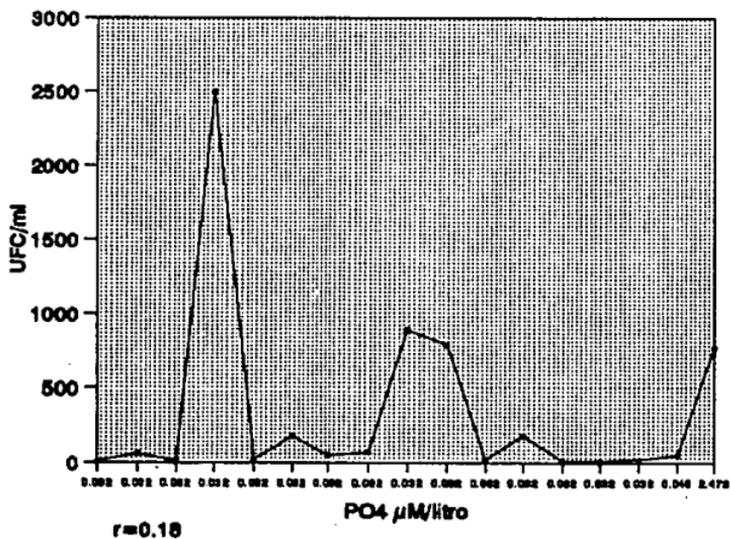
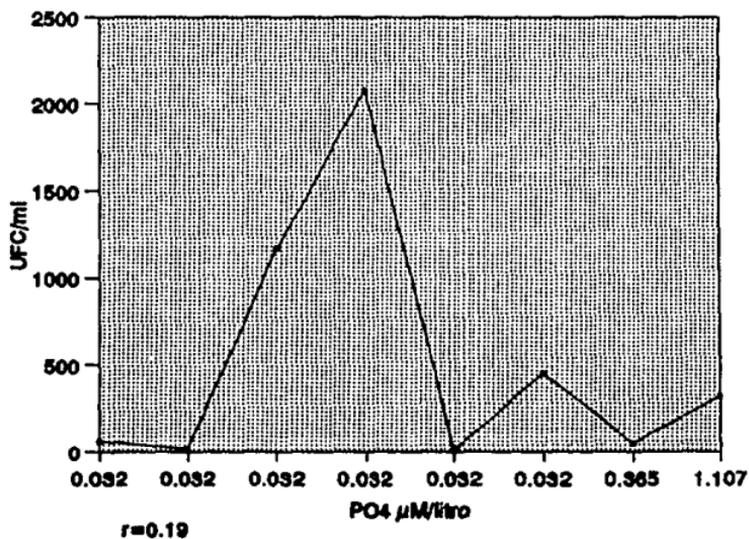


FIG. 13b EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PO4 SOBRE LA DENSIDAD BACTERIANA EN AGUA PROFUNDA



VI DISCUSION

BACTERIAS HETEROTROFAS

En el presente estudio las concentraciones bacterianas más altas se localizan en la región que corresponde a la desembocadura del sistema lagunar del Golfo de Tehuantepec, tanto para agua superficial (10 m) como de fondo (20-30 m), así como para las áreas más cercanas a la costa (1.5 mn) y más lejanas (20.5 mn) (Fig. 5).

La abundancia bacteriana en estas regiones se debe a la concentración de materia orgánica fácilmente asimilable, y por lo tanto a la disponibilidad de alimento, que es mayor en las áreas con altas concentraciones de material orgánico, lo que permite a su vez un mayor desarrollo microbiano heterótrofo (Oppenheimer, *et al.*, 1977). La desembocadura de ríos y lagunas costeras es una fuente rica de materia orgánica, más aún cuando es época de lluvias puesto que al aumentar el desgaste terrestre hay mayor flujo de materia orgánica hacia el mar (Lizárraga *et al.* 1986); la colecta de las muestras se efectuó en verano, época de lluvias en esta región. Como se mencionó anteriormente se encontraron altas densidades cerca y lejos de la costa, de acuerdo a la figura 6 a y b y a los índices de correlación (0.51 y 0.09, respectivamente), no se encontró una correlación significativa entre la densidad bacteriana y la distancia a la costa. De acuerdo con lo anterior se puede decir que la materia orgánica se encontraba con igual disponibilidad en las regiones cercanas a la desembocadura del sistema lagunar. Esto posiblemente es consecuencia de las descargas del sistema lagunar hacia el mar, las cuales son mayores por ser época de lluvias, ocasionando la formación de corrientes con la suficiente fuerza para remover la materia orgánica sedimentada, sumando ésta a la presente en las descargas, homogeneizando la materia orgánica en el agua de mar.

La correlación entre la densidad bacteriana y los parámetros físico-químicos cuantificados no fué estrecha, estos factores son los siguientes:

OXIGENO

En el presente estudio se encontró en promedio 206.59 μM de oxígeno disuelto en agua superficial y 85.62 μM en agua profunda, estos valores se encuentran por debajo de los reportados por Steemann (1960) para el agua de mar (468.75 μM), sin embargo de acuerdo con las gráficas de concentración bacteriana contra concentración de oxígeno disuelto y con el índice de correlación lineal (Fig. 9 a y b) no hay dependencia de la concentración bacteriana con este elemento, esto significa que el oxígeno no es una limitante para el crecimiento bacteriano. Además la concentración promedio de oxígeno en agua superficial (206.59 μM) es suficiente para que pueda llevarse a cabo el proceso de biodegradación de hidrocarburos, en caso de llevarse a cabo éste, se reporta que se necesitan 109.37 μM de oxígeno para oxidar 1 g de petróleo (Floodgate, 1978; Zobell, 1964).

PH Y SALINIDAD

El mar teóricamente presenta un pH de 7.4- 7.5, sin embargo hay diversos factores que lo hacen variar, nosotros obtuvimos un pH de 8.18 para agua superficial y de 7.68 para agua profunda, valores mayores a los teóricos. La salinidad promedio encontrada fué de 34.3 ‰ en agua superficial y de 34.77 en agua profunda, valores ligeramente por debajo del valor promedio para agua de mar que es de 35 ‰ (Campbell, 1977). Con base en las gráficas y en los índices de correlación lineal (Figs. 7, 8 a y b) no se encontró influencia significativa de estos parámetros sobre la densidad bacteriana.

NITROGENO Y FOSFORO

La concentración de nitrógeno en el mar varía de acuerdo a la forma en que se encuentre, época del año, ambiente, etc.. En forma de nitrato se encuentra en una concentración de 7.14 μM , de amonio varía de 2.9 μM a 5.88 μM y de nitrógeno hay bajas concentraciones, generalmente menores a las del nitrato, ya que es rápidamente transformado a

ésta última forma durante el proceso de nitrificación (Campbell, 1977). En este trabajo los valores promedio registrados de nitrato son: para agua superficial 3 μM y para agua profunda 5.54 μM , estas concentraciones son menores a las reportadas para agua de mar. Los datos de amonio son: para agua de superficie 13.9 μM y para agua profunda 6.28 μM , valores que se encuentran en el rango de concentraciones reportado por Campbell (1977).

En cuanto al fosfato, se obtuvieron concentraciones de 0.2 μM en agua superficial y de 0.252 μM en agua profunda, estos valores se encuentran dentro del rango reportado para agua marina por Campbell (1977), el cual va de 0.105 μM a 0.737 μM . Sin embargo, de acuerdo con las gráficas de UFC/ml contra concentración de nutrientes y a los índices de correlación lineal (Figs.10, 11, 12 a y b), no se encontró una correlación significativa, lo que indica que estos nutrientes no se encuentran limitando o estimulando significativamente el crecimiento bacteriano.

El hecho de que los nutrientes no estén afectando el crecimiento bacteriano, posiblemente se debe a que la fuente principal de nitrógeno y fósforo en estos momentos se encuentra en la materia orgánica presente. Además las formas inorgánicas NO_2 , NO_3 y NH_3 , representan las fuentes principales de nitrógeno para los organismos autótrofos más que para los heterótrofos, estos últimos lo toman directamente de la materia orgánica en descomposición, sin embargo el amonio y el nitrato presentes en el agua de mar, pueden ser usados por los heterótrofos para formación de material celular sin representar por esto la fuente principal de abastecimiento.

El fósforo a pesar de ser esencial para la vida por estar presente en fosfolípidos, ácidos nucleicos y ATP, es requerido en bajas cantidades, menores a los requerimientos de nitrógeno y carbón (Campbell, 1977). Sin embargo, sí puede llegar a ser un factor limitante de la fisiología bacteriana; las bacterias hidrocarbonoclasticas en cultivo requieren de una cantidad extra de

nitrógeno y fósforo para optimizar el proceso de degradación, ya que la carencia de estos elementos en un ambiente natural retrasa esta función (Atlas y Bartha, 1972). por lo antes expuesto, al medio de cultivo para bacterias hidrocarbonoclasticas se le enriqueció con nitrógeno y fósforo para tener la concentración óptima de estos nutrientes, para que el nitrógeno y el fósforo no fueran una limitante del crecimiento bacteriano heterótrofo aerobio incluyendo a los tipos degradadores de petróleo. De acuerdo con Alexander (1971), para los heterótrofos acuáticos la limitante nutricional más común es la disponibilidad de carbón orgánico.

Las características morfológicas que presentaron las bacterias aisladas en este estudio coinciden con lo reportado por Campbell (1977) y Dawes (1986), observando que la mayoría fué de forma bacilar, móviles y el 100 % de ellas presentaron tipo de Gram negativo, unicelulares y en cadena. La minoría fueron cocos.

ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLASTICA.

Otra fuente potencial de carbono en el medio marino es el petróleo, sin embargo, su distribución en el mar está restringida en aquellas áreas donde ocurren derrames naturales o accidentales, plataformas de explotación petrolera, zonas de carga y descarga del hidrocarburo, rutas marítimas seguidas durante su transporte y desembocaduras de efluentes terrestres (Botello, 1979). A pesar de que el petróleo no es un componente natural del agua marina, ni única fuente de carbono y energía potencialmente utilizable, existe una variedad de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, capaces de utilizarlo y transformarlo (Zobell, 1971), para la formación de materia celular y así como para la obtención de energía en la oxidación, teniendo como productos finales CO₂ y H₂O o intermediarios (Carlucci *et al.*, 1985).

En el presente estudio se encontró que la población bacteriana del área muestreada en el Golfo de Tehuantepec en la época de verano de 1982, no manifiesta ninguna capacidad de utilizar el petróleo crudo (Ixtoc 1). Tagger *et al.* (1983) reporta que la comunidad bacteriana nativa de un ambiente marino que tiene la capacidad de degradar petróleo, la manifiesta 4 días después de entrar en contacto con él; los cultivos del presente trabajo, después de transcurridos estos 4 días de incubación con petróleo crudo no presentaron señales de que tal proceso se estuviera llevando a cabo, ni siquiera después de 60, 180 y 360 días, tiempo en que fueron revisados nuevamente. De acuerdo con Le Petit *et al.* (1975) una minoría de las bacterias capaces de usar el petróleo presentan los sistemas enzimáticos principales necesarios para ello, la mayoría de ellas desarrollan sistemas adaptativos que aparecen solamente si el organismo entra en contacto con el hidrocarburo, este proceso se activa en unos minutos o en pocos días.

De acuerdo con lo anterior, la comunidad bacteriana estudiada posiblemente no presenta la información genética suficiente para la formación de los sistemas enzimáticos constitutivos o para el desarrollo de un mecanismo adaptativo que le permita hacer uso del petróleo crudo.

Por otro lado, es importante señalar que el Golfo de Tehuantepec, no es un área de explotación petrolera, por lo que el mar no está constantemente expuesto al flujo de petróleo; y si hay hidrocarburos en el área posiblemente se debe a efluentes terrestres, derrames durante su transporte por mar o derrames de combustible durante la navegación de barcos locales y mercantes, u otra actividad. Lo que puede indicar también, que tales cantidades y el tipo del hidrocarburo no han sido suficientes para estimular el desarrollo de la capacidad de degradación de petróleo crudo. Posiblemente tengan capacidad para degradar un sólo tipo de hidrocarburo y no un complejo de estos. Sin embargo es posible encontrar bacterias con potencialidad para degradar petróleo ya que existen bacterias con esta capacidad, que viven en ríos y lagunas

costeras y que actúan como inóculo para cuando haya un aporte crónico de petróleo en el área (Lizárraga *et al.*, 1986); en el presente trabajo los muestreos más cercanos a la costa se realizaron a 1.5 mn de distancia, tal vez debería ser más cercana para poder determinar la presencia o ausencia de este tipo de bacterias.

Las bacterias heterótrofas marinas responden rápidamente a un aporte de petróleo, se ha observado que el número de éstas aumenta al ocurrir un derrame, encontrándose en altas concentraciones en áreas impactadas durante el tiempo que permanece el hidrocarburo (Pfaender *et al.*, 1984; Atlas, 1981; Atlas *et al.*, 1976; Oppenheimer *et al.*, 1977; Le Petit *et al.*, 1977), debido a esto, la relación de bacterias degradadoras de petróleo y de heterótrofas viables (hidrocarbonoclasticas/heterótrofas) es utilizada como indicador del grado de afectación de un ambiente marino por hidrocarburos (Lizárraga *et al.*, 1990).

Se ha elaborado una escala para clasificar áreas impactadas por hidrocarburos, basada en el porcentaje de bacterias hidrocarbonoclasticas respecto de las heterótrofas aerobias viables (Lizárraga *et al.*, 1983) (Fig. 2). De acuerdo con lo anterior y debido a la ausencia de bacterias degradadoras de petróleo, el área muestreada queda clasificada como no afectada, es decir que los hidrocarburos que pueden estar presentes en el área no causan efectos aparentes en los microorganismos.

La presencia de petróleo crudo o derivados en el ambiente marino, además de representar una fuente de alimento para algunos microorganismos, puede ocasionar grandes daños a otros organismos que se encuentran en ese medio, así por ejemplo los primeros efectos adversos sobre animales son por acción mecánica, ya que cubre

superficies y estructuras finas, inhibiendo el movimiento, la respiración y alimentación, principalmente cuando son pequeños y/o formas sedentarias, en los peces irritan la piel de las

branquias y cuando las cubre completamente puede causar la muerte, en plancton y organismos invertebrados causa alteraciones en su desarrollo o la muerte, deformación e inhibición del movimiento en larvas. En animales superiores, como aves marinas el petróleo se adhiere a su plumaje, impidiéndoles el nado o el vuelo por el sobrepeso y a consecuencia de esto pueden llegar a morir, su plumaje pierde su función aislante, dificulta también la obtención de alimento, puede suprimir la conducta reproductiva, afecta la viabilidad de los huevos por reducción de la permeabilidad del cascarón y cuando las aves ingieren hidrocarburos sufren irritación intestinal severa, alteraciones en el hígado, anomalías nerviosas. En mamíferos marinos, provoca irritación de ojos y obstrucción de la visión provocando que se puedan perder, cubre los narizos dificultando la respiración (Nelson-Smith, 1973).

En particular los hidrocarburos como las parafinas (alcanos, cicloalcanos y alquenos) causan anestesia en concentraciones bajas, daño celular y muerte en altas concentraciones; las cicloparafinas (cicloalcanos, cicloalquenos y naftenos) interfieren o bloquean procesos naturales de organismos marinos como búsqueda de alimento, escape de los depredadores, selección del hábitat y atracción sexual (Nelson-Smith, 1973; Botello, 1979); finalmente los aromáticos son los más dañinos, actúan como venenos, anestésicos sobre plancton como protozoarios y larvas de peces, en concentraciones de 0.1 μ l retardan la división celular y el desarrollo del plancton (Mironov, 1970) y como cancerígenos, la mayoría de estos son aromáticos policíclicos (HAP), los más conocidos son los benzopirenos como el 3-4 benzopireno y benzantracenos; éstos causan carcinomas, papilomas, hiperplasias, sarcomas subcutáneos e incluso cáncer de piel en humanos (Nelson-Smith, 1973).

El petróleo, al igual que a los animales, afecta negativamente al fitoplancton, algas y vegetación marina; éste al encontrarse sobre la superficie del mar impide hasta en un 90% la penetración de la luz provocando una reducción de la actividad fotosintética del fitoplancton, North (1964) reporta que una emulsión al 0.1% de petróleo inhibe completamente la tasa

fotosintética en algas, y como se mencionó anteriormente reetarda la división celular y al desarrollo del plancton (Mironov, 1970). El petróleo al estar en contacto con plantas superiores provoca producción de mucilago, como mecanismo de protección, sin embargo el petróleo puede penetrar por los estomas de tallos y hojas y difundirse fácilmente por los espacios intercelulares (Nelson-Smith, 1973), además pueden penetrar en la membrana celular, aumentar su permeabilidad y provocar la salida del contenido celular, ocasionando incluso la muerte de la planta (Currier y Peoples, 1954), interfieren con la actividad fotosintética de los cloroplastos, afectan las áreas de crecimiento, la floración y la producción de semillas (Nelson-Smith, 1973), así mismo en los manglares, el petróleo puede penetrar las raíces y afectar la actividad bacteriana normal y la difusión de oxígeno (Baker, 1971).

El daño por hidrocarburos a nivel celular se debe a que penetran por la membrana celular, causando hinchamiento y en ocasiones hasta rompimiento celular (Van Overbeek y Blondeau 1954), a este fenómeno se les atribuye su efecto narcótico sobre los organismos, además interfiere con la actividad de sistemas enzimáticos y otras proteínas en plantas y animales (Manwell y Baker, 1967).

El papel que juegan las bacterias en la degradación de petróleo es de vital importancia, ya que esta oxidación biológica modifica todas las fracciones del petróleo, disminuyendo con esto la toxicidad de sus componentes y su presencia en el mar, por el contrario procesos abióticos como la fotooxidación modifica sólo una parte del hidrocarburo dando como resultado compuestos resistentes a la biodegradación y que además crean un ambiente desfavorable para este proceso, provocando que las posibilidades de transformación disminuyan, haciendo que el petróleo sea una fuente de carbón y energía más difícil de metabolizar (Tegger *et al.*, 1983).

Por lo anterior es importante seguir realizando investigaciones para incrementar el desarrollo y la actividad de los microorganismos degradadores de petróleo en su ambiente

natural, ya que su papel es muy importante en áreas impactadas por hidrocarburos y así poder evitar daños ecológicos irreversibles.

CRECIMIENTO O INHIBICION POR AMINOACIDOS

Las bacterias heterótrofas obtienen sus nutrientes principalmente de la materia orgánica, sin embargo pueden tener otra fuente de nutrientes como es el caso de los aminoácidos, que representa una fuente de nitrógeno, energía e incluso de carbón. Estos se encuentran en el mar, como proteínas, péptidos o disueltos en forma libre (Campbell, 1977; Carlucci *et al.*, 1985). Los aminoácidos se encuentran entre los factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de microorganismos heterótrofos, ya sea para obtención de energía o para incorporación y formación de material celular (Alexander, 1971). En el presente estudio se hizo un ensayo de utilización de aminoácidos o inhibición del crecimiento por estos; se probaron 10 aminoácidos con 62 cepas bacterianas. Observándose que el 100 % de bacterias crecieron en los 10 aminoácidos probados, esto indica que estos no inhiben su crecimiento (Tabla 4).

De acuerdo con el índice Medio de Utilización (IMU) que fué de 100 % y el de Capacidad Catabólica (CC) que dió 1, ésta población bacteriana muestra una amplia capacidad de utilizar los aminoácidos empleados, sin ninguna preferencia. Carlucci (1984, 1985) reporta que Arginina, Asparagina, Glutámico, Leucina, Treonina y Valina se encuentran disueltos en el medio marino.

Estos valores de IMU y CC nos permiten concluir que la población bacteriana tiene un amplio rango de capacidad para la utilización de los aminoácidos empleados; por lo tanto en el medio marino tienen una ventaja metabólica que les permite tener una variedad de fuentes de alimento.

VII CONCLUSIONES

- La población bacteriana en el área muestreada, se encuentra concentrada en la región de la desembocadura del sistema lagunar.
- La densidad bacteriana (UFC/ml) no tuvo una correlación significativa con los parámetros físicoquímicos y nutricionales tales como oxígeno disuelto, pH, salinidad, nitritos, nitratos, amonio y fósforo.
- La ausencia de bacterias hidrocarbonoclasticas, permite determinar que el área de estudio es una zona que no se encuentra afectada por hidrocarburos, además el Golfo de Tehuantepec es un área sin explotación petrolera por lo que no hay un aporte constante y suficiente de petróleo para estimular el desarrollo de tal capacidad metabólica; con base en la ausencia de bacterias hidrocarbonoclasticas y en la escala de impacto por hidrocarburos elaborada por Lizárraga *et al.* (1983), el área queda clasificada como no afectada por hidrocarburos.
- Los aminoácidos empleados para el crecimiento de las cepas bacterianas obtenidas, no tienen ninguna influencia inhibitoria sobre éstas y de acuerdo a los valores de IMU y CC, dichas bacterias tienen una gran capacidad de metabolizarlos sin ninguna preferencia.

BIBLIOGRAFIA

Alexander, M. 1971. *Microbial Ecology*. John Wiley and Sons. USA. 511p.

Atlas, R. M. 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. Appl. Microbiol. 30: 396-403.

Atlas, R. M. 1977. Studies on petroleum biodegradation in the Arctic. p. 261-269. *in* D. Wolfe (ed.), Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N. Y.

Atlas, R. M. 1981. Fate of oil from two major oil spills: role of microbial degradation in removing oil from the Amoco Cadiz and Ixtoc I spills. Environ. Inter. 5:33-38.

Atlas, R.M. y R. Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Can. J. Microbiol. 18: 1851-1855.

Atlas, R. M. y R. Bartha. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. Biotechnol. Bioeng. 14:309-318.

Atlas R. M. y R. Bartha. 1973 a. Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. Environ. Pollut. 4: 291-300.

Atlas R. M. y R. Bartha. 1973 b. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. Environ. Sci. Technol. 7: 538-541.

Atlas, R. M., E. A. Schofield, F. A. Morelli y R. E. Cameron. 1976. Interactions of microorganisms and petroleum in the Arctic. Environ. Pollut. 10:35-44.

Atlas R. M., A. Horowitz y M. Busdosh. 1978. Prudhoe crude oil in arctic marine ice, water and sediment ecosystems: degradation and interactions with microbial and benthic communities. J. Fish. Res. Board. Can. 35: 585-590.

Becker, J. M. 1971. oil and salt marsh soil; pp. 62-71 *in* The Ecological effects of oil pollution on littoral communities. Institute of Petroleum, London.

Bailey, N. J. L., A. M. Jobson y M. A. Rogers. 1973. Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. Chem. Geol. 11: 203-221.

Bergstein, P. E. y J. R. Vestal. 1978. Crude oil biodegradation in Arctic tundra ponds. Arctic. 31: 158-169.

Berridge, S. A., R. A. Dean, R. G. Fallows y A. Fish. 1968. The properties of persistent oils at sea, pp. 2-11 *in* Scientific aspects of pollution of the sea by oil. Institute of Petroleum, London.

Bianchi, A. 1971. Ecologie et taxonomie des bactéries hétérotrophes aérobies des sédiments marins. leur participation a la dégradation des matières organiques. tesis doctoral de Estado. Universidad de Marseille, Francia. 221 p.

- Botello, V. A. 1979. Presencia e importancia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente marino: nota científica. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nat. Autón. México, 6 (1):1-6.
- Brown, D. W., L. S. Ramos, A. J. Fiedman y W. D. Macleod. 1969 a. Analysis of trace levels of petroleum hydrocarbons in marine sediments using a solvent-slurry extraction procedure, p. 161-167. In Trace organic analysis: a new frontier in analytical chemistry. Special publication no. 519. National Bureau of Standards, Washington, D. C.
- Brown, L. R., W. E. Phillips, G. S. Pabst y C. M. Lander. 1969 b. Physical, chemical and microbiological changes occurring during degradation of oil in aquatic and brackish water environments. Presented at the American Society of Mechanical Engineers Annual Winter Meeting, 16-20 November, Los Angeles, Calif.
- Byrom, J. A. y S. Beasall. 1971. Microbial degradation of crude oil with particular emphasis on pollution. pp. 73-85 In Microbiology. Institute of Petroleum, London.
- Campbell, R. 1977. Microbial Ecology, basic Microbiology Volume 5. Blackwell Scientific publications. 148 p.
- Carlucci, A. F., D. B., Craven y S. M., Henrichs. 1984. Diel production and microheterotrophic utilization of dissolved free amino acids in waters off Southern California. Applied and Environmental microbiology, pp. 165-170.
- Carlucci, A. F., D. B. Craven y S. M. Henrichs. 1985. Surface-film microheterotrophs: amino acids metabolism and solar radiation effects on their activities. Marine Biology, 85:13-22.
- Currier, H. B. y S. A. Peoples. 1954. Phytotoxicity of hydrocarbons. Hilgardia, 23:155-173.
- Dewes, C. J. 1986. Botánica Marina. Editorial Limusa S.A. de C.V. México D.F. 673 p.
- Dibble, J. T y R. Bertha. 1979. The effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 31: 544-550.
- Dood, E. N. 1971. Report of working party on the effects of natural factors on the movement, dispersal and destruction of oil at sea. Ministry of Defence (Navy Department).
- Fey, J. A. 1969. The spread of oil slicks on a calm sea. Plenum Press, N. Y. pp 53-63.
- Floodgate, G.D..1979. Nutrient limitation. p. 107-118. In A. W. Bourquin y P. H. Pritchard (Ed.). Proceedings of workshop, microbial degradation of pollutants in marine environments. EPA 660/9-79-012. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, Fla.
- Gunkel, W. 1967. Experimentell-ökologische untersuchungen uber die limitierenden faktoren des mikrobiellen abbaues in merinen milieu. Helgol. Wiss. Meeresunters. 15: 210-224.
- Gunkel, W. 1968. Comments in discussion. p. 10 In Scientific aspects of pollution of the sea by oil. Institute of Petroleum, London.

Izyurova, A. I. 1952. The rate of oxidation of petroleum products in water without the addition of nitrogen (in Russian). Gig. Sanit. 7: 12-17.

Jannasch, H. W., K. Elmhjellen, C. O. Wirsen y A. Farnalan. 1971. Microbial degradation of organic matter in the deep sea. Science, 171: 672-675.

Johnstone, R. 1970. The decomposition of crude oil residues in sand columns. J. mar. biol. Ass. U.K. 50: 925-937.

Klug, M. J. y A. J. Markovetz. 1967 a. Degradation of hydrocarbons by members of the genus Candida. J. Bacteriol. 93: 1847-1852.

Klug, M. J. y A. J. Markovetz. 1967 b. Thermophilic bacteria isolate on n-tetradecane. Nature (London) 215: 1082-1083.

Le Petit, J., J. C. Bertrand, M. H. N' Guyen y S. Tagger. 1975. Etude taxonomique et physiologique de bactéries se développant sur hydrocarbures en milieu marin. Ann. Microbiol. 126 A, 367-380.

Le Petit, J. y M. H. N'Guyen. 1976. Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les hydrocarbures en mer. Can. J. Microbiol. 22: 1364-1373.

Le Petit, J., M. H. N' Guyen y S. Tagger. 1977. Quelques données sur l'écologie d'une zone marine littorale recevant les rejets d'une raffinerie de pétrole. Environ. pollut. 13:41-56.

Lizárraga-Partida, M.L., F.B. Izquierdo-Vicuña, y I. Wong-Chang. 1990. Marine oil degrading bacteria related to oil inputs and surface currents in the western Caribbean Sea. Oil and Chemical Pollution 7: 271-281.

Lizárraga, P. M. L. 1979. Pseudomonades du milieu marin. Taxonomie polyphasique et ecologie. Tesis de Doctorado de Estado. Universidad de Marsella, Francia. 117 p.

Lizárraga-Partida, M.L., Pomas-Aguirre, J. y F.B. Izquierdo-Vicuña. 1983. Tasa bacteriana hidrocarbonoclasticas/heterótrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la zona de Campeche. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nat. Autónoma, México, 10 (1) : 177-186.

Lizárraga-Partida, M. L., F. B. Izquierdo-Vicuña y I. Wong-Chang. 1990. Marine oil degrading bacteria related to oil inputs and surface currents in the Western Caribbean Sea. Oil and Chemical Pollution, 7:271-281.

Lizárraga-Partida, M. L., J. Pomas-Aguirre, F. B. Izquierdo-Vicuña y M. C. Roseno-Hernández. 1986. Bacteriología del Sur del Golfo de México y el área del Canal de Yucatán. Ciencias Marinas, 12 (2):21-34.

Ludzack F. J. y D. Kinkoad. 1956. Persistence of oily wastes in polluted water under aerobic conditions. Industr. enging. Chem. 48: 263-267.

Lyman, J. y R. H. Fleming. 1940. Composition of sea water. J. Mar. Res. 3: 134-146.

Manwell, C. Y. C. M. Baker. 1967. A study of detergent pollution by molecular methods; starch gel electrophoresis of a variety of enzymes and other proteins. J. mar. biol. Ass. U.K. 47: 659-675.

Mateles, R. I., J. N. Baruah y S. R. Tannenbaum. 1967. Growth of a thermophilic bacteria on hydrocarbons: a new source of single cell protein. Science, 157: 1322-1323.

Mills, A.L.C. Brett y R.R. Colwell. 1978. Enumeration of petroleum degrading marine and stuarine microorganisms by the most probable number method. Can. J. Microbiol., 24 (5):552-557.

Mironov, O. G. 1970. The effect of oil pollution on the flora and fauna of the Black Sea. Eco teach. Conf. mar. pollut. Rome, pap. E-92.

Nelson-Smith, A. 1973. Oil Pollution and Marine Ecology. Plenum Press, N. Y. 259 p.

Niskin, S. J. 1962. A water samples for microbiological studies. Deep Sea Res. Oceanogr. Abst. 9: 501-503.

Novell, G. D. y C. E. Zobell. 1944. Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. 47: 447-448.

North, W. J., M. Neushul and K. A. Clendenning. 1964. Successive biological changes observed in a marine cove exposed to a large spillage of mineral oil. Symp. Poll. Mar. Microorg. Prod. Petrol. Mónaco, pp. 335-354.

Oppenheimer, C. y C. Zobell. 1952. The growth and viability of stdy three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Mar. Res. 11: 10-18.

Oppenheimer, C. H., W. Gunkel and G. Gessman. 1977. Microorganisms and hydrocarbons in the North sea during july-august 1975. pp. 593-610 in Proceedings of the 1977 oil spill conference. Washington D. C.: American petroleum Institute.

Parker, C. A., M. Freearge y C. G. Hatchard. 1971. The effect of some chemical and biological factors on the degradation of crude oil at sea. pp. 237-244 in Water pollution by oil. Institute of Petroleum, London.

Pfaender, F. K. and E. N. Buckley. 1984. Effects of petroleum on microbial communities in Petroleum Microbiology.

Pedraza-Espinosa, R.N. 1991. Caracterización de la actividad sulfatoredutora en el sedimento superficial del Golfo de Tehuantepec. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Univ. Nal. Autón. México. 66 p.

Pierce, R. H., A. M. Cundell y R. W. Trapper. 1975. Persistence and biodegradation of spilled residual fuel oil on an estuarine beach. Appl. Microbiol. 29: 646-652.

Pilpel, N. 1968. The natural fate of oil on the sea. Enterprise 27: 11-13.

Prokop, J. F. 1950. A study of the microbial decomposition of crude oil. Texas A and M Research Foundation.

Rosenfeld, W. D. 1947. Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. J. Bacteriol. 54: 664-665.

Schwartz, J.R., J. D. Walker y R. R. Colwell. 1974. Growth of deep-sea bacteria on hydrocarbons at ambient and *in situ* pressure. Dev. Ind. Microbiol. 15: 239-249.

Schwarz, J. R., J. D. Walker y R. R. Colwell. 1975. Deep-sea bacteria: growth and utilization of n-hexadecane at *in situ* temperature and pressure. Can. J. Microbiol. 21: 682-687.

Secretaría de Marina. 1980. Estudio oceanográfico del Golfo de Tehuantepec. Tomos I, II y III. Dirección de Oceanografía Naval. Secretaría de Marina. México.

Söhngen, N. L. 1913. Benzin, petroleum, paraffinöl und Paraffin als kohlenstoff und energiequelle für mikroben. Zentralbl. Bakt., Abt. II. 37: 595-609.

Steemann Nielsen, E. 1960. Productivity of the oceans. Annu. Rev. Plant Physiol. 11: 341-362.

Stone, R. W., M. R. Fenske y A. G. C. White. 1942. Bacteria attacking petroleum and oil fractions. J. Bacteriol. 44: 166-178.

Tagger, S., A. Bianchi, M. Julliard, J. Le Petit and B. Roux. 1983. Effects of microbial seeding of crude oil in sea water in a model system. Marine Biology. 78:13-20.

Trader, R. W. 1973. Bacterial degradation of petroleum material in low temperature marine environments, p. 163-170. In D. G. Ahearn y S. P. Meyers (Ed.). The microbial degradation of oil pollutants. Publication no. LSU-SG-73-01. Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge.

Turner-Garcés, M.M. 1992. Estudio oceanográfico en algunos parámetros físicos y químicos de la zona de surgencia del Golfo de Tehuantepec, en los meses de mayo y noviembre de 1989. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Univ. Nat. Autón. México. 35 p.

Van Overbeek, J. y R. Blondeau. 1954. Mode of action of phytotoxic oils. Weeds. 3: 55-65.

Vázquez, F., Alexander, H., Turner, M., Collin, L. y Gutierrez, A. Informe técnico de la Campaña Oceanográfica FIQUIMBI I. Laboratorio de fisicoquímica Marina. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. Informe inédito.

Voroshilova, A. A. y E. V. Dianova. 1950. Bacterial oxidation of oil and its migration in natural waters (in Russian). Mikrobiologiya. 19: 203-210.

Ward, D., R. M. Atlas, P. D. Boehm y J. A. Calder. 1980. Microbial biodegradation and the chemical evolution of Amoco Cadiz oil pollutants. Ambio 9: 277-283.

Ward, D. M. y T. D. Brock. 1976. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes. Appl. Environ. Microbiol. 31: 764-772.

Ward, D. M. y T. D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. Appl. Environ. Microbiol. 35: 353-359.

Zobell, C. E. 1946. Action of micro-organisms on hydrocarbons. Bact. Rev. 10: 1-49.

Zobell, C. E. 1959. Microbiology of oil. New Zealand oceanogr. Inst. Mem. 3: 39-47.

Zobell, C. E. 1964. The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. Adv. Water Pollut. Res. 3: 85-109.

Zobell, C. E. 1971. Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons. Pro. Conf. Prevent. Control Oil Spills. Wash. pp. 441-451.

Zobell, C. E. 1973. Bacterial degradation of mineral oils at low temperatures, p. 153-161. In D. G. Ahearn and S. P. Meyers (ed.), The microbial degradation of oil pollutants, Publication no. LSU-SG-73-01, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge.

Zobell, C. E. y J. F. Prokop. 1968. Microbial oxidation of oils in Barataria Bay bottom deposits. Zellchr. Allg. Mikrobiol. 6: 143-162.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE

MEDIO MINERAL CONCENTRADO (LYMAN Y FLEMING, 1940)

Concentración en gramos por 20 litros de agua destilada.

1.-Fluoruro de sodio	0.15
2.-Cloruro de estroncio hexahidratado	1.2
3.-Acido bórico	1.3
4.-Fosfato monobásico de potasio	4.5
5.-Bromuro de potasio	4.8
6.-Bicarbonato de sodio	9.6
7.-Cloruro de potasio	33
8.-Nitrato de amonio	36
9.-Cloruro de calcio dihidratado	30
10.-Cloruro de magnesio hexahidratado	248
11.-Cloruro de sodio	1175
12.-Sulfato de sodio anhidro	195

a) Disolver cada compuesto en la mínima cantidad de agua, por separado.

b) Ir agregando poco a poco en orden cada reactivo al resto del agua destilada, y mover para evitar que precipiten.

MEDIO MINERAL DILUIDO PARA BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTICAS

Medio mineral concentrado	200 ml
Agua destilada	800 ml
Cloruro férrico al 1.2 %	1 ml
Amortiguador Tris H Cl 1M	10 ml
Petróleo crudo	50 µl (0.05 ml)

1.-Mezclar el medio mineral, el agua y el cloruro férrico, ajustar el pH a 7.5.

2.-Agregar el amortiguador y el petróleo.

3.-Esterilizar en autoclave a 110 ° C por 30 minutos y 10 libras de presión.

MEDIO ZOBELL

Concentración por litro

Agua de mar afejada	750 ml
Agua destilada	250 ml
Levadura	1 gr
Peptona	5 gr
Agar bacteriológico	15 gr
Cloruro férrico al 1.2 %	1 ml

- 1.- Se mezclan agitando uno por uno todos los componentes, hasta **disolver**, menos el agar.
- 2.- Se ajusta el pH a 7.5
- 3.- Se agrega el agar, calentar un poco y **agitar** para **disolverlo**.
- 4.- Esterilizar en autoclave a 15 libras ó 121 ° C por 15-20 minutos.

CALDO ZOBELL

Se prepara como el medio Zobel, pero sin agregar el agar.

MEDIO BASE

Medio mineral	200 ml
Agua destilada	800 ml
Cloruro férrico al 1.2 %	1 ml
Amortiguador Tris HCl	10 ml
Agar bacteriológico	15 gr

- 1.- Mezclar medio mineral, agua destilada y ClFe
- 2.- Ajustar el pH a 7.5-7.6
- 3.- Agregar el amortiguador
- 4.- Finalmente edicionar el agar
- 5.- Esterilizar a 121 ° C ó 15 libras durante 20 minutos

MEDIO BASE CON AMINOACIDOS

AMINOACIDO 1 gr / litro

MODO DE ESTERILIZACION

ARGININA
ASPARAGINA
CISTEINA
GLUTAMATO
LEUCINA
LISINA
METIONINA
ORNITINA
TREONINA
VALINA

FILTRACION
AUTOCLAVE
AUTOCLAVE
FILTRACION
AUTOCLAVE
FILTRACION
AUTOCLAVE
FILTRACION
FILTRACION
AUTOCLAVE

- 1.- Se disuelve cada aminoácido en la mínima cantidad de agua destilada
- 2.- Ajustar el pH a 7.5
- 3.- Se agrega el aminoácido disuelto al medio base y se esteriliza todo junto o se adiciona el aminoácido después de esterilizado el medio cuando se trate de aquellos que se esterilizan por filtración

AMORTIGUADOR TRIS HCL
(TRIS HIDROXIMETIL AMINO METANO)

Para 1 litro de amortiguador 1 M

Tris 121.14 gr aforado a 1 litro
HCl 1 N El necesario para ajustar a un pH= 7.5

- 1.- Ir agregando el HCl al Tris hasta ajustar el pH=7.5

TINCION DE GRAM

- 1.- Hacer una preparación, procurando no concentrarla y fijarla con calor
- 2.- Tefir con Cristal Violeta por 1 minuto
- 3.- Lavar con agua corriente
- 4.- Poner Lugol 1 minuto
- 5.- Lavar con agua corriente
- 6.- Decolorar con alcohol por 30 segundos
- 7.- Lavar con agua corriente

8.- Poner Safranina 30 segundos.

9.- lavar con agua corriente, dejar secar y observar a lmersión.

ESTACION	PROFUNDIDAD (m)	DISTANCIAS A LA CORTA (mm)	UFCA POR (ml)	OXIGENO DISUELTO (µM)	NO2 (µM)	NO3 (µM)	NH3 (µM)	PO4 (µM)	SALINIDAD ‰	Ph
1	10	15	20	208.88	0.071	1.871	45.167	0.032	33.965	8.25
4	10	1.5	50	199.23	1.628	4.833	12.797	0.046	34.015	7.66
4	200	"	20	9.24	2.02	8.996	21.078	0.032	34.956	6.79
9	10	16	10	201.66	0.071	0.503	9.033	0.032	34.356	8.20
12	10	2	20	207.39	0.071	0.978	21.078	0.032	37.101	8.22
12	50	"	10	168.46	4.448	4.177	12.045	0.032	34.633	8.10
13	10	2	20	198.99	2.342	2.756	4.517	0.032	34.032	8.22
13	75	"	30	46.49	2.406	7.139	1.468	0.365	34.931	7.70
16	10	14	10	200.71	0.071	1.992	0.489	0.032	34.346	8.22
17	10	15	770	231.96	2.906	9.210	0.979	2.473	34.815	8.31
20	10	2	50	197.18	2.299	3.362	49.420	0.032	34.050	8.17
20	75	"	320	30.03	0.071	7.925	6.830	1.107	34.829	7.35
21	30	2	2080	197.43	0.071	3.434	1.957	0.032	34.117	8.22
24	10	19	10	206.86	0.071	5.647	13.70	0.032	33.974	8.03
24	150	"	150	39.01	—	—	—	—	—	7.29
25	10	20	890	209.48	0.071	6.511	36.209	0.032	34.447	8.07
25	200	"	450	44.49	0.071	8.567	1.957	0.32	33.082	7.49
27	10	5	10	199.02	0.071	1.635	12.233	0.32	34.274	8.32
28	20	2.5	60	190.51	0.071	1.728	1.957	0.032	34.464	8.27
29	10	11.5	60	209.48	0.071	4.576	6.361	0.32	34.304	8.06
29	30	"	INC.	202.24	0.071	1.107	4.893	0.32	34.407	8.08
30	10	20.5	2530	—	—	—	—	0.032	—	—
30	75	"	1170	44.97	0.071	6.804	4.404	0.032	35.576	7.58
40	10	14.5	2500	204.54	0.071	1.821	4.893	0.032	34.236	8.17
41	10	4	180	228.02	0.071	1.635	4.404	0.032	34.139	8.22
42	10	1.5	70	186.34	0.071	0.778	4.404	0.032	34.154	8.51
42	10	12.5	790	203.24	0.071	0.071	6.850	0.032	34.119	8.26
54	10	3.5	180	219.06	0.071	1.628	3.914	0.032	33.753	8.26

DATOS POR ESTACION MUESTREADA