

24/120



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**TAXONOMIA DE BACTERIAS HIDROCARBONCLASTICAS
DE AGUA Y SEDIMENTOS EN LA SONDA
DE CAMPECHE.**

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de
B I O L O G O

p r e s e n t a

JULIO MUÑOZ RUBIO

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Resumen.....	1
1: Introducción.....	3
2: Material y Método.....	11
3: Resultados.....	25
3.1: Estudio de Poblaciones...	25
3.2: Estudio Taxonómico.....	35
4: Discusión.....	55
4.1: Análisis de fenones por estación y hábitat.....	58
4.2: Análisis Morfológico.....	65
4.3: Análisis del Metabolismo Respiratorio.....	67
4.4: Análisis de la Degradación del Petróleo.....	69
4.5: Análisis de la Producción de Exoenzimas.....	72
4.6: Análisis de Pruebas Nutricionales.....	73
4.7: Consideraciones Finales..	78
Apéndice.....	81
Bibliografía.....	96

R E S U M E N

Un total de 204 cepas bacterianas degradadoras de petróleo colectadas en la Sonda de Campeche, México, en marzo de 1980 fueron caracterizadas por métodos de taxonomía numérica a fin de ayudar a comprender el impacto de la presencia de petróleo en esta zona sobre las poblaciones de bacterias.

La utilización del índice de Jaccard para comparar la similitud entre las cepas trabajadas dió como resultado la formación de 18 fenones separados entre sí por sus diferencias morfológicas y fisiológicas observadas a través de 101 pruebas de identificación. Se observó una mayor diversidad en los fenones integrados por cepas correspondientes al área de plataforma que en aquellos integrados por cepas más alejadas de esta zona y cercanas a la costa. Sólo el 84% de las cepas mostró una capacidad hidrocarbonoclástica evidente, haciendo suponer que el 16% restante la perdió o vive gracias a los productos de excreción de aquel 84%.

Estas poblaciones bacterianas son mayoritariamente bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos. Aunque hay una mayor diversidad morfológica en el agua que en el sedimento, las cepas de este último habitat presentan un mayor porcentaje de Gram positivos que en el agua, así como de esporulados. Hay mayor producción de exoenzimas en el agua y el consumo de substratos orgánicos fue mayor entre los ácidos orgánicos, ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos y muy bajo entre los alcoholes y compuestos aminados.

A partir del presente estudio se sugiere profundizar más en el estudio del papel que multitud de factores químicos, físicos y biológicos -

juegan en el ecosistema para determinar la distribución de estas bacterias en la Sonda de Campeche. Asimismo se recomienda completar el estudio taxonómico determinando los porcentajes de Guanina-Citosina y haciendo hibridación de ácidos nucleicos.

Para fines didácticos se incluye un apéndice detallando los métodos de trabajo en cada una de las pruebas fisiológicas y nutricionales.

1: INTRODUCCION

El rápido incremento que en el mundo entero ha tenido la explotación petrolera y sus actividades relacionadas, - lleva consigo la aparición de múltiples problemas.

Uno de ellos es el de poder evaluar los efectos al medio ambiente del continuo derrame de hidrocarburos. Las diversas operaciones que se llevan a cabo (exploración, explotación y transporte del crudo) implican no sólo el permanente riesgo de accidentes, sino también el hecho de que en muchas de estas operaciones se arrojan cotidianamente pequeñas cantidades de petróleo. Especial importancia ha cobrado el problema en las zonas costeras, estuarinas y de mar abierto, en donde la mayor parte de las operaciones antedichas tiene lugar. Hasta 1975 se arrojaban al mar más de 6 millones de toneladas de hidrocarburos anuales a través de diversas fuentes (N.A.S., 1975). A raíz de los accidentes conocidos como "Torrey Canyon" en marzo de 1967 en las costas de Gran Bretaña y "Amoco Cádiz" en marzo de 1978 en las de Francia, se comprendió con mayor claridad que estos derrames pueden ocasionar alteraciones en el medio ambiente, muchas de ellas de gran envergadura.

En la Sonda de Campeche, los efectos de la creciente explotación petrolera habían comenzado a despertar el interés de científicos nacionales y extranjeros. Previamente al derrame del pozo IXTOC 1 se demostró que existía un incremento en las concentraciones de hidrocarburos en especies de bivalvos como Crassostrea virginica y angiospermas

como Thalassia testudinum; este incremento fué más evidente en lugares con presencia de refinerías y plantas petroquímicas, concretamente en las lagunas de Tamiahua y Pueblo Viejo en Veracruz y las de Carmen y Machona en Tabasco (Botello, - 1979). Los hidrocarburos arrojados en un derrame ocurrido en 1976 en Laguna de Términos, Campeche, fueron depositados en los sedimentos de la parte litoral de Isla del Carmen, así como en los esteros localizados en el interior de esta laguna, llegándose incluso a cuadruplicar la concentración de parafinas (Botello, 1980).

Al ocurrir en junio de 1979 el derrame del pozo IXTOC 1 en la Sonda de Campeche, derrame que se prolongaría por más de 10 meses, convirtiéndose en el más grande de la historia, se presentó una importante oportunidad para estudiar el impacto que los hidrocarburos fósiles tienen sobre los ecosistemas del Golfo de México a corto, mediano y largo plazo.

En ese momento se realizaron diversos estudios en diferentes campos para observar los efectos del derrame. Los ejemplos más sobresalientes son los de Yáñez-Arancibia, et. al. (1982), trabajando con comunidades de peces; Licea et. al. (1981), analizando la variación del fitoplancton causada por la presencia masiva de petróleo; Soto et. al. (1980), estudiando las poblaciones de camarón; Botello y Castro (1980) y Botello y Soto (1981), determinando las concentraciones de hidrocarburos fósiles en el Golfo y en diversas especies de camarones, peces y calamares y Lizárraga-Partida et. al. -

(1982) con referencia a las poblaciones bacterianas heterótrofas e hidrocarbonoclasticas.

Todos los resultados expuestos en estas investigaciones coinciden en señalar que el derrame del IXTOC 1 no produjo consecuencias catastróficas sobre el ecosistema, haciéndose sin embargo la observación de que la continua presencia de petróleo en el área puede, en el futuro, producir daños al medio ambiente mayores que el del IXTOC 1.

El estudio de las comunidades bacterianas hidrocarbonoclasticas de la Sonda de Campeche hasta antes del derrame ya citado, había estado ausente del panorama de la investigación nacional e incluso internacional. Sólo a causa de este derrame se comenzaron a hacer algunas investigaciones para esclarecer el impacto que el petróleo tuvo sobre estas comunidades, pues ya es ampliamente conocido que son uno de los principales indicadores para evaluar los índices de contaminación en la medida en que una población hidrocarbonoclastica va substituyendo a la población bacteriana heterotrófica original (Atlas, 1977).

Por un lado se encontró que la relación existente entre el número de bacterias hidrocarbonoclasticas con respecto al total de heterótrofas era tan sólo del 1% para concentraciones que iban de 10^2 bacterias por mililitro de agua a 10^4 por gramo de sedimento. Estas cifras son una evidencia de que las poblaciones bacterianas no fueron afectadas mayormente por causa del derrame, sin embargo se ha encontrado

que en las áreas cercanas a las plataformas la proporción aumenta al menos al doble, evidenciando así la contaminación crónica existente (Lizárraga-Partida et. al., 1983).

Al analizar y comparar las velocidades de degradación del petróleo por bacterias en la Sonda de Campeche y en donde tuvo lugar el accidente del Amoco Cádiz (que a lo largo de 2 semanas arrojó al mar más de doscientas mil toneladas de crudo, menos de la mitad de las arrojadas por el IXTOC 1), se encontró que en el primer caso la acción de las bacterias fué más lenta que en el segundo, y su concentración mucho más baja. Mientras en las costas francesas 4 meses después del derrame, el porcentaje de mineralización (conversión de los hidrocarburos a CO_2) del hexadecano fué igual o mayor al 13%, en la Sonda de Campeche fué del orden del 5% anual, además de que las concentraciones bacterianas hidrocarbonoclasticas nunca sobrepasaron el orden de 10^3 bacterias por mililitro 4 meses después del inicio del derrame; en tanto que en las costas francesas tan sólo a tres meses de que éste hubiera terminado, la concentración de este tipo de organismos fué de $10^6 - 10^7$ bacterias por gramo de arena. Todo esto indica que en el caso del IXTOC 1 hubo una fuerte limitación en la degradación por microorganismos causada principalmente por la falta de nutrientes como nitratos y fosfatos, los cuales jugaron un papel importante en el caso del Amoco Cádiz (Atlas, 1981, a,b; Atlas y Bronner, 1981).

Sin embargo el estudio de la estructura de las comuni-

dades microbianas degradadoras de petróleo en la Sonda de Campeche no ha sido abordado aún. Sólo Pfaender y Buckley (1980) y Buckley y Pfaender (1980) en trabajos sobre la res puesta de la comunidad microbiana al deramne del IXTOC 1, logran identificar los tipos celulares y algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclásticas: Alcaligenes, Flavobacterium y Vibrio entre los principales.

El conocimiento de la existencia de este tipo de organismos no es algo novedoso. Desde la década de los 40 se demostró la capacidad de múltiples géneros bacterianos como Pseudomonas, Vibrio, Achromobacter, Acinetobacter, Brevibacterium, Nocardia, Corynebacterium, Flavobacterium, etc , para degradar el petroleo o algunos de sus compuestos (Zobell, 1946). Este hecho, considerado por aquellos tiempos como una curiosidad biológica ha pasado a tener un papel muy relevante en la actualidad, cuando se sabe que más de doscientas especies bacterianas pueden degradar muy diversos tipos de hidrocarburos (Zobell, 1977).

A esta larga lista de bacterias hidrocarbonoclásticas pueden agregarse varios géneros de hongos, levaduras y algas con capacidad de utilizar a los compuestos del petróleo como fuente de carbono y energía. Entre ellos podemos encontrar Penicillium y Verticillium entre los hongos (Davies y Westlake, 1979), Oscillatoria, Microcoleus, Chlamydomonas, Cylindreteca, Amphora, Petalonia, etc, entre las algas y cianobacterias (Cerniglia, et. al. 1980) y Cándida y Rhodosporidium entre las

levaduras (Komagata, et. al. 1964, Ahearn, 1971)

Todos estos descubrimientos han sido canalizados por múltiples vías, entre otras cosas a fin de encontrar las mejores condiciones para poder utilizar a estos microorganismos como agentes anti-contaminantes; como elementos de "limpieza" de aguas con presencia de petróleo, para lo cual es necesario conocer los factores químicos o biológicos que afectan la degradación del petróleo y que básicamente son: la naturaleza del crudo, la estructura de la comunidad microbiana, la presencia de nutrientes como nitratos y fosfatos, la salinidad, presencia de oxígeno y otros factores físicos como temperatura, presión, etc (Atlas, 1981, b).

En el presente trabajo se considera que es importante profundizar en el conocimiento de la estructura de estas poblaciones de bacterias, esto es, su taxonomía. La taxonomía bacteriana se ha encontrado en las tres últimas décadas con problemas considerables. La taxonomía clásica ha seleccionado una serie de características de manera arbitraria y les ha asignado una importancia clave en los estudios de identificación; de hecho son estos caracteres "clave" los que definen a los taxa, pero no necesariamente todos los caracteres tienen un valor igual para un género que para el otro, sino que pueden cambiar según de quien se trate. Lo que es definitorio para un grupo bacteriano puede no serlo para otro. Esto ha redundado en la proliferación cada vez mayor de número de especies, que en muchas ocasiones tiene una validez muy dudosa y que contribuyen más a crear confu-

si3n que a evitarla (Colwell y Liston, 1961).

Esta deficiencia puede ser subsanada otorgándoles a todos los caracteres bacterianos el mismo peso y llevar a cabo las clasificaciones en funci3n de la correlaci3n de sus caracteres y de sus índices de similitud, lo cual ha sido discutido por Sneath (1957), y posteriormente ampliado por Liston y Colwell (1960), Colwell y Liston (1961), Stanier et. al. (1966) y Véron (1969). Este es el método de la taxonomía numérica que se ha decidido utilizar en este estudio.

En las bacterias, la taxonomía numérica ha sido utilizada con diversos fines desde los trabajos citados en el párrafo anterior. De la literatura revisada, Ventosa et. al. (1982) utiliza la taxonomía numérica en la identificaci3n de bacterias halofílicas Gram-Negativas; Pfister y Burkholder (1965), trabajando con bacterias de aguas antárticas y tropicales; Bensoussan (1977), la utiliza para trabajar sobre el género Flavobacterium; Le Petit (1975) trabaja con bacterias que se desarrollan sobre hidrocarburos en el mar; Bianchi (1976) realiza un trabajo taxonómico de bacterias del género Vibrio y otros relacionados que se desarrollan en el mar; Roussos (1977) lleva adelante estudios taxonómicos de cocos del medio marino y Lizárraga-Partida (1979), examinando Pseudomonas. Este método de clasificaci3n también ha sido empleado en la identificaci3n de bacterias hidrocarbonoclasticas del tracto digestivo del camar3n (Ponras-Aguirre, comunicaci3n personal) y del agua de la Bahía de

Chesapeake (Austin et. al., 1977 a, b.). En este último estudio se examinaron más de 400 cepas de lugares contaminados y no contaminados en esa bahía, encontrándose 15 especies de otros tantos géneros.

La presente investigación forma parte de la cada vez más larga lista de trabajos de taxonomía numérica bacteriana y tiene como principales objetivos los siguientes:

- 1.- Hacer una caracterización de los diversos grupos de bacterias hidrocarbonoclasticas del agua y sedimento de la Sonda de Campeche y su distribución introduciendo al país las técnicas de taxonomía numérica bacteriana, hasta el momento jamás aplicadas por los investigadores nacionales.
- 2.- Contribuir al conocimiento del impacto del derrame del pozo IXTOC I sobre el medio ambiente y muy específicamente sobre las poblaciones bacterianas del área afectada.

2: MATERIAL Y METODO

Las cepas con que se trabajó fueron colectadas en Marzo de 1980 durante el crucero OPLAC II (Oceanografía de la Plataforma de Campeche). Un total de 14 estaciones fueron trabajadas obteniéndose sus respectivas muestras de agua y sedimento (Fig 1). Las primeras fueron colectadas con una botella especial y las segundas con una dragá Van Veen y submuestreo con una jeringa de 10 ml.

De todas las muestras se hicieron diluciones al décimo en tubos de ensaye con agua de mar sintética y estériles --- (Lyman y Fleming, 1940). Una vez alcanzada la dilución conveniente para el agua superficial y el sedimento, se efectuó el sembrado en placa de las mismas en medio tipo Oppenheimer-Zobell (1952) para cuantificar a las bacterias heterótrofas, así como la técnica del número mas probable (NMP) para cuantificación de bacterias hidrocarbonoclasticas, segun la descripción de Mills, et. al. (1978).

En razón de la profundidad del estudio fueron seleccionadas las estaciones 10, 11, 12, 13, 6 y 32 para el trabajo taxonómico; las cuatro primeras localizadas en el área de -- plataformas de la Sonda de Campeche y las dos últimas en lugares mas cercanos a la costa; particularmente la 32, situada en el lugar denominado "Punta dos Bocas", sujeto a una -- presencia crónica de petróleo por ser un lugar de carga y -- descarga del mismo.

En todos estos lugares existe una gran cantidad de mate...

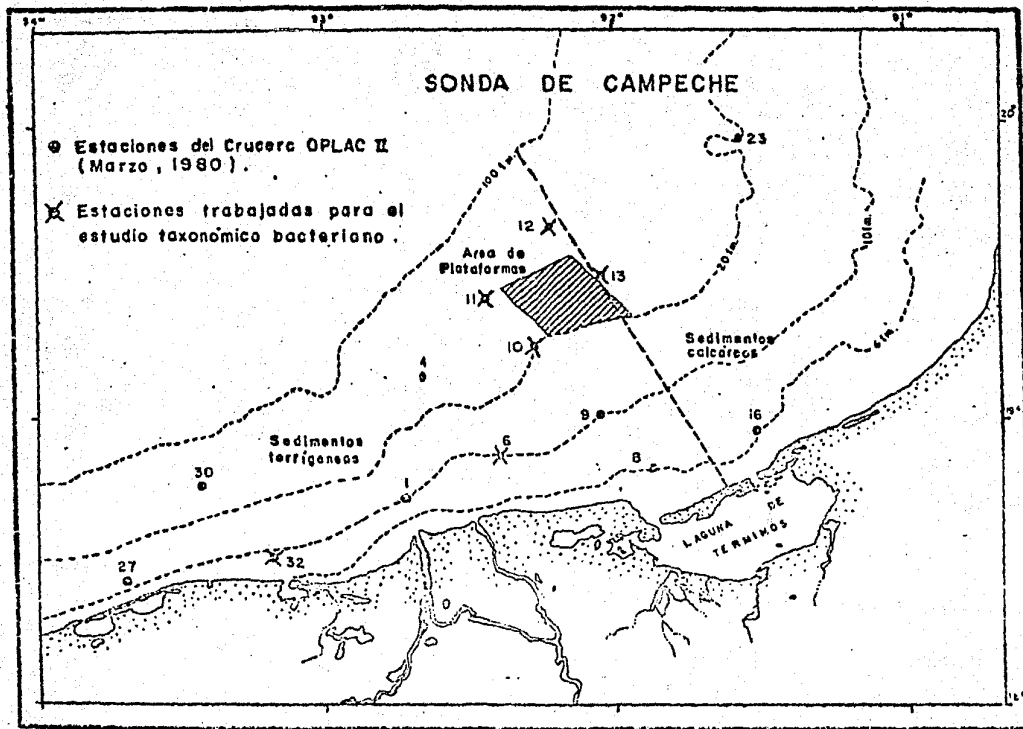


Fig. 1: Localización de Estaciones del Crucero OPLAC II, Marzo 1980.

ria orgánica en los sedimentos terrígenos, así como nutrientes y partículas en suspensión, todo ello producto del aporte llevado a cabo por las aguas de los ríos que desembocan en esta zona, así como por las corrientes marinas.

De los frascos del NMP que correspondían a aquellas estaciones ya señaladas y con una degradación mas evidente, se tomó 0.1 ml. de muestra, inoculándose en una placa de medio 2216 E (Oppenheimer-Zobell, 1952) -ver apéndice-, en donde se dejaron crecer a temperatura ambiente las bacterias de nuestro inóculo. Se utilizó una caja de Petri para cada dilución.

En las placas donde fue mas claro el crecimiento se aislaron al azar las colonias que serían sometidas a las pruebas de identificación. Después se llevó a cabo el proceso de purificación tomando como referencia las pruebas morfológicas y de tinción Gram que se habían realizado previamente y que se repitieron a cada momento que se pensaba que la cepa podía estar ya pura. Se aislaron y purificaron un total de 204 cepas para el agua y el sedimento en las 6 estaciones trabajadas (Tabla 1).

La cepa ya purificada se inoculó por duplicado en frascos de 5 ml. y se introdujeron en un refrigerador a 4°C. - antes de comenzar a hacer las siguientes pruebas de identificación.

Estas fueron muy variadas. No sólo se rectificaron las pruebas morfológicas y de tinción Gram realizadas durante

TABLA 1:

CEPAS AISLADAS EN CADA ESTACION DE MUESTREO

Estación 6 (18°52' N, 92°23' W)

Agua: 422, 423, 424, 425, 426, 427, 430, 432, 434, 442, 444,
445, 449, 447, 436, 448, 450, 443.

Sedimento: 451, 458, 459, 461, 466, 468, 472, 474, 475.

Estación 10 (19°12' N, 92°17' W)

Agua: 183, 186, 193, 185, 187, 192, 195, 196, 197, 204, 210,
201, 189, 194, 202, 203.

Sedimento: 229, 231, 230, 220, 227, 234, 211, 235, 237, 213, 221,
223, 224, 240, 228, 214, 233, 218, 222.

Estación 11 (19°24' N, 92°26' W)

Agua: 246, 247, 250, 257, 258, 264, 265, 267, 268, 270.

Sedimento: 271, 272, 273, 276, 277, 278, 279, 230, 283, 285, 287,
288, 289, 290, 293, 294, 295, 296, 297, 299

Estación 12 (19°29' N, 92°13' W)

Agua: 304, 311, 312, 314, 316, 317, 319, 320, 321, 322, 323,
325, 326, 327, 328, 329, 330, 315.

Sedimento: 331, 332, 335, 337, 341, 344, 348, 349, 350, 351, 352,
355, 356, 357, 358, 359, 360

Estación 13 (19°28' N, 92°03' W)

Agua: 361, 362, 363, 364, 366, 367, 373, 374, 375, 376, 377,
379, 380, 381, 383, 386, 387, 388, 389.

Sedimento: 391, 392, 394, 396, 397, 399, 400, 401, 402, 404, 405,
406, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 416, 419, 420.

Estación 32 (18°31' N, 93°11' W)

Agua: 483, 485, 486, 488, 489, 490, 491, 492, 494, 495, 496,
499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509,
510.

Sedimento: 511, 512, 513, 515, 518, 519, 521, 522, 523, 524, 525,
538, 540.

T O T A L E S :

Estación 6: Agua, 18 cepas; Sedimento, 9 cepas.
Total: 27 cepas.

Estación 10: Agua, 16 cepas; Sedimento, 19 cepas
Total: 35 cepas.

Estación 11: Agua, 10 cepas; Sedimento, 20 cepas
Total: 30 cepas .

Estación 12: Agua, 18 cepas; Sedimento, 17 cepas
Total: 35 cepas.

Estación 13: Agua, 19 cepas; Sedimento, 22 cepas
Total: 41 cepas.

Estación 32: Agua, 23 cepas; Sedimento, 13 cepas
Total: 36 cepas.

TOTAL DE CEPAS: 204.

el aislamiento y la purificación; se hicieron además dos -- grandes grupos de pruebas: las llamadas "nutricionales" y las "fisiológicas". Las primeras entendidas como aquellas en las que se muestra la capacidad de una cepa para utilizar -- a un sólo substrato como fuente de Carbono y energía; las -- segundas fueron todas aquellas en las que se mostraban otros aspectos del metabolismo bacteriano: Producción de exoenzimas, de polisacáridos, necesidad de factores de crecimiento, el metabolismo del Nitrógeno, la respuesta a agentes fisi--cos y químicos limitantes del desarrollo de los organismos, etc, etc.

En las pruebas nutricionales se utilizaron substratos de las siguientes familias: carbohidratos, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, otros ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y compuestos aminados, así como al lactato (un -- hidroxiaácido) y al fenol (un compuesto aromático).

Para cada una de las siete familias mencionadas (exceptuano el lactato y al fenol) se observó su porcentaje de -- crecimiento y se sacó una media para el grupo bacteriano con el que se trabajaba, al cual se le llamó Índice Medio de Utilización (I.M.U.), definido como la sumatoria de los porcentajes de utilización de un determinado número de substratos dividido entre ese número.

Pero no necesariamente todos los compuestos de una familia o familias químicas son consumidos por las bacterias -- en porcentajes iguales o cercanos a los de su I.M.U. Por e-

llo Bianchi (1971), introduce el término Afinidad Asimilatríz (A.A.), que no es otra cosa que la desviación standard y que en este caso expresa el grado de afinidad de un grupo bacteriano para consumir cierta o ciertas familias químicas probadas, o bien, el grado de dispersión de los substratos con respecto a los grupos de poblaciones bacterianas.

Lizárraga-Partida (1979), introduce el concepto de capacidad catabólica (C.C.), utilizado en este estudio al igual que el I.M.U. y la A.A., y que indica la proporción de substratos utilizados al menos por una cepa en una familia o conjunto de familias químicas.

Todos estos conceptos fueron utilizados en las pruebas nutricionales para un entendimiento mas completo de cómo las bacterias hidrocarbonoclasticas trabajadas utilizan a los compuestos orgánicos.

Se efectuaron un total de 101 pruebas, de las cuales 59 fueron nutricionales, 27 fisiológicas y 15 morfológicas (Tabla 2).

Por la metodología empleada, las pruebas pueden dividirse en tres grandes grupos: aquellas que se hicieron en medio de cultivo líquido, las que se hicieron en medio de cultivo sólido y las que no requirieron medio de cultivo.

En las segundas, la cepa purificada en el frasco de 5 ml., se sembró y dejó crecer masivamente en el medio 2216 E. De ahí se tomó con una pipeta Pasteur una suspensión lo mas

TABLA 2: DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS REALIZADAS

Número de la prueba	Nombre	Clave	Concentración* (g/lit o ml/lit)	Método de Esterilización
<u>PRUEBAS NUTRICIONALES</u>				
Carta 1	CARBOHIDRATOS			
1	L-Arabinosa	LARA	2 g/lit	Filtración
2	Ribosa	RIBO	"	"
3	Xilosa	XILO	"	"
4	Fructosa	FRUC	"	"
5	Galactosa	GALA	"	"
6	Glucosa	GLUC	"	"
7	Manosa	MANO	"	"
8	Ramnosa	RHAM	"	"
9	Celobiosa	CELO	"	"
10	Lactosa	LATO	"	"
11	Maltosa	MALT	"	"
12	Sacarosa	SACA	"	"
13	Trealosa	TREA	"	"
14	Almidón	AMID	"	"
<hr/>				
ACIDOS GRASOS				
15	Acetato	ACET	"	"
16	Propionato	PROP	2 ml/lit	"
17	Butirato	BUTY	"	"
18	Pelargonato	PLAR	"	Autoclavado
19	Palmí tato	PALM	2 g/lit	Calentamiento
<hr/>				
ACIDOS DICARBOXILICOS				
20	Oxalato	USAL	1 g/lit	Filtración
21	Malonato	MALO	"	"
22	Succinato	SUCI	"	"
23	Maleato	MALE	"	"
<hr/>				
24	Lactato	LATA	2 ml/lit	"
<hr/>				
ACIDOS ORGANICOS				
25	Citrato	CITR	1 g/lit	"
26	Piruvato	PYRU	"	"
27	Alfa-Cetoglutarato	CGTA	"	"
<hr/>				
ALCOHOLES				
28	Glicerol	GLOL	2 ml/lit	"
29	Adonitol	ADOL	1 g/lit	"
30	Heso-Inositol	HIOL	"	"
31	Manitol	MAOL	"	"
32	Sorbitol	SOOL	"	"
33	Metanol	MEOL	1 g/lit	"
34	Etol	ETOL	"	"
35	Propanol	PROL	"	"

Número de la Prueba	Nombre	Clave	Concentración* (g/lit o ml/lit)	Método de Esterilización
Carta 1				
36	ALCOHOLES Butanol	BUOL	1 g/lit	Filtración
37	Dulcitol	DUOL	2 g/lit	"
38	Fenol	FENO	0.25 g/lit	"
AMINOACIDOS				
39	L-Fenilalanina	LFAL	1 g/lit	"
40	L-Tirosina	LTIR	2 g/lit	"
41	L-Histidina	LHIS	1 g/lit	"
42	L-Triptofano	LTRY	"	"
43	L-Alanina	LALA	"	"
44	L-Treonina	LTNR	"	"
45	L-Valina	LVAL	"	"
46	L-Leucina	LLEU	"	Calentamiento
47	Asparagina	AGIN	"	Filtración
48	Metionina	MTIO	"	"
49	L-Glutamato	LGLU	"	"
50	L-Lisina	LLYS	"	"
51	L-Arginina	LARG	"	"
52	L-Ornitina	LORN	"	"
53	L-Cisteína	CTEI	"	"
COMPUESTOS AMINADOS				
54	Etanolamina	ETNH	"	"
55	Butilamina	BUTH	1 g/lit	Filtración
56	Urea	UREA	"	"
57	Tiourea	TIQU	"	"
58	Timina	TYMI	"	Calentamiento
59	Tiamina	TIAM	"	Filtración
Pruebas Fisiológicas				
60	Prototrofia	PROT		Filtración y Autoclavado
61	Prototrofia+ Vitaminas	PRVI		"
62	Prototrofia+ Vitaminas + Aminoácidos	PRVA		"
63	Reducción Nitratos	RNOS		Autoclavado
64	Reducción Nitritos	RNIS		"
65	Producción N ₂ (Gas)	RENS		"
66	Oxidación Glúcica	UGLU		"
67	Fermentación Glúcica	FGLU		"
68	Acumulación PHB	APHB		"
69	Degradación Petróleo	DEPE		"
70	Producción Levón	PRLE		"

Número de la Prueba	Nombre	Clave	Concentración* (g/lt o ml/lt)	Método de Esterilización
Carta 2:				
1	Amilasa	AMIL		Autoclavado
2	Gelatinasa	GELA		"
3	ADNasa	ADNA		"
4	Tween 80	TW80		"
5	Ureasa	URSA		Filtración
6	Catalasa	CATA		
7	Oxidasa	OXID		
8	Salinidad 0 ppm	SAL0		Autoclavado
9	Salinidad 70 ppm	SA70		"
10	Salinidad 120 PPM	SI20		"
11	Salinidad 180 ppm	SI80		"
12	Temperatura 40°C	TE40		"
13	Temperatura 37°C	TE37		"
14	Temperatura 41 °C	TE41		"
30	Gram Positivo	GPOS		"
31	Gram Negativo	GNEG		"

PRUEBAS MORFOLOGICAS

15	Color Crema-Blanco	CRBL
16	Color Anaranjado-Rojo	ANRO
17	Color Amarillo-Verde	AMVE
18	Otro Color	OTCO
19	Pigmento Difusible	PDIF
20	Cocos	COCO
21	Bacilos	BACI
22	Espirales	ESPI
23	Pleomorfismo	PLOM
24	Espora Deformante	EDEF
25	Espora No Deformante	ENDE
26	1 a 2 Células	12CE
27	Cadenas	CADE
28	Racimos	RACI
29	Otro Arreglo	OTAR

Los espacios que no fueron ocupados por ninguna prueba en las cartas fueron:

32-70 ESPACIOS EN BLANCO (En la carta 2 únicamente)

71-74 INFORMACION ECOLOGICA

75-78 NUMERO DE LA CEPA

79-80 NUMERO DE CARTA

* Sólo en pruebas nutricionales.

concentrada posible (no menos de 10^6 bacterias/ml.) que se vació en una pequeña cubeta de 1 a 2 ml. de capacidad con el objeto de seguir la metodología de Stanier et. al., (1966) modificada por Lizárraga-Partida (1979) en la cual pueden sembrarse y hacer crecer hasta 20 cepas simultáneamente en una sola caja de Petri con la ayuda de un replicador semi automático diseñado en el laboratorio.

Las pruebas de morfología y arreglo celulares, presencia de esporas y acumulación de PHB fueron hechas con la ayuda de un microscopio ZEISS de contraste de fases, en tanto que la tinción Gram fue hecha con un microscopio ZEISS de campo claro. El color de la colonia se observó a simple vista o con la ayuda de una lupa.

Para tener un marco de referencia se utilizaron 16 cepas: 13 de ellas del catálogo ATCC y las tres restantes de la colección de Shapiro, J., todas ellas señaladas como de gradadoras de petróleo (Bartha y Atlas, 1977 b; Austin, et. al., 1977 a.b.). La cepa PpS126 (Pseudomonas putida contiene en la información genética un plasmidio (Tabla 3).

Los resultados obtenidos para todas y cada una de las pruebas fueron reportados señalándose como positivos (+), negativos (-) y no comparables (), y se transfirieron a --tarjetas I.B.M. para ser trabajados con programas de taxonomía numérica.

En las tarjetas I.B.M. cada prueba de identificación

Número de Catálogo (ATCC u otro)	Número asignado en el presente trabajo	Nombre
+ 6051	9000	<u>Bacillus subtilis</u>
+ 14580	9001	<u>Bacillus lincheriformis</u>
+ 14581	9003	<u>Bacillus megaterium</u>
+ 842	9004	<u>Bacillus polymyxa</u>
+ 14577	9006	<u>Bacillus sphaericus</u>
+ 25411	9052	<u>Pseudomonas mendocina</u>
+ 27129	9053	<u>Pseudomonas marina</u>
+ 17423	9056	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
# PAW1	9057	<u>Pseudomonas arvilla</u>
# PpG1	9058	<u>Pseudomonas putida</u>
# PpS126	9060	<u>Pseudomonas putida</u>
+ 14403	9062	<u>Brevibacterium stationis</u>
+ 15831	9063	<u>Brevibacterium albidum</u>
+ 23055	9064	<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>
+ 23333	9067	<u>Moraxella phenylpiruvica</u>
++19260	9200	<u>Flavobacterium marinotipicum</u>

+ Bartha y Atlas (1977, b), Catálogo ATCC

Cortesía de Shapiro, J.A. University of Chicago

++ Austin, et. al. (1977, a.b.), Catálogo ATCC

TABLA 3. Lista de Cepas empleadas como referencia.

ocupó una columna. De este modo las 101 pruebas fueron repartidas en dos tarjetas por cepa. 70 de ellas ocuparon las primeras columnas de la carta número 1 y las 31 restantes - las primeras columnas de la carta número 2. Los últimos seis espacios para ambas tarjetas se utilizaron: 4 para señalar el número de la cepa y las 2 restantes para el número de la carta (Tabla 2).

Los programas en que fueron corridas las tarjetas I.B.M. dieron como resultado la obtención de listados y un dendrograma en el que las cepas fueron ordenadas de acuerdo al índice de Jaccard (Sneath, 1957), procedimiento matemático - mediante el cual las muestras obtenidas se agrupan en función de la similitud de los caracteres positivos entre un par de cepas. Su fórmula se expresa así:

$$\text{Indice de Jaccard (Sj)} = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde: a=un par de cepas con el mismo carácter positivo

b=un par de cepas donde el mismo carácter es positivo en la primera de ellas y -- negativo en la segunda

c=un par de cepas donde el mismo carácter es negativo en la primera de ellas y po sitivo en la segunda.

Al construir el dendrograma se estableció la línea de corte siguiendo el criterio de la especie conocida. El punto de referencia fue el porcentaje de similitud aproximado al que se agruparon las cepas de referencia pertenecientes a Bacillus y Pseudomonas.

También se obtuvieron una serie de listados de porcentajes por prueba, es decir, listados en los que se indican los porcentajes de cepas positivas y negativas obtenidos en cada prueba. Se imprimieron listados de este tipo para todos y cada uno de los fenones surgidos del dendrograma, así como para las poblaciones del agua, sedimento y el total de cepas salvajes.

Con el dendrograma y el conjunto de listados de porcentajes por prueba, los datos quedaron listos para ser interpretados.

3: RESULTADOS

3.1: Estudio de Poblaciones

Como ya se señaló anteriormente, de las 204 cepas de la población total 104 pertenecen al agua y 100 al sedimento. Sus características son bastante similares. Tanto en un hábitat como en otro los bacilos predominan sobre todas las demás formas celulares, observándose un 75% en la población total. Las cepas de individuos pleomórficos abarcan el 18% quedando el resto de las cepas entre los cocos, 5% y los espirales, 3%; el color de las colonias bacterianas fue crema-blanco en un 80%, amarillo-verde en un 17% y únicamente 5% de colonias anaranjado-rojas (Tabla 4).

Sin embargo existen ciertos cambios importantes al analizar las cepas del sedimento y las del agua por separado. En las primeras el porcentaje de bacilos se incrementa hasta alcanzar un 89%, que en el agua es sólo de 62%. En cambio los porcentajes de pleomórficos disminuyen notablemente del agua al sedimento. El incremento de bacilos en este hábitat corresponde a un incremento en la proporción de colonias crema-blanco y a una disminución del porcentaje de las colonias de los demás colores. Otra característica importante de las poblaciones del sedimento es el aumento de cepas esporuladas. En el agua no alcanzan más que el 2% las cepas con espora deformante y un 5% las de espora no deformante, mientras que en el sedimento llegan a alcanzar 19 y 17% respectivamente. Estos últimos porcentajes obviamente reflejan

un aumento en la proporción de Gram positivos, que, aunque son en general minoritarios (pues sólo abarcan el 26% de la población total) llegan a alcanzar hasta 43% en el sedimento contra sólo 12% en el agua.

Un 84% de la población tanto de agua como de sedimento mostró actividad hidrocarbonoclástica, el 16% restante, es decir, que no presenta esta función puede estar constituido por cepas que perdieron esta capacidad, o por cepas que se desarrollaron en el medio a expensas de los productos de excreción de las otras.

Se encontró una ligera diferencia en la fermentación de glucosa entre los dos hábitats. En el sedimento existe un 7% más de fermentación que en el agua, pero sólo un 1% más en la oxidación; esto es importante en la medida que indica una presencia mayor de anaerobios facultativos, sobre todo en el sedimento. La reducción de nitritos fue siempre menor que la de nitratos para los dos hábitats, aunque no se encuentran cambios muy drásticos entre ellos al analizar las dos pruebas por separado. No obstante un porcentaje casi igual al de reducción de nitratos se presenta en la población para la producción gaseosa de nitrógeno en anaerobiosis.

La población bacteriana en términos generales mostró características de halotolerancia, pues a 120 partes por mil, el crecimiento sólo decreció hasta 66%, viniendo de un

99% a 0 y 70 partes por mil (ppm). Únicamente se mostró una drástica caída a 180 ppm. en donde los porcentajes fueron - de 10 y 17% para agua y sedimento respectivamente. Se puede decir que las cepas trabajadas son eurihalinas.

A 37 y 41°C prácticamente el total de la población fue capaz de crecer. A 4°C el porcentaje no llega a alcanzar el 40%. A pesar de esto las cepas que sí crecieron a esta última temperatura tienen una amplia capacidad de tolerancia a los cambios en este importante factor físico y constituyen más de un tercio de la población.

Con respecto a las exoenzimas se observa una ligera - predominancia a la producción de estas sustancias en las - cepas del agua con respecto a las del sedimento; concretamente en los casos de amilasa, tween 80, ureasa y oxidasa. En los casos de gelatinasa, ADNasa y catalasa, se encuentra que fueron producidas en mayor porcentaje en las cepas aisladas del sedimento.

Las cepas trabajadas no necesitan de factores de crecimiento para su desarrollo, el 99% fue capaz de crecer en los medios de prototrofia simple, sin requerir siquiera la mezcla de vitaminas o la de aminoácidos.

Más de las dos terceras partes de la población es capaz de almacenar el Poli-Beta-Hidroxi-butirato (PHB). Aunque la diferencia sea muy ligera, es importante señalar que el 72% de las cepas del sedimento fueron capaces de almacenar-

lo, contra un 66% de las cepas del agua.

La producción de leván fue muy baja tanto en el agua - como en el sedimento.

Todos los resultados hasta aquí mencionados se muestran en la Tabla 4.

Pruebas Nutricionales. La población de bacterias mostró una orientación al consumo de ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos en este orden tanto en el total de cepas salvajes como en las cepas del sedimento; sólo en las cepas del agua los carbohidratos ocupan el tercer lugar desplazando al cuarto a los ácidos grasos. Los ácidos - dicarboxílicos y los alcoholes muestran un consumo medio; en los compuestos aminados este consumo es bajo (Tabla 5).

Para fines prácticos se ha excluido al lactato (hidroxiácido) y al fenol (compuesto aromático) de las tablas, basando con mencionar que el consumo del primero fue muy alto tanto en agua como en sedimento, en tanto que el del segundo fue más bien bajo (89 y 36% respectivamente).

La atención fundamental se centra sobre las 7 familias de substratos arriba mencionados. Se observa que a pesar - de tener un Índice Medio de Utilización muy elevado, la dispersión en el consumo de ácidos grasos es siempre muy grande; el rango de utilización va de 0% en el caso del pelargolato (único compuesto no utilizado por ninguna de las cepas salvajes) hasta 92% en el acetato para las cepas del sedimen

	Cepas Agua (%)	Cepas Sedimento (%)	Total (%)
PRUEBAS FISIOLÓGICAS			
Prototrofia	99	98	99
Prototrofia + Vitaminas	99	98	99
Prototrofia + Vitaminas + A.A.	99	98	99
Reducción de Nitratos	67	69	68
Reducción de Nitritos	23	17	20
Producción de Nitrógeno Gaseoso	65	61	63
Oxidación de Glucosa	50	51	50
Fermentación de Glucosa	56	69	62
Producción de PHB	66	72	69
Degradación de Petróleo IXTOC-1	84	84	84
Producción de Leván	21	20	21
Amilasa	58	56	57
Gelatinasa	55	56	55
ADNasa	71	77	74
Tween 80	70	60	65
Ureasa	26	21	24
Catalasa	82	86	84
Oxidasa	69	55	62
Salinidad 0 p.p.m.	98	99	99
Salinidad 70 p.p.m.	99	98	99
Salinidad 120 p.p.m.	62	71	66
Salinidad 180 p.p.m.	18	10	14
Temperatura 4 ^o C	38	35	36
Temperatura 37 ^o C	99	98	99
Temperatura 41 ^o C	99	100	100
Gram Positivo	12	43	26
Gram Negativo	88	57	74
PRUEBAS MORFOLÓGICAS			
Color Crema-Blanco	72	89	80
Color Anaranjado-Rojo	6	4	5
Color Amarillo-Verde	23	11	17
Otro Color	0	0	0
Pigmento Difusible	0	0	0
Cocos	9	2	5
Bacilos	62	89	75
Espirales	3	4	3
Pleomórficos	27	8	18
Espora Deformante	2	19	10
Espora No Deformante	5	17	11
1 a 2 Células	98	98	98
Cadenas	2	2	2
Racimos	0	0	0
Otro Arreglo	0	0	0

TABLA 4: PORCENTAJES DE CARACTERES POSITIVOS EN CEPAS SALVAJES: PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS

		CARBOHIDRATOS	ACIDOS GRASOS	ACIDOS DICARBOXILICOS	ACIDOS ORGANICOS	ALCOHOLES	AMINOACIDOS	COMPUESTOS AMINADOS	TOTAL
CEPAS AGUA	I.M.U.	54.07	50.40	42.00	75.33	42.00	57.07	21.33	49.76
	A.A.	10.64	38.44	32.51	12.90	21.17	24.36	17.93	24.43
	C.C.	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.30
CEPAS SEDIMENTO	I.M.U.	41.64	46.60	37.50	68.00	29.50	46.73	16.50	40.42
	A.A.	12.77	41.57	37.13	22.07	18.08	19.63	13.44	28.62
	C.C.	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.30
TOTAL DE CEPAS	I.M.U.	47.93	48.60	40.00	71.67	36.00	52.13	19.00	45.25
	A.A.	11.93	39.90	83.71	17.04	19.38	21.47	15.85	23.25
	C.C.	100.00	80.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.30

I.M.U.= Índice Medio de Utilización

A.A.= Afinidad Asimilatriz

C.C.= Capacidad Catabólica

TABLA 5: CARACTERISTICAS NUTRICIONALES DE LAS POBLACIONES HIDROCARBONOCLASTICAS.

to y 89% en las del agua, de manera tal que el I.M.U. elevado lo están determinando en este caso no el conjunto de substratos utilizados en una familia, sino aquellos que mostraron un porcentaje más elevado de utilización.

En el otro extremo se encuentran los ácidos dicarboxílicos, en quienes un I.M.U. medio basido determinado por una enorme diferencia en el bajo porcentaje de ciertos compuestos como el oxalato y el malonato (10 y 15% respectivamente) y el muy alto del succinato (91%), y que producen una dispersión muy grande de la muestra; todo lo cual se ilustra en las figuras 2,3 y 4.

En estas mismas figuras y en la Tabla 5 se observa que los carbohidratos, ácidos orgánicos y compuestos aminados tienen una A.A. menor. En estas familias químicas, el I.M.U. expresa con mayor claridad el porcentaje de utilización de los compuestos y no existen casos tan extremos en su diferencia como en los grupos señalados en el párrafo anterior.

Entre estos dos grupos de familias se encuentran los alcoholes y los aminoácidos, en los que si bien es cierto existe una amplia dispersión y porcentajes de utilización bastante distintos entre los compuestos, la cantidad de substratos estudiados en estas familias determina que sólo algunos de estos compuestos estén determinando fundamentalmente el I.M.U. Son pues, por lo que respecta a su Afinidad

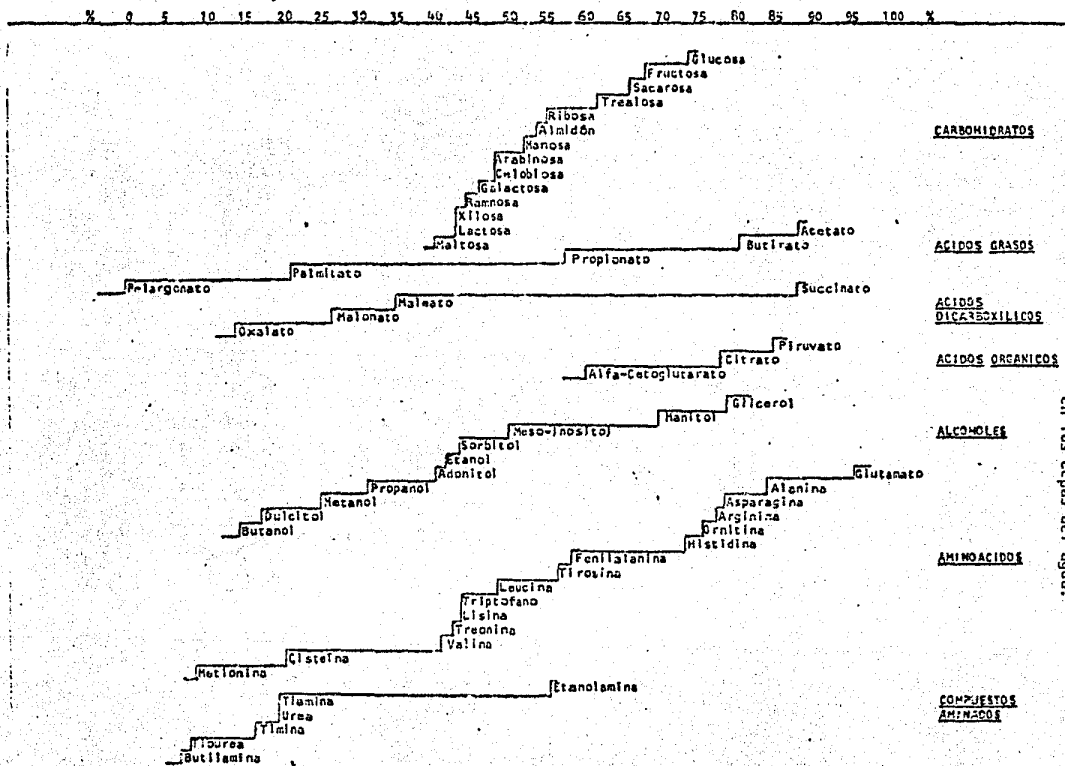


Fig. 2: Porcentajes de Utilización de Compuestos Orgánicos en las cepas de agua.

% 0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 %

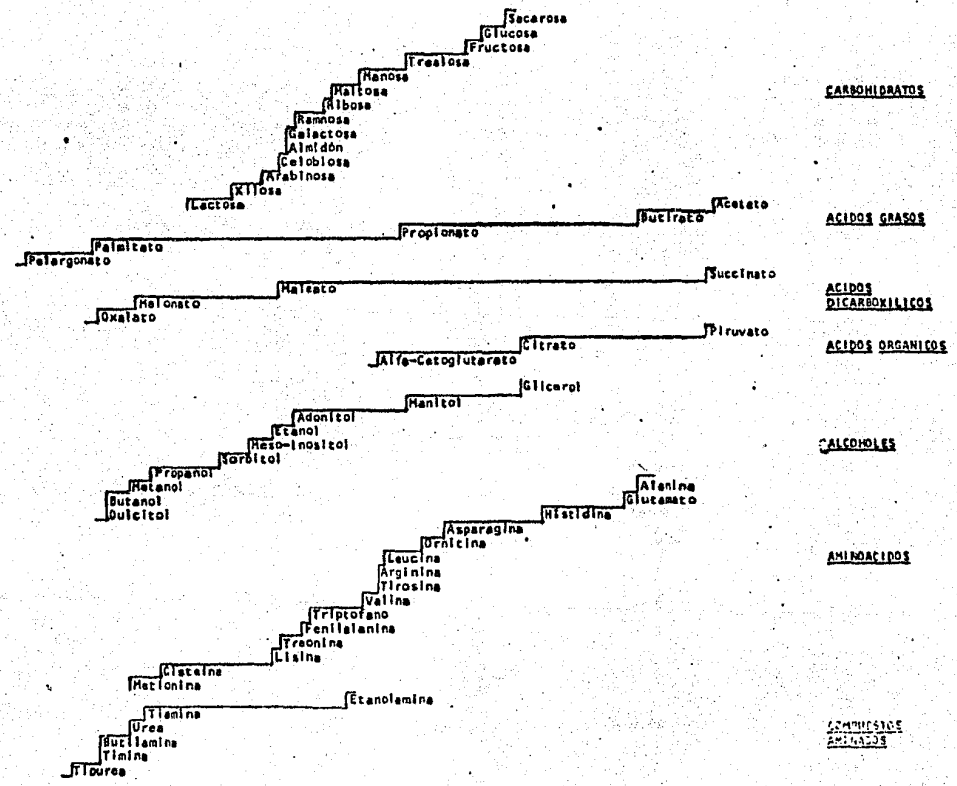


Fig 3: Porcentajes de Utilización de Compuestos Orgánicos en Cepas del Sedimento.

75 0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 7

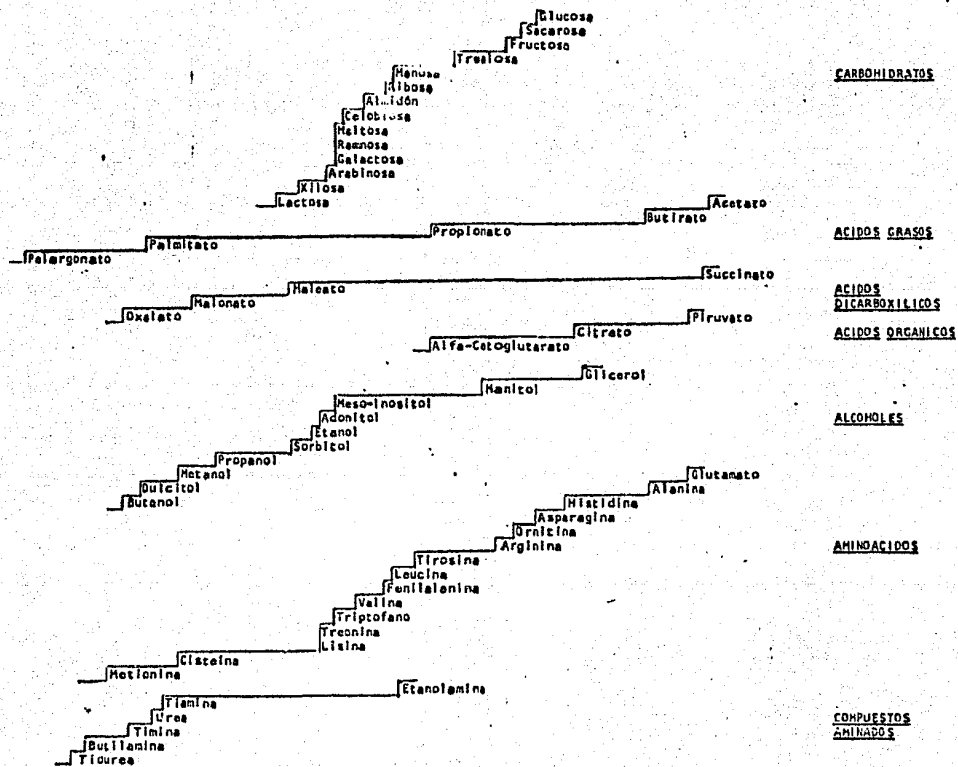


Fig 4: Porcentajes de Utilización del Total de Cepas Hidrocarbonoclasticas Salvajes.

Asimilatriz, un grupo intermedio entre los de baja y alta dis
persión.

En total, se obtuvo un I.M.U. de 45.25. Las cepas del agua mostraron una mayor efectividad en el consumo de subs
tratos orgánicos (I.M.U. = 40.42) y además mostraron una Afi
nidad Asimilatriz menor que las segundas a pesar de que en las familias de alcoholes, aminoácidos y compuestos amina--
dos esta fue mayor que en la población del sedimento. La Ca
pacidad Catabólica fue igual para ambas poblaciones dado --
que sólo uno de los 59 compuestos no fue utilizado (Tabla 5).

Englobando los resultados, se puede caracterizar a la población bacteriana hidrocarbonoclástica de la Sonda de --
Campeche como predominantemente integrada por bacilos Gram negativos con colonias color crema-blanco, no esporuladas, eurihalinas, anaerobios facultativos, con alta capacidad de consumo de ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos especialmente en las cepas del agua y con un incremento de Gram positivos esporulados en el sedimento y mayor diversidad morfológica y de producción de exoenzimas en el agua.

3.2: Estudio Taxonómico

En el dendrograma construido se estableció la línea de corte al 64% de similitud empleando el método de la especie

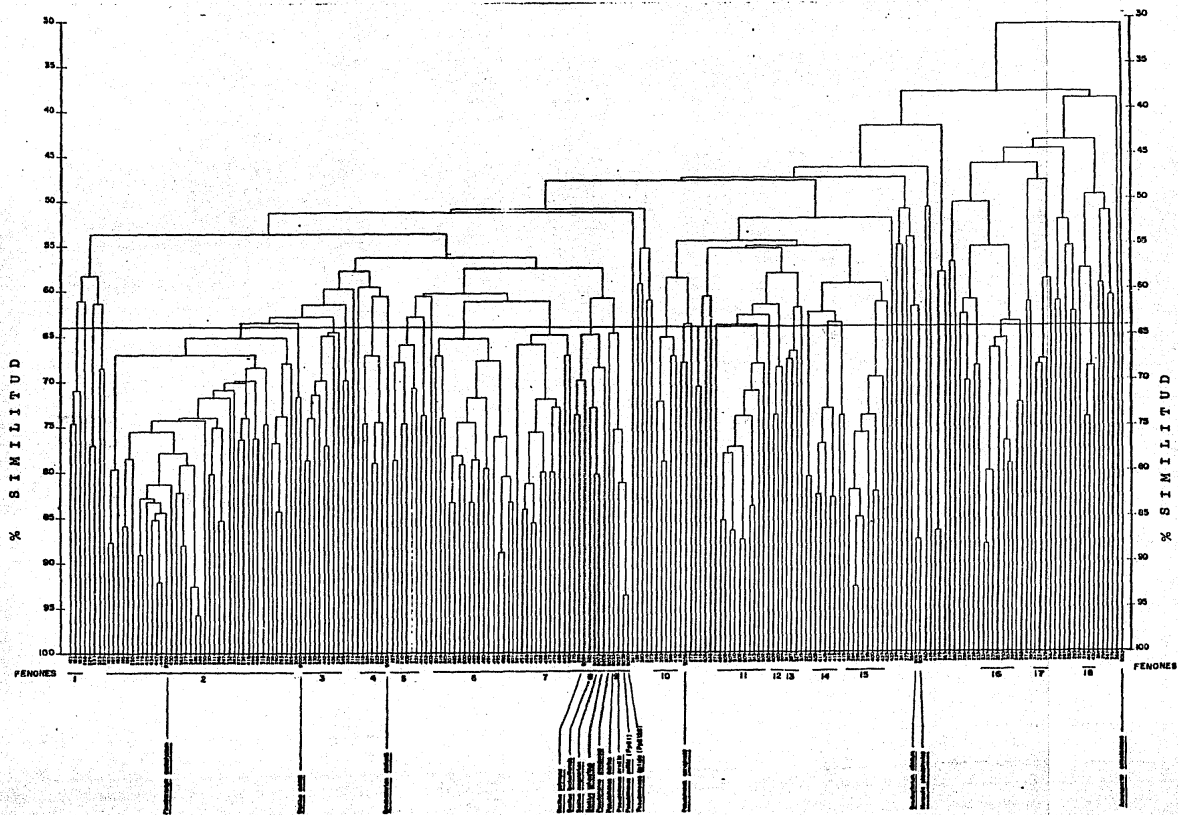


FIG 5: DENDROGRAMA DE CEPAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS DE AGUA, SEDIMENTO Y COLECCION SEGUN EL INDICE DE JACCARD (S.J).

conocida. El punto de referencia para hacer este corte fue el porcentaje al que se agruparon las cepas de colección de los géneros Bacillus y Pseudomonas (figura 5).

Quedaron formados 18 fenones a lo largo del dendrograma, todos ellos conteniendo un mínimo de 3 cepas; se ignoraron los grupos formados por pares.

Descripción de fenones (Tablas 6 y 7).

Fenón 1:

Constituido por 3 cepas, todas del agua, estación 10.

Cepas pleomórficas, Gram negativas. Su capacidad hidrocaraobnolástia es la más baja de los 18 fenones (sólo 33%). En anaerobiosis las tres cepas reducen los nitratos hasta nitrógeno gaseoso, sin embargo, los procesos de reducción de nitratos y nitritos en aerobiosis son muy incipientes; dos de las tres cepas son capaces de fermentar la glucosa y todas ellas la oxidan en condiciones aerobias.

De las exoenzimas sólo se producen oxidasa y tween 80 en su totalidad y la gelatinasa en un 67%. Cepas eurihalinas entre 0 y 120 ppm; no crecen a 180 ppm. Como en todos los fenones, hay un crecimiento del 100% a 37 y 41°C. A 4°C sólo una de las tres cepas exhibió crecimiento. Asimismo el 100% creció, como en todos los fenones en las pruebas de prototrofia, prototrofia + vitaminas y prototrofia + vitaminas + aminoácidos.

Este fenón tiene una amplia capacidad de crecimiento -

en ácidos orgánicos y carbohidratos, aunque en estos últimos su A.A. es muy grande y la C.C. no es de 100%. No se presenta consumo de compuestos aminados.

Fenón 2:

Es el más grande de los 18 fenones. Está constituido por 39 cepas de todas las estaciones; sólo están ausentes las cepas del agua, estación 32. Predominan ligeramente las cepas de las estaciones 11 (9 cepas), 10 (8 cepas) y 13 (8 cepas). Además, en este fenón se ubica como cepa de referencia Flavobacterium marinotipicum. Como consecuencia de todo lo anterior tenemos que el fenón es el más heterogéneo de cuantos existen en el dendrograma, aunque se puede distinguir una predominancia de las cepas del agua con respecto a las del sedimento.

También se observa que el fenón presenta el mayor consumo de substratos orgánicos. Se exhibe un amplio índice de utilización de ácidos orgánicos y carbohidratos. A excepción de los ácidos grasos y aminoácidos, el fenón dos tiene los I.M.U. más elevados para cada familia química en comparación con los demás fenones; el I.M.U. total es el más elevado también.

El único substrato que no fue consumido es el pelargonato, de manera que la C.C. total es igual a la de la población entera de bacterias, y es el único fenón que tiene una C.C. igual a 100.00 para cada familia química con excepción

de los ácidos grasos. Particularmente importante es el caso de los alcoholes y compuestos aminados, cuya C.C. es de -- 100.00 sólo en este fenón. La A.A. total es la segunda más baja de los 18 fenones y las A.A. de cada familia química muestran también una relativamente baja dispersión de la utilización de compuestos orgánicos como fuente de Carbono y energía.

En este fenón existen cepas de todas las formas, aunque predominan los bacilos, ampliamente, seguidos por los - pleomórficos. El color de las colonias es mayoritariamente crema-blanco, pero existen también colonias amarillo-verdes y es el único fenón que posee colonias anaranjado-rojas. -- Existen porcentajes bajos de esporas tanto deformantes como no deformantes y un 25% de cepas Gram positivas.

La capacidad hidrocarbonoclástica del fenón es baja -- comparada con la mayoría de los fenones. Aunque a todas - las salinidades se observa crecimiento, este es relativamente pobre; el fenón es poco eurihalino.

Fenón 3;

Integrado por 8 cepas de cuatro estaciones diferentes. Predomina el agua, estación 6 (3 cepas) y el sedimento, estación 32 (2 cepas). Un 75% de las cepas son del agua.

Al igual que en el fenón anterior, la mezcla de hábitats y estaciones produce un grupo de cepas muy heterogéneo. Sólo los cocos no están presentes; hay un 100% de colonias

crema-blanco, 13% de esporulados (espora deformante) y 25% de Gram positivos. La degradación de petróleo se lleva a cabo en la gran mayoría de las cepas.

En este fenón la producción de exoenzimas fue muy elevada; a excepción de la ureasa todas las demás se producen por arriba del 70% y la ADNasa, catalasa y tween 80 alcanzan el 100%. La reducción de los nitratos es más bien baja, así como la producción de Nitrógeno en anaerobiosis. La producción de leván es la más elevada de los 18 fenones.

En las pruebas nutricionales se observa un mayor consumo de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. En los 2 primeros se exhibe una Capacidad Catabólica igual a 100.00 y una Afimidad Asimilatriz muy baja.

Fenón 4:

Formado por 5 cepas, todas provenientes del sedimento, estación 32. Posee todas las formas celulares excepto pleomorfismo y colonias color crema-blanco. Hay una gran cantidad de Gram positivos, pero ninguna esporulada. Es el único fenón en el que esta obvia correlación Gram positivos-esporulados no se presenta.

Existe casi la misma capacidad hidrocarbonoclástica -- que en los fenones anteriores y el mismo comportamiento en anaerobiosis.

Las familias químicas mas utilizadas son los ácidos orgánicos, los aminoácidos y los alcoholes. Los carbohidratos

muestran un I.M.U. muy bajo; sólo la arabinosa, la xilosa - y la lactosa no fueron utilizadas. Los alcoholes aparecen - por última ocasión como una de las 3 familias químicas con I.M.U. mas elevado. Los compuestos aminados tienen en este fenón su I.M.U. mas elevado y una C.C. bastante grande en - comparación con la del resto de los fenones.

Fenón 5:

Tiene 6 cepas: 3 del agua, estación 10, 2 del sedimento de esa misma estación y una del sedimento de la estación 13.

Se encuentra un 100% de bacilos, 17% de los cuales tienen una espora no deformante. Este último porcentaje es -- exactamente el mismo de las cepas Gram positivas del fenón. Hay una eurihalinidad del 100% entre 0 y 120 ppm de salinidad y ninguna cepa crece a 4°C. Todo el fenón es capaz tanto de fermentar como de oxidar la glucosa. El 83% de las cepas produce Nitrógeno gaseoso en anaerobiosis. Por lo que - toca a las exoenzimas sólo el tween 80 y la catalasa se producen en porcentajes elevados. En las pruebas nutricionales se vuelve al esquema de alto consumo de ácidos orgánicos y carbohidratos; debajo de ellos quedan los ácidos grasos y aminoácidos, quedando las cepas de este fenón como bajas consumidoras de alcoholes y compuestos aminados. Las A.A. tienen valores altos. La C.C. es alta en todas las familias -- excepto compuestos aminados. El 83% de las cepas degrada el petróleo.

Fenón 6:

Integrado por 17 cepas: 12 del agua, estación 32 y 2 - del sedimento de la misma estación. Las demás son cepas de las estaciones 10 y 13 para el agua y de la 12 para el sedimento. Predominan las cepas del agua.

Una mayoría de bacilos y algunos pleomórficos integran al fenón. 100% Gram negativos color crema-blanco en sus colonias. 100% de hidrocarbonoclásticas y un muy alto porcentaje de nitrato-reductoras, así como de productoras de Nitrógeno gaseoso en anaerobiosis. De los fenones que producen leván este es el que lo hace en mayor porcentaje.

El I.M.U. total del fenón es de 46.11. Los compuestos que se consumen en mayor cantidad son los ácidos orgánicos y los aminoácidos. En los carbohidratos la C.C. es muy elevada a pesar de tener un I.M.U. relativamente bajo.

Fenón 7:

Formado por 12 cepas, 9 de las cuales pertenecen al -- agua, estación 6.

La morfología es enteramente de bacilos, Gram negativos en su mayoría aunque existe un pequeño porcentaje de Gram positivos (18 %) el color colonial es en un 91% crema-blanco y amarillo-verde el 9% restante. Las 12 cepas son -- hidrocarbonoclásticas así como reductoras de nitratos en aerobiosis. Las exoenzimas se producen en porcentajes altos, especialmente la catalasa y la oxidasa; la ureasa alcanza -- un 60%. El leván se produce en un 55%, porcentaje superado

en el fenón 3.

El fenón es de los más eurihalinos pues todas las cepas crecen a 0, 70 y 120 ppm y el 36% a 180 ppm.

Se utilizan en alta cantidad los ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos, que tienen en este fenón una C. C. de 100.00 en los tres casos. En los aminoácidos la A.A. es alta debido a la diferencia entre el consumo de metionina y cisteína (9%) y todos los demás substratos empleados para esta familia química, que muestran porcentajes de utilización mayores al 80%.

Fenón 8:

Tenemos en este fenón 2 cepas del sedimento, estación 11, una del agua, misma estación y 4 cepas de referencia del género Bacillus: Bacillus polymyxa, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium y Bacillus sphaericus.

Debido a la dominancia de este género en el fenón, encontramos un elevado porcentaje de Gram positivos (71%) y de esporulados, junto con las Gram negativas en colonias crema-blanco.

Sólo el 50% de las cepas de este fenón degradaron el petróleo; estas cepas son menos eurihalinas que en otros fenones pues sólo se logra un 100% de crecimiento a 70 ppm de salinidad, observándose solamente un 14% a 0 ppm. Pero a diferencia de la mayoría de los fenones en este hubo un crecimiento en todas las salinidades. A 180 ppm el crecimiento -

fue de 43%.

Entre las exoenzimas, la gelatinasa alcanzó un 100% de producción, siendo este uno de los pocos fenones que presenta esta característica. La utilización de compuestos orgánicos en pruebas nutricionales se orientó hacia el consumo de ácidos orgánicos y aminoácidos al igual que en los anteriores fenones; observándose en estas familias capacidades catabólicas iguales a 100.00. Los carbohidratos y ácidos grasos también presentan altos índices de utilización y C.C. de 100 y 80 respectivamente. Ninguna cepa aprovechó el fenol.

Fenón 9:

Enteramente constituido por 5 cepas de referencia del género Pseudomonas; estas son: Pseudomonas mendocina, Pseudomonas marina, Pseudomonas arvilla, Pseudomonas putida (PpG1) y Pseudomonas putida (PpS126).

Formado por bacilos Gram negativos con color crema-blanco en las colonias y no fermentativos. Su porcentaje de degradación del petróleo fue de 100%.

Estas cepas sólo pueden crecer, por lo que a que salinidades se refiere, en un 100% a 70 ppm. Al igual que el anterior este fenón es de los menos eurihalinos, pues sus cepas no crecen a 0 ppm y sólo el 60% lo hace a 120 ppm; a pesar de esto último hay también, como en el fenón anterior - un elevado porcentaje de crecimiento a 180 ppm (40%).

Se producen exoenzimas en porcentajes muy bajos. A excepción de la catalasa, con un 100% de porcentaje, ninguna otra rebasa siquiera el 50% y sí la ADNasa, ureasa y gelatinasa tienen un porcentaje de 0.00.

En este fenón los ácidos orgánicos y grasos son los que se utilizan en mayor proporción y los últimos exhiben el I.M.U. más alto de los 18 fenones para esta familia. Los aminoácidos también son producidos en proporciones altas (I.M.U.= 74.66).

Fenón 10:

Una mezcla entre cepas de las estaciones 10 y 13 se presenta en este fenón de 5 cepas, correspondiendo la mayoría a las del agua, estación 10 (3 cepas).

Se presentan las mismas características morfológicas de los fenones precedentes: bacilos Gram negativos con colonias crema-blancas.

El metabolismo del Nitrógeno es una característica importante de este fenón, pues en condiciones aerobias presenta uno de los porcentajes más elevados de reducciones de nitratos y nitritos (60%). En anaerobiosis la producción de Nitrógeno gaseoso es de un 100%. La fermentación de glucosa apenas alcanza un 20% y no existe oxidación del carbohidrato.

En este fenón el PHB se acumula en todas las cepas.

La producción de exoenzimas es muy elevada. Amilasa, ADNasa y oxidasa son producidas en porcentajes del 100%. Las demás exoenzimas se producen en porcentajes iguales o

mayores al 75 % a excepción de la ureasa, que alcanza el -- 60%, porcentaje relativamente elevado para la producción de esta substancia.

En las pruebas nutricionales se muestra de nuevo que -- las familias de ácidos orgánicos y grasos fueron las que se consumieron en mayor medida; les siguen en importancia los ácidos dicarboxílicos, quienes presentan una C.C. igual a 100.00. En las demás familias este parámetro es mas bien -- bajo excepto en los aminoácidos (C.C.=80.00). La A.A. glo-- bal y de las distintas familias es superior a 30.00 excepto en los ácidos orgánicos.

Fenón 11:

Constituido por 10 cepas de la estación 32; 8 del agua y 2 del sedimento.

Su morfología una vez más es de bacilos Gram negativos con colonias crema-blanco. Tiene un comportamiento igual al del fenón anterior en cuanto a la reducción de nitratos, pe-- ro la de nitritos y la producción de Nitrógeno gaseoso son mas bajas que en aquel.

Es un fenón poco resistente a los cambios de salinidad, aunque hay crecimiento en las 4 concentraciones. A 120 y -- 180 ppm. se muestran los más bajos porcentajes entre los fe-- nones que pueden crecer a estas salinidades. La degradación del petróleo es muy alta (90%) y pocas cepas fermentan la -- glucosa. Al igual que en el fenón 10, todas las cepas acumu-- lan PHB.

En este fenón comienzan a presentarse bajos índices de utilización para las pruebas nutricionales. El I.M.U. total no llega a 30.00. Los compuestos mas utilizados son los ácidos orgánicos y los grasos, pero el valor de sus I.M.U., especialmente en los ácidos orgánicos (que en fenones anteriores llegaba usualmente a 100.00) experimenta una reducción drástica. Los aminoácidos también muestran I.M.U. relativamente bajo, así como los carbohidratos, quienes en este fenón sólo ven consumidos 5 de los 14 substratos probados.

La Capacidad Catabólica también es baja en este fenón, tanto para las diversas familias químicas como para el total, pues sólo los ácidos orgánicos logran obtener un valor de 100.00 y los ácidos dicarboxílicos de 75.00. Todas las demás familias químicas presentan la C.C. igual o menor a 60.00.

La Afinidad Asimilatriz es superior a 50.00 tanto en ácidos orgánicos como en grasos, sólo los carbohidratos -- (por su bajo consumo generalizado) la presentan baja.

Fenón 12:

Dos cepas del sedimento, estación 13 y una del agua, estación 32 constituyen este pequeño fenón que en sus características morfológicas y de tinción Gram es igual a los anteriores: Bacilos de colonia crema-blanco y Gram negativos.

Sin embargo presenta características fisiológicas muy particulares. Es el único fenón en el que todas las cepas pueden reducir nitratos y nitritos y en el que ninguna produce Nitrógeno gaseoso. No oxida la glucosa aunque una de -

las 3 cepas sí la fermenta. Al igual que en los 2 fenones anteriores, se acumula PHB en todas las cepas e igual que en los 2 siguientes todas degradan petróleo. La producción de exoenzimas es bastante baja, el tween 80 no se produce en este fenón.

Los compuestos orgánicos más utilizados son los ácidos orgánicos y grasos, pero ninguna familia tiene una C.C. de 100.00 y las A.A. son siempre superiores a 30.00. Todo lo cual se ve reflejado en los resultados totales del fenón.

Fenón 13:

Formado por 2 cepas del agua, estación 12 y una del mismo hábitat, estación 13.

Junto con el fenón 1 es el único con un 100% de cepas pleomórficas, en un 67% de color crema-blanco en sus colonias y en un 33% amarillo-verdes; todas Gram negativas.

La degradación del petróleo se efectúa en todas las cepas.

Este fenón es poco eurihalino dado que sólo una de las 3 cepas crece a 120 ppm. y ninguna a 180, aunque todas lo hacen a 0 y 70 ppm. Ninguna cepa crece a 4°C.

El metabolismo del Nitrógeno es prácticamente lo opuesto al fenón anterior. Ninguna cepa es capaz de reducir ni los nitratos ni los nitritos, y en cambio el 67% es capaz de producir el Nitrógeno gaseoso en anaerobiosis.

Hay una elevada producción de exoenzimas. Si bien la u

reasa no es producida por ninguna cepa, en cambio todas -- producen ADNasa y tween 80, y el 67% catalasa y oxidasa.

Los aminoácidos y ácidos grasos son las familias consumidas preferentemente, pero en bajos porcentajes. Entre los alcoholes sólo se consume el Glicerol, sólo el Citrato entre los ácidos orgánicos y el succinato entre los dicarboxílicos, lo cual produce I.M.U. y C.C. bajas.

Fenón 14:

5 cepas del sedimento, estación 13, integran este fenón que muestra cepas formadas por bacilos Gram negativos, tanto de color crema-blanco como amarillo-verde en sus colonias.

En este fenón todas las cepas degradan el petróleo y son fermentadoras de glucosa.

Entre las exoenzimas la amilasa se sintetiza por parte de todas las cepas. Al igual que en los tres anteriores fenones no hay producción de leván. Las cepas del fenón pueden crecer todas entre 0 y 120 ppm, pero ninguna resiste -- 180 ppm. de salinidad.

Los ácidos orgánicos y los grasos son los que se consumen en mayor proporción y por tanto presentan un I.M.U. mas elevado. Entre los alcoholes sólo se consume el glicerol y los compuestos aminados tienen I.M.U., A.A. y C.C. igual a cero. En general las Capacidades Catabólicas son bajas exceptuando a los ácidos orgánicos; las Afinidades Asimilatrices son bastante altas a excepción de alcoholes y compuestos a-

minados.

Fenón 15:

Este fenón agrupa a 7 cepas del sedimento, estación 13 y una del agua, estación 6, y está constituido también por bacilos Gram negativos y de colonias crema-blancas.

La degradación del petróleo se efectúa por parte del 88% de las cepas y en el mismo porcentaje se redujeron los nitratos. Es uno de los pocos fenones en los que la producción de Nitrógeno gaseoso es menor a la reducción de nitratos e igual a la de nitritos,

También sus cepas son capaces de crecer entre 0 y 120 ppm, y el 75% crece a 4°C. Tiene un relativamente alto porcentaje de almacenamiento de PHB.

Nutricionalmente son una vez mas los ácidos orgánicos y grasos los que se utilizan en mayor medida. Las Afinidades Asimilatrices siguen siendo muy altas y la C.C. se eleva en comparación con sus valores en los últimos 4 fenones, pero sin llegar a sobrepasar los de los primeros 10.

Fenón 16:

Agrupa 7 cepas del sedimento, estación 12.

La morfología de este fenón es muy diferente a la de la mayoría de los fenones y en especial a la de los inmediatamente precedentes. En este renglón los resultados son perfectamente coherentes: 86% de bacilos y 14% de pleomórficos; 86% de Gram positivos y 14% de Gram negativos. Dentro de --

los Bacilos el 29% son esporulados con espora deformante y otros tantos con espora no deformante. Es el fenón que -- presenta mayor porcentaje de Gram positivos entre los 18 agrupamientos bacterianos.

Todas las cepas fermentan y reducen la glucosa. Ninguna cepa reduce los nitritos pero el 67 % reduce los nitratos. En anaerobiosis el 71% produce Nitrógeno gaseoso. Como en otros 7 fenones no hay producción de leván. El 67 % degrada el petróleo del pozo IXTOC 1.

La producción de exoenzimas alcanza un alto nivel. --- Tween 80, catalasa y oxidasa son sintetizadas por todas las cepas, las dos terceras partes del fenón sintetizan amilasa y ADNasa y la mitad gelatinasa. Unicamente la ureasa no es sintetizada por ninguna cepa.

Este fenón es el segundo más euritérmico de los 18, -- pues 6 de las 7 cepas crecieron a 4°C; en cambio es el más stenohalino, pues sólo hay crecimiento celular a 0 y 70 ppm.

Desde el punto de vista nutricional los ácidos dicarboxílicos y grasos son los que se utilizaron en mayor escala. Todas las demás familias químicas de compuestos fueron utilizadas en niveles muy bajos, lo cual expresó en sus bajas Capacidades Catabólicas (exceptuando de nuevo a los ácidos orgánicos) y en sus Afinidades Asimilatrices.

En este sentido es importante hacer notar que los aminoácidos, normalmente consumidos en altos porcentajes, en este fenón presentan un I.M.U. próximo a cero, pues sólo la

histidina se aprovechó, y el lactato, un hidroxiaácido cuyo porcentaje de utilización fue casi siempre de 100%, en este fenón fue sólo de 71%.

Fenón 17:

Formado por 3 cepas del agua, estación 12.

Cepas de cocos y pleomórficos (único fenón con estas características) predominando los últimos y con colonias -- crema-blanco y amarillo-verde, predominando estas últimas. Las 3 cepas son Gram negativas y todas degradan el petróleo.

Todas fermentan la glucosa y sólo una no la oxida. Una reduce los nitratos y ninguna los nitritos, pero sólo una no produce Nitrógeno gaseoso en condiciones de anaerobiosis. - Hay una producción de leván relativamente alta.

Al contrario como sucedió en el fenón 16, éste es el más eurihalino, pues sólo una de las cepas no fue capaz de crecer a 180 ppm.

En los medios nutricionales el fenón mostró una mayor capacidad para crecer en ácidos dicarboxílicos y ácidos grasos, y en la mayoría de las familias la C.C. fue mayor que en algunos de los fenones anteriores.

Fenón 18:

Agrupada también a 3 cepas del agua: 2 de la estación 6 y una de la 13.

Este fenón está compuesto por una mayoría de bacilos y una cepa pleomórfica. Las 3 con colonias crema-blanco y Gram negativas; el 67% degrada petróleo.

En este fenón la característica más importante en cuanto a su fisiología es el tan elevado porcentaje de producción de exoenzimas. A excepción de la ureasa las otras 6 -- probadas fueron producidas por todas las cepas, e incluso -- la ureasa exhibió su porcentaje mas elevado a lo largo de -- los 18 fenones (67%).

En otros aspectos de las pruebas fisiológicas las 3 cepas producen Nitrógeno gaseoso en anaerobiosis y el 33% -- fermenta y oxida la glucosa.

Nutricionalmente el fenón también es interesante pues a excepción del glutamato, ningún otro de los 58 compuestos químicos restantes fue utilizado, dando como resultado, los más bajos índices de utilización y Capacidades Catabólicas, al igual que Afinidades Asimilatrices, casi siempre iguales a cero, excepto en la familia de los aminoácidos; (A.A.=25.81) De este modo el glutamato se convierte en el substrato más -- utilizado por las cepas integrantes de los 18 fenones.

Una relación de las cepas integrantes de los fenones -- se puede encontrar en el dendrograma y en la Tabla 9, en tan -- to que la Tabla 7 muestra los porcentajes obtenidos en las pruebas morfológicas y fisiológicas. La Tabla 6, correspondiente a porcentajes de utilización de compuestos orgánicos, muestra los resultados obtenidos en pruebas nutricionales.

TABLA 6:

PORCENTAJE DE UTILIZACION DE SUSTRATOS ORGANICOS.

SUSTRATOS	FENOMES																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
CARBOHIDRATOS:																			
Arabinosa	100	95	75	0	67	11	55	29	60	0	0	0	33	0	0	0	0	0	
Ribosa	100	95	58	40	100	56	100	27	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	
Glucosa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fructosa	100	100	100	100	100	67	83	100	80	80	0	67	0	100	50	0	67	0	
Galactosa	100	87	63	80	67	56	45	37	20	20	10	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosamina	100	100	100	40	90	94	91	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Mannosa	100	97	100	80	100	67	81	29	30	0	0	0	0	0	13	0	0	0	
Ramnose	67	87	88	40	17	61	100	43	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
Celulosa	100	92	88	40	67	17	91	43	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lactosa	100	82	38	0	50	11	91	43	20	60	0	0	0	0	0	0	0	0	
Maltosa	0	87	88	40	0	11	81	86	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	
Sacarosa	67	97	100	40	87	23	100	100	100	100	20	100	0	100	100	0	67	0	
Trehalosa	100	97	100	40	87	23	91	100	0	0	0	33	33	20	50	0	33	0	
Amidasa	67	100	100	40	87	11	18	100	0	60	0	67	33	0	13	29	0	0	
J.M.U.	88.14	89.14	85.92	37.71	66.75	36.14	76.64	66.42	34.28	35.71	7.14	19.07	9.42	22.85	29.57	4.07	21.35	0.00	
A.A.	28.14	23.70	18.11	25.02	29.75	28.35	25.50	29.34	40.17	37.76	12.04	31.93	15.87	35.11	48.03	8.77	33.00	0.00	
C.C.	92.90	100.00	100.00	77.78	92.50	92.90	100.00	100.00	57.14	71.42	35.71	28.57	28.57	35.71	50.00	21.42	35.71	0.00	
ACIDOS GRASOS:																			
Acetato	67	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	57	100	
Propionato	35	64	38	0	100	72	73	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	33	
Sulfato	67	92	88	100	100	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	29	100	0	
Pelargonato	0	0	0	0	0	0	0	0	29	80	0	0	0	0	0	0	0	0	
Palmitato	0	64	0	0	0	6	18	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	
J.M.U.	33.40	64.00	45.20	40.00	50.00	53.20	65.16	65.60	76.00	60.00	60.00	66.60	40.00	60.00	60.00	17.20	46.60	0.00	
A.A.	33.50	39.29	47.36	54.77	54.77	46.05	45.10	47.23	43.23	54.77	54.77	47.19	54.77	54.77	54.77	25.54	50.57	0.00	
C.C.	60.00	85.00	60.00	40.00	60.00	60.00	80.00	80.00	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00	40.00	60.00	60.00	40.00	60.00	
ACIDOS DICARBOXILICOS:																			
Oxalato	0	44	0	0	0	6	9	0	0	20	0	0	0	20	0	0	0	0	
Malonato	67	74	38	0	17	4	0	57	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0	
Succinato	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Malato	33	87	25	20	50	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	100	100	
J.M.U.	50.00	76.25	40.75	30.00	41.75	28.00	27.25	35.75	45.00	55.00	35.00	25.00	25.00	10.00	25.00	50.00	50.00	0.00	
A.A.	43.11	23.97	42.53	47.60	44.03	44.08	48.68	42.94	52.53	34.15	50.00	50.00	50.00	47.60	50.00	57.73	57.73	0.00	
C.C.	75.00	100.00	75.00	50.00	75.00	75.00	50.00	75.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	75.00	50.00	25.00	50.00	0.00	
LACTEO:																			
Lactosa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	71	100	6.00	
ACIDOS ORGANICOS:																			
Citrato	100	100	88	60	100	100	100	100	100	60	100	100	33	80	100	14	0	0	
Piruvato	100	100	63	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	86	100	0	
Alfa-Cetoglutarato	100	100	88	100	67	44	82	100	100	100	100	70	0	20	25	29	0	0	
J.M.U.	100.00	100.00	79.66	86.66	66.66	81.33	94.00	100.00	100.00	86.66	70.00	66.66	11.00	66.67	75.00	43.00	33.33	0.00	
A.A.	0.00	0.00	14.33	25.00	19.05	25.33	10.33	0.00	0.00	23.09	51.96	57.73	19.05	41.63	43.20	37.99	57.73	0.00	
C.C.	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	66.66	33.00	100.00	100.00	33.33	0.00	
ALCOHOLES:																			
Glicerol	100	100	100	100	100	100	91	100	100	100	100	100	67	80	0	0	0	0	
Adonitol	0	9	0	0	0	83	37	0	0	0	0	0	0	0	20	18	0	0	
Mesa-Inositol	0	90	100	60	50	100	45	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0	
Manitol	33	100	100	100	100	89	64	100	40	80	10	100	0	0	13	0	0	0	
Sorbitol	0	85	100	100	100	100	9	86	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	
Metanol	0	29	0	100	0	16	9	15	0	20	0	33	0	0	0	0	33	0	
Etanol	0	74	50	80	100	12	0	100	50	100	33	100	0	100	0	0	0	0	
Propanol	33	74	35	0	33	0	43	0	60	0	33	0	0	0	0	0	0	0	
Butarol	0	24	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Butilol	33	49	0	80	33	0	9	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
J.M.U.	19.90	85.60	53.80	80.00	69.90	41.40	25.40	48.60	24.00	38.00	13.00	46.60	6.70	8.00	13.90	1.40	10.00	0.00	
A.A.	33.15	17.68	44.00	31.24	38.53	44.98	31.43	42.27	49.35	38.42	30.93	42.21	21.18	35.29	11.41	4.42	21.55	0.00	
C.C.	40.00	100.00	70.00	60.00	80.00	80.00	70.00	80.00	30.00	50.00	40.00	66.66	33.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	
Fenol																			
Fenol	33	85	13	100	63	28	45	0	40	20	0	0	0	38	0	0	0	0	
AMINOACIDOS:																			
Formilalanina	33	90	0	60	83	94	91	100	100	100	30	33	0	0	13	0	0	0	
Tirosina	0	29	-63	100	83	94	82	100	100	100	80	0	0	0	100	0	0	0	
Metionina	67	92	100	100	50	100	100	100	100	100	40	67	100	60	89	57	33	0	
Triptofano	0	79	88	100	17	94	100	86	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alanina	100	90	75	100	100	100	100	100	80	100	100	100	67	100	67	100	0	0	
Treonina	67	77	75	100	33	28	55	29	0	40	0	33	67	0	0	0	100	0	
Valina	67	77	25	100	28	55	71	89	40	20	0	0	0	100	0	0	0	0	
Leucina	67	77	63	100	100	67	71	80	100	60	100	67	100	67	100	0	0	0	
Asparagina	100	27	75	120	100	89	100	100	80	80	0	67	67	-20	50	0	67	0	
Metionina	0	44	0	0	0	0	0	14	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cisteamina	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Lisina	33	79	75	100	0	28	100	86	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Arginina	100	87	100	100	83	85	91	100	100	20	100	67	100	0	33	0	67	0	
Ornitina	100	87	100	100	83	85	91	100	100	20	30	33	100	20	0	0	100	0	
Cisteina	0	54	13	80	0	0	9	14	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
J.M.U.	55.60	79.93	62.73	89.33	58.80	63.26	78.26	78.06	74.66	49.33	47.00	33.33	40.06	20.00	44.26	2.80	31.13	6.66	
A.A.	41.19	16.43	35.57	27.11	39.70	39.67	31.00	32.39	35.81	39.97	44.59	37.86	45.81	36.25	47.19	14.78	42.70	25.81	
C.C.	77.78	100.00	93.33	93.33	80.00	93.33	100.00	100.00	53.33	60.00	60.00	46.66	40.00	26.67	60.00	66.66	33.33	6.66	
COMPUESTOS AMINADOS:																			
Etanolamina	0	64	75	100	83	61	27	57	80	80	90	33	100	0	0	14	67	0	
Difetilamina	0	18	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Urea	0	51	25	0	0	0	27	14	20	0	0	0	0	0	13	0	0	0	
Tiouracil	0	21	0	0	0	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiainol	0	21	0	0	0	6	9	14	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiamina	0	64	13	0	0	0	18	14	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
J.M.U.	0.00	42.66	27.16	43.33	13.81	13.16	18.00	28.33	40.00	16.00	15.00	5.50	16.66	0.00					

FENONES

PRUEBAS FISIOLÓGICAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Prototrofia	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Prototrofia + Vitaminas	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Prototrofia + Vitaminas + Aminodados	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Reducción Nitratos	33	81	43	0	67	94	100	33	80	80	80	100	100	100	100	100	100	100	
Reducción Nitricos	0	14	14	0	33	38	40	0	20	60	20	100	0	40	38	0	0	33	
Producción de Nitrogeno Gaseoso	100	56	50	60	83	89	64	57	40	100	80	0	67	80	38	71	67	67	
Oxidación Glucosa	100	69	38	40	100	61	73	29	80	0	40	0	0	50	38	100	67	33	
Fermentación Glucosa	67	82	83	20	100	33	18	57	0	20	20	33	33	100	50	100	100	33	
Producción de PHB	67	47	57	40	67	82	90	50	60	100	100	100	67	80	68	67	67	67	
Degradación Aceite Pezo IXTOC-I	33	81	86	80	83	100	100	50	100	60	90	100	100	100	88	67	100	67	
Producción de Leván	0	28	63	0	17	11	55	29	20	40	0	0	0	0	25	0	33	0	
Amilasa	0	81	71	0	17	25	70	83	40	100	20	0	33	100	38	67	67	100	
Gelatinasa	67	69	85	33	33	19	30	100	0	75	50	50	25	67	50	100	100	100	
ADNasa	0	70	100	100	67	63	80	83	0	100	100	100	100	25	75	67	100	100	
Tween 80	100	65	100	40	100	63	40	50	40	80	60	0	100	20	38	100	100	100	
Ureasa	0	27	14	0	33	19	60	17	0	60	30	0	0	0	0	0	0	67	
Catalasa	0	85	100	100	83	83	100	100	80	80	100	67	100	88	100	100	100	100	
Oxidasa	100	58	75	20	50	61	91	29	20	100	70	0	67	40	13	100	100	100	
Salinidad 0 p.p.m.	100	97	100	100	100	100	100	14	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Salinidad 70 p.p.m.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Salinidad 120 p.p.m.	100	64	75	60	100	61	100	71	60	80	50	67	33	100	100	0	100	67	
Salinidad 180 p.p.m.	0	18	0	0	0	17	35	43	40	60	10	0	0	0	0	0	67	0	
Temperatura 40 C	33	59	25	40	0	55	73	57	100	20	10	67	0	0	75	86	0	33	
Temperatura 37 C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Temperatura 41 C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Gram Positivo	0	26	25	40	17	0	18	71	0	0	0	0	0	0	0	0	86	0	
Gram Negativo	100	74	75	60	83	100	82	29	100	100	100	100	100	100	100	14	100	100	
PRUEBAS MORFOLÓGICAS																			
Color Crema-Blanco	0	57	100	100	67	100	91	100	100	100	100	100	67	60	100	100	33	100	
Color Anaranjado-Rojo	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Color Amarillo-Verde	100	26	0	0	33	100	9	0	0	0	0	0	33	40	0	0	67	0	
Otro Color	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pigmento Difusible	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cocos	0	3	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	
Bacilos	0	74	25	40	100	94	100	100	100	100	100	100	0	100	100	86	0	67	
Espirales	0	3	13	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Filamentosos	100	21	63	0	0	6	0	0	0	0	0	0	100	0	0	14	67	33	
Espora Deformante	0	3	13	0	0	0	9	43	23	0	0	0	0	0	0	29	0	0	
Espora No Deformante	0	8	0	0	17	6	0	14	0	20	0	0	0	0	0	29	0	0	
De 1 a 2 Células	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Cadenas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Racimos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Otro Arreglo Celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TABLA 7: PORCENTAJE DE CEPAS POSITIVAS EN PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS.

4: DISCUSION

Antes de comenzar a discutir los resultados obtenidos es necesario hacer ciertas consideraciones previas en cuanto a la conformación geológica de la Sonda de Campeche y las estaciones trabajadas.

De acuerdo al tipo de sedimento puede dividirse al área de estudio en 2 partes. La primera de ellas, situada -- en la parte occidental, está caracterizada por poseer sedimentos terrígenos y una fuerte influencia fluvio-lagunar o deltáica proveniente del sistema Grijalva-Usumacinta y de las lagunas de Términos, Carmen, Machóna, etc. En ellas están situadas las estaciones 6 y 32 entre las isobatas de 6 y 10 brazas de profundidad y cercanas a la costa.

En la región oriental de la Sonda, se presenta una composición de sedimentos calcáreos y la influencia que se recibe se tiene a través de la "Corriente del Lazo", que proviene del Mar Caribe y se interna a la Sonda de Campeche -- bordeando la Península de Yucatán. En el límite aproximado -- de estas dos regiones o provincias se encuentra la zona de plataformas y por lo tanto las estaciones 10, 11, 12 y 13.

En la primera región la cantidad de arcilla en el sedimento va del 10 al 15%. En la segunda, situada entre 20 y 40 brazas de profundidad hay una cantidad de limo de más del 50% (Machado-Navarro, et.al., 1979).

Al examinar el conjunto de poblaciones que integran -- las comunidades bacterianas degradadoras de petróleo, se ob-

serva que existe una gran diversidad tanto morfológica como fisiológica.

Esta diversidad en los distintos aspectos de la caracterización bacteriana significa que en estas poblaciones coexisten muchos géneros y especies. Esto es importante para poder evaluar el impacto del petróleo en el área de estudio. En la medida en que un agente externo y nocivo para la comunidad biótica vaya aumentando su presencia, sus efectos nocivos serán cada vez mayores, lo cual puede traducirse en una eliminación cada vez más considerable de especies.

Los resultados de Lizárraga-Partida et. al. (1983) en relación a la baja proporción de bacterias hidrocarbonoclasticas con respecto al total de heterótrofas, indican un bajo índice de contaminación a causa del petróleo. Sin embargo puede añadirse que una mayor contaminación por parte de este combustible podría reflejarse en una disminución en el número de especies bacterianas, incluso hidrocarbonoclasticas, aunque la proporción de estas con respecto al total de heterótrofas aumente. Ninguna de las dos condiciones aquí señaladas se ha cumplido para la Sonda de Campeche.

Se puede distinguir el grado de homogeneidad de las poblaciones de una estación o hábitat a través de la cantidad de cepas que entran a lo largo de todos y cada uno de los 18 fenones (Fig.5). Existen estaciones en las que en general los grupos de bacterias son más similares que en otras, aunque pueda presentarse mas de un fenón por hábitat

y estación.

La estación 32 tiene 36 cepas en total entre agua y sedimento. De ellas solamente una quedó por fuera de los fenones. Las 35 restantes se repartieron en 7 de ellos, mayoritariamente en el 4 (con cepas del sedimento), en el 6 y en el 11 (con cepas del agua). Un caso similar sucede con la estación 6, en la que 21 de sus 27 cepas se integraron en 3 de los 18 fenones principalmente en el 7 (cepas del agua) y en el 18 (cepas del sedimento).

Sin embargo en otras estaciones sucedió un fenómeno diferente; en la estación 12 quedaron fuera 15 de las 35 cepas; estas cepas no formaron ningún grupo ni se integraron a ningún fenón, y en la estación 11, 18 de las 30 cepas tampoco formaron ningún grupo. Es tal la heterogeneidad de las cepas de esta estación que resulta muy difícil ubicar algún grupo con ciertas características que lo hagan diferenciarse de otros. Todos estos datos pueden observarse claramente en la Tabla 9.

Todo esto tiene importancia taxonómica porque se puede extraer como conclusión que en las estaciones 6 y 32 las bacterias hidrocarbonoclasticas, a pesar de estar en una concentración más baja que en las estaciones del área de plataformas (Lizárraga-Partida et. al., 1982) permanecen formando grupos mejor definidos que en esta última zona, en donde la heterogeneidad es mayor, así como su concentración con res-

pecto al total de heterótrofas.

La mayor presencia de petróleo en la zona de plataformas pudiera ser la causante de la heterogeneidad de bacterias hidrocarbonoclasticas en esa zona, que, sin embargo no está lo suficientemente afectada como para poder observar una -- disminución en el número de especies.

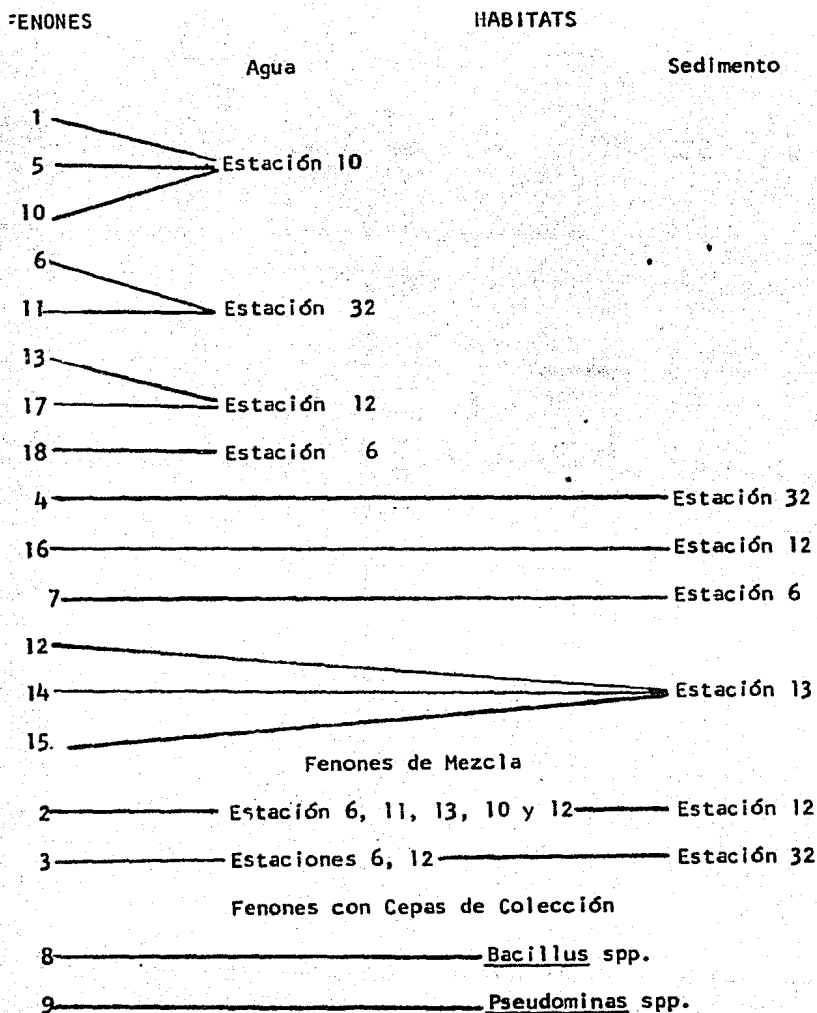
No queda sin embargo claro si el aspecto de las in----fluencias y características geológicas en ambas zonas tiene alguna relevancia en la forma de agrupamiento de las cepas.

Estas consideraciones acerca de la homogeneidad de las cepas tienen hasta aquí un carácter muy general que debe -- particularizarse para los casos de cada estación.

4.1: Análisis de fenones por estación y hábitat.

Las estaciones del área de plataformas, como se ha señalado, poseen poblaciones bacterianas más heterogéneas, pero también tienen poblaciones bien definidas. Si consideramos a cada fenón como una población encontraremos lo siguiente: La estación 10, aunque en general muy diversa y con más del 40% de sus cepas fuera de los fenones, tiene 2 poblaciones características: una en el fenón 1 y otra en el 10, ambas -- para el agua y una tercera población de agua-sedimento en -- el fenón 5. La estación 13, también con más del 40% de sus cepas sin entrar a ninguno de los fenones, muestra que la -- mayor parte de este 40% perteneció al agua, pues en el sedi--mento existen 3 poblaciones bien delimitadas en los fenones

TABLA 8: Predominancia de Hábitats y Estaciones en los 18 fenones obtenidos.



12, 14 y 15, no habiendo ningún fenón que agrupara claramente a las cepas del agua. Todo ello lleva a concluir que en todas las estaciones, a excepción de la 11, existen poblaciones de bacterias hidrocarbonoclasticas bien definidas y con mayor diversidad en el área de plataformas (Tabla 8).

Existen además de estos fenones, algunos mas que pueden considerarse como "fenones de mezcla", y los constituidos por cepas de colección. Los fenones de mezcla pueden indicar la presencia de cepas con una amplia distribución, es decir, con amplios márgenes de adaptación a las condiciones fisicoquímicas del área estudiada.

El fenón 2 no puede ser caracterizado taxonómicamente en vista de que ahí confluyen bacterias provenientes de todas las estaciones y hábitats; con todas las formas. con todos los colores de colonia; Gram positivos y Gram negativos; esporulados y no esporulados y que en conjunto presentan el Índice Medio de Utilizaciónmas alto de los 18 fenones. Similares características presenta el fenón 3, por lo cual puede decirse lo mismo que del fenón 2. Estos fenones pueden servir como un punto intermedio entre las características del área de plataformas y las del área cercana a la costa.

La integración de Flavobacterium marinotipicum en el fenón 2 no implica que alguna o varias cepas salvajes de este agrupamiento pertenezcan a este género en vista de la gran diversidad de características encontradas. Es posible, sin

embargo, que los fenones con estas características, producto de una mezcla de cepas bacterianas sean más eficientes en la degradación del petróleo como numerosos autores lo han señalado (Atlas, 1977; Atlas, 1981; Colwell y Walker, 1977).

Los fenones 8 y 9 están formados principalmente por cepas de colección. En el número 8 están agrupadas las cepas de Bacillus (con la excepción de Bacillus subtilis que no entró en ningún fenón y 3 cepas de la estación 11 (una del agua y dos del sedimento). Queda descartado el hecho de que dos de estas tres cepas pertenezcan al género en cuestión dado que han sido caracterizadas como Gram negativas. La única cepa que puede ser considerada como Bacillus sp. es la 285.

Del fenón 9, enteramente compuesto por Pseudomonas no se puede sacar mucho provecho pues no hay cepas salvajes insertas. No obstante, no debe descartarse la posibilidad de encontrar cepas de Pseudomonas sp. dada su abundancia en el medio marino, entre las especies de hidrocarbonoclasticas y en la Sonda de Campeche. De ser así se corroboraría lo establecido por Lizárraga-Partida (1979), con respecto a la originalidad de las especies de Pseudomonas aisladas del medio marino con respecto a las reportadas por Buchanan y Gibsons (1974).

Es necesario llamar la atención sobre el hecho de que al otorgárseles el mismo peso a todos los caracteres, el -

TABLA 9: Relación de las cepas incluidas en los 18 fenones y su localización.

Fenon	Número de Cepas	Habitat	Estación	%Agua y Sedimento	
1, 3 Cepas	183	Agua	10	Agua=100 %	
	186	Agua	10		
	193	Agua	10		
2, 39 Cepas	185	Agua	10	Agua=66 % Sedimento=30,80% Colección -2.56%	
	187	Agua	10		
	192	Agua	10		
	195	Agua	10		
	196	Agua	10		
	230	Sedimento	10		
	314	Agua	12		
	376	Agua	13		
	425	Agua	6		
	434	Agua	6		
	447	Agua	6		
	449	Agua	6		
	9200	<u>Flavobacterium marinotipicum</u>			
	450	Agua	6		
	358	Sedimento	12		
	362	Agua	13		
	377	Agua	13		
	381	Agua	13		
	386	Agua	13		
	250	Agua	11		
	220	Sedimento	12		
	511	Sedimento	12		
	246	Agua	11		
	247	Agua	11		
	332	Sedimento	12		
	283	Agua	13		
	227	Sedimento	10		
	234	Sedimento	10		
	416	Sedimento	13		
	288	Sedimento	11		
	466	Sedimento	6		
	316	Agua	12		
322	Agua	12			
258	Agua	11			
280	Sedimento	11			
283	Sedimento	11			
267	Agua	11			
265	Agua	11			
3,8 Cepas	326	Agua	12	Agua=75,00% Sedimento=25,00%	
	538	Sedimento	32		

	330	Sedimento	32	
	329	Agua	12	
	442	Agua	6	
	444	Agua	6	
	375	Agua	13	
Fenón 4,5 Cepas	518	Sedimento	32	Sedimento 100%
	524	Sedimento	32	
	521	Sedimento	32	
	523	Sedimento	32	
	522	Sedimento	32	
Fenón 5, 6 Cepas	197	Agua	10	Agua=50.00%
	204	Agua	10	Sedimento 50.00%
	210	Agua	10	
	405	Sedimento	13	
	235	Sedimento	10	
	237	Sedimento	10	
Fenón 6, 17 Cepas	201	Agua	10	Agua=77.00%
	519	Sedimento	32	Sedimento=22.00%
	525	Sedimento	32	
	351	Sedimento	12	
	485	Agua	32	
	364	Agua	13	
	500	Agua	32	
	483	Agua	32	
	489	Agua	32	
	486	Agua	32	
	490	Agua	32	
	491	Agua	32	
	494	Agua	32	
	495	Agua	32	
	496	Agua	32	
	499	Agua	32	
	501	Agua	32	
Fenón 7, 12 Cepas	391	Sedimento	13	Agua=83.33%
	451	Sedimento	6	Sedimento=16.67%
	468	Sedimento	6	
	461	Sedimento	6	
	475	Sedimento	6	
	458	Sedimento	6	
	459	Sedimento	6	
	472	Sedimento	6	
	474	Sedimento	6	
	488	Agua	32	
	445	Agua	6	
	540	Sedimento	32	
Fenón 8, 7 Cepas	270	Agua	11	Agua = 14.00 %
	299	Sedimento	11	Sedimento 29.00 %
	9004	<u>Bacillus polyniuxa</u>		Colección 57.00 %
	285	Sedimento	11	
	9001	<u>Bacillus lincheriformis</u>		
	9003	<u>Bacillus megaterium</u>		
	9006	<u>Bacillus sphaericus</u>		
Fenón 9, 5 Cepas	9052	<u>Pseudomonas mendocina</u>		Colección 100%

9053 Pseudomonas marina
 9057 Pseudomonas arvilla
 9058 Pseudomonas putida (Pp G1)
 9060 Pseudomonas putida (PpS 126)

Fenón 10, 5 Cepas	194	Agua	10	Agua=80.00 %
	202	Agua	10	Sedimento=20.00%
	203	Agua	10	
	389	Agua	13	
	410	Sedimento	13	
Fenón 11, 10 Cepas	492	Agua	32	Agua=80.00 %
	506	Agua	32	Sedimento=20.00%
	507	Agua	32	
	510	Agua	32	
	508	Agua	32	
	509	Agua	32	
	512	Sedimento	32	
	513	Sedimento	32	
	505	Agua	32	
	502	Agua	32	
Fenón 12, 2 Cepas	404	Sedimento	13	Agua=33.33%
	420	Sedimento	13	Sedimento=66.66%
	504	Agua	32	
Fenón 13, 3 Cepas	311	Agua	12	Agua=100.00%
	387	Agua	13	
	327	Agua	12	
Fenón 14, 5 Cepas	408	Sedimento	13	Sedimento=100.00%
	411	Sedimento	13	
	409	Sedimento	13	
	412	Sedimento	13	
	413	Sedimento	13	
Fenón 15, 8 Cepas	392	Sedimento	13	Agua=12.50%
	394	Sedimento	13	Sedimento=87.50%
	396	Sedimento	13	
	397	Sedimento	13	
	399	Sedimento	13	
	400	Sedimento	13	
	401	Sedimento	13	
	427	Agua	6	
Fenón 16, 7 Cepas	331	Sedimento	12	Sedimento=100.00%
	337	Sedimento	12	
	335	Sedimento	12	
	350	Sedimento	12	
	357	Sedimento	12	
	359	Sedimento	12	
Fenón 17, 3 Cepas	321	Agua	12	Agua=100.00%
	328	Agua	12	
	320	Agua	12	
Fenón 18, 3 Cepas	374	Agua	13	Agua=100.00%
	443	Agua	6	
	430	Agua	6	

agrupamiento de las cepas se realizó en función de los grupos de pruebas que fueron mayoritarios. En este caso las pruebas nutricionales fueron más de la mitad de las que se hicieron, y fué más en función de éstas que de las morfológicas o algunas fisiológicas como Gram o metabolismo de glucosa -que en la taxonomía clásica tienen un peso muy grande- como se llevó a cabo la agrupación de cepas, lo cual no implica que la agrupación se haya llevado a cabo de manera incoherente o contrapuesta con las que se hacen en taxonomía clásica.

4.2: Análisis Morfológico

Como se señaló en los resultados, la forma general de las cepas trabajadas fué de bacilos, sin embargo se encuentra una importante cantidad de pleomórficos en varios fenos, lo cual hace una diferencia con los resultados de Pfaender y Buckley (1980) y Buckley y Pfaender (1980), quienes reportan la existencia de cocos, cocobacilos y bacilos en su población hidrocarbonoclástica aislada del agua superficial de la Sonda de Campeche, pero no hacen mención a ninguna cepa u organismo de tipo pleomórfico.

En este estudio se encuentran estos organismos sobre todo en el agua (27%) y un porcentaje menor en el sedimento (8%). Su abundancia es mayor en las estaciones 12 y 10, ambas localizadas en el área de plataformas. Su presencia puede ser explicada en función de la etapa del ciclo de vi-

da en que las cepas fueron observadas. Asimismo, en condiciones de niveles bajos de Oxígeno algunos géneros como Moraxella (que según los autores antes señalados incrementó su concentración al aumentar la presencia de petróleo), exhiben pleomorfismo.

La cantidad de cocos y de espirales es demasiado pequeña y no se considera representativa del conjunto de la población hidrocarbonoclásica.

Es de hacerse notar que en el agua hubo una mayor diversidad morfológica y en el color de la colonia. Además, las cepas Gram negativas predominaron de manera mucho más amplia que en el sedimento. De igual modo se presentaron en el agua porcentajes más bajos de esporulados y fermentadores de glucosa, lo cual indirectamente podría estar apoyando la idea de Lizárraga-Partida y Bianchi (1978), en el sentido de encontrar una menor cantidad de bacterias con flagelación polar en el agua que en el sedimento, aunque la cantidad de fermentadores es muy alta en comparación con los datos de Leifson et. al.(1964), con poblaciones heterótrofas.

La presencia y el aumento en cantidad de poblaciones hidrocarbonoclásticas de Vibrio sp. (organismos fermentadores de glucosa) (Buckley y Pfaender, 1980) es un hallazgo que debe de tomarse en cuenta en función de la patogenicidad de este género sobre el hombre y muchas especies de

organismos de importancia comercial, y que la explotación y contaminación petrolera están ayudando a proliferar.

4.3: Análisis del Metabolismo Respiratorio

En casi todos los fenones se lleva a cabo un proceso de denitrificación con mayor eficiencia en condiciones de anaerobiosis. En este proceso los nitratos sirven como una vía alternativa al Oxígeno para la captación de electrones y la producción de ATP. En condiciones aerobias la reducción de nitritos está restringida a un número pequeño de cepas, pero la de nitratos es mayor. Este proceso se lleva a cabo en géneros bacterianos como Moraxella, Bacillus, Pseudomonas y otros (Brock 1979).

En especial las estaciones 10 y 12 son quienes mostraron con mayor claridad este fenómeno, al igual que en el sedimento de la 32. En la estación 13 es menos clara la existencia de estas rutas metabólicas y una población, la del fenon 12 es incluso incapaz de reducir los nitratos en aerobiosis.

Los procesos de denitrificación bacteriana, en la cantidad en la que se llevan a cabo en la Sonda de Campeche podrían ser en parte responsables de la baja cantidad de nitratos, nutrientes indispensables en la optimización de la actividad hidrocarbonoclastica.

El carácter anaerobio facultativo de la mayoría de las cepas a lo largo de los fenones queda reafirmado al obser-

var que en 15 de ellos la glucosa se puede degradar en condiciones tanto aerobias como anaerobias. El único agrupamiento formado por cepas probablemente aerotolerantes es el 13 tanto por su comportamiento exclusivamente fermentativo como por su nula capacidad de reducción de nitratos y nitritos en aerobiosis. Los fenones 10 y 12 son únicamente fermentadores pero reducen nitratos y nitritos en aerobiosis.

La vía Entner-Doudoroff podría ser el principal proceso por medio del cual la glucosa es oxidada aeróbicamente, al menos para todas aquellas cepas de Pseudomonas y géneros relacionados (Sokatch, 1969), aunque no pueden descartarse la vía oxidativa de las pentosas o la vía Embden-Meyerhoff.

Juntando fenones representativos de las estaciones se ve que las poblaciones son muy diferentes en este renglón de la fermentación-oxidación de glucosa. La estación 10 tiene tres fenones en el agua que son: uno más oxidativo que fermentativo, otro a la inversa y uno más en el que el 100% de las cepas oxidan y fermentan glucosa. Sin embargo las poblaciones integrantes de los fenones del sedimento, estación 13 son preferentemente fermentativos al igual que los del agua, estación 12, en donde se encuentra el fenón 13, probablemente de organismos aerotolerantes. En la estación 32 el metabolismo es más bien oxidativo tanto en el agua como en el sedimento.

Estas diferencias en el metabolismo de la glucosa -- dicen mucho acerca de la heterogeneidad existente en las distintas estaciones y hábitats trabajados.

La conclusión que se extrae a través de los resultados del metabolismo del Nitrógeno (reducción de nitratos y nitritos en aerobiosis y producción de Nitrógeno gaseoso en anaerobiosis) y del metabolismo de la glucosa (oxidación y fermentación) es que en su mayoría la población bacteriana degradadora de petróleo de la Sonda de Campeche está compuesta por organismos anaerobios facultativos. Los organismos estrictamente aerobios forman la minoría de esta población.

4.4: Análisis de la Degradación del Petróleo

El hecho de que el 84% de las cepas fuera capaz de degradar el petróleo es un dato importante porque se demuestra que en presencia de este combustible una comunidad bacteriana será seleccionada para vivir no únicamente en función de la capacidad que tenga para descomponerlo, sino además por su capacidad para obtener sus fuentes de Carbono y energía a partir de los productos de excreción y degradación del crudo por parte de las bacterias hidrocarbonoclas^{ti}cas, las cuales constituirían otra parte de la comunidad y establecen el inicio de una pequeña cadena trófica. También es factible que algunas cepas puedan perder la capacidad hidrocarbonoclas^{ti}ca debido a mutaciones y cambios --

genotípicos.

En las estaciones 12 y 13 la degradación del petróleo fue llevada a cabo por un porcentaje mas alto de cepas en el agua que en el sedimento; esto no es una característica generalizada, pues se encuentra el caso en el que la situación es a la inversa, como en las estaciones 6 y 13, en las que el sedimento muestra un porcentaje de degradación muy alto. Esto es una evidencia de que a pesar de las diferencias que puedan encontrarse entre las comunidades del agua y del sedimento, la degradación del petróleo ocurrió de manera similar en ambos hábitats.

Como se observó en los resultados, la mayoría de los fenones presenta porcentajes de degradación muy parecidos - (en 13 de los 18 fenones los porcentajes de degradación van del 80 al 100% y en 16 de los 18 van del 60 al 100%) y fenones de estaciones sometidas a condiciones físicas, químicas y biológicas muy distintas entre sí presentaron porcentajes de degradación casi idénticos, por ejemplo los fenones 6 con el 13 y el 7 con el 17. Esto significa que los porcentajes de bacterias que degradaron el crudo pueden ser altos o bajos independientemente de la estación o hábitat al que pertenezcan.

Salvo en 4 de las 58 cepas que no degradaron el petróleo, no es posible atribuir esta falta de degradación a la presencia de cepas esporuladas que pudieran resistir las condiciones hostiles. Estas 4 excepciones son cepas pertene--

cientes al sedimento de las estaciones 10 y 11.

Se sugiere que para observar los efectos que estos períodos de sometimiento a nutrición por petróleo tienen en las bacterias, se lleven a cabo experimentos con mezclas de cepas de una o varias estaciones a fin de observar probables cambios en las tasas de degradación.

El estudio de estas tasas de degradación es una consecuencia importante e inmediata del estudio de la estructura poblacional bacteriana. Sólo Atlas et. al. (1980) y Atlas (1981) han llevado a cabo estos estudios en la Sonda de Campeche pero trabajando únicamente con poblaciones del agua de regiones muy cercanas al derrame del pozo IXTOC 1. Sus estudios han indicado bajas tasas de degradación por parte de las bacterias hidrocarbonoclasticas, atribuyéndosele esto a la falta de nutrientes. Sin embargo en ninguno de los estudios mencionados se ha medido la concentración de nitratos ni de fosfatos; además, se ha señalado que en una región como la que se ha estudiado en el caso del derrame de este pozo, diversos factores físicos como las altas temperaturas, la alta actividad metabólica de los organismos que allí viven, la evaporación, la oxidación fotoquímica, etc, son factores que juegan un papel importante en la eliminación o remoción del petróleo del área del derrame (Botello y Soto, 1981). El estudio de las tasas de degradación es un elemento indispensable para completar el análisis

y caracterización de las poblaciones microbianas degradadoras de petróleo, sobre todo en los lugares cercanos a la costa, como son las estaciones 6 y 32, en las que los efectos del petróleo podrían ser más nocivos y en donde no se ha hecho ningún trabajo de esta naturaleza con poblaciones bacterianas.

4.5: Análisis de la Producción de Exoenzimas

Tres tipos de pruebas indican una mayor capacidad de las cepas del agua que las del sedimento para consumir materia orgánica. Primero unos porcentajes ligeramente superiores en las tres pruebas de prototrofia, en segundo lugar una mayor capacidad para el consumo de substratos orgánicos (lo cual se analizará posteriormente) y finalmente una mayor frecuencia de producción de 4 de las 7 exoenzimas probadas: amilasa, tween 80, ureasa y oxidasa.

Esta mayor frecuencia de producción en el agua es particularmente importante y clara en los casos de los fenones 10, 17 y 18. Algunos fenones con cepas predominantemente del sedimento tienen una producción regular de exoenzimas (fenones 7 y 16). Las estaciones con mayor producción de estas substancias son la 12 y la 6, mostrando que, al igual que en la degradación del petróleo, la frecuencia de producción de exoenzimas no está determinada ni influenciada por la región de la Sonda de Campeche en la que las poblaciones bacterianas se encuentren.

El hecho de que sea el agua donde se presenta este índice más elevado se puede explicar en función de que en la época de muestreo una gran cantidad de los vientos conocidos como "Nortes" estuvieron soplando sobre la región. Estos vientos produjeron obviamente marejadas y a su vez una remoción de los sedimentos, lugares en los que normalmente se encuentra la mayor concentración de organismos productores de exoenzimas.

4.6: Análisis de Pruebas Nutricionales

Salvo excepciones el esquema general de utilización de compuestos orgánicos como fuente de Carbono y energía fué mayor en las familias de ácidos orgánicos, aminoácidos, y ácidos grasos, teniendo los carbohidratos con Índices Medios de Utilización regulares y bajos en los casos de alcoholes y compuestos aminados, lo cual se puede observar claramente en la Tabla 6.

La Afinidad Asimilatriz tuvo valores muy diferentes de un fenómeno a otro. Los fenómenos que más substratos consumieron, así como los que no consumieron casi ninguno fueron lógicamente los que tuvieron una A.A. menor. Tales son los casos de los fenómenos 2 y 18; el primero por haber consumido todos los substratos excepto el pelargonato y el segundo por no consumir más que el glutamato. Para todos los demás fenómenos la variación en el valor de la A.A. dependió no sólo del porcentaje de utilización de los substratos

por las cepas, sino además, del número de cepas por fenón analizado y del número de sustratos por cada familia química.

Los ácidos orgánicos, carbohidratos y compuestos aminados mostraron en promedio una A.A. menor a la de otros grupos como ácidos grasos y dicarboxílicos. En los carbohidratos hay que atribuirlo a una utilización muy uniforme de los 14 sustratos probados para esta familia. En ellos el I.M.U. está siempre muy cercano a los porcentajes de consumo para cada uno de los sustratos y la A.A. por tanto, es generalmente baja, como en los fenones 2, 3, 11, 13 y 16.

Por parte de los ácidos orgánicos la A.A. baja es producto de los casi siempre altos porcentajes de consumo de los tres sustratos empleados, aunque aquí la mínima variación produce un brusco cambio en el valor de la A.A. como en el caso de los fenones 12 y 17. La baja cantidad de cepas utilizadoras de compuestos aminados es el factor determinante de la baja A.A. como en los fenones 1, 14, 15, 16, 17 y 18.

En los casos de ácidos dicarboxílicos y ácidos grasos hay una A.A. muy grande que muestra que los sustratos son consumidos en porcentajes muy diferentes entre sí. En los ácidos grasos se encuentra el único compuesto no utilizado por ninguna cepa salvaje: el pelargonato, así como el ace-

tato, que en cambio fué utilizado por el 91% de las cepas salvajes. En los ácidos dicarboxílicos se encuentra el oxalato, cuyo porcentaje de utilización más alto fué en el fenón 2 (44%) y que en 13 fenones fué de 0%; y el succinato, que en el fenón 18 tuvo un porcentaje de crecimiento igual a cero y en todos los demás de 100% a excepción del fenón 8. En estos casos las Afinidades Asimilatrices son siempre muy altas debido a tan altas fluctuaciones en los porcentajes de utilización, además de que el número de substratos es muy bajo.

En los grupos de alcoholes y aminoácidos se presenta una situación intermedia en la cual hay una A.A. alta pero que no llega a alcanzar los valores de los grupos anteriores y sin embargo la diferencia entre la utilización de substratos es de consideración.

En las estaciones 6 y 32, en la zona costera, el consumo de substratos fué menor para el agua que para el sedimento; esto es especialmente claro en el fenón 18, del agua, estación 6. En cambio en las estaciones del área de plataformas el I.M.U. es mayor para los fenones correspondientes al agua que para aquellos del sedimento. Como ejemplo se tienen los fenones del agua de la estación 12 (fenones 13 y 17) y el del sedimento de la misma estación (fenón 16). Parcialmente se observa esta situación en los fenones 12, 14 y 15, del sedimento, estación 13 y en el 2, con cierta presencia de las estaciones 10, 11, 12 y 13 en el agua.

La Capacidad Catabólica (C.C.) es consecuencia directa del Índice Medio de Utilización. En este sentido puede llegar a compartir muchas de las características de este último. El valor de la C.C. es menor en los fenones correspondientes al agua de estaciones de la zona costera que en aquellos -- correspondientes al sedimento de aquella región. Esta situación se invierte, al igual que en el I.M.U., en las estaciones del área de plataformas.

Es probable que en estos puntos señalados (C.C. e I.M.U.), la naturaleza del sedimento marino sea uno de los principales factores que afecten el consumo de materia orgánica. En los sedimentos calcáreos existe menos cantidad de materia orgánica que en los terrígenos. En estos últimos se deposita el -- grueso de la materia orgánica por parte de los ríos y lagunas que desembocan en la región, lo cual podría propiciar este alto índice de substratos orgánicos consumidos, que en el agua existen en cantidades menores probablemente. Para la zona de plataformas la situación es distinta pues no es tan determinante la influencia que los ríos tienen ahí. La "Corriente del Lazo", en cambio, podría estar dando un mayor aporte de compuestos orgánicos, aprovechables preferentemente por los microorganismos que viven en el agua. Por otro lado, esta zona tiene localizados los sedimentos a una profundidad que -- va de veinte a cuarenta brazas (como ya se ha visto) contra

6 a 10 brazas en la región costera, y esto influye también en la concentración de consumo de materia orgánica, pues la productividad decrece conforme aumenta la profundidad.

Múltiples factores más pueden converger para determinar la cantidad y el tipo de substratos orgánicos utilizados por las bacterias: la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, la naturaleza misma de la comunidad bacteriana, microbiana en general y de todo el ecosistema, determinan de una forma o de otra el modo en el que las bacterias hidrocarbonoclasticas de la Sonda de Campeche aprovechan para su nutrición a la materia orgánica. La forma precisa en que éstos y otros parámetros influyen en la nutrición de estas bacterias es un problema complejo con perspectivas en futuras investigaciones.

Una cosa puede inferirse sin embargo: la capacidad de éstos fenones bacterianos para utilizar compuestos orgánicos como fuente de Carbono y energía no está relacionada en forma coherente con su capacidad para degradar el petróleo. Por lo general se encuentran fenones con un porcentaje de degradación superior al de los Indices Medios de Utilización y Capacidades Catabólicas, pero no muestran relaciones que pudieran ser explicadas en forma alguna, por lo cual se concluye que no se puede inferir nada preciso al comparar las pruebas nutricionales con las de degradación del petróleo.

4.7: Consideraciones Finales

El estudio realizado condujo a hacer una caracterización de las poblaciones bacterianas hidrocarbonoclasticas existentes en la Sonda de Campeche en los últimos días del derrame del pozo IXTOC 1. El hecho de que no se haya podido identificar el género y especie de casi ninguna de las 204 cepas salvajes (a excepción de la 285, identificada como Bacillus sp.) no ha sido un obstáculo para su caracterización. Se demuestra así que no es necesario asignarle por fuerza un nombre a una cepa bacteriana para poder trabajar con ella, caracterizándola y estudiando su papel en el ecosistema. A lo largo de la historia de la taxonomía bacteriana se han cometido graves errores a causa de esta obsesión por asignar nombres e inventar nuevas especies al observar la mínima diferencia entre cepas bacterianas.

Sin embargo se sugiere que en el futuro se lleven a cabo investigaciones con estas poblaciones bacterianas para poder llegar a una identificación total. Esto se logrará al medir los porcentajes de Guanina-Citosina y realizar experimentos de hibridación de ácidos nucleicos.

Las poblaciones bacterianas, como cualesquiera otras en la biósfera, van cambiando su estructura con el paso del tiempo. Es probable que desde la época del crucero OPLAC II hasta la fecha, las poblaciones bacterianas en general y

las hidrocarbonoclasticas en particular hayan sufrido cambios de naturaleza muy diversa y que de uno u otro modo estén afectando al ecosistema en que viven.

Un problema que se presentó en todos los aspectos del estudio de la ecología de la Sonda de Campeche para poder evaluar no sólo el impacto del derrame del IXTOC 1, sino también el de la presencia continua de petróleo fué la ausencia de un continuo monitoreo en el área, que permita ir observando los cambios que se producen en el ecosistema, por lo cual se sugiere que se lleve a cabo este muestreo permanente, en especial para los aspectos de la ecología microbiana del área.

Este estudio no ha pretendido llegar al conocimiento profundo del cómo y por qué de todos los aspectos concernientes a la estructura de las comunidades bacterianas hidrocarbonoclasticas. Su caracterización y la observación de ciertas causas y efectos que el petróleo tiene sobre estas comunidades es una parte mínima pero indispensable en nuestro conocimiento de la ecología bacteriana de la Sonda de Campeche, a raíz de la cual se abren nuevas interrogantes que se añaden a las ya existentes. La influencia de los factores geológicos, meteorológicos y físicos en general, así como de factores químicos y biológicos; el papel jugado por los dispersantes en el combate contra la contaminación y su afectación sobre las poblaciones bacterianas, los efectos secundarios que estos organismos devoradores de petróleo tienen sobre el ecosistema y muchas otras cuestiones más deberán ser el mo-

tivo de futuras investigaciones.

Finalmente, es necesario hacer la consideración de que este tipo de estudios, como todos los realizados en México y otras partes del mundo tanto por científicos nacionales y extranjeros con motivo de los derrames masivos de petróleo han tenido un motivo central que en última instancia es: encontrar las condiciones óptimas para continuar adelante con la explotación petrolera. Pero esta explotación ha sido llevada a cabo de una manera desenfrenada y anárquica en todo el mundo, sin excluir a México. Los resultados han sido negativos en más de un sentido; el caso de la leve, pero perceptible alteración de las comunidades bacterianas es una evidencia de lo dicho y una advertencia para lo que en el futuro puede convertirse en un problema ecológico mucho más serio y cuya solución no es otra sino la de detener toda inútil y excesiva explotación petrolera.

A P E N D I C E

DESCRIPCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y
METODOLOGIA DE LAS PRUEBAS
NUTRICIONALES Y FISIOLOGICAS.

Agua de Mar Sintética de Acuerdo con el Método de Lyman y Fleming (1940).

NaCl.....	1.175 Kg.
MgCl ₂	248.00 gr.
Na ₂ SO ₄	195.00 gr.
CaCl ₂	30.00 gr.
KCl.....	33.00 gr.
NaHCO ₃	9.60 gr.
KBr.....	4.80 gr.
H ₃ BO ₃	1.30 gr.
SrCl ₂ · 6H ₂ O.....	1.20 gr.
NaF.....	0.15 gr.
NH ₄ Cl.....	36.00 gr.
KH ₂ PO ₄	4.50 gr.
Agua Destilada.....	20.00 lt.

Medio de Cultivo Tipo 2216 E
(Oppenheimer-Zobell, 1952)

Bacto-Peptona (Difco).....	5 gr.
Extracto de Levadura (Difco)...	1 gr.
Cloruro Férrico.....	1 ml.
Agua Destilada.....	800.00 ml.
Agua de Mar Sintética.....	200.00 ml.

Ajustar pH = 7.5-7.6

Agar Bacteriológico.....15.00 gr.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos y servir en cajas de Petri.

PRUEBAS NUTRICIONALES

Medio Base:

FeCl₃..... 1 ml.

Tris Buffer HCl..... 10 ml.

Agua de Mar Sintética..... 200 ml.

Agua Destilada..... 800 ml.

pH = 7.5 - 7.6

Agar Bacteriológico..... 15 gr.

Método:

El medio base se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. Por otro lado el substrato se diluye en agua destilada y a la dilución se le ajusta el pH a 7.5-7.6. Salvo las excepciones indicadas en la Tabla 3, en la cual se indican también las cantidades de cada substrato por litro de medio base, se esteriliza por filtración y se inocular en los frascos que contienen este medio. El medio de cultivo ya completo se sirve en cajas de Petri.

Las cepas se siembran con el método del replicador semi automático y se dejan crecer durante 15 días. Al término de este lapso se observa su crecimiento comparándolo con el de un testigo en el que no existe ningún substrato, sólo medio

base. Los resultados se consideran positivos si hay un crecimiento mayor que en el testigo y negativos si el crecimiento es igual o menor que en aquel.

GELATINASA (Frazier, 1926)

Medio de Cultivo:

Agar Nutritivo..... 23 gr.
Gelatina..... 4 gr.
Agua de Mar Sintética.....200 ml.
Agua Destilada.....800 ml.

pH = 7.5 - 7.6

Método:

Se sirve en cajas de Petri y se siembran las cepas con el replicador semiautomático. Al cabo de 72 y 96 horas se recubre la placa con cloruro mercúrico preparado de la siguiente manera:

Cloruro Mercúrico..... 15 gr.
HCl Concentrado..... 20 ml.
Agua Destilada.....100 ml.

La prueba tiene por objeto ver si la cepa en cuestión es capaz de hidrolizar la gelatina, por lo tanto, para ver si la prueba es positiva o negativa se observará lo siguiente:

Gelatina no Hidrolizada.....Inerte
Gelatina Hidrolizada.....Halo claro alrededor de las colonias.

TWEEN 80 (Sierra, 1957)

Medio de Cultivo:

Agar Nutritivo..... 23 gr.
Tween 80..... 10 ml.
Agua de Mar Sintética.....200 ml.
Agua Destilada.....800 ml.

pH = 7.5 - 7.6

Método:

Se sirve en cajas de Petri después de haber esterilizado a 121°C por 20 minutos. Al cabo de 72 y 96 horas se observan las colonias formadas, si se forma un halo blanco -- alrededor de ellas esto significa que hubo una depositación de cristales de Ca y por tanto la prueba es positiva, en caso --- contrario es negativa.

ADNasa (Jeffries *et. al.*, 1957)

Medio de Cultivo:

Agar para prueba de ADNasa (Difco).... 42 gr.
Agua de Mar Sintética.....200 ml.
Agua Destilada.....800 ml.

pH = 7.5 - 7.6

Método:

Se esteriliza a 121°C durante 20 minutos, se sirve en cajas de Petri el medio ya estéril y se siembran las cepas. Al cabo de 72 y 96 horas se recubren con una solución 1 N de á--cido clorhídrico. La prueba sirve para detectar la presencia o ausencia de ADNasa y en caso de ser positiva se formará un

halo blanco alrededor de la colonia, lo que no sucederá en caso de ser negativa.

UREASA (Roland et.al. 1947)

Medio de Cultivo:

KH_2PO_4	1 gr.
K_2HPO_4	1 gr.
NaCl.....	5 gr.
Urea.....	20 gr.
Alcohol 96%.....	10 ml.
Rojo Fenol 1%.....	0.25 ml.
Agua Destilada.....	1 lt.

pH = 6.7

Método:

Se esteriliza por filtración y se sirve en frascos de 5 ml. se agrega una suspensión bacteriana muy concentrada - (aproximadamente 0.5 ml. por 2 ml. de medio de cultivo) y se deja reposar por una hora a 37°C. Si la cepa contiene la exo enzima ureasa, el color del líquido virará de rojo a morado, si por el contrario la reacción es negativa, el líquido permanecerá en su color original. Se hace una segunda lectura a las 24 horas.

CATALASA

Método:

La presencia de esta exoenzima se detecta fácilmente - al agregar unas cuantas gotas de peróxido de hidrógeno

sobre la colonia bacteriana. Si la enzima está presente doblará el peróxido de Hidrógeno en agua y Oxígeno. La presencia de pequeñas burbujas indica una respuesta positiva, - si no hay tal, la respuesta es negativa.

OXIDASA (Kovacs, 1956)

Método:

Se toma una asada de una colonia bacteriana con un asa de platino y se esparce sobre una superficie de papel mojado con Reactivo de Kovacs. Si el color de la colonia se torna - morado la prueba es positiva, si no cambia su color, es negativa.

PROTOTROFIA (Marty, 1978)

Medio de Cultivo:

Acetato.....	1 gr.
Succinato.....	1 gr.
L-Prolina.....	0.5 gr.
Glicerina.....	1 gr.
Piruvato.....	1 gr.
Bacto-Agar (Difco).....	10 gr.
Agua de Mar Sintética.....	200 ml.
Agua Destilada.....	800 ml.

pH = 7.5

Tris Buffer..... 10 ml.

Método:

Se esteriliza a 110°C por espacio de 45 minutos y se sirve en cajas de Petri. Las cepas se siembran con el replicador semi automático y al igual que en las pruebas nutricionales, la lectura se hace comparando con un testigo idéntico al preparado para aquellas pruebas. Si la prueba es positiva se infiere que la cepa en cuestión puede crecer a expensas de substratos orgánicos y sin necesidad de factores de crecimiento; si es negativa se infiere que la cepa requerirá de estos factores.

PROTOTROFIA MAS VITAMINAS (Marty, 1978)

Al medio de cultivo anterior se le agrega el siguiente stock de vitaminas:

Vitamina B 12.....	0.5 mg.
Biotina.....	5.0 mg.
Acido Fólico.....	50 mg.
Acido p-Aminobenzoico.....	50 mg.
Piridoxina.....	50 mg.
Riboflavina (B 2).....	50 mg.
Tiamina.....	50 mg.
Tiourea.....	50 mg.
Pantotenato de Calcio.....	500 mg.
Meso-Inositol.....	500 mg.
Agua Destilada.....	1 lt.

Método:

Se sigue exactamente igual que para la prueba anterior.

Las cepas que no obtuvieron crecimiento en aquella y sí lo obtuvieron ahora se infiere que necesitan vitaminas como factores de crecimiento. La concentración de vitaminas en el medio debe ser de 2ml/lt.

PROTOTROFIA MAS VITAMINAS MAS AMINOACIDOS (Marty, 1978)

A todo lo preparado anteriormente se agregan 0.050 gr/lt de cada uno de los siguientes aminoácidos:

L-Cisteína	L-Asparagina	L-Arginina
L-Alanina	L-Glutamato	Leucina
L-Prolina	L-Aspartato	Glicina
Lisina	L-Metionina	

Método:

El mismo de las dos pruebas precedentes. Un resultado positivo indicará la necesidad de aminoácidos por parte de las cepas para crecer.

ACUMULACION DE PHB
(Stanier et. al., 1966)

Medio de Cultivo:

DL B-Hidroxibutirato.....	2 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 gr.
Na ₂ HPO ₄	13 gr.
KH ₂ PO ₄	4.5 gr.
FeCl ₃	0.5 ml.
NaCl.....	10 gr.
Succinato de Sodio.....	1 gr.
Agua Destilada.....	500 ml.

pH = 7.5

Método:

El medio ya preparado se reparte en los frascos de 5 ml. a razón de 2 ml. por frasco. Se inocula una cepa distinta en cada uno de ellos y se deja crecer en el medio durante 8 o 10 días, al cabo de los cuales se observan las cepas - al microscopio de contraste de fases. Si existe acumulación de poli-beta-hidroxibutirato, las células se observarán con una serie de inclusiones de color mas obscuro que el resto - del citoplasma.

PRODUCCION DE LEVAN (Fuchs, 1956)

Medio de Cultivo:

Agar Nutritivo..... 23 gr.
Sacarosa..... 40 gr.
Agua de Mar Sintética.....200 ml.
Agua Destilada.....800 ml.

pH = 7.5

Método:

Se esteriliza a 110°C por espacio de 45 minutos y se sirve en cajas de Petri el medio estéril. Se siembran las cepas por el método del replicador semi automático. La producción del polisacárido Leván se aprecia en cuanto la colonia tiene un aspecto viscoso.

VARIACION DE TEMPERATURAS

Método:

Se sirve el medio 2216 E (Oppenheimer-Zobell, 1952) en cajas de Petri y se siembran con el replicador semi automático. Se observa el crecimiento de todas y cada una de las cepas al igual que en las pruebas nutricionales.

VARIACION DE SALINIDADES

Método:

Se utiliza el medio 2216 E (Oppenheimer-Zobell, 1952) en cajas de Petri y se siembran las cepas con el replicador semi automático con las siguientes modificaciones en la composición del medio de acuerdo a la salinidad empleada:

0 ppm: Medio con agua destilada y sin agua de mar sintética.

70 ppm: Medio con 70 gr. de de sal de mar no tratada en vez de agua de mar sintética.

120 y 180 ppm: Al igual que en el anterior, el agua de mar sintética se substituye por 120 y 180 gr. - de sal de mar no tratada

El crecimiento se observa de la misma manera que en las pruebas nutricionales y los criterios de positividad y negatividad también son iguales.

DEGRADACION DE PETROLEO DEL POZO IXTOC 1

Método: Las cepas se inocularon en frascos de 5 ml. con

teniendo agua de mar sintética y agua destilada (200 ml. y 800 ml. por litro respectivamente) y una solución al 1% de petróleo del pozo IXTOC 1 como fuente única de Carbono y energía. Al cabo de 2 meses aproximadamente se observaron los resultados. Las cepas capaces de degradar el petróleo se distinguieron de las demás por presentar una mayor turbidez en el medio de cultivo en el que fueron inoculadas. las otras se reportaron como negativas.

REDUCCIONES DE NITRATOS Y NITRITOS

Medio de Cultivo:

Caldo Nutritivo (Difco).....	8 gr.
KNO ₃	1 gr.
Agua de Mar Sintética.....	200 ml.
Agua Destilada.....	800 ml.

pH = 7.5

Método:

Se esteriliza a 121°C por espacio de 20 minutos una vez que este ha sido repartido en frascos de 5 ml. a razón de 3 ml. por frasco. Las cepas se inoculan en ellos por duplicado y se dejan crecer por espacio de 15 días. Entonces se utilizan los reactivos de Griess.

Reactivo de Griess "A"	Reactivo de Griess "B"
Acido Sulfanílico.....8 gr.	Alfa Naftilamina.....5 gr.
Acido Acético.....1 lt	Acido Acético.....1 lt.

Se agregan sobre el medio unas gotas del reactivo "A"

y del "B"; si aparece una coloración rojiza o marrón la reducción a nitritos es positiva; si no hay cambio en la coloración se añaden unos cuantos granos de polvo de Zinc, y si no hay cambio de color quiere decir que la reducción fue mas allá de los nitritos, pero si se torna rojo entonces la reacción es negativa incluso para la reducción de nitratos.

PRODUCCION DE NITROGENO
GASEOSO

Medio de Cultivo:

KNO ₃	10 gr.
Extracto de Levadura.....	5 gr.
Glicerol.....	10 gr.
Bacto-Agar (Difco).....	1 gr.
Agua de Mar Sintética.....	200 ml.
Agua Destilada.....	800 ml.

Método:El medio así preparado se reparte en ampojetas desechables a razón de 2 ml. en cada una y se esteriliza a 121°C por espacio de 20 minutos. Las cepas se inoculan del frasco de reducción de nitratos por duplicado, e inmediatamente se cubren con un tapón de parafina con objeto de crear condiciones de anaerobiosis. La producción de Nitrogeno se evidencia aproximadamente a los 15 días por la expulsión del tapón de parafina a causa de la presión que aquel gas ejerce sobre el recipiente.

TINCION GRAM (Park, 1980)

Preparación de Reactivos:

Violeta Gram:

Solución Alcohólica Saturada de Cristal Violeta...114 ml.

Agua Destilada..... 1 lt.

Lugol:

Safranina: •

Yodo..... 1 gr. Solución Alcohólica Saturada..10 ml.

Yoduro de Potasio..... 2 gr. Agua Destilada.....90 ml.

Agua.....300 ml.

Método:

Previamente a la tinción se toma una asada de la cepa que se desee teñir, se esparce sobre un porta-objetos al que se le han aplicado algunas gotas de agua destilada y se deja secar.

Se tiñe con violeta gram por espacio de 1 min., se lava y seca; se aplica lugol por espacio también de 1 minuto, se lava, seca y decolora durante 45 segundos con alcohol al 95%. Finalmente se vuelve a teñir durante 30 segundos, esta vez con safranina, se lava y se deja secar.

Se observa al microscopio de campo claro. Las bacterias que muestran una coloración morada son consideradas Gram positivas; las que no se tiñen se ese color y se observan rojas o anaranjadas se consideran Gram negativas.

OXIDACION Y FERMENTACION DE GLUCOSA

Medio de Cultivo:

Bacto-Casitona (Difco).....	0.1 %
Extracto de Levadura.....	0.01 %
Sulfato de Amonio.....	0.05 %
Tris Buffer.....	0.05 %
Rojo de Fenol.....	0.001 %
Agua Destilada.....	800 ml.
Agua de Mar Sintética.....	200 ml.

pH = 7.5

Glucosa.....entre 0.5 y 1.0 %

Método:

El medio se vacía en matraces, se esteriliza a 110°C - durante 45 minutos y se vacía en ampojetas desechables a -- razón de 2 ml. por cada una. Se inocula cada cepa por duplicado en las ampojetas. Una de ellas se cubre perfectamente con un tapón de parafina para observar la fermentación. En la oxidación se deja la ampojeta en condiciones aerobias.

El medio de cultivo tiene originalmente una coloración roja, tanto en la prueba de fermentación como en la de oxidación; si el color se torna amarillo, la prueba será positiva. Si no hay cambio en el color, entonces será negativa.

BIBLIOGRAFIA

- Aheran, D.G., Meyers, S.P. y P.G Standard (1971) The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. Developmental Industrial Microbiology 12: 126-134.
- Atlas, R.M y R. Bartha (1972) Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters. Biotechnology and Bioengineering 14: 297-308.
- Atlas, R.M. y R. Bartha (1972) Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. Biotechnology and Bioengineering 14: 309-328 .
- Atlas, R.M.(1977) Stimulated petroleum biodegradation. Critical Reviews in Microbiology 5: 371-386.
- Atlas, R.M., Roubal, G., Bronner, a. y J. Haines (1980) Microbial degradation of hidrocarbons in mousse from IXTOC 1. 'En: Proceedings of a Symposium of Preliminary Results from the september 1979 Researcher/Pierce IXTOC 1 Cruise. Key Biscayne, Florida, June 9-10, 1980: 411-438.
- Atlas, R.M. (1981). Fate of oil from two major oil spills: role of microbial degradation in removing oil from the Amoco Cádiz and IXTOC 1 spills. Environment International 5: 33-38
- Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hidrocarbons: an enviromental perspective. Microbiologi-

cal Reviews (1): 180-209

- Atlas, R.M. y A. Bronner (1981). Microbial hidrocarbon degradation within intertidal zones impacted by the Amoco Cádiz oil spillage. En: Amoco Cádiz: Fates and Effects of the oil spill. Centre National pour l'Exploitation des Oceans, Paris: 251-256
- Atlas, R.M, Boehm, P.D. y J. A. Calder (1981). Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cádiz spillage, within the litoral zone. Estuarine Coastal and Shelf Science 12: 589-608
- Austin, B., Calomiris, J.J., Walker, J.D. y R.R. Colwell (1977) Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. Environmental Microbiology 34: 6068
- Austin, B., Colwell, R.R., Walker, J.D. y J.J. Calomiris(1977) The application of numerical taxonomy to the study of petroleum-degrading bacteria isolated from the aquatic environment. Development in Industrial Microbiology 18: 685-695
- Bartha, y R.M. Atlas (1977). Biodegradation of oil in seawater: limiting factors and artificial stimulation. Proceedings of the 1977 Oil Spill Conference (Prevention, Behavior, Control, Cleanup). Marzo 8-10, 1977. New Orleans, Louisiana: 147-152
- Bartha, y R.M. Atlas (1977). The microbiology of aquatic oil spills. Advanced Applied Microbiology 22: 225-265

- Bensoussan, M. (1977). Contribution a l'etude du genre Flavobacterium. Taxonomie numerique et analyse spectrale des pigments de bactéries isolees du mileu marin. Tesis Doctoral, 3er Ciclo. Université de Provence Aix-Marseille II. 97 pp.
- Bergstein, P.E. y J.R. Vestal (1978). Crude oil biodegradation in arctic tundra ponds. Arctic 31 (3): 158-169.
- Bianchi, A.J.M. (1971). Ecologie et taxonomie des bactéries hétérotrophes aerobies des sediments marins. Leur participation a la degradation des matieres organiques. Tesis Doctoral. Université d'Aix-Marseille. II 221 pp.
- Bianchi, M. (1976) Etude taxonomique et distribution ecologique des bactéries vivrioides du mileu marin. Tesis Doctoral. Université D'Aix-Marseille II 126 pp.
- Botello, A.V. (1979). Niveles actuales de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos del Golfo de México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM 6 (1): 7-14.
- Botello, A.V. (1980). Cuantificación de un derrame petrolero ocurrido en Laguna de Términos, Campeche, México. 1976. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM 7 (1): 169-176.
- Botello, A.V. y S Castro-Gessner (1980). Chemistry and natural weathering of various crude oil fractions from the IXTOC 1 oil spill. En: Proceedings of a sympo-

- sium on Preliminary Results from the September --
1979 Research/Pierce IXTOC 1 Cruise. Key Biscaine,
Florida. Junio 9-10, 1980: 387-410
- Botello, A.V. y L.A Soto (1981). Cuantificación de hidrocarburos fósiles y metales pesados en sedimentos y organismos marinos (camarón, moluscos y peces) de la Sonda de Campeche. Informe Final Presentado al Programa Coordinado de Estudios Ecológicos de la Sonda de Campeche. UNAM/ICML. 66 pp.
- Brock, T.D. Biology of microorganisms. 3a. Edición. Ed. Prentice Hall, Inc. N.J.: 802 pp.
- Broda, E. (1975). The evolution of bioenergetic processes. -
Ed. Pergamon Press. N.Y.: 211 pp.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (eds) (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 8a Edición.: 1268 pp.
- Buckley, E.N. Y F.K. Pfaender (1980). Response of the pelagic microbial community to oil from the IXTOC 1 blowout: II model ecosystems studies. En: Proceedings of a Symposium on Preliminary Results from the September 1979 Research/Pierce IXTOC 1 Cruise. Key Biscaine, Florida, Junio 9-10, 1980: 563-588.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. y C. Van Baalen (1980). Oxidation of naphtalene by cianobacteria and microalgae. Journal of General Microbiology., 116: 495-500.
- Colwell, R.R. y J. Liston (1961). Taxonomic relationships -

- mong the Pseudomonads. Journal of Bacteriology 82: 1-14.
- Colwell, R.R. y W. Wiebe (1970). "Core" characteristics for use in classifying aerobic, heterotrophic bacteria by numerical taxonomy. Bulletin of the Georgia Academy of Science 28: 175-185.
- Colwell, R.R. y J.D. Walker (1977) Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. Critical Reviews in Microbiology 5: 423-445.
- Davies, J.S. y D.W.S. Westlake (1979). Crude oil utilization by fungi. Canadian Journal of Microbiology 25: 146-156.
- Dibble, J.T. y R. Bartha (1976). Effect of the iron on the biodegradation of petroleum in seawater. Environmental Microbiology 31(4): 544-550.
- Floodgate, G.D. (1979) . Nutrient Limitation. En: Bourguin, A.N. y P.M. Pritchard (eds) Proceedings of Workshop, Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze Florida.: 107-118.
- Frazier, W.C.(1926).A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. Journal of Infectologic Disease 39: 302.
- Fuchs, A. (1956) Synthesis of levan by Pseudomonads. Nature 178: 921.

- Gherna, R.L., Pienta, P. Jong, S.C., Hsu, H, Dagget, P.M.--
Matt, H.D., Sant, M.J. y J. Piper (eds) (1980). The American Type Culture Collection. Catalogue of Strains I. 14a. Edición.: 648 pp.
- Gunkel, W. (1977) Distribution and abundance of oil-oxidizing bacteria in the North Sea. Proceedings of the 1977 Oil Spill Conference (Prevention, Behaviour, Control, Cleanup) Marzo 8-10, 1977. New Orleans, Louisiana: 127-140.
- Higgins, I.J. y P.D. Gilbert (1978). The biodegradation of hydrocarbons. En: Chater, K.N.A. y H.J. Somerville (eds) The Oil Industry and Microbial Ecosystems. - Heyden & Son, Ltd. Londres: 81-117
- Hollaway, S.L., Faw, G.M. y R.K. Sizemore, (1981). The bacterial community composition of an active oil field in the North Western Gulf of México. Marine Pollution Bulletin 11:153-156.
- Hood, M.A., Bishop Jr, W.S., Bishop, F.W., Meyers, S.P. y T. Whelan III. (1975). Microbial indicators of oil-rich salt marsh sediments. Applied Microbiology 30(6): 982-987.
- Hugh, R. y E Leifson (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

- Jeffries, C., Holtman, D. y D. Guse (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on -- nucleic acids. Journal of Bacteriology 73: 590-591.
- Kator, H. (1977). Utilization of crude oil hidrocarbons by - mixed cultures of marine bacteria. Proceedings of the 1977 Oil Spill Conference (Prevention, Behaviour, Control, Cleanup). Marzo 5-10, 1977. New Orleans, Louisiana: 47-66.
- Komagata, K Nakase, T y N. Katsuya (1964). Assimilation of - hidrocarbons by yeasts I. Preliminary screening. Journal of General and Applied Microbiology 10 (4): 313-321.
- Kovacs, N. (1956). Identification of Pseudomonas pyocyanea - by the oxidase reaction. Nature 178: 703.
- Lee, J.V., Gibson, D.M. y J.M. Shewan (1977). A numerical taxonomic study of some Pseudomonads-like marine - bacteria. Journal of General Microbiology 98: - 439-451.
- Lehninger, A.L. (1975). Biochemistry. 2a Ed. Worth Publishers Inc: 1104 pp.
- Licea, D.S., Luna, R y P. Torres. (1981). Comunidades y producción de fitoplancton en la región occidental de la Sonda de Campeche durante las campañas de Febrero a Junio de 1980, así como las conclusiones del primer ciclo anual 1979-80. En: Proyecto

- de Investigación "Evaluación de los Posibles Efectos del derrame del Pozo IXTOC 1 Sobre las Comunidades del Fitoplancton y la Productividad Primaria" (Tercer Informe). UNAM. CCML., 26 pp., 16 figs., 22 tablas.
- Leifson, E., Consenza, B.J., Murchelano, R. y R. Clevedon (1964). Motile marine bacteria. I: Techniques, ecology and general characteristics. Journal of Bacteriology 87 (3): 652-666
- Le Petit, J. (1975) Etude ecologique, taxonomique et physiologique de microorganismes se developant sur hydrocarbures en mer. Tesis Doctoral. Université --- d'Aix-Marseille III. 171 pp
- Liston, J. y R.R. Colwell (1960). Taxonomic relationships among the Pseudomonads. Bacteriological Proceedings 68: 680-686.
- Lizárraga-Partida, M.L. y A.J.M. Bianchi (1978). Bacterial flagellation at deep sea water-sediment interface. Journal du Recherche Oceanographique 3 (4): 9-11.
- Lizárraga-Partida, M.L. (1979). Pseudomonades du milieu marin, taxonomic poliphasique et ecologie. Tesis Doctoral. Université de Provence Aix-Marseille. 117 p.
- Lizárraga-Partida, M.L., Rodríguez-Santiago, H y J.M. Romero-Jarero, (1982). Effects of the IXTOC 1 blowout

- on heterotrophic bacteria. Marine Pollution Bulletin 13(2): 67-70.
- Lizárraga-Partida, M.L., Porrás-Aguirre, J. y F. Izquierdo--
Vicuña (1983) Tasa bacteriana hidrocarbonoclasticas/heterótrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la Sonda de Campeche. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (en prensa).
- Lyman, J y K.H. Fleming (1940). Composition of sea water. Journal of Marine Research 3: 134-136.
- Marty, D. (1978). Etude taxonomique et ecologique des populations bacteriennes coryneformes isolees de divers biotopes du milieu marin. Tesis Doctoral 3er Ciclo. Université de Privence Aix-Marseille. 101 pp.
- Marty, D., Bianchi, A.J.M. y C. Gatellier (1979). Effects of three oil spill dispersants on marine bacterial populations. Marine Pollution Bulletin 10: 285-287.
- Machado-Navarro, A., Ley Lou, F., Alba-Cornejo, V. y R. Cruz-Orozco (1979). Características texturales, pH y porcentajes de materia orgánica, humedad y minerales ligeros de los sedimentos colectados en el OPLAC I. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Reporte técnico.
- Mills, A., Brevil, C., y R.R. Colwell (1978) Enumeration of

petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. Canadian Journal of Microbiology 25: 552-557

N.A.S. (National Academy of Sciences) 1975. Petroleum in the marine environment. Workshop on Inputs, Fates and Effects of Petroleum in Marine Environment. Mayo 21-25, 1973 Airlie, Va., Ocean Affairs Board, U.S. National Academy of Sciences, Washinton, D.C. 107 pp.

Oliver, J.D. (1982) Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. Deep-sea Research 29 (6): 795-798.

Oppenheimer, C.H. (1980). Oil ecology. En: Geyer, R. (ed): Marine environmental pollution 1. Hydrocarbons. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam: 21-36.

Oppenheimer, C.H. y C.E. Zobell (1952). The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hidrostatic pressure. Journal of Marine Research 11: 10-18.

Park, G. (1980) Reagents, stains an miscellancous test procedures. En: Lennete, E.H., Balows, A., Haustler, W. y J. Truant. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3a. Edición. Cap. 98: 1000-1024.

Pfaender, F.K. y E.N. Buckley (1980). Respnse of the pelagic

microbial community to oil from the IXTOC 1 blow out: I. In Situ studies. En: Proceedings of a Symposium on Preliminary Results from the September 1979 Researcher/Pierce IXTOC 1 Cruise. Key Biscaine, Florida. Junio 9-10, 1980: 545-562.

Pfister, R y P. Burkholder, (1965). Numerical taxonomy of some bacteria isolated from antarctic and tropical seawaters. Journal of Bacteriology 10(4): - 863-872.

Programa Coordinado de Estudios Ecológicos en la Sonda de Campeche (1980). Informe de los Trabajos para el Control del Pozo IXTOC 1, el Combate del Derrame de Petroleo y Determinación de sus Efectos sobre el Ambiente Marino. Instituto Mexicano del Petróleo, 242 pp.

Raymond, D.D. y R. Bartha (19) Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria. Development in Industrial Microbiology 16: 97-110.

Reisfeld, A.E., Rosenberg, E. y D. Gutnick (1972). Microbial degradation of crude oil: Factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. Applied Microbiology 24(3): 363-368.

Roland, F., Bourdon, D. y S. Sztrum (1947) Differentiation rapide des enterobacteriaceae sans action sur le lactose. Annals de Institute Pasteur (Paris) 73: 914.

- Roussos, S. (1977). Taxonomie et ecologie des bacteries spheriques heterotrophes isolees du milieu marin. Tesis Doctoral, Tercer Ciclo. Universite de Provence Aix-Marseille. 107 pp.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between the cells and fatty acid substances. Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology 23: 15.
- Sneath, P.H.A. (1957). The application of computers to taxonomy. Journal of General Microbiology 17: 201-226
- Sheath, P.H.A. y R.R. Sokal (1973). Numerical taxonomy. Ed. - W.H. Freeman and Company, San Francisco: 573 pp.
- Sokatch, J. (1969). Bacterial fisiology and metabolism. Academic Press, Londres.
- Soli, G. y E.M. Bens (1972). Bacteria which attack petroleum hydrocarbons in a saline medium. Biotechnology and Bioengineering 14: 319-330.
- Soto, L.A., Gracia, A. y A.V. Botello (1980). Study of the penaeid shrimp population in relation to petroleum hydrocarbons in Campeche Bank. Proceedings of the Thirty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, San José, Costa Rica: 81-100.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N.J. y M Doudoroff (1966). The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. Journal

- of General Microbiology 43: 159-271.
- Tsukomura, M. (1976). An approach to numerical identification of bacterial species. Journal of General Microbiology 95: 207-212.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berruero, F. y A. Ramos-Cormenzana (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. Journal of General Microbiology 128 :1959-1968.
- Véron, M. (1969). Taxonomie numérique et classification des bactéries. Bulletin Institute Pasteur 67: 2739-2766.
- Véron, M. (1974). Sur un critère de calcul du meilleur niveau de coupe d'un dendrogramme de classification hiérarchique. Annals du Microbiologie Institute Pasteur 125B: 29-44.
- Walker, J.D. y R.R. Colwell (1976) Petroleum degradation by estuarine microorganisms. En: Sharpley, J.M. y Kaplan, A.M. (eds.). Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium. Applied Science Publishers. Ltd. Londres: 197-204.
- Walker, J.D., Seesman, P.A. y R.R. Colwell (1974). Effects of petroleum on estuarine bacteria. Marine Pollution Bulletin 5(12): 186-188.
- Walker, J.D. y R.R. Colwell (1976). Long-chain n-alkanes o-

- curing during microbial degradation of petroleum. Canadian Journal of Microbiology 22(6): 886-891.
- Yañez-Arancibia, A., Lara-Domínguez, A., Sánchez-Gil, P., - Guillén-Alvarez, M., Maldonado-Vargas, I., León-Aguirre A., García-Tapia, M., Abad-García, Ma. de la C., Hernández-Flores, D., Chavance, P., Linares-Amezcuca, F., Rubio-Alvarez, M. y J.L. Galaviz-Rojas (1982). Caracterización ambiental del sistema ecológico y análisis comparativo de las poblaciones de peces de la Sonda de Campeche y de la Laguna de Términos antes y después del derrame petrolero del pozo IXTOC 1. Informe Final. PCEESC/UNAM/ICML (IF). 4 Partes, 221 Páginas, 22 Tablas, 49 Figuras.
- Zobell, C.E. (1932). Factors Influencing the reaction of nitrate and nitrite by bacteria in semi-solid media. Journal of Bacteriology 24: 273-278
- Zobell, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriological Reviews 10: 1-49
- Zobell, C. E. (1950). Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. Advanced Enzimology 10: 443-486.
- Zobell, C. E. (1977). Microbial degradation of oil: present status, problems and perspectives. Proceedings of the 1977 Oil Spill Conference (Prevention, Behaviour, Control, Cleanup). Marzo 8-10, 1977. New Orleans, Louisiana: 3-16