

141  
2 ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE BACTERIAS HETEROTROFAS  
AISLADAS EN EL MARICULTIVO DEL CARACOL  
Strombus gigas Linn



T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

MA. TERESA NUÑEZ CARDONA.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	I
I INTRODUCCION	2
II OBJETIVOS	7
III ETAPAS DEL CULTIVO DE <u>Strombus gigas</u>	8
IV MATERIAL Y METODO	11
1) Muestreo	11
2) Procesamiento de las muestras	11
a) Aislamiento	13
b) Obtención de cultivos puros	13
c) Conservación de las cepas bacterianas	14
3) Estudio Fenotípico	16
a) Pruebas morfológicas	16
b) Pruebas fisiológicas y Bioquímicas	16
c) Pruebas nutricionales	17
4) Estudio Numérico	19
5) Indices de evaluación del metabolismo catabólico bacteriano.	23
a) Capacidad catabólica	23
b) Índice medio de utilización	24
c) Índice medio de producción de exoenzimas	24
V RESULTADOS Y DISCUSION	25
1) Análisis global	
a) Características morfológicas	25
b) Características fisiológicas y Bioquímicas	28

c) Características nutricionales	31
d) Potencialidades catabólicas	36
2) Resultados del análisis numérico	43
CONCLUSIONES	58
LITERATURA CITADA	60
APENDICE 1	69
APENDICE 2	73
APENDICE 3	89

## RESUMEN

Se aislaron y purificaron 259 cepas bacterianas recolectadas en las diferentes fases de cultivo del caracol marino Strombus gigas (Linn.) que se está llevando a cabo en el Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivo en Puerto Morelos, Quintana Roo.

Las cepas bacterianas obtenidas se caracterizaron mediante el Método de la Taxonomía Numérica, para ello se utilizó como medida de similitud el Coeficiente de Asociación de Jaccard que dió como resultado la formación de diez grupos separados por sus diferencias morfológicas, fisiológicas y nutricioanles observadas a través de 92 pruebas.

Las poblaciones bacterianas encontradas fueron en su mayoría bacilos gram negativos no esporulados y aerobios facultativos. Se observaron bacilos gram positivos esporulados únicamente en los cultivos de microalgas y estanques; y las células en forma de coco (tanto positivos como negativos) se encontraron en todo el sistema.

Las exoenzimas que más produjeron fueron la amilasa y lipasa. Todos los sustratos orgánicos probados como única fuente de carbono y energía fueron utilizados por más de una cepa bacteriana, observándose cierta inclinación por los ácidos grasos y aminoácidos.

## I. INTRODUCCION

Uno de los temas de investigación que actualmente tiene gran trascendencia en nuestro país es la utilización de los recursos marinos como respuesta a la demanda alimenticia.

Dentro de estos recursos se encuentran los moluscos, importantes no sólo por su abundancia sino también por su diversidad ya que sólo en las costas del Pacífico mexicano, son explotadas alrededor de 29 especies diferentes (Baqueiro, 1984).

Tradicionalmente los bivalvos y gasterópodos han sido los más explotados; sin embargo, en los últimos años la demanda ha aumentado considerablemente por lo que se ha hecho necesario el desarrollo de técnicas de cultivo intensivo y extensivo.

En el Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos (CRIEM) en Puerto Morelos, Quintana Roo, se cultiva en forma intensiva y a nivel de planta piloto el caracol marino Strombus gigas.

S. gigas es un organismo herbívoro que habita en aguas someras del Atlántico. En los últimos años esta especie ha empezado a ser una fuente comercial y lucrativa para los países del Caribe y actualmente es el segundo recurso pesquero más valuable en la región después de la langosta Panulirus argus (Leroy C. 1984).

Su carne es una fuente importante de proteína y a partir de su concha se obtienen algunos productos como son: lima para mortero, material para la manufactura de porcelanas y artesanías, etc. (Berg, 1976).

Los gobiernos y organizaciones privadas de varios países (Islas Bahamas, Belice, Estados Unidos, Cuba y Puerto Rico), donde se capturan a las conchas reinas, (como también se le conoce a S. gigas) han reconocido la necesidad de desarrollar tecnologías para criar conchas en donde las poblaciones han desaparecido por la sobrecaptura de la que ha sido objeto.

Uno de los objetivos del CRIEM es el de recuperar el nivel poblacional de S. gigas en condiciones naturales ya que se teme por su extinción en el Caribe mexicano.

Otro de sus objetivos es el de proporcionar organismos juveniles a las cooperativas pesqueras de la región para que en condiciones adecuadas puedan alcanzar tallas comerciales.

El cultivo de esta especie y de todas las especies marinas en general, involucran diferentes etapas de desarrollo hasta alcanzar la talla adecuada para su comercialización y son en las fases de producción de larvas y de cultivo de las microalgas en donde se requiere cuidado extremo.

La vida de los organismos marinos acuáticos (planctónicos) esta típicamente caracterizada por una gran mortalidad durante las etapas tempranas de desarrollo que declina con la talla (Appeldoorn y Ballantine, 1983; Appeldoorn, 1984).

Esto quizá se deba a que son susceptibles a un gran número de enfermedades, especialmente en las fases de huevo y larval. Dentro de los microorganismos que pueden causarles daño se encuentran los hongos, bacterias, virus y protozoarios. Se ha observado una alta mortalidad larval en cultivos de ostras

y moluscos debido principalmente a bacterias y virus (Tamaka, J., 1969; Brown C. y Col., 1979; Tubiash y Col., 1965).

Villena (1986), observó que en el criadero de S. gigas hubo una disminución en la producción de larvas y encontró un gran número de bacterias en los estanques en donde se cultiva dicho organismo.

Según Brown (1973), las condiciones de cultivo intensivo a las que se ven sometidas las larvas de los organismos acuáticos favorecen el crecimiento y multiplicación de las bacterias junto con la acumulación de sus metabolitos que pueden ser tóxicos para las larvas.

Guillard (1959) observó que la destrucción de las larvas se debe a la invasión de tejidos por las bacterias más que por exotoxinas secretadas en el medio, sin embargo, grandes cantidades de metabolitos bacterianos detienen completamente el desarrollo larval sin una mortalidad extensiva inmediata.

Dentro de los géneros bacterianos que se han informado como causantes de enfermedades en larvas de bivalvos están Aeromonas y Vibrio que las invaden a través del tracto digestivo (Tubiash y Col., 1965). En larvas de Crassostrea virginica se han observado a los géneros Pseudomonas, Flavobacterium, Citophaga, Achromobacter, Alcaligenes y diversas Enterobacterias (Brown, 1973).

Prieur (1976) observó que los géneros Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Flavobacterium, Citophaga, Achromobacter, Alcaligenes y Enterobacterias se encuentran asociadas a los cultivos de larvas de bivalvos.

Martin y Mengus (1977) alimentaron larvas de moluscos con bacterias y observaron que estas aportan nutrimentos y complementan a la alimentación algal clásica, pero todavía falta mucho por explorar al respecto.

Durante el estadio larval de S. gigas, este es alimentado con 4 especies de microalgas y se observó en los cultivos de ellas un gran número de bacterias por lo que se consideraron como no axénicos (Villena, 1986).

Al agregarse las microalgas a las larvas, estas reciben al mismo tiempo un inóculo muy grande de bacterias, lo que podría originar muertes masivas de larvas.

Desde hace muchos años, Berland y Col. (1970), Muchelano y Brown (1969), Litchfield y Col. (1969) informaron que uno de los problemas con los cultivos de microalgas es que se ven acompañados por poblaciones bacterianas que en su mayoría pertenecen a los géneros siguientes: Pseudomonas, Xanthomonas, Acinetobacter, Micrococcus y Staphylococcus.

Una de las principales preocupaciones de los experimentadores que estudian a las microalgas es determinar a las bacterias que las acompañan y conocer su potencial metabólico para contribuir a comprender la naturaleza de la relación algas-bacterias, (Berland y Col., 1969).

Se ha observado que algunas especies de microalgas en cultivo se desarrollan mejor en interacción con poblaciones bacterianas que en ausencia de ellas; esto depende de la especie de microalga así como de las condiciones de crecimiento, (Berland y Col. 1970).

En numerosos casos las bacterias son las responsables de la producción de sustancias de importancia nutricional que no pueden ser sintetizadas por algas como son las vitaminas (tiamina, cobalamina y biotina) aunque también pueden secretar sustancias tóxicas para las microalgas (Rheinheimer, 1984).

Sin embargo, en los cultivos de microalgas con bacterias (no axénicos), estas últimas utilizan algunas de las sustancias liberadas por las células algales vivas o muertas. Dentro de estos productos extracelulares se incluyen compuestos simples de bajo peso molecular tales como aminoácidos (prolina, lisina, y ácido glutámico) azúcares y péptidos (Bell y Col. 1974).

Rheinheimer (1984) observó que en condiciones naturales el 90% de los exudados (producto de la producción primaria) son utilizados por las bacterias ya que estos son nutrimentos fácilmente asimilables.

Aún cuando se ha incrementado el interés por el cultivo en masa de las microalgas, existe poca información concierne a las relaciones químicas, metabólicas y nutricionales en la interacción algas-bacterias (Litchfield y Col., 1969) lo cual marcó la pauta para la realización de la presente investigación.

## II. OBJETIVOS

Las cepas aisladas a partir de diferentes fases del maricultivo de Strombus gigas, serán purificadas y sometidas a diferentes pruebas morfológicas, fisiológicas y nutricionales para su caracterización mediante la técnica de la taxonomía numérica.

Esto con el objeto de contribuir al estudio de la interrelación bacterias-microalgas y su influencia en los diferentes estadios larvarios de S.gigas para establecer técnicas adecuadas en el cultivo de dicha especie.

### III ETAPAS DEL CULTIVO DE Strombus gigas

En el Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos de Quintana Roo, el cultivo de Strombus gigas se inicia con la recolección de la hueva, la cual se realiza mediante técnicas de buceo en los meses de marzo y octubre, época del desove.

Una vez obtenida, la hueva es transportada en bolsas de plástico conteniendo agua de mar. En el laboratorio, ésta se coloca en canaletas de fibra de vidrio (200 litros de capacidad) con flujo constante de agua de mar previamente pasada por un filtro de cartucho de 5 micras para eliminar la materia orgánica en suspensión. Aquí permanecen durante 5 días, tiempo que tarda la eclosión.

En el tiempo de incubación, se efectúan observaciones microscópicas periódicas de los huevecillos con el objeto de conocer la fecha de eclosión. Un día antes de que esto suceda, la hueva se traslada a estanques de concreto (1000 litros de capacidad) que contienen agua de mar sin aireación y permanecen aquí todo su estadio larvario (25 a 35 días).

Cuando se inicia la metamorfosis, se cambian a estanques de mayor capacidad (3000 litros), los cuales se mantienen en las mismas condiciones que los estanques arriba mencionados y permanecen allí hasta completar su desarrollo.

El agua que se utiliza en todo el cultivo se bombea

a través de un tubo localizado aproximadamente a 20 m de la costa y se almacena en un tanque. Antes de ser utilizada, se purifica y para ello se somete a un sistema de filtración que consta de un tubo de arena y de un tubo de PVC — por donde fluye el agua para su aireación, quedando así lista para usarse en el llenado de los estanques.

Durante su estadio larvario, S.gigas es alimentado con diferentes especies de microalgas, para ello el CRIEM cuenta con un laboratorio destinado a su cultivo, en el que se mantienen temperaturas que oscilan entre 20 y 25 °C y con iluminación constante las 24 horas.

Las microalgas cultivadas son las siguientes:

Tetraselmis chuii

Thalassiosira weisflogii

Isochrysis tahiti

Chaetoceros calcitrans

Las tres primeras especies, se cultivan con agua de mar estéril, enriquecida con medio OTT y la última con medio Provasoli modificado por Fukushima (Villena, 1986).

Pueden delimitarse tres fases en los cultivos de microalgas.

La primera es el cultivo de las cepas madres ("stocks") en tubos de ensaye conteniendo agua de mar enriquecida (con OTT o Provasoli). Cada uno de ellos inoculados con 1 ml. de

cultivo de microalgas que tienen 10 días de crecimiento.

La segunda fase comprende la producción en microalgas en matraces de dos litros de capacidad. A estos se les colocan un litro de agua de mar enriquecida y 10 ml. de cultivos de cepas madre que tienen 15 días de crecimiento.

En estas dos fases, el material de cristalería se esteriliza en autoclave junto con el agua de mar y los nutrimentos se adicionan por filtración utilizando una membrana millipore de 0.22 um de poro, para más tarde inocularlos en condiciones asépticas.

La tercera fase es la producción masiva en garrafones de 8 y 18 litros de capacidad. En estos, el agua de mar que se utiliza, es esterilizada por un sistema que consta de un filtro de cartucho de 1 micra y una lámpara de luz ultravioleta (no se controla el tiempo de exposición), posteriormente se le adicionan los nutrientes por filtración con membrana Millipore de 0.22 micras.

Estos garrafones no se esterilizan, sólo son lavados con cloro el cual es neutralizado con tiosulfato de sodio.

Después de 5-7 días de crecimiento, las microalgas están listas para emplearse en la alimentación de las larvas.

La cantidad de alimento que se suministra a las larvas en los estanques es variable y depende de la especie de microalga y de la edad o tiempo de cultivo de las larvas.

#### IV MATERIAL Y METODO

##### 1) MUESTREO

Se colectaron muestras de agua de las diferentes fases del maricultivo de Strombus gigas, en mayo y diciembre de 1984 y junio de 1985.

Los muestreos se realizaron en: estanques (1000 y 3000 litros de capacidad), cultivos de microalgas (tubos de ensaye, matraces y garrafrones), tanque de almacenamiento y larvas moribundas recolectadas de los estanques (fig.1).

En los estanques y tanque de almacenamiento el muestreo se realizó introduciendo tubos de ensaye estériles y en los cultivos de microalgas pipetas de 10 ml. las muestras se colocaron en tubos de ensaye. Para la colecta de las larvas se emplearon pipetas Pasteur estériles y se trasladaron cuidadosamente en tubos de ensaye conteniendo agua de mar artificial diluída tipo Lyman y Fleming (1940).

Las muestras fueron refrigeradas (4°C aproximadamente) y en estas condiciones se transportaron al laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM en donde fueron procesadas antes de transcurridas 6 horas después de su recolección.

##### 2) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Con las muestras obtenidas se hicieron diluciones

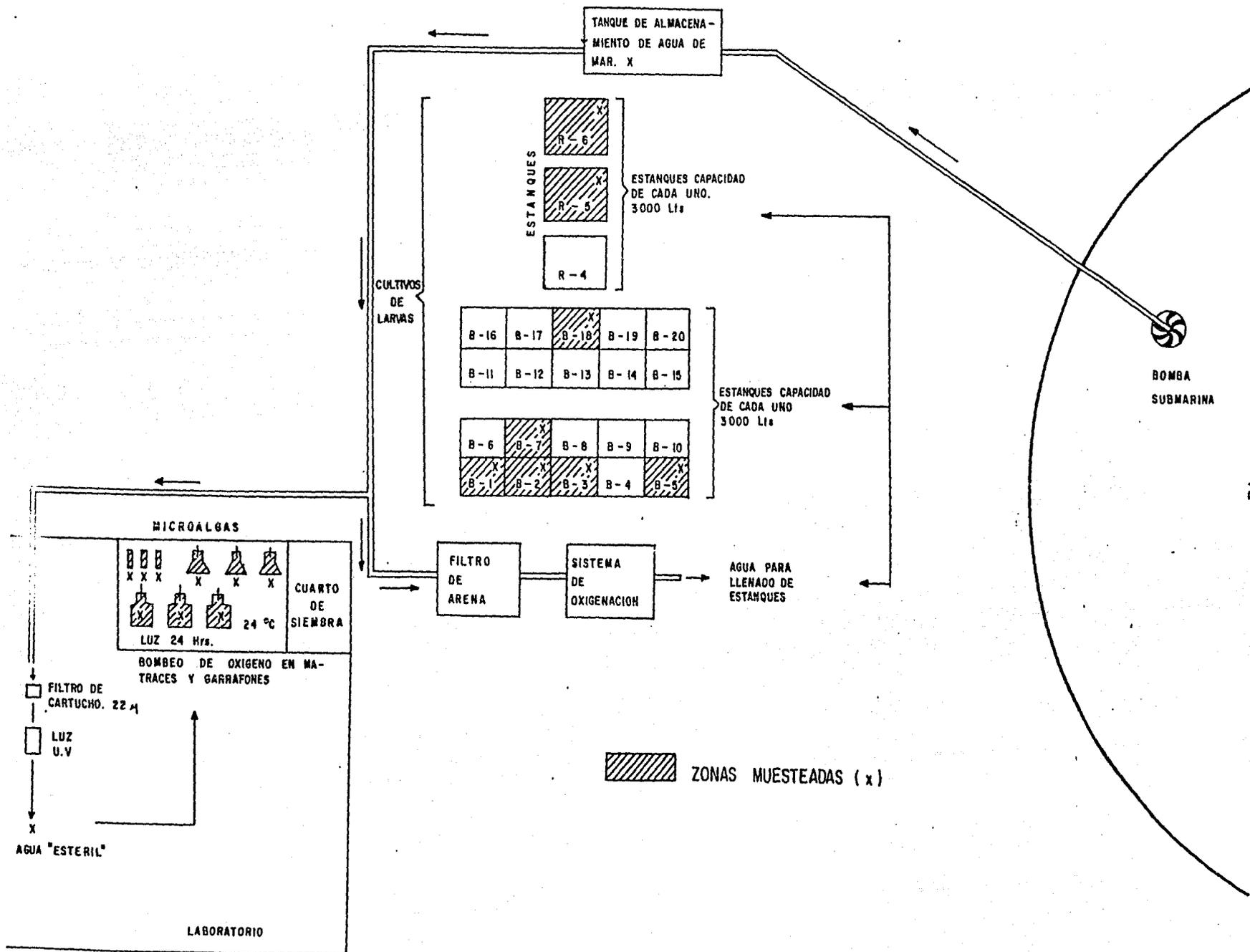


FIG. I. ARREGLO Y OPERACION DEL CRIADERO

decimales hasta  $10^{-4}$  en agua de mar artificial diluida (apéndice 2). De cada muestra se inocularon por duplicado 0.1 ml. en medio peptonado tipo Zobell (Oppenheimer y Zobell, 1952), esparciéndolos en la superficie del agar con un rastrillo de vidrio flameado previamente con alcohol.

Las larvas moribundas se homogenizaron en medio TGY (Tubiash, et al., 1965); a partir del extracto se hicieron diluciones hasta  $10^{-4}$ , inoculando 0.1 ml. de cada dilución en medio TGY sólido.

En ambas técnicas se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas.

#### a) AISLAMIENTO

Una vez que se obtuvo crecimiento en las placas se hizo el aislamiento de las colonias, a partir de aquéllos cultivos en los que se observó una mejor separación de las mismas. Se tomaron un promedio de 10 colonias por cada lugar de muestreo, para ello se utilizó una plantilla cuadrículada para aislamiento al azar (fig.2); cada colonia se resebró por estría en medio peptonado Zobell y se incubaron a 30°C durante 48 horas.

#### b) OBTENCION DE CULTIVOS PUROS

Para la purificación de las cepas bacterianas se utilizó el método de siembra-resiembra por estría de Thibault,

y Col. (1963), llevando controles de pureza macro y microscópicos en cada réplica y de la aplicación de 2 pruebas fisiológicas.

Las pruebas morfológicas coloniales y celulares que se consideraron fueron las siguientes: -para las coloniales: tamaño, elevación, color, presencia de pigmento difusible; -para las celulares: forma, arreglo, presencia de esporas y respuesta a la tinción de Gram.

Las pruebas fisiológicas ensayadas fueron: catalasa y oxidasa.

#### c) CONSERVACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Ya puras las cepas, se resembraron por duplicado en frascos de vidrio (5 ml. de capacidad), conteniendo medio peptonado Zobell, inclinado.

Después de 24 horas de incubación a 30°C, a uno de los frascos se le agregó aceite mineral estéril y ambos frascos se conservaron en refrigeración (4°C).

La resiembra de cada una de las cepas se realizó cada 90 días con el objeto de mantenerlas puras y viables.

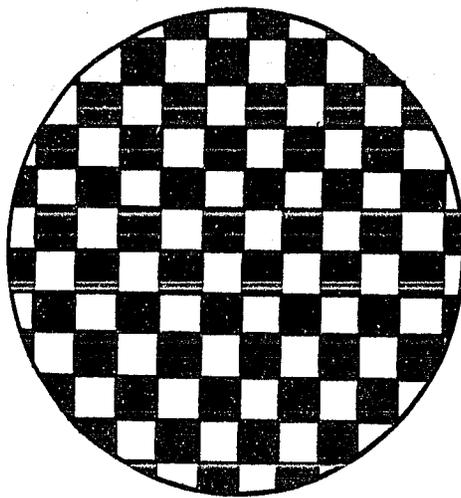


FIG. 2. PLANTILLA DE AISLAMIENTO AL AZAR.

### 3.- ESTUDIO FENOTIPICO

Este estudio se realizó con 259 cepas bacterianas silvestres y ocho de colección (Tabla 1), aplicándoles una serie de 92 pruebas divididas en: a) morfológicas, b) fisiológicas y bioquímicas y c) nutricionales (Tejero, 1977; Lizárraga, 1979; Martin, 1980) y se presentaron en el apéndice 1.

#### a) Pruebas morfológicas

Estas pruebas se efectuaron en cultivos bacterianos incubados a 30°C durante 48 horas en medio peptonado Zobell (Apéndice 2) y seleccionadas en base a las propuestas por Colwell y Wiebe (1970).

#### b) Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Este grupo comprende 32 pruebas:

- 1) Tolerancia a crecer en diferentes condiciones de: salinidad, temperatura y pH.
- 2) Producción de exoenzimas; ADNasa, amilasa, gelatinasa, lipasa y ureasa.
- 3) Requerimiento de diferentes factores de crecimiento: vitaminas, aminoácidos o ambos (prototrofas I, II y III).
- 4) Determinación de su metabolismo respiratorio; presencia de catalasa y oxidasa; reducción de nitratos, nitritos y desnitrificación; utilización de la glucosa en condiciones aerobias y anaerobias (oxidación-fermentación de Hugh y Leifson).

5) Producción de un polisacárido (Levana).

c) Pruebas nutricionales

Cada una de las cepas se inoculó por duplicado en placas conteniendo un medio base (Apendice 2) más uno de los 36 compuestos orgánicos probados con el fin de determinar la utilización de cada uno de ellos como única fuente de carbono y energía para así conocer sus potencialidades catabólicas.

Los sustratos ensayados pertenecen a las siguientes familias químicas:

- 1) Carbohidratos
- 2) Acidos grasos
- 3) Acidos dicarboxílicos
- 4) Hidroxiácidos
- 5) Alcoholes y glicoles
- 6) Aminoácidos

En el apéndice 1 se muestra el total de pruebas ensayadas y en el 2 la descripción detallada de cada uno de los medios de cultivo, preparación y lectura de las mismas.

En forma general, para algunas pruebas fisiológicas y el total de las nutricionales se utilizó un replicador múltiple de tipo manual. Este instrumento permite ensayar 20 cepas diferentes por placa.

En cada serie de pruebas se incluyeron dos placas control con medio base sin fuente de carbono y energía, que se

TABLA 1. NUMERO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DEL MARICULTIVO DE *S. gigas* POR MUESTREO Y POR LUGAR DE ORIGEN

Muestreo	O R I G E N			
	Cultivo de microalgas	Larvas	Estanque	Tanque de almacenamiento
1	102	11	42	1
2	21	8	7	5
3	62	-	-	-
Total	185	19	49	6

Total de cepas silvestres ensayadas: 259.

Cepas de colección ensayadas (Cepas de referencia)

Cepa	ATCC
<u>Bacillus subtilis</u>	6051
<u>Bacillus cereus</u>	14579
<u>Bacillus licheniformis</u>	14580
<u>Pseudomonas putida</u>	
<u>Pseudomonas spp.</u>	25411
<u>Alteromonas communis</u>	27118
<u>Alcaligenes feacalis</u>	19018
<u>Flavobacterium marinotipicum</u>	19260

Estas cepas forman parte de la colección del Laboratorio de Microbiología del ICMYL, se les aplicaron las mismas pruebas que a las cepas silvestres; fueron incluidas para utilizarlas como punto de referencia y así poder compararlas.

utilizaron como blanco y dos placas conteniendo medio Zobell, estas últimas para asegurar la viabilidad del inóculo.

El desarrollo de la inoculación con el replicador múltiple se resume en la figura 3.

#### 4.- ESTUDIO NUMERICO

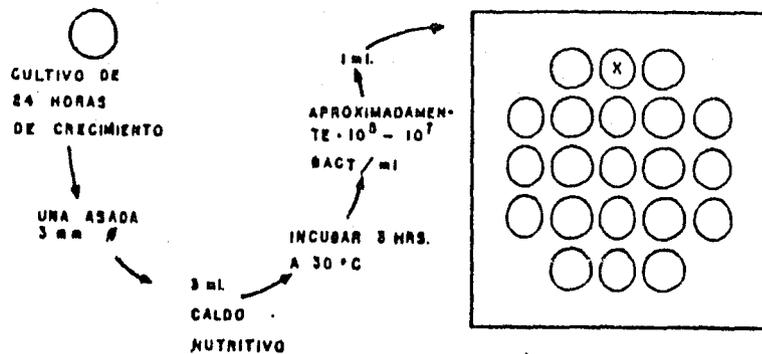
La Taxonomía Numérica puede definirse como la evaluación de similitudes entre grupos de organismos y ordenarlos en taxas definidos cuantitativamente por su similitud intergrupal o sus valores de disimilitud.

El método de la Taxonomía Numérica se ha utilizado para estudiar a un gran número de organismos superiores y ha mostrado ser muy útil en los estudios de bacterias. La mayoría de los trabajos bacteriológicos que se han hecho con esta técnica han sido 3 clases principales: a) para definir taxas y clarificar las relaciones de estos taxas con otros, b) para conocer la validez taxonómica de ciertos géneros o especies aceptadas y c) para realizar estudios ecológicos en ambientes particulares (Jones y Sacking, 1980).

En 1957, Sneath introdujo el concepto de análisis por computadora de la Taxonomía Numérica Bacteriológica y con base en la Taxonomía Adansoniana, sugirió los siguientes principios: 1) Todos los caracteres tienen el mismo peso 2) todas las características deben ser probadas para cada una de las cepas 3) los taxas son establecidos con base en su similitud (Colwell y Wiebe, 1970).

NUMERO DE SERIE				
1	X	2		
3	4	5	6	7
8	9	10	11	12
13	14	15	16	17
	18	19	20	

EL NUMERO EN CADA CUADRO REPRESENTA EL LUGAR DE LA CEPA EN LA CAJA PETRI.



PLACA DE FLEXIOLAS CON 20 CUBETAS DADA UNA CON 1 ml. DE SUSPENSION DE LA CEPA A PROBAR.  
X- REFERENCIA PARA LECTURAS.

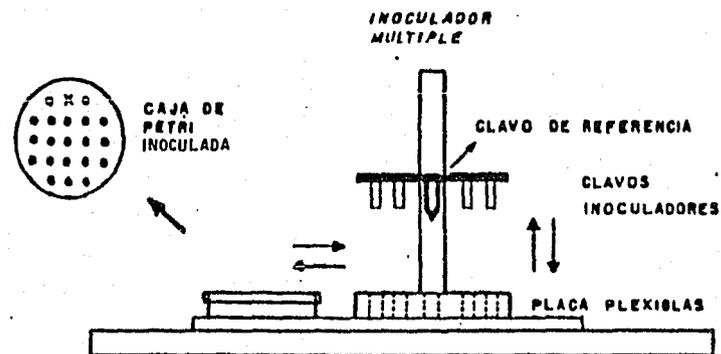


FIGURA 3. METODO DE INOCULACION MULTIPLE EN CAJA DE PETRI

Las pruebas para la aplicación de la Taxonomía Numérica están basados en datos fisiológicos y bioquímicos, debido a la escasez y a la casi nula disponibilidad de datos filogenéticos (Jones y Sacking, 1980).

Este método tiene la ventaja de que es objetivo, reproducible y la información que se obtiene es amplia (Sneath y Sokal, 1963; Colwell y Wiebe, 1970), además de que ofrece la posibilidad de manejar y comprender un gran número de datos y poder seguir las fluctuaciones en las poblaciones bacterianas.

Se han empleado un gran número de índices de similitud pero pocos han tenido aceptación en Microbiología. Los más utilizados son los índices de asociación de Gower-Michener y el de Jaccard (Jones y Sacking, 1980).

En un estudio realizado con Enterobacterias por Austin y Colwell (1977), utilizaron 35 coeficientes diferentes con 220 caracteres concluyendo que los coeficientes de asociación de Sokal y Michener (1958) y el de Jaccard (Sneath, 1957) son los más útiles para la formación de grupos coherentes.

En el presente estudio con los datos obtenidos a partir del estudio fenotípico se realizó el análisis numérico utilizando el coeficiente de asociación de Jaccard, para ello se codificaron los resultados de la siguiente manera:

- 0 Ausencia (respuesta negativa)
- 1 Presencia (respuesta positiva)

Este índice mide las coincidencias y diferencias entre dos cepas y considera sólo a las respuestas positivas sin darles importancia a las respuestas negativas en ambas cepas (a, d 0,0) como elementos en favor de la similitud (Crisci y López, 1983).

Los valores obtenidos a partir de la aplicación de este coeficiente varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud).

La expresión matemática del coeficiente de Jaccard es:

$$CAJ = \frac{a}{a + b + c}$$

De donde:  
a = (1,1)  
b = (1,0)  
c = (0,1)

Una vez obtenidos los valores de similitud por el método seleccionado se procedió al agrupamiento o ligamiento de los mismos, para ello se utilizó el método de las medias aritméticas ponderadas.

Los resultados del agrupamiento se expresaron en un dendograma o diagrama de árbol, en el que se determinó un nivel de corte para el análisis de los grupos fisiológicos con los que se trabajó.

Hay varios criterios para determinar el nivel de corte, Ravin (1963) propuso uno en el que los grupos se constituyen por géneros y especies conocidos; Véron (1974) propuso otro con base en el punto de inflexión que se obtiene al graficar el número de cepas que hay en función al porcentaje de similitud.

No obstante, la selección del nivel de corte puede ser arbitraria o bien no se establece como lo hicieron Gray y Stewart, (1980) quienes analizaron grupos bacterianos a diferentes valores de similitud.

#### 5.- INDICES DE EVALUACION DEL METABOLISMO CATABOLICO BACTERIANO.

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas nutricionales y de la producción de exoenzimas se calcularon diferentes índices para evaluar el metabolismo catabólico bacteriano. Estos permiten resumir el comportamiento "in vitro" de un grupo o población.

Los índices que se utilizaron fueron:

C.C. Capacidad Catabólica (Lizárraga, P. 1979).

IMU Índice medio de utilización (Bianchi, 1971)

IME Índice medio de producción de exoenzimas (Izquierdo, 1985).

##### a) Capacidad Catábolica

Indica la proporción de sustratos utilizados por al menos una cepa del grupo y se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

$$CC = \left( \frac{\sum nP \neq 0}{N} \right) 100$$

nP  $\neq$  0 No. de porcentajes diferentes de 0

N = Número total de sustratos probados

b) Índice medio de utilización

Este índice corresponde al número promedio de utilización de un sustrato, de una familia química o del total de sustratos probados. Indica la proporción de cepas que participa en el metabolismo de los sustratos.

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

P = Porcentaje de utilización por cada sustrato

N = Número total de sustratos probados.

c) Índice medio de producción de Exoenzimas

Este índice se expresa como un porcentaje del total de exoenzimas probadas y corresponde al número promedio de exoenzimas poseídas por las cepas asociadas a una muestra. Proporcióna la capacidad para producirlas por un grupo de cepas que participan en la degradación de ciertos o todos los sustratos que son incorporados a su metabolismo.

$$IME = \frac{Pe}{Ne}$$

Pe = Porcentajes positivos de exoenzimas

Ne = Número de exoenzimas Probadas

## V RESULTADOS Y DISCUSION

### 1) ANALISIS GLOBAL

Los resultados obtenidos para las 92 pruebas realizadas en las 267 cepas bacterianas estudiadas, se exponen en tres fases: por muestreo, por lugar de origen y por el total de cepas ensayadas en la tabla 2 del apéndice 3.

A continuación se hizo un análisis de las características generales de las cepas trabajadas.

#### a) CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

##### Características coloniales

Del total de cepas sólo el 8% presentó un tamaño menor de 5 mm y se encontraron porcentajes iguales para las tallas más pequeñas (46%). Estos resultados concordaron con los que obtuvieron Muchelano y Col. (1975), quienes trabajaron con un cultivo de Crassostrea virginica.

El 77% de las colonias fueron convexas y la coloración varió considerablemente pero predominaron las colonias con pigmento; según Austin (1982) ésta es una característica importante para las bacterias marinas. Con respecto a las

colonias transparentes, sólo el 37% presentaron esta característica. El valor más bajo fue para las colonias con pigmento difusible (característica del género Pseudomonas). Estos resultados fueron observados en los muestreos 1 y 2 ya que en el tercero, la mayoría de las colonias fueron transparentes y todas se aislaron a partir de los cultivos de microalgas.

### Características celulares

El 69% de las cepas aisladas presentaron forma de bacilo, el 21% de coco y el 8% de cocobacilos. El menor porcentaje correspondió a las células pleomórficas (2%).

El número de cocos observados en el sistema fue muy alto con respecto a los resultados obtenidos por otros autores quienes informaron porcentajes de cocos no mayores del 5% en cultivos de microalgas (Berland y Col., 1969, 1970; Litchfield y Col., 1969), larvas (Muchelano y Brown, 1960; Muchelano y Col., 1975) y en agua de mar (Carballo, 1975; Izquierdo, 1985).

En los dos primeros muestreos se obtuvieron los porcentajes de cocos más altos (24% y 22%, respectivamente) y en los aislamientos de origen larval, de las 19 cepas aisladas, el 53% de ellas presentaron ésta característica.

La mayoría de las células estuvieron solitarias o en pares (77%) y los arreglos de menos de 5 células aparecieron en un 10%, un valor cercano se observó en los arreglos de más de 5 células (11%).

En cuanto a la presencia de espora, el número de células con esta característica superó considerablemente a los que se mencionan en otras investigaciones: Martin y Bianchi (1980), en un análisis que realizaron con microalgas, encontraron sólo el 1% durante la primavera y el 3% en el otoño; Muchelano y Brown (1969), en estudios realizados en cultivos de microalgas y de Mercenaria mercenaria, observaron el 0.8% de bacilos esporulados aunque en el cultivo de Clorella sp., se aisló un número mayor (12%).

En el presente estudio se obtuvo el mayor porcentaje de cepas con espora en los cultivos de microalgas (16%) y en los aislamientos del primer muestreo (20%).

Es necesario señalar que en condiciones naturales, los bacilos esporulados se asocian más a los sedimentos que al agua (Izquierdo, 1981).

La mayoría de las cepas presentaron una reacción negativa a la tinción de Gram (73%) y sólo un 27% tuvo una reacción positiva.

Según Bianchi y Martin (1978), las bacterias Gram positivas (Bacillus y Micrococcus) son inhibidas por las células del fitoplancton.

#### b) CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

El 88% de las cepas pudieron desarrollarse en ausencia de sales y el 100% crecieron con una concentración del 2%, misma que contienen todos los medios de cultivo trabajados además de que la concentración de sales que se encuentran en el medio ambiente marino fluctúan entre 35 y 37 partes por mil aunque estas varían considerablemente (Izquierdo, 1981).

Al aumentarse la concentración de sales, disminuyó el número de cepas que fueron capaces de crecer en ellas, por lo que de las 267 cepas ensayadas, sólo el 18% de ellas pudieron soportar la concentración de sales más elevada (18%). No obstante, las cepas trabajadas se consideraron como halotolerantes.

En las pruebas de temperatura, un porcentaje muy bajo fue capaz de crecer a 4°C mientras que en las temperaturas más altas crecieron todas, sin observarse variaciones considerables en ninguno de los tres muestreos realizados y el origen de las cepas tampoco influyó en su tolerancia a las temperaturas.

En cuanto a su capacidad para crecer a diferentes

pH, el total de las cepas crecieron a un Ph de 7 lo cual resultó lógico ya que además de que corresponde a la neutralidad, Lynch y Poole (1979), afirmaron que el pH óptimo para la mayoría de las bacterias acuáticas está entre los valores de 6.5 y 8.5, que corresponden a la mayoría de los cuerpos de agua.

Más del 90% de las cepas pudieron crecer en los pH de 8 y 9; en los pH más bajos, las cepas aisladas durante el primer muestreo y las obtenidas de los estanques, fueron las más resistentes a el pH de 4. Sólo el 22% de las cepas pudieron crecer a pH de 3. Puede afirmarse que las cepas trabajadas resistieron intervalos amplios de pH.

Las características del metabolismo respiratorio fueron las siguientes: el 90% de las cepas presentaron catalasa y el 79% oxidasa, esto varió muy poco con respecto al lugar de origen.

La capacidad de reducción de nitratos se presentó en el 73% de las cepas, y en los aislamientos del tercer muestreo el porcentaje fue mayor (84%); en condiciones anaerobias y a partir de los nitratos el 35% los llevó a nitritos y sólo el 26% los llevó más allá de los nitritos.

Un poco más de la mitad de las cepas fueron capaces e acidificar a la glucosa, el 45% la alcalinizó y el 36% la fermentó.

Con respecto a la producción de exoenzimas y a la producción del polisacárido de levana, se obtuvieron los siguientes resultados:

Las cepas que produjeron ureasa y gelatinasa fueron poco numerosas (15% y 13%, respectivamente), porcentajes mayores se observaron en la producción de amilasa (54%) lipasa (41%) y ADNasa (36%).

En los tres muestreos se mantuvieron casi iguales estos resultados, a excepción de la ADNasa que se observó en un mayor porcentaje en las cepas del tercer muestreo. Sin embargo, sí se encontraron diferencias con respecto al lugar de origen.

En los aislamientos obtenidos de los homogenizados de las larvas moribundas, la presencia de ADNasa fue mayor que la de lipasa, lo mismo ocurrió con los de los cultivos de microalgas y en las del tanque de almacenamiento, en donde hubo una mayor producción de amilasa y lipasa.

La presencia de un mayor número de cepas productoras de amilasa y lipasa difirieron con respecto a los resultados obtenidos por Muchelano y Brown (1969), en donde los porcentajes mayores fueron para las exoenzimas proteolíticas y amilolíticas.

Sin embargo, Gillette (1981); Litchfield y Col. (1969) y Lizárraga (1976), mencionan que en estudios realizados con bacterias del género Pseudomonas, se observaron valores mayores de amilasa y lipasa.

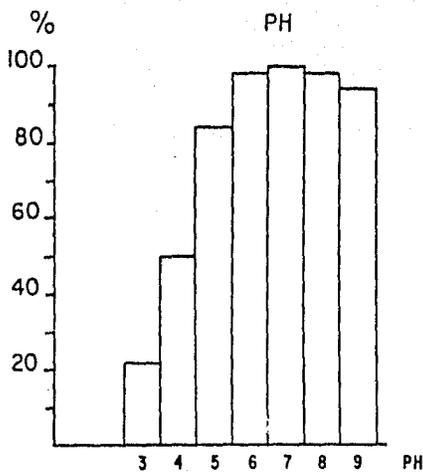
Los resultados que aquí se obtuvieron se debieron a que las cepas que se trabajaron pertenecen en su gran mayoría a este género (Villena, 1986).

Refiriéndose a la producción del polisacárido de Levana, ésta fue muy baja ya que del total de cepas estudiadas, sólo el 25% fueron capaces de producirlo. No se observaron cambios notorios de un muestreo a otro y aún menos en las cepas de los diferentes lugares muestreados.

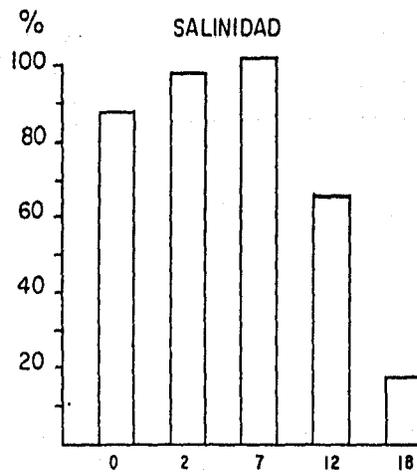
En la figura 4 se muestran los porcentajes positivos de las 267 cepas bacterianas para las pruebas fisiológicas y bioquímicas, y en la tabla 2 (apéndice 3) se listan los resultados para cada una de estas pruebas.

### C) CARACTERISTICAS NUTRICIONALES

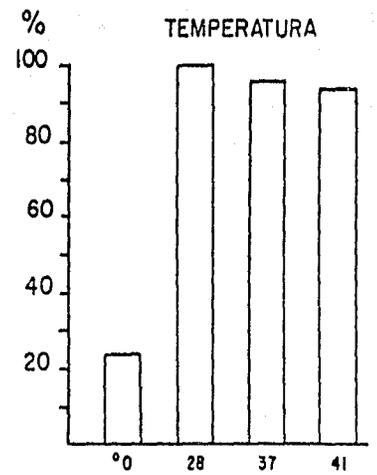
De los 36 sustratos que se probaron como única fuente de carbono y energía, el lactato, alanina y prolina (83% para los dos primeros y 82% para el último), fueron los sustratos mejor utilizados, mientras que el metanol y el oxalato de amonio (4% y 15% respectivamente), mostraron ser poco favorables para el desarrollo de el total de las cepas ensayadas (fig. 5).



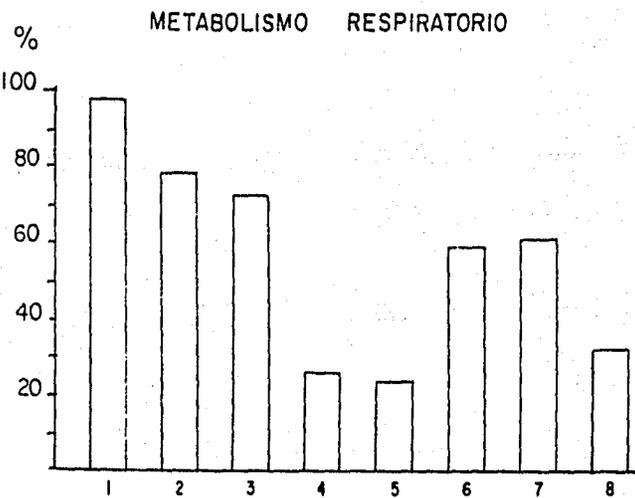
PH	%
3	22.
4	51
5	86
6	98
7	100
8	98
9	95



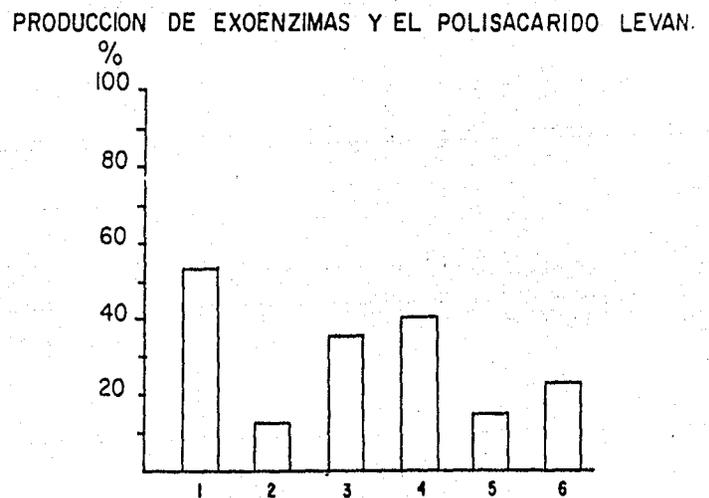
[ ] SAL	%
0	88
2	100
7	91
12	65
18	18



°C	%
4	24
28	100
37	97
41	94



PRUEBA	%
1. Catalasa	98
2. Oxidasa	79
3. Red de nitratos	73
4. Red de nitritos	26
5. Desnitrificación	24
6. Acidificación de glucosa	49
7. Alc. y no utilización de glucosa	51
8. Fermentación de glucosa	32



PRUEBA	%
1. Almidasa	54
2. Gelatinasa	13
3. ADNasa	36
4. Lipasa	41
5. Ureasa	15
6. Polisacárido de levana	25

FIG. 4. PORCENTAJES DE LAS PRUEBAS FISIOLÓGICAS REALIZADAS EN LAS 267 CEPAS BACTERIANAS ESTUDIADAS.

Con base a los resultados obtenidos al calcular los IMU de las diferentes familias químicas se dividieron en los siguientes grupos:

- A) Familias químicas muy utilizadas (IMU mayor al 50%)
- B) Familias químicas poco utilizadas (IMU menor del 50%)

Por lo tanto, se obtuvieron los siguientes resultados

GRUPO A	IMU	GRUPO B	IMU
Acidos grasos	68%	Alcoholes y glicoles	42%
Hidroxiácidos	57%	Acidos dicarboxílicos	42%
Hidroxiácidos	57%		
Carbohidratos	53%		

Los sustratos pertenecientes a las familias químicas de los ácidos grasos y aminoácidos mostraron ser los más favorables para el crecimiento al ser utilizados como única fuente de carbono y energía; estos forman parte de la pared celular (compuesta por lípidos y aminoácidos como la alanina y el ácido glutámico) de las bacterias.

La utilización de ácidos grasos por las células bacterianas, puede ser perjudicial para las larvas de S. gigas, en estudios hechos sobre la composición de la dieta adecuada para el cultivo de éste, se encontró que los ácidos grasos y los lípidos son muy importantes en ella (Pillsbury, 1985).

Según Gaudy A. y Gaudy E. (1981), los microorganismos que son capaces de utilizar compuestos orgánicos simples como única fuente de carbono y energía, probablemente tienen una

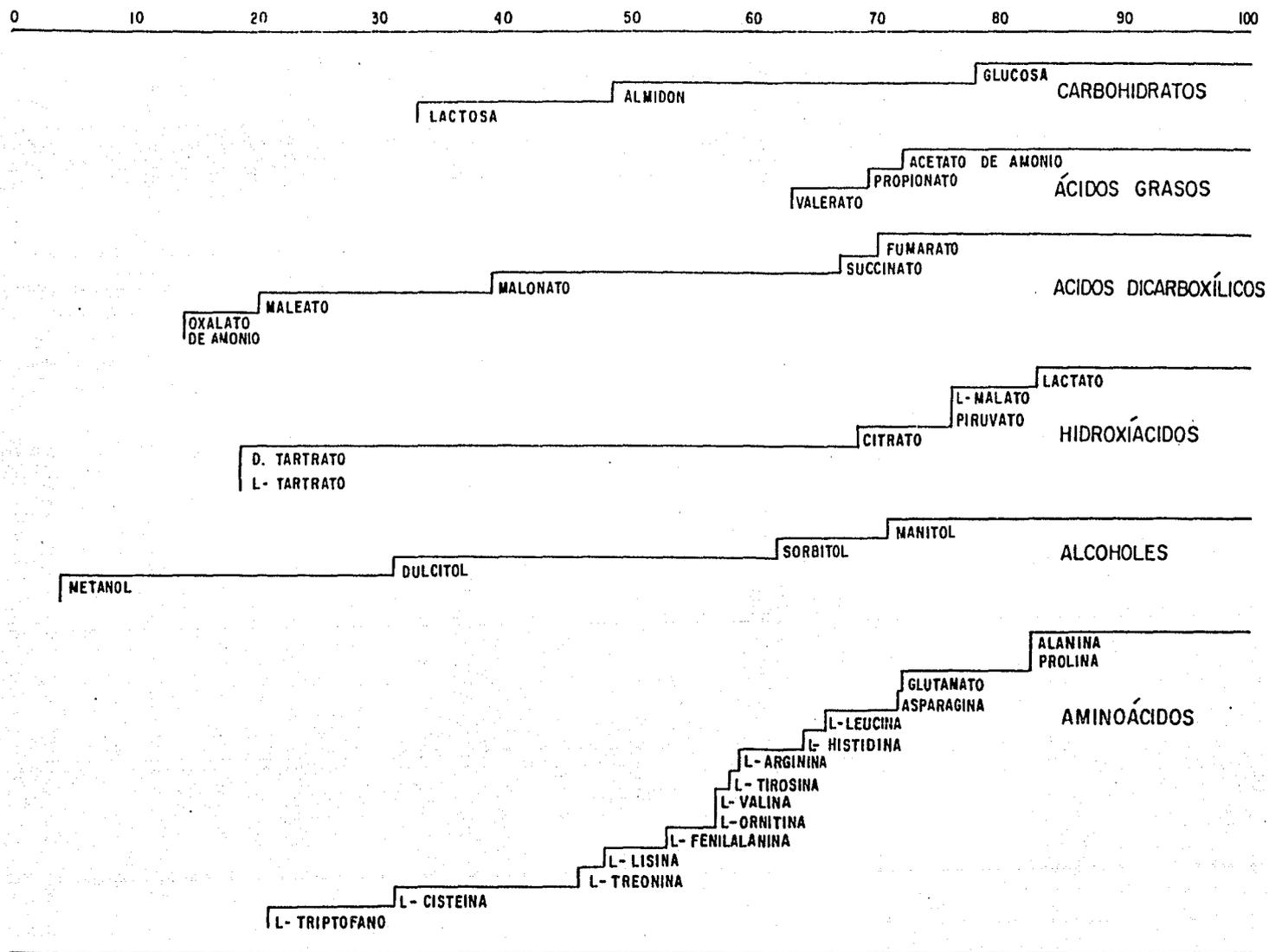


FIG. 5 PORCENTAJES DE UTILIZACION DE COMPUESTOS ORGANICOS POR LAS 267 CEPAS ESTUDIADAS.

ventaja selectiva en muchos ambientes naturales, donde los com  
puestos orgánicos están muy limitados. Es por ello, que quizás  
el género Pseudomonas es el más abundante en los sistemas acuá  
ticos, ya que una de las propiedades de este género es su habi  
lidad para utilizar compuestos orgánicos simples como única o  
principal fuente de carbono; algunas de ellas utilizan alrede  
dor de 100 sustratos diferentes (Buchanan y Gibson, 1974).

Guillespié (1981), observó que las cepas que perte  
necían a este género presentaron diferencias en cuanto a la  
fuente de carbono empleada

MacLeond y Col. (1954), encontraron que las bacterias  
pueden crecer en sustratos simples y que el ácido succínico,  
es el mejor para ellas y en menor proporción la glucosa; los  
ácidos aspártico y glutámico permiten también un excelente cre  
cimiento. Lizárraga (1979), en un estudio de Pseudomonas, ob  
servó que el lactato, el piruvato, el glicerol y el manitol  
son bien utilizados aunque el fumarato y el succinato fueron  
los mejor empleados

Los resultados que se obtuvieron en este estudio  
coincidieron con los obtenidos por ambos autores. No se obser  
varon diferencias grandes en cuanto al porcentaje de utiliza  
ción de sustratos de los tres muestreos, los más favorables de  
cada familia química fueron los siguientes: la glucosa, el ace  
tato de amonio, el propionato, el piruvato, el manitol, la pro  
lina y la alanina. (fig. 6)

Si se distinguieron variaciones en cuanto al tipo de

sustrato utilizado por las cepas de acuerdo al lugar de origen como se observa en la figura 7.

#### d) POTENCIALIDADES CATABOLICAS DEL TOTAL DE CEPAS TRABAJADAS

Como se observó en los resultados, las cepas bacterianas presentaron una capacidad catabólica de 100, ya que todos los sustratos fueron utilizados al menos por una cepa, aunque algunos de ellos como el oxalato de amonio y los D y L tartrato, así como el metanol, fueron asimilados por un número muy reducido de ellas.

Los IMU (tabla 3) de las cepas bacterianas no variaron mucho en los aislamientos de los tres muestreos, y se encontraron los mayores IMU para los ácidos grasos y aminoácidos. Sin embargo, al realizar el análisis de éstos, considerando el lugar de origen de las cepas, se observó que los aislamientos del tanque de almacenamiento utilizaron mejor los carbohidratos que los ácidos grasos y aminoácidos mientras que los de los estanques los ácidos grasos e hidroxiaácidos, lo cual indica que las cepas aisladas de los diferentes lugares muestreados, tienen cierta capacidad para crecer en fuente de carbono distintas.

Se notó algún parecido en cuanto al tipo de fuente de carbono utilizada por las cepas bacterianas aisladas de los homogenizados de las larvas y los cultivos de microalgas por lo que los valores de los IMU no fueron muy diferentes. Esto quizá se deba a que cuando las larvas son alimentadas con los cultivos de microalgas, reciben al mismo tiempo un inóculo bac

teriano, y en ambos sistemas podrían encontrarse el mismo tipo de poblaciones bacterianas.

En cuanto a los IME, no variaron mucho en los tres muestreos, pero sí se observaron diferencias en los IME de las cepas de acuerdo al lugar de origen. Las microalgas y las larvas presentaron IME con valores casi iguales (60 y 69, respectivamente) y el mayor se encontró en los aislamientos que pertenecían al tanque de almacenamiento.

Bianchi y Martin (1978) y Martin y Bianchi (1980), observaron que la producción de exoenzimas juega un papel muy importante en el cultivo de microalgas y señalaron que los IME bajos indican condiciones oligotróficas en el sistema y que al presentarse la fase exponencial en los cultivos de microalgas, el IME se estabiliza y el IMU aumenta, pero en la fase de mortalidad el fitoplancton, el IME aumenta y el IMU se reduce.

Los resultados obtenidos en este estudio coincidieron con lo dicho por Bianchi y Martin, ya que se encontró que cuando el IME aumenta el IMU disminuye y viceversa.

Al encontrarse un IMU de 55 e IME de 32 en los cultivos de microalgas y de acuerdo con lo citado por Bianchi y Martin (1980), puede pensarse que este sistema es oligotrófico, lo cual es de gran importancia para el control en la proliferación de las bacterias heterotróficas ya que al aumentar la materia orgánica disponible, también aumentará el número de éstas.

TABLA 3. INDICES MEDIOS DE UTILIZACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS SILVESTRES, POR MUESTREO Y POR LUGAR DE ORIGEN.

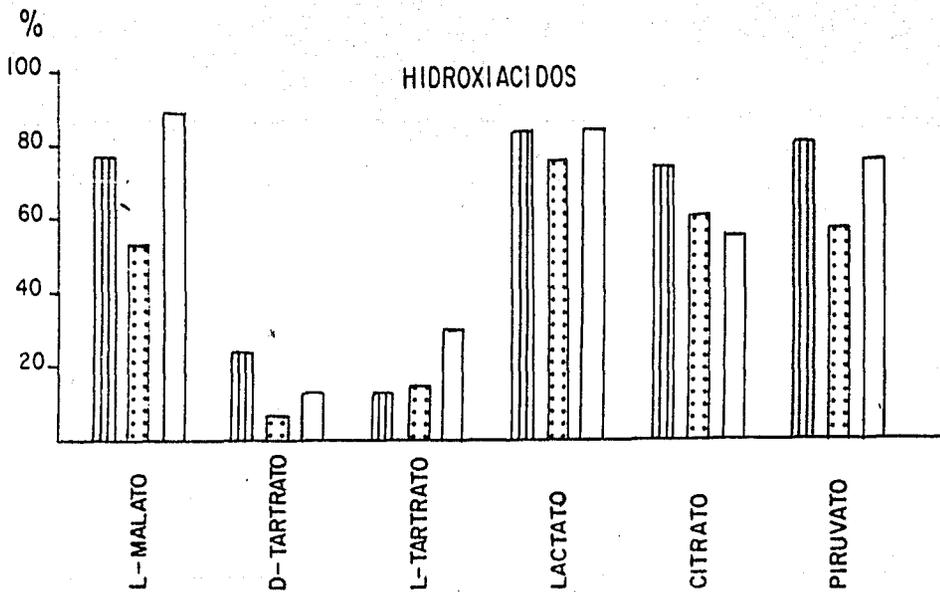
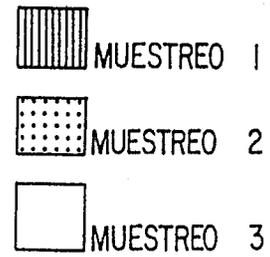
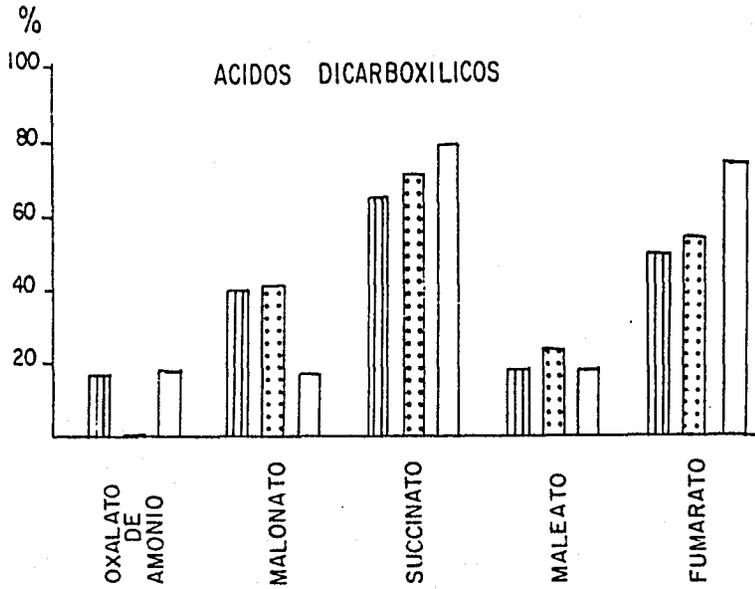
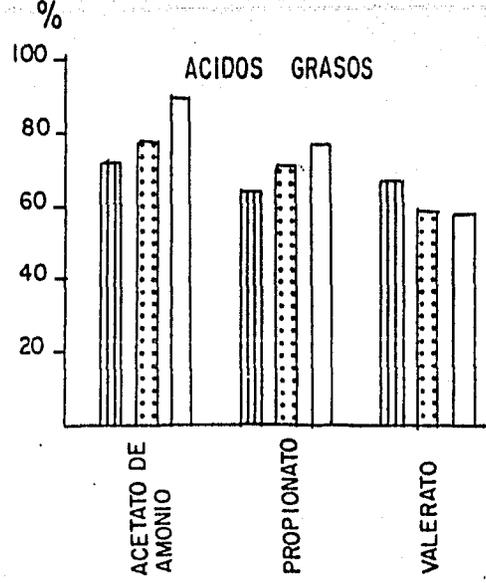
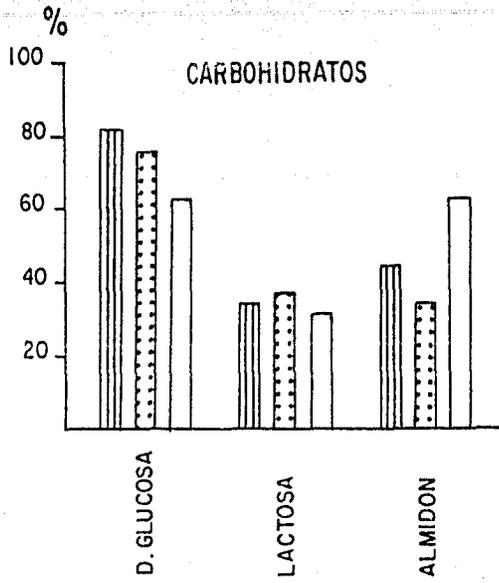
Familia Química	Muestreo			Lugar de origen				Total 267
	1	2	3	A	B	C	D	
Carbohidratos	58	49	52	54	58	46	55	53
Acidos grasos	67	63	73	70	68	66	17	63
Acidos dicarbox.	43	38	44	44	44	35	33	42
Hidroxiácidos	59	45	58	58	53	56	33	57
Alcoholes y glic.	43	43	39	43	46	39	33	42
Aminoácidos	58	53	61	60	59	51	47	58

Producción de Exoenzimas

Exoenzima	Muestreo			Lugar de origen				Total 267
	1	2	4	A	B	C	D	
Amilasa	53	58	56	55	37	55	83	54
Gelatinasa	16	12	5	11	21	16	0	13
ADNasa	29	32	53	38	37	22	50	36
Lipasa (Tween 80)	40	37	43	42	16	38	67	41
Ureasa	17	10	10	13	16	16	17	15
I M E	30	30	33	32	25	30	43	30

Lugar de Origen

- A Cultivo de Microalgas
- B Larvas
- C Estanques
- D Tanque de almacenamiento



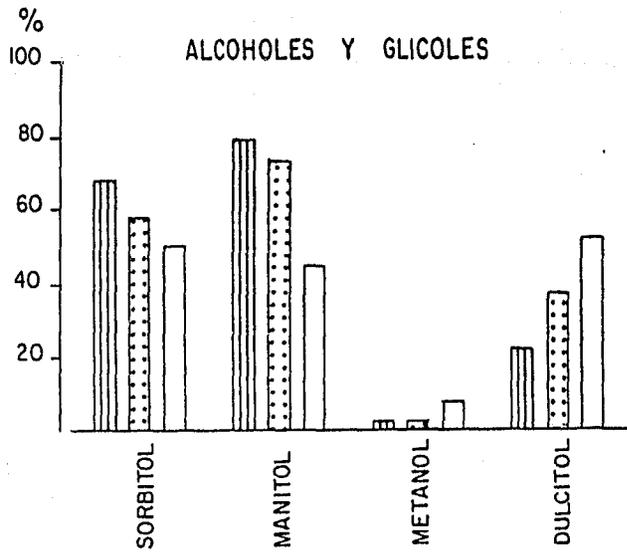
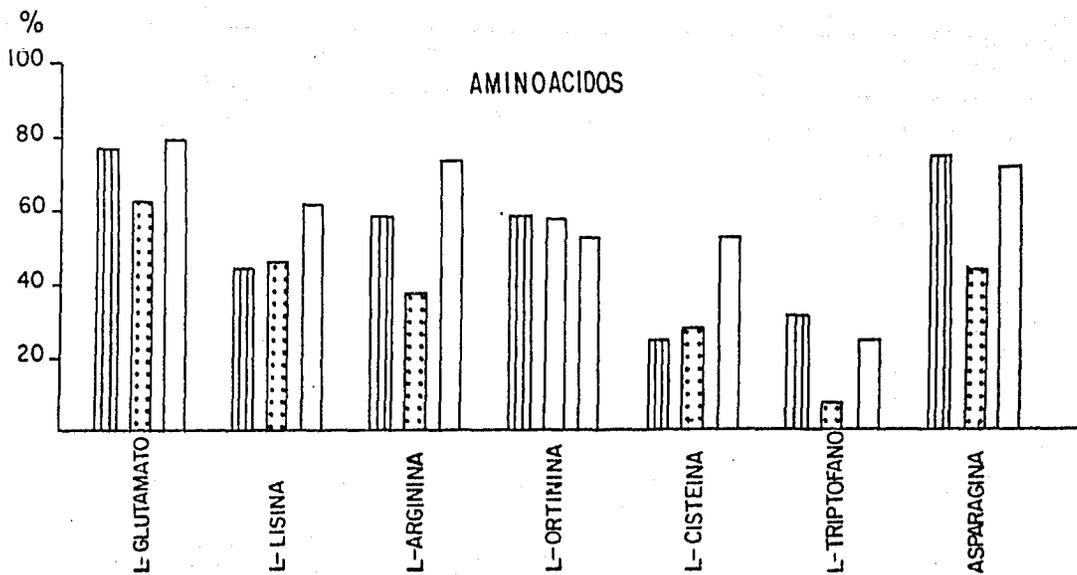
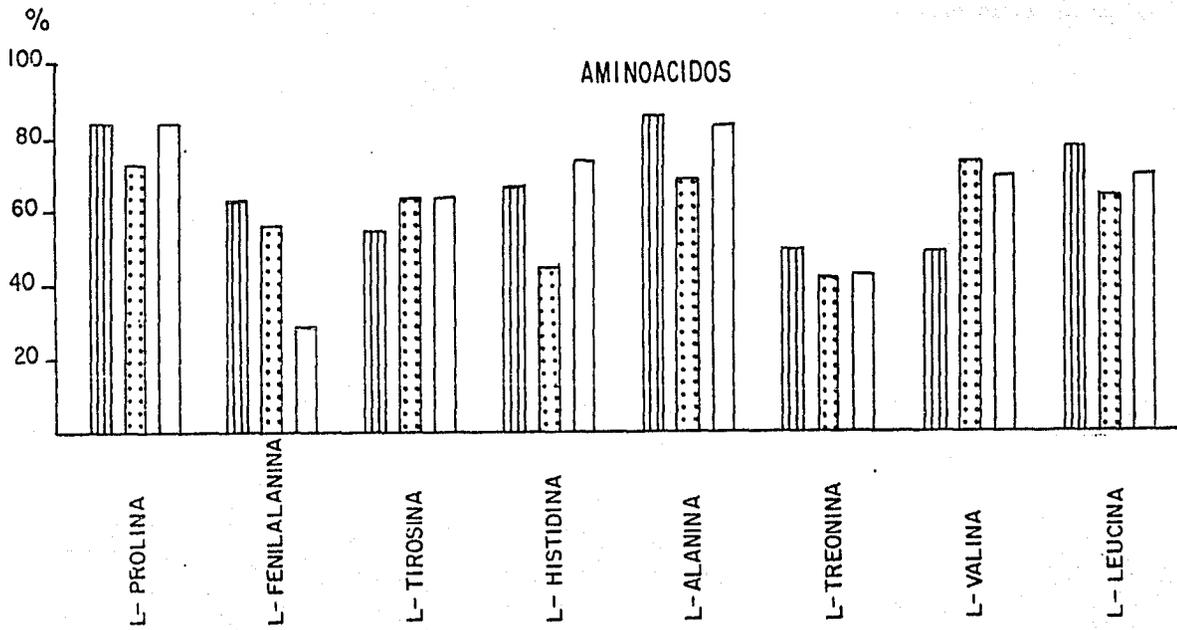


FIG. 6.



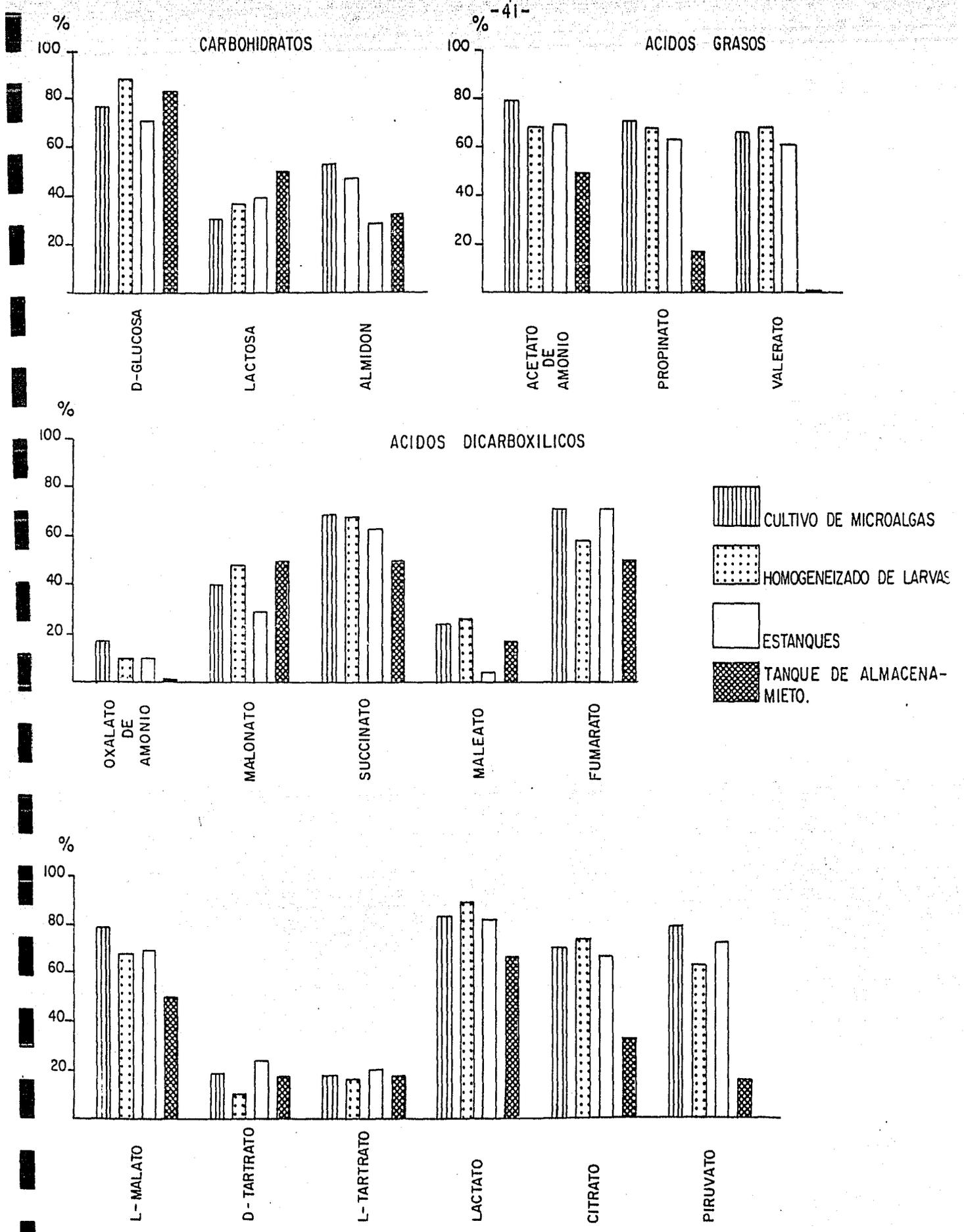
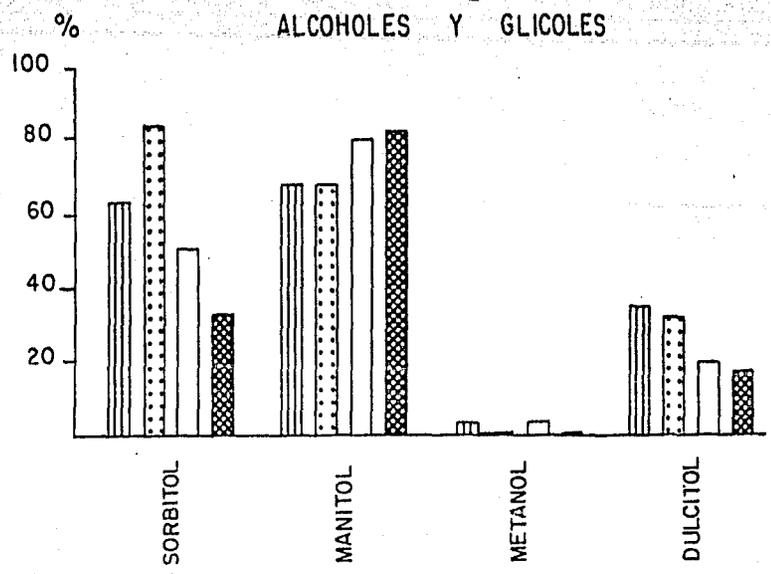


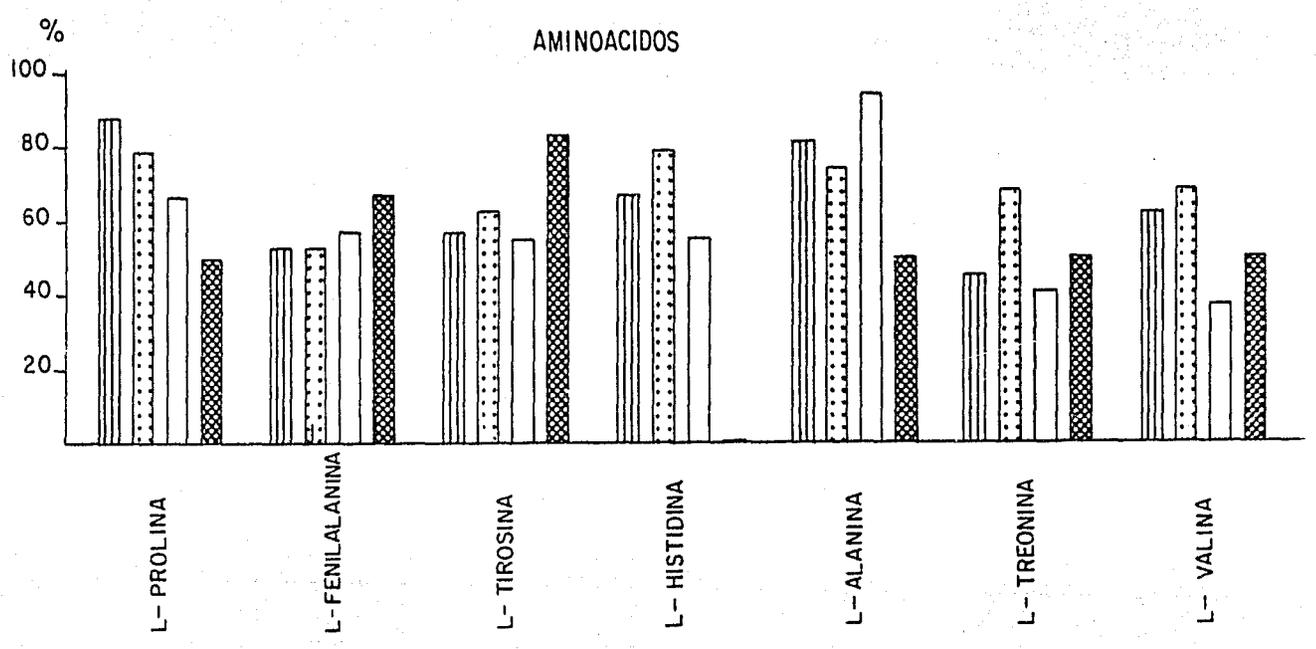
FIG. 7. PORCENTAJES DE UTILIZACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DEL MARICULTIVO DE *Strombus gigas*. POR LUGAR DE ORIGEN.

ALCOHOLES Y GLICOLAS

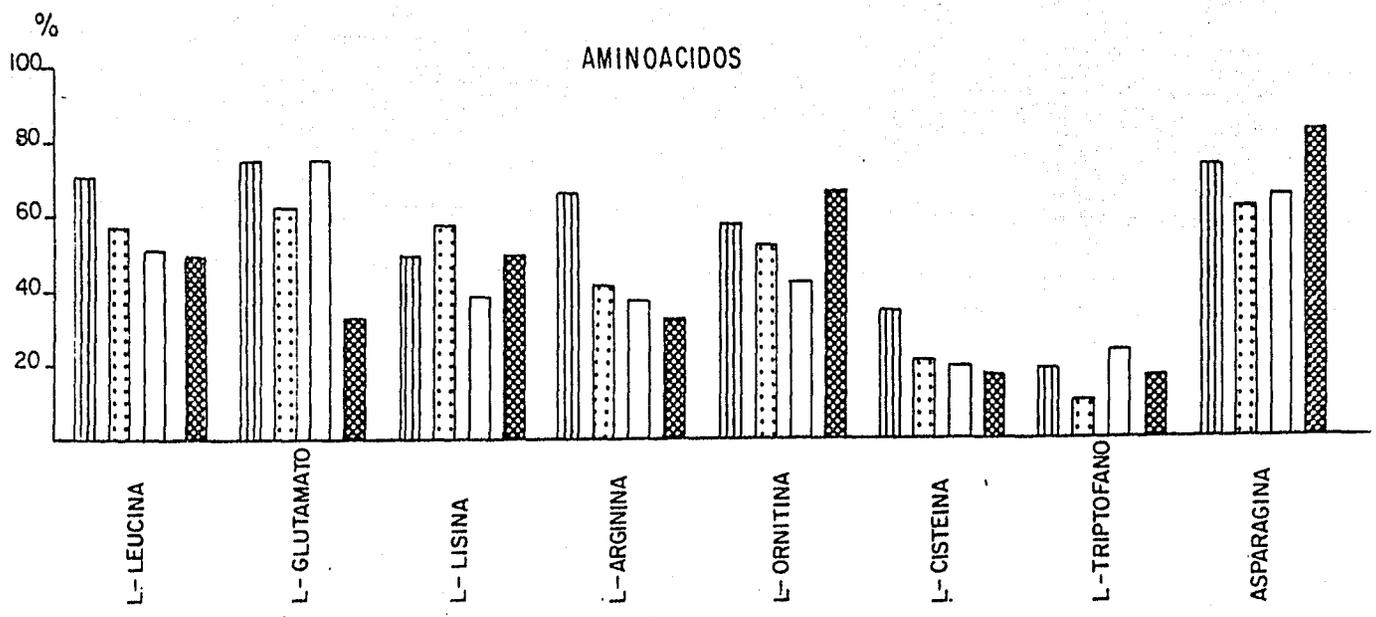
FIG. 7.



AMINOACIDOS



AMINOACIDOS



## 2.- RESULTADOS DEL ANALISIS NUMERICO

Para el análisis numérico se utilizó como medida de similitud el coeficiente de asociación de Jaccard y el agrupamiento se efectuó con el programa CLUSTER (Davis, 1973), que utiliza el método de ligamiento promedio con medias aritméticas ponderadas.

La fig. 8 muestra el dendograma obtenido, el nivel de corte en el mismo se estableció con base en el criterio propuesto por Véron (1974), por lo que se consideró el punto de inflexión de la curva que se obtuvo al graficar el número de cepas que estuvieron en función del nivel de similitud, el cual se encontró en un valor de 0.55 (fig. 9).

El criterio de la especie conocida no se aplicó debido a que el número de cepas de colección ensayadas fue insuficiente.

Al nivel de corte de 0.55 de similitud se obtuvieron 10 grupos, cada uno integrado por más de 3 cepas. Del total de ensayos, sólo 32 cepas silvestres y una de colección (Bacillus cereus), no formaron parte de ningún grupo. (Tabla 4).

No se observó agrupamiento de las cepas silvestres con respecto al lugar de origen y muestreo. Las cepas de colección por el contrario, se distribuyeron a lo largo del dendograma pero las que pertenecían al mismo género (Bacillus y Pseudomonas), formaron parte del mismo grupo, esto permitió darse una idea del género al que podrían pertenecer las cepas silvestres, aunque es relativo ya que algunos grupos están

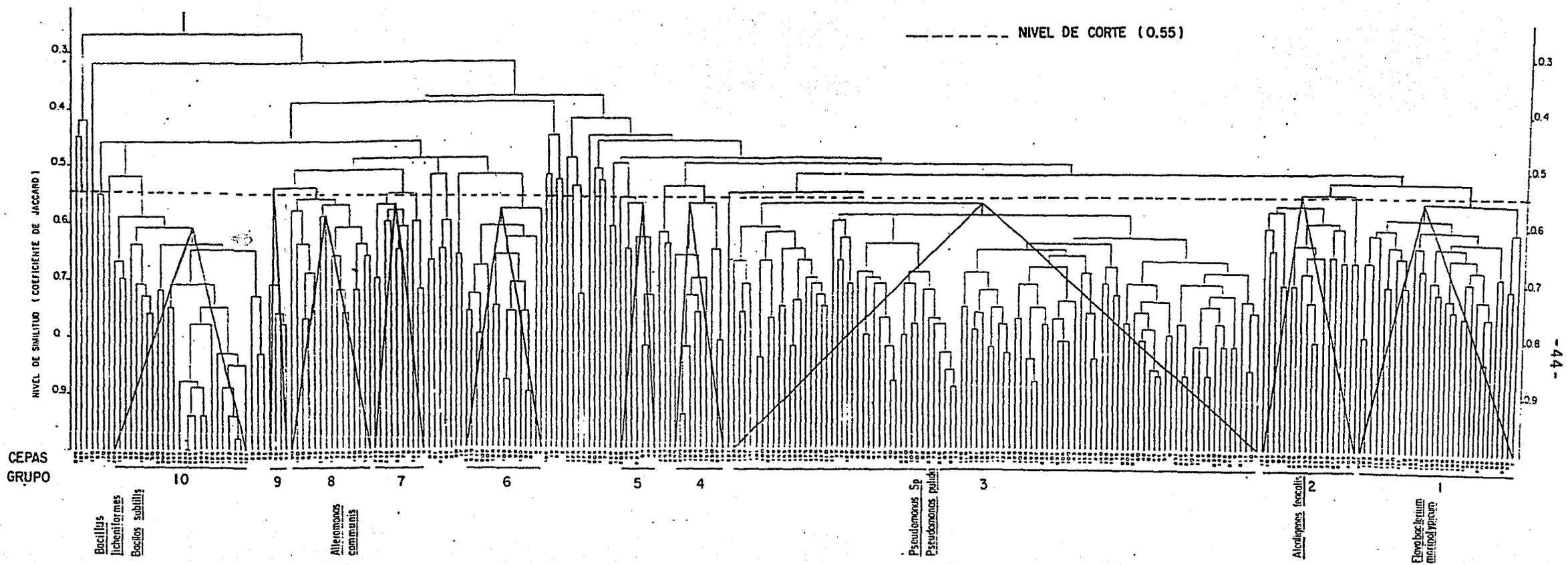


FIG. 8 DENDROGRAMA DE ASOCIACION DE LAS 267 CEPAS BACTERIANAS HETEROTROFAS AISLADAS EN DIFERENTES FASES DEL MARICULTIVO DE *Streblospio benedicti* SEGUN EL COEFICIENTE DE ASOCIACION DE JACCARD.

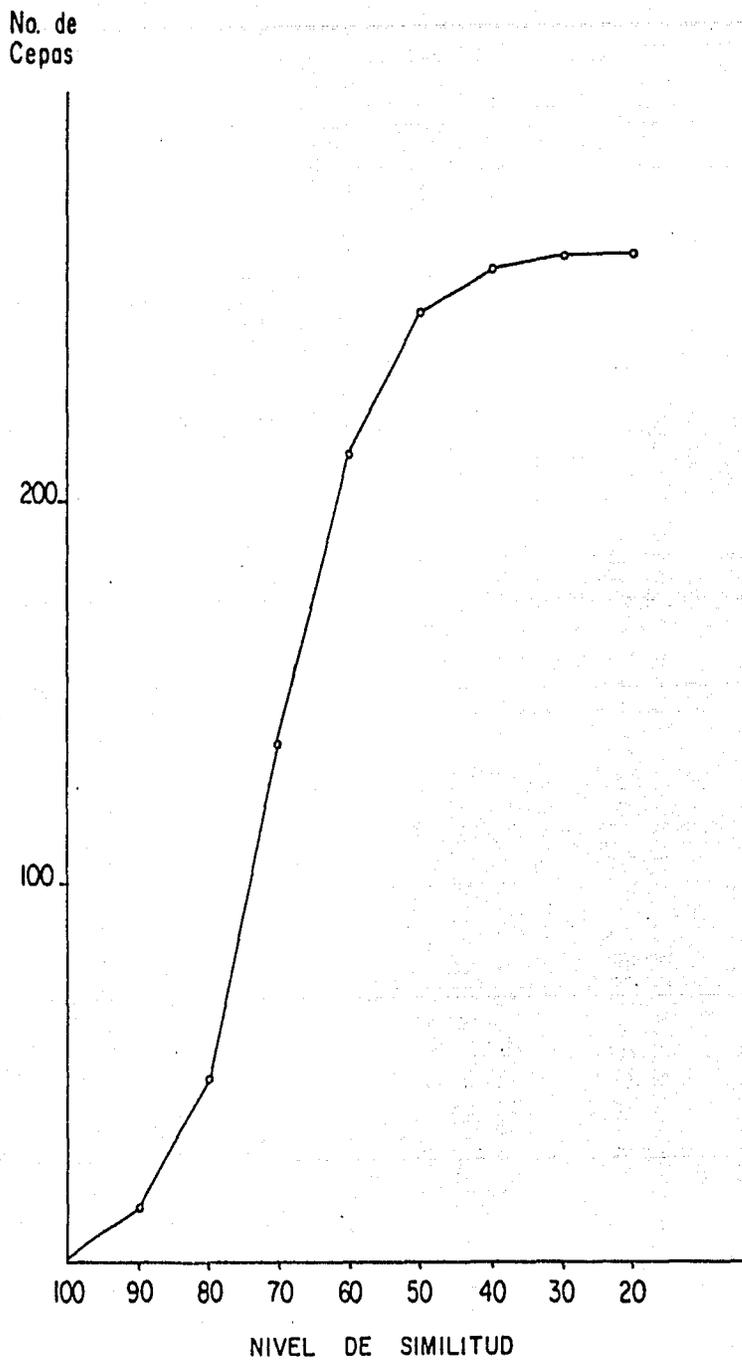


FIG.9. NIVEL DE CORTE DEL DENDOGRAMA CON BASE EN LA RELACION DEL NUMERO DE CEPAS POR EL NIVEL DE SIMILITUD.

constituídos por células en forma de bastón, cocos, pleomórficos, tanto gram positivos como negativos, lo cual fue muy evidente en los grupos 1 y 2.

El resto de los grupos presentaron características morfológicas más o menos bien definidas.

Los grupos del 3 al 6 se formaron casi exclusivamente por bacilos gram negativos y arreglados de 1 a 2 células pero se presentaron grandes diferencias en cuanto a su metabolismo respiratorio.

Los grupos del 7 al 9, comprendieron células en forma de coco y cocobacilos con diferencias en cuanto a su reacción a las respuesta a la tinción de Gram pero todas fermentaron a la glucosa.

El último grupo (10) quedó integrado por la mayor parte de bacilos gram positivos, esporulados y las dos cepas de colección pertenecientes a el género Bacillus.

En los grupos del 1 al 5 la mayoría de las cepas acidificaron o alcalinizaron a la glucosa, y por el contrario, en los grupos del 6 al 9. presentaron como característica principal la fermentación de la misma, lo cual nos llevó a pensar que esta prueba (oxidación-fermentación de la glucosa) es clave importante para la definición de los grupos asociados con el método de la taxonomía numérica.

El grupo 1 incluyó a una cepa de colección (Flavobacterium marinotypicum) y 19 cepas silvestres, que como se mencionó arriba, fue un grupo muy heterogéneo.

De acuerdo con la clasificación hecha por Villena (1986), éstas quedaron comprendidas dentro de los géneros (Branhamella, Acinetobacter, Bacillus, Neisseria, Enterobacter, Pseudomonas y Staphylococcus).

Este grupo se caracterizó por su gran actividad sobre los sustratos orgánicos pertenecientes a las familias de los ácidos grasos y aminoácidos (el 100% utilizó prolina y el 97% leucina) (fig. 10).

El grupo 2 también estuvo integrado por una cepa de colección (Alcaligenes feacalis), y 18 cepas silvestres aisladas de todos los lugares muestreados.

Las cepas de este grupo utilizaron mejor el manitol y la tirosina aunque su IMU mayor fue para los aminoácidos (todas las cepas utilizaron manitol y L-tirosina). Algunos miembros de este grupo se relacionaron con los géneros Aeromonas, Pseudomonas y Flavobacterium.

El grupo 3 fue el más numeroso y estuvo formado por más de la tercera parte del total de los aislamientos y por dos cepas de colección que fueron: Pseudomonas spp y Pseudomonas putida.

El 76% de ellas se aislaron a partir de los cultivos de microalgas y el resto de las larvas (6%) y estanques (15%).

Considerando sus características (bacilos gram negativos no esporulados, catalasa y oxidasa positivas y no fermentadoras), se propusieron en su mayoría como miembros del género Pseudomonas, lo cual se vió apoyado por la agrupación de las cepas de colección y por la identificación hecha por Villena (1986), para las mismas.

Un número reducido de estas cepas quedarían comprendidas dentro de los géneros Flavobacterium, Aeromonas, Moraxella,

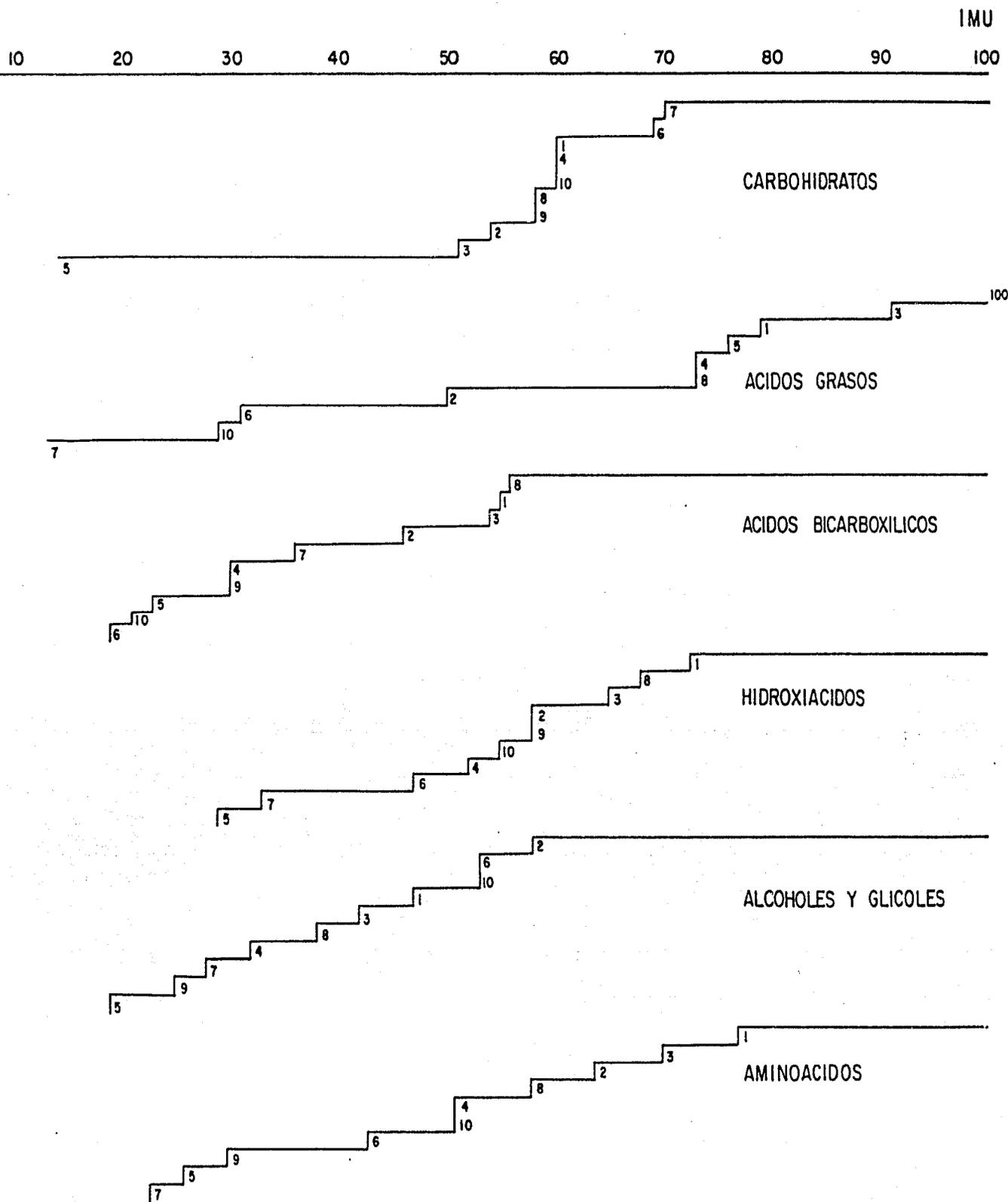


FIG. 10 INDICES MEDIOS DE UTILIZACION DE LAS FAMILIAS QUIMICAS EN LOS 10 GRUPOS. LOS NUMEROS INDICAN EL GRUPO AL QUE CORRESPONDEN

Staphylococcus y Acinetobacter.

Este grupo se consideró como importante ya que además de ser numeroso, el 72% de los aislamientos redujeron a los nitratos que si bien estos son esenciales para las microalgas, en cantidades adecuadas, su abundancia o exceso puede ser tóxico para las mismas.

Su inclinación hacia los ácidos grasos (IMU=91) y aminoácidos (IMU=70) fué muy notoria, y a diferencia de los otros grupos constituídos también por bacilos gram negativos, éste fue el único que tuvo una capacidad catabólica de 100 para todos los sustratos.

La habilidad para utilizar a los aminoácidos es una cualidad importante en cualquier microorganismo, ya que además de utilizarlos como única fuente de carbono y energía pueden emplearlos como fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas lo cual lleva como ventaja poder desarrollarse en cualquier medio en donde existan concentraciones bajas de estos.

Como se mencionó anteriormente este grupo presentó gran actividad sobre los ácidos grasos, los cuales han sido informados como importantes en las dietas de larvas de almeja, ostiones y peces (Pillsbury, 1985), por lo que sería desfavorable la existencia de los miembros de este grupo en los sistemas de cultivo de dichos organismos pues se podría presentar cierta competencia por sustrato entre ambos.

Según la descripción en el manual de Bergey's (Buchanan y Gibson, 1970), el acetato puede ser empleado como nutrimen

to principal por todas las especies que han sido bien caracterizadas como Pseudomonas. Y el lactato, succinato, y glucosa son usados como única fuente de carbon y energía, pero no por todas las especies, muestran además cierta incapacidad para crecer en pH menores de 6, lo cual concuerda con las características del grupo 3 en el presente trabajo.

Este género ha sido mencionado como el más abundante en los cultivos de microalgas (Berland y Col., 1969; 1970) Litchfield y Col., 1969), también se han relacionado con la descomposición de peces (Guillespie, 1981) y en mortalidades masivas de Crassostrea virginica (Muchelano y Col., 1975).

Si bien la capacidad catabólica de cualquier microorganismo se encuentra sometida a las variaciones del medio ambiente en el que se desarrollan, puede afirmarse que este grupo (3) presentó una gran versatilidad nutricional, que además de que no presentaron requerimientos a factores de crecimiento son capaces de desarrollarse en cualquier medio ambiente con éxito.

El grupo 4 se formó por bacilos solitarios gram negativos, no esporulados. Estas cepas se aislaron exclusivamente de los cultivos de microalgas y considerando el esquema de identificación propuesto por Shewan y Col. (1960), se les relacionó con el género de las Pseudomonas del grupo III.

Según Gillespie (1981), existen diferencias en cuanto a la utilización de los sustratos dentro del género Pseudomonas lo que explicaría la separación de este grupo con el anterior. Este se inclinó más por los carbohidratos (IMU=60) y los ácidos grasos (IMU=73). Porcentajes semejantes se observaron en los aislamientos del total de microalgas (carbohidratos IMU=54

y ácidos grasos = 70).

En el grupo 5 se agruparon bacilos gram negativos arreglados de 1 a 2 células, fue el grupo que utilizó el menor número de sustratos probados, aunque al igual que las Pseudomonas, utilizaron bien a los ácidos, grasos, especialmente el acetato de amonio.

Ninguno de los miembros de este grupo requirió de factores para su crecimiento y su capacidad catabólica no fue de 100.

De acuerdo con lo propuesto por Villena (1986), estas cepas quedaron comprendidas dentro de los géneros Flavobacterium, Pseudomonas y Xanthomonas. Los dos primeros se han encontrado ampliamente distribuidos en agua marina y asociados a cultivos de microalgas y las Xanthomonas a plantas o residuos vegetales (Buchanan y Gibson 1974).

El grupo 6 correspondió a células fermentadoras (93%) con formas bacilares gram negativas y arregladas de 1 a 2 células y en todas las cepas se observó la presencia de catalasa y oxidasa. Tentativamente estaría incluidas dentro del género Vibrio (Buchanan y Gibson 1974).

Aunque para la determinación exacta de los miembros de este grupo, y según lo que propuso Shewan y Col. (1969), en su esquema de identificación sería importante conocer su reacción frente al compuesto O/129, considerada como una prueba adicional de gran valor.

Algunos de los miembros del género *Vibrio* son patógenas para los peces y humanos (*Vibrio comma* y *V. anguillarum*). También se han encontrado asociados a cultivos de microalgas (Berland, 1970, 1979) y a larvas de *Crassostrea virginica* (Muchelano y Brown, 1969; Muchelano y Col., 1975) aunque en porcentajes muy bajos (No mayores del 5%).

El grupo 7 quedó integrado por cocos y cocobacilos gram positivos, todos presentaron catalasa y la oxidasa estuvo ausente en una cepa. Ninguna de ellas produjo el polisacárido de levana que al parecer, es una característica poco frecuente en los cocos. Todas fermentaron a la glucosa y un buen porcentaje redujo los nitratos. De acuerdo a la descripción de Buchanan y Gibson (1974), este grupo quedaría comprendido dentro del género *Staphylococcus*. Los miembros de este género aún cuando su rango de huéspedes es muy amplio se han aislado generalmente de piel, glándulas y membranas de mucosas en animales de sangre caliente, también a partir de cultivos de microalgas (Berland y Col. 1970).

Las cepas que integraron a este grupo se aislaron a partir de los cultivos de microalgas (4), Larvas (2), estanques (1) y tanque de almacenamiento (3); lo que indicó que se encontraron en todo el sistema.

En el grupo 8 se agregaron en su mayoría células esféricas (93%) y un menor número de bacilos, además de una cepa de colección (*Alteromonas communis*).

Se encontraron diferencias en cuanto a su respuesta a

la tinción de gram (el 53% presentó una respuesta positiva y el 47% negativa). Aunque casi en su totalidad fermentaron a la glucosa (93%). Todas las cepas presentaron catalasa y sólo el 47% oxidasa lo que confirmó su metabolismo aeróbico facultativo.

Los géneros tentativos con los que se les relacionó fueron: Neisseria, Alcaligenes, Acinetobacter y Alteromonas.

Según Pagel y Seyfried (1976) estas bacterias son oportunistas y su potencialidad de patogenicidad parece ser baja, aunque algunas veces causan severas infecciones cuando la resistencia del hospedero no es muy alta, la mayoría de los aislamientos informados son de origen humano (piel y saliva).

Berland y Col. (1970, 1979); Litchfield y Col., (1969), aislaron Acinetobacter a partir de cultivos de microalgas y Muchelano y Brown, (1969) relacionaron a este mismo género con mortalidades de Crassostrea virginica.

El grupo 9 se formó únicamente por cuatro cepas aisladas a partir de los cultivos de microalgas (1) y de los estanques (3), morfológicamente fueron cocos gram negativos y fue el único grupo que resistió todos los rangos de salinidad y casi todos los pH ensayados. El 100% presentó catalasa y el 50% oxidasa, ninguna cepa utilizó a los nitratos y de los 15 aminoácidos ensayados, 5 de ellos no fueron utilizados por ninguna cepa de este grupo.

Del total de sustratos probados sólo 20 de ellos fueron empleados aunque su actividad sobre los ácidos grasos

se observó notablemente ya que toda utilizaron a los 4 ácidos grasos ensayados.

Esto indicó que presentaron ciertas exigencias nutricionales.

A los miembros de este grupo se les relacionó con el género Neisseria.

En el grupo 10 se incluyeron la mayoría de los bacilos gram positivos esporulados (93%). Casi todas estas cepas se aislaron a partir de los cultivos de microalgas (22) y un porcentaje menor de los estanques (4). El mayor número de ellas se aislaron en el primer muestreo (20%), menores cantidades se observaron en el segundo y tercer muestreo (2 y 6%, respectivamente).

Pese a que un porcentaje alto produjo lipasa (71%), su actividad sobre los ácidos grasos fue muy baja (IMU=29).

No presentaron requerimientos nutricionales y su capacidad catabólica para todas las familias químicas no fue de 100, (para hidroxiaácidos ésta fue de 83% y para los alcoholes y glicoles de 75%).

El género Bacillus no se ha observado en porcentajes altos en agua de mar y se han asociado más a los sedimentos (Izquierdo, 1981). Muchelano y Col. (1975) aislaron bacilos esporulados en agua almacenada, Izquierdo (1986) en agua de mar (6%); Muchelano y Brown (1969) a partir de cultivos de microalgas (0.6%) Litchfield y Col. (1969) a partir de un cultivo

de Clorella sorokiniana.

Los porcentajes que se han informado son muy bajos, sin embargo, en los resultados obtenidos del presente estudio, se encontró que el mayor porcentaje de células esporuladas se originaron en los cultivos de microalgas.

Considerando su frecuencia tan baja en los tres muestreos y a que principalmente se aislaron de los cultivos de microalgas, se asumió la presencia de estos como contaminación aérea más que por los aportes del agua de mar que se emplea en el criadero.

En la tabla 4 se representaron al número y las cepas que formaron a cada uno de los grupos, su origen y el número de cepas que no se agruparon.

Los porcentajes positivos para cada una de las pruebas de cada uno de los grupos se presentó en la tabla 5 del apéndice 3.

TABLA 4. NUMERO DE CEPAS QUE INTEGRAN CADA UNO DE LOS GRUPOS BACTERIANOS OBTENIDOS A UN NIVEL DE SIMILITUD DE 0.55 SEGUN EL COEFICIENTE DE ASOCIACION DE JACCARD

Cepas que integran cada uno de los grupos

Grupo 1 formado por 30 cepas

1	22	256	25	52	33	102	254	79	78
126	141	166	168	179	148	155	182	118	143
167	72	111	120	131	146	119	136	182	201

192 = 19260 Flavobacterium marinotipicum

Origen: A = 23, B = 6

Grupo 2

27	206	39	241	218	236	227	234	240	235
245	238	246	53	83	67	163	171		

206 = 19018 Alcaligenes faecalis

Origen: A = 6, B = 3, C = 6, D = 2

Grupo 3

7	10	11	212	9	215	95	145	230	96
97	112	104	217	219	231	8	34	41	45
51	42	50	216	209	232	12	139	135	140
24	115	133	113	43	100	106	233	101	44
225	157	183	184	109	169	26	132	114	187
189	139	181	197	116	185	14	223	55	226
73	239	58	107	108	220	222	56	60	66
71	61	64	69	68	40	127	75	77	117
110	137	142	176	173	154	159	164	153	158
149	259	160	161	151	152	165	186		

187 = P<sub>p</sub>S<sub>126</sub> Pseudomonas putida

189 = 25411 Pseudomonas spp

Origen: A = 75, B = 6, C = 15

Grupo 4

144	247	250	150	162	194	196	199	200	255
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Origen: A = 10

Continuación Tabla 4...

Grupo 5

46 49 54 229 47 48 202

Origen: A = 6, C = 1

Grupo 6

3 6 88 89 130 98 99 103 94 156  
207 208 211 210 213

Origen: A = 9, C = 6

Grupo 7

4 16 224 5 76 251 13 242 237 243

Origen: A = 4, B = 2, C = 1, D = 3

Grupo 8

15 267 30 190 29 37 38 172 23 244  
19 82 82 86 180 90

190 = 27118 Alteromonas communis

Origen: A = 5, B = 3, C = 6

Grupo 9

57 63 59 65

Origen: A = 1, C = 3

Grupo 10

21 36 28 121 129 123 124 125 128 261  
264 263 265 266 262 147 253 204 260 80  
85 105 87 92 35 191 203

191 = 6051 Bacillus subtilis

203 = 14580 Bacillus licheniformis

Origen: A = 22, C = 4

Cepas no agrupadas = 33

221 248 257 258 193 228 74 134 205 252  
174 175 178 177 2 32 18 198 17 20  
31 68 214 81 84 188 70 93 170 91  
195 249

188 = 14569 Bacillus careus

Origen: A = Cultivo de microalgas  
B = Homogenizado de larvas  
C = Estanques  
D = Tanque de almacenamiento

## C O N C L U S I O N E S

Las cepas bacterianas trabajadas fueron en su mayoría bacilos gram negativos, no esporulados, halotolerantes, mesófilos y capaces de resistir intervalos amplios de acidez.

En general no presentaron requerimientos nutricionales y pocas tuvieron cierta preferencia sobre los sustratos en sayados, por lo que la mayoría puede ser capaz de desarrollarse en cualquier medio ambiente.

El porcentaje de cepas bacterianas que se observaron con forma de coco permitió afirmar que existe en todo el sistema de cultivo, contaminación de origen animal.

Con la técnica de asociación numérica, se formaron grupos más o menos bien definidos, que si bien no se incluyeron a cada una de las cepas silvestres en grupos taxonómicos propuestos por la taxonomía clásica, sí se distinguieron sus características fisiológicas y nutricionales.

Los grupos obtenidos a un nivel de similitud de 0.55 no se formaron de acuerdo al lugar de origen ni tampoco al muestreo por lo que puede pensarse que en cualquier parte del sistema existen los mismos grupos bacterianos sin ninguna diferencia.

Las cepas de colección mostraron ser de gran importancia para el tipo de análisis empleados ya que de esta manera se pudo especular acerca del probable género al que pertenecen los

grupos de cepas silvestres estudiadas. Esto debido a que para su completa identificación, además de aumentar el número de pruebas sería necesario realizar otro tipo de ensayos no disponibles en el laboratorio por el momento (porcentaje de guaninacitocina, tinción de flagelos, principalmente).

Sería importante realizar análisis de los cultivos de microalgas en cada una de sus fases de crecimiento y de producción para poder evaluar con mayor exactitud las potencialidades catabólicas y la producción de exoenzimas bacterianas aunque puede afirmarse que el presente estudio contribuirá a conocer un poco a las poblaciones bacterianas que están en relación con estos.

Así mismo será necesario tener un buen control de los análisis químicos del agua utilizada en los cultivos así como de la disponibilidad de los nutrimentos y de los productos de excreción tanto de las microalgas y bacterianas como de las larvas para ampliar el conocimiento de las poblaciones que se desarrollan en cada una de las etapas de cultivo de S. gigas y diseñar técnicas de saneamiento ya que no solo es importante la cantidad de bacterias presentes sino también los tipos de las mismas.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, D.A., B. AUSTIN y R.R. COLWELL, 1983. Numerical Taxonomy of bacterial isolates associated with freshwater fishery. J. Gen. Microbiol. 129: 2043-2062.
- APPELDOORN, R.S. y D.L. BALLANTINE. 1983. Field release or cultured queen conchs in Puerto Rico for stock restoration. Proc. Gulf. Caribb. Fish. Inst. 35: 57-63.
- APPELDOORN R.S., 1984. The effect of size on mortality of small juvenile conchs (Strombus gigas Linné y S. costatum Gmelin). J. Fish. Res. 4 (1): 37-43
- AUSTIN, B. y R.R. COLWELL, 1977. Evaluation of some coefficients in Numerical Taxonomy of microorganisms. Inter. J. Bacteriol. 27 (3): 204-210
- AUSTIN, B., 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a costal marine fish-rearing unit. J. Appl. Bacteriol. 53: 253-268.
- BAQUEIRO, C.E., 1984. Status of Molluscan aguaculture on the Pacific coast of Mexico. Aquaculture. 39: 83-93.
- BELL, W.H., J.M.LANG y R. MITCHELL, 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracelular products. Limmol. Oceanogr. 19(5): 833-839.
- BERG Jr., C. J., 1976. Growth of the queen conch Strombus gigas with a discuss of the practicality of its mariculture. Mar. Biol. 34: 191-198.

- BERLAND, B.R., M.G. BIANCHI y S.Y. MAESTRINI, 1969. Etude des bactéries associées aux algues en culture. Mar. Biol. 2: 350-355.
- BERLAND, B.R., D.J. BONIN y S.Y. MAESTRINI, 1970. Study of bacteria associated with marine algae in culture. III. Organic substrates supporting growth. Mar. Biol. 5 (1): 68-76.
- BIANCHI, A., 1971. Ecologie et taxonomie des bactériés hétérotrophes aérobies des sédiments marins. Leur participation á la dégradation des matériés organiques. Tesis de Doctorado de Estado. Universidad Dáix Marsella, Francia. 221 pp.
- BIANCHI, M.A. y Y.P. MARTIN, 1978. Dynamique des populations bactériennes au cours de deux productions expérimentales de phytoplancton marin naturel. Publ. Sci. Tech. CNEOX: Actes Colloq., N° 7. 323-350.
- BROWN, C. 1973. The effect of some selected bacteria on embryos and larvae of the american oyster. Crassostrea virginica. J. Inv. Pathol. 21: 215-223.
- BROWN, C. 1981. A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a long island hatchery. J. Shellf. Res. 1: 83-87.
- BUCHANNAN, R.E., y N.E., GIBSON (Eds.), 1974. Bergey's Manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 8a. Edición. 1268 pp.

- COLWELL, R.R. y W.J. WIEBE, 1970. "Core" characteristics for use in classifying aerobic, heterotrophic bacteria by numerical taxonomy. Bull. Georgia Acad. Sci. 28: 165-185.
- CARBALLO, C.R., 1985. Caracterización de bacterias heterótrofas en los aportes de la laguna de Términos a la Sonda de Campeche. Tesis Profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 128 pp.
- CRISCI, J.V. y A.F. LOPEZ, 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. OEA, Washington D.C. 131 pp.
- DAVIS, J.C., 1973. Statistics and data analysis in geology. John Willey and Sons. New York, 550 pp.
- FRAZIER, W.C., 1926. The Ecology of Marine Sediments (Cambridge Studies in Modern Biology; 2). Cambridge University Press, London. 185 pp.
- GAUDY, A. y GAUDY E., 1981. Microbiology for Environmental Scientists and Engineers. International Student Edition. Mc Graw-Hill, Kongakusha, L.T.D. 560 pp.
- GRAY, P.A. y D.J. STEWART, 1980. Numerical Taxonomy of some marine Pseudomonads and Alteromonads. J. Appl. Bacteriol. 49 (3): 375-384.
- GUILLARD, R.R. 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol. Bull. 177:258-266 pp.

- GUILLESPIE, N.C., 1981. A Numerical Taxonomic study of Pseudomonas-like bacteria isolated from fish in Southeastern Queensland and their association with spoilage. J. Appl. Bacteriol. 50 (1):29-44.
- HELLEBUST, J.A., 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 10: 192-206.
- HUCKER, G.J. y H.J. CONN, 1957. Methods of Gram staining. Tech. Bull. N.Y. Sta. Agric. Exp. Sta. No. 93.
- HUGH, R. y E. LEIFSON, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. of Bacteriol. 66: 24-26.
- IZQUIERDO, F.B., 1981. Estudio monográfico acerca de la Microbiología marina. Tesis Profesional. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 249 pp.
- IZQUIERDO, F.B., 1985. Caracterización de bacterias hidrocarboclasticas de las plataformas de explotación petrolera de la Sonda de Campeche. Tesis de Maestría en Ciencias del Mar (Oceanografía Química). Ins. Cienc. Mar. y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México, 119 pp..
- JEFFRIES, C., D. HOLTMAN y D. GUSE, 1957. A rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bacteriol. 73: 590-591.

- JONES D. y M.J. SACKING, 1980. Numerical methods in the classification and identification of bacteria with special reference to the Enterobacteriaceae. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series N° 8. 73-106.
- KOVACS, N., 1965. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature. 178:703.
- LEROY, C. 1984. Ingestion, assimilation and growth of juveniles of the queen conch Strombus gigas Linne fed experimental diets. J. Shellf. Res. 4(1) 23-30.
- LITCHFIELD, C.D., R.R. COLWELL y J.M. PRESCOTT, 1969. Numerical Taxonomy of heterotrophic bacteria growing in association with continuous culture Clorella sorokiniana. Appl. Microbiol. 18(6): 1044-1049.
- LÍZARRAGA-PARTIDA, M.L., 1979. Pseudomonas du milieu marin, taxonomique poliphasique et écologie. Tesis de Doctorado de Estado. Université de Provence d'Aix Marseille, Francia. 177 pp.
- LYMAN, J. y R.W. FLEMING, 1940. Composition of sea water. J. Mar. Res. 3: 134-146.
- LYNCH, J.M. y N.J. POOLE, 1979. Microbial Ecology a conceptual approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford 266. pp.
- MACLEOND, R.A., E. ONOFREY y M.E. NORRIS, 1954, Nutrition and metabolism of marine bacteria. I. survey of nutritional requirements. J. Bact. 68:680-686.

- MARTIN, Y.P. y B.M. MENGUS, 1977. Utilisation de souches bactériennes sélectionnées dans l'alimentation des larves de Mytilus galloprovincialis LMK (mollusque bivalve) en élevages expérimentaux. Aquaculture 10:253-262.
- MARTIN, Y.P. y M.A. BIANCHI, 1980. Structure, diversity and catabolic potentialities of aerobic heterotrophic bacterial populations associated with continuous cultures of natural marine phytoplankton. Microb. Ecol. 5: 265-279.
- MARTY, D., 1978. Etude taxonomique et écologique des populations bactériennes Coryneformes isolées de divers biotopes du milieu marin. Tesis de Doctorado de 3er. ciclo. Universidad de Provence, Marsella, Francia. 101 pp.
- MUCHELANO, R.A. y C. BROWN, 1969. Bacterial flora of some algal foods used for rearing bivalve larvae. J. Fish. Res. Bd. Canada 26: 2760-2764.
- MUCHELANO, R.A., C. BROWN y J. BISHOP, 1975. Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, Crassostrea virginica. J. Fish. Res. Board. Can. 32: 739-745.
- OPPENHEIMER, C.H. y C.E. ZOBELL, 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. of Mar. Res. 11:10-18.

- PAGEL J.E. y P.L. SEYFRIED, 1976. Numerical Taxonomy of aquatic Acinetobacter isolates. J. Gen. Micro. 95: 220-223.
- PILLSBURY, K.S. 1985. The relative food value and biochemical composition of five phytoplankton diets for queen conch, Strombus gigas (Linne) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 90: 221-231.
- PRIEUR, D., 1976. Etude de bactéries associées aux élevages de larves de bivalves marins. Aquaculture. 8: 225-240.
- RAVIN, A.N., 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. Amer. Naturalist. 97: 307-318.
- RHEINHEIMER, G. 1984. Interrelationships between bacteria and phytoplankton in a marine area. Bacteriologie marine. Editions du CNRS, Paris.
- RODINA, A.G., 1972. Methods in aquatic Microbiology. University Park Press, N.Y. 270 pp.
- SHEWAN, J.M., G. HOBBS Y W. HODGKISS, 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. J. Appl. Bacteriol. 23 (3): 379-390.
- SIERRA, G., 1957. A simple method for the detection of lypholitic activity of microorganisms and some observations on the contact between the cell and fatty substrates. Antonie Van Leeuwenhoek, 23: 15.
- SNEATH, P.H.A., 1957. The aplication of computers to Taxonomy. J. Gen. Microbiol. 17: 201-226.

- SNEATH, P.H.A. y R.R. SOKAL, 1963. Numerical Taxonomy. Nature.  
139: 855-860.
- STANIER, R.Y., N.J. PALLERONI y M. DOUDOROFF, 1966. The aerobic  
Pseudomonads. A taxonomical study. J. Gen. Microbiol.  
43: 159-271.
- TEJERO, I.A., 1977. Estudio bacteriológico de la zona de aflo-  
ramiento del NW de Africa. Implicaciones ecológicas.  
Tesina de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Univer-  
sidad de Barcelona, España. 78 pp.
- THIBALTH, Y. P., M. PIECHAUD y M. VERON, 1963. Matériel et  
méthodes utilisés en bactériologie. En: H. R. Oliver  
(Director) Traité de Biologie Appliquée. Tome II  
Diagnostics Microbiologiques. Libraire Maloine, Paris.  
1-109.
- TUBIASH, H.S., P.E. CHENLEY y E. LEIFSON, 1965. Bacillary necro-  
sis, a Disease of larval and juvenile bivalve mollusks.  
I. Etiology and Epizootiology. J. Bact. 90 (4): 1036-  
1044.
- VERON, M., 1974. Sur un critère de calcul du meilleur niveau  
de coupure d'un dendrogramme de classification -  
hiérarchique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 125 B;  
29-44.
- VILLENA, F.J., 1986. Evaluación de las poblaciones bacterianas  
en la biotecnología del caracol marino Strombus gigas.  
Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Univ. Nal.  
Autón. Méx. 79 pp.

ZOBELL, C.E., 1932. Factors influencing the reaction of nitrate and nitrite bacteria in semisolid media. J. Bacteriol. 24: 273-278.

ZOBELL, C.E., 1971. Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons. En: Proceedings Joint Conference on Prevention and control of oil spills. American Petroleum Institute, Washington, D.C. págs. 441-451.

# A P E N D I C E N° 1

## PRUEBAS ENSAYADAS

### A) PRUEBAS MORFOLOGICAS

#### Coloniales

- 1) Talla
  - a) Menor de 2 mm
  - b) de 2-5 mm
  - c) Mayor de 5 mm
  
- 2) Elevación
  - a) Difundida
  - b) Concava
  - c) Convexa
  
- 3) Coloración
  - a) Transparente
  - b) Blanca
  - c) Crema
  - d) Amarilla
  - e) Naranja
  - f) Roja
  - g) Pigmento difusible

#### Celulares

- 1) Forma celular
  - a) Bacilos
  - b) Cocos
  - c) Cocobacilos
  - d) Pleomórficos
  
- 2) Arreglo celular
  - a) de 1-2 células
  - b) Menor de 5 células
  - c) Mayor de 5 células
  
- 3) Presencia de esporas
  
- 4) Respuesta a la tinción de Gram
  - a) Positivo
  - b) Negativo

### B) PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

Salinidades	Temperaturas	pH
0%	4 °C	3
2%	28 °C	4
7%	37 °C	5
12%	41 °C	6
13%		7
		8
		9

Producción de Exoenzimas

- a) ADNasa
- b) Amilasa
- c) Gelatinasa
- d) Lipasa
- e) Ureasa

Metabolismo respiratorio

- a) Presencia de catalasa
- b) Presencia de oxidasa
- c) Alcalinización de glucosa
- d) Acidificación de glucosa
- e) Fermentación de glucosa
- f) Reducción de nitratos
- g) Reducción de nitritos
- h) Producción de gas nitrógeno (Desnitrificación)

Factores de Crecimiento

- a) Prototrofia I (Sólo sustratos orgánicos)
- b) Prototrofia II (Sustratos orgánicos más vitaminas)
- c) Prototrofia III (Sustratos orgánicos más vitaminas más aminoácidos).

Producción del polisacárido de Levana

c) PRUEBAS NUTRICIONALES

1) Carbohidratos

D-Glucosa

Lactosa

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Almidón

2) Acidos grasos

a) Acetato de amonio

b) Propionato

c) Valerato

3) Acidos dicarboxílicos

Oxalato de amonio

Malonato

Succinato

Maleato

Fumarato

4) Hidroxiácidos

L-Malato

D-Tartrato

L-Tartrato

Lactato

Citrato

Piruvato

5) Alcoholes y glicoles

Sorbitol

Manitol

Metanol

Dulcitol

6) Aminoácidos

L-Prolina

L-Fenilalanina

L-Tirosina

L-Histidina

L-Triptófano

L-Alanina

L-Treonina

L-Valina

L-Leucina

L-Glutamato

L-Lisina

L-Arginina

L-Ornitina

L-Cisteína

Asparagina

## APENDICE 2

### DESCRIPCION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

#### Agua de mar artificial o medio mineral concentrado (Lyman y Fleming, 1940)

1) NaF	0.15 g
2) $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.20 g
3) $\text{H}_3\text{BO}_3$	1.30 g
4) $\text{KPO}_4$	4.50 g
5) $\text{KB}_r$	4.80 g
6) $\text{NaHCO}_3$	9.60 g
7) KCl	33.00 g
8) $\text{NH}_4\text{NO}_3$	36.00 g
9) $\text{CaCl}_2$	30.00 g
10) $\text{MgCl}_2$	248.00 g
11) NaCl	1,175.00 g
12) $\text{NaSO}_4$	20.00 litros

Se disuelve por separado cada una de las sales en el orden señalado.

#### Medio peptonado Zobell tipo 2216 (Oppenheimer-Zobell, 1952)

1) Extracto de levadura	1.0 g
2) Bacto peptona	5.0 g
3) $\text{FeCl}_3$ (1.2%)	1.0 ml
4) Agua de mar artificial	200.0 ml
5) Agua destilada pH 7.5-7.6	800.0 ml
6) Agar bacteriológico	15.0 g

Esterilizar a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos

Tinción de Gram (Modificado por Hücker, 1957).

1.- Reactivo de Cristal Violeta-Oxalato de amonio

Solución A

Cristal violeta	0.2 g
Alcohol etílico al 96%	200.0 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Combinar A más B, filtrar y dejar reposar 24 horas.

2.- Solución de Lugol

Solución A

Iodo	1.0 g
Ioduro de Potasio	2.0 g
Agua destilada	240.0 ml

Solución B

NaHCO al 5%	60.0 ml
-------------	---------

Combinar A más B, filtrar y reposar 24 horas antes de ser utilizados.

3.- Alcohol etílico al 95%

4.- Safranina para tinción de Gram (Sigma)

Técnica de Tinción

1.- Preparar una frotis de la cepa y dejarla secar

2.- Cubrir la preparación con la solución de cristal violeta-oxalato de amonio, por un minuto. Lavar con agua.

- 3.- Exponer la preparación a solución de Lugol por un minuto y lavar con agua.
- 4.- Decolorar con alcohol etílico al 95% durante 45 segundos. Lavar con agua.
- 5.- Aplicar safranina (colorante de contraste) durante 30 segundos y lavar con agua.

#### METABOLISMO RESPIRATORIO

Catalasa (Rodina, 1972)

Reactivo: Agua oxigenada al 3% (Peróxido de oxígeno)

Método: Agregar unas gotas del reactivo a cultivos bacterianos inoculados en medio Zobell con 24-48 horas de crecimiento.

Lectura: La observación de burbujas segundos después de la adición del reactivo indica una prueba positiva. Si no se observan, la respuesta es negativa.

Uso: La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno más agua. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los carbohidratos.

Citocromo Oxidasa (Kovacs, 1956)

Reactivo: monohidrocloreuro-de-dimetil-

Parafenilendiamina 0.1 g

Agua destilada 10.0 ml

**Método:** Agregar unas gotas del reactivo sobre cultivos bacterianos inoculados en medio peptonado Zobell de 24-48 horas de crecimiento.

**Lectura:** La presencia de un color rojo que pasa a marrón y finalmente a negro indica una prueba positiva, si no se observan cambios o bien es blanco, la prueba entonces es negativa.

**Uso:** Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones del hidrógeno al oxígeno con formación de agua.

## Alcalinización, Acidificación y Fermentación de Glucosa

### Oxido-Fermentación de glucosa (Hugh y Leifson, 1953)

Peptona	2.0 g
Glucosa	10.0 g
Azul de Bromotimol	0.03 g
Agar	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	0.30 g
Agua destilada	1000.0 ml

pH 6.9

Vaciar el medio en ampolletas

Esterilización: 118 °C por 10 minutos

Método: Disolver el medio, ajustar el pH y calentarlo.

Colocar 3 ml de éste en ampolletas de 5 ml de capacidad y esterilizarlas. Inocular por duplicado cada cepa a probar. Cubrir una de las ampolletas con aceite mineral estéril (1 cm<sup>3</sup> aproximadamente) o ponerle un tapón de parafina, dejar la otra abierta e incubarlas a 35 °C durante 48 horas o más.

Lectura:

Ampolleta abierta	Ampolleta cerrada	Metabolismo
Acido (amarilla)	Alcalino (verde)	Oxidativo
Acido (amarilla)	Acido (amarilla)	Fermentativo
Alcalino (verde)	Alcalino (verde)	No sacarolítico

Uso: Determinar el tipo de metabolismo de carbohidratos que poseen la cepas silvestres.

### Reducción de Nitratos y Nitritos (Zobell, 1971)

Caldo nutritivo	8.0 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
pH 7.5-7.6	

Esterilización: 121 °C durante 20 minutos.

Método: Colocar 8 ml del medio de cultivo en tubos de ensaye de 15 ml de capacidad. Esterilizar. Inocular por asada e incubar a 29 °C durante 48-72 horas.

Lectura: se agregan unas gotas del reactivo de Griess. La reducción de nitratos es positiva cuando aparece un color rojo o marrón. Si no hay cambio de color se añade un poco de polvo de zinc, la ausencia de color indica que los nitritos fueron más reducidos (NH<sub>3</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, hidroxilamina o N<sub>2</sub>); si el color es rojo, indica que los nitratos aún están presentes y que no fueron reducidos por lo que la prueba se considera negativa tanto para los nitratos como para los nitritos.

#### Reactivo de Griess (A + B)

Reactivo A	Reactivo B
Acido Sulfanílico 8.0 g	Naftilamina 5.0 g
Acido acético (5N) 1000 ml	Acido acético 1000. ml

Producción de gas nitrógeno (Zobell, 1932)

KNO <sub>3</sub>	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Glicerol	10.0 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
Agar bacteriológico	2.0 g

pH 7.5

Esterilización: 121 °C durante 20 minutos

Método: Calentar el medio y agregar 3 ml en ampolletas de 5 ml de capacidad, esterilizar. Inocular 0.5 ml de cultivos bacterianos previamente crecidos en medio para reducción de nitratos, sellar con parafina e incubar a temperatura ambiente durante 20 días. Incubar un blanco en las mismas condiciones.

Lectura: La prueba es positiva si se observa desplazamiento del tapón de parafina con respecto al blanco, debido a la presión ejercida por el gas que se produce.

Uso: Esta prueba detecta el metabolismo anaerobio de los nitratos hasta la formación de nitrógeno (N<sub>2</sub>).

## PRODUCCION DE EXOENZIMAS

### Amilasa (Stanier, et. al., 1966)

Agar nutritivo	23.0 g
Almidón	1.5 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
pH 7.5-7.6	

Esterilización: 121 °C durante 20 minutos.

Método: Vaciar en cajas Petri. Inocular 10 cepas en una caja utilizando el replicador múltiple. Incubar a 29 °C durante 48-72 horas.

Lectura: Empapar los cultivos con solución de lugol, la presencia de un halo transparente formado por la degradación del almidón indica una respuesta positiva.

#### Solución de Lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

### Gelatinasa (Frazier, 1926)

Agar nutritivo	23.0 g
Gelatina	4.0 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
pH 7.5-7.6	

Esterilización 121 °C durante 20 minutos.

Método: Vaciar en cajas de Petri e inocular 10 cepas

## PRODUCCION DE EXOENZIMAS

### Amilasa (Stanier, et. al., 1966)

Agar nutritivo	23.0 g
Almidón	1.5 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml

pH 7.5-7.6

Esterilización: 121 °C durante 20 minutos.

Método: Vaciar en cajas Petri. Inocular 10 cepas en una caja utilizando el replicador múltiple. Incubar a 29 °C durante 48-72 horas.

Lectura: Empapar los cultivos con solución de lugol, la presencia de un halo transparente formado por la degradación del almidón indica una respuesta positiva.

#### Solución de Lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

### Gelatinasa (Frazier, 1926)

Agar nutritivo	23.0 g
Gelatina	4.0 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml

pH 7.5-7.6

Esterilización 121 °C durante 20 minutos.

Método: Vaciar en cajas de Petri e inocular 10 cepas

diferentes por caja utilizando el replicador múltiple.

Incubar a 29 °C durante 72-76 horas.

Lectura: La presencia de un halo transparente formado minutos después de agregarle solución de cloruro mercúrico indica una respuesta positiva. Un precipitado blanco en el medio indica el caso negativo.

Uso: Las gelatinasas son enzimas proteolíticas capaces de desdoblar la gelatina, proteínas o péptidos y aminoácidos. Con esta prueba se observa la capacidad de las cepas para hidrolizar a la gelatina.

Solución de Cloruro Mercúrico

Cloruro mercúrico	15.0 g
HCL concentrado	20.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

ADNasa (Jeffries, et. al., 1957)

Agar ADN (Difco)	42.0 g
Agua de Mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
pH 7.5-7.6	

Esterilización: 121 °C durante 20 minutos

Método: Vaciar en cajas de Petri. Inocular 10 cepas diferentes por caja con la ayuda de un replicador múltiple. Incubar a 29 °C durante 48-72 horas.

Lectura: Agregar sobre las células en crecimiento unas gotas de ácido clorhídrico 1 N. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias indican una respuesta positiva.

Uso: Determinar la actividad desoxirribonucleasa en las cepas bacterianas.

Lipasa (Sierra, 1957)

Agar nutritivo 26.0 g

Tween 80 10.0 ml

Agua de mar 200.0 ml

Agua destilada 800.0 ml

pH 7.5-7.6

Esterilización: 121 °C por 20 minutos

Método: Vaciar en cajas de Petri e inocular 10 cepas en cada caja utilizando el replicador múltiple. Incubar a 29 °C por 48-72 horas.

Lectura: La presencia de cristales blancos de oleato de calcio, precipitados en el medio, indican una prueba positiva, la ausencia de los mismos indican el caso negativo.

Uso: Esta prueba pone de manifiesto la presencia de esta enzima capaz de hidrolizar los lípidos.

Ureasa (Bioxon)

En gramos por litro de agua destilada

Peptona de gelatina 1.0 g

Dextrosa 1.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Fosfato monopotásico 2.0 g

Urea 2.0 g

Rojo fenol 0.012 g

pH 6.8

Método: Disolver 15 g de agar en 900 ml de agua destilada. Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 minutos, enfriar a 50 grados centígrados. Disolver 20 g de la base de agar aurea en 100 ml de agua destilada, esterilizarla por filtración y agregarla al agar en condiciones asépticas, mezclar y vaciar en tubos de ensaye estériles y dejar que se solidifiquen en pico de flauta (inclinados). El medio solidificado debe tener un color ligeramente rosado. Inocular con asa y dejarlos incubar a 29 °C durante 48-72 horas.

Lectura: La prueba se considera positiva cuando el medio adquiere un color rosa intenso, y negativa cuando no se observa cambio alguno.

Uso: Los microorganismos que poseen la enzima ureasa tiene la capacidad de hidrolizar urea con liberación de amonio que puede ser detectado con un indicador de pH en el medio.

Producción de Levana (Fuchs, 1956).

Agar nutritivo	23 g
Sacarosa	40 g
Agua de mar	200 ml
Agua destilada	800 ml
pH 7.5-7.6	

Esterilización: en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Método: Vaciar en cajas Petri e inocular 10 cepas diferentes en cada placa (por duplicado) incubar a 28°C durante 76-96 horas.

Lectura: El aspecto viscoso y fluído de la colonia indica una respuesta positiva.

Uso: Detectar la capacidad de las bacterias para producir el polisacárido de Levana.

## Factores de Crecimiento

### I. Prototrofia Simple (Marty, 1978).

Acetato de amonio	1.0 g
Succinato	1.0 g
L-Prolina	0.5 g
Glicerina	1.0 g
Piruvato	1.0 g
Agua de mar	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
pH 7.5	
Agar bacteriológico	15.0 g
Buffer Tris-HCl	10.0 ml

Esterilización: 110°C por 45 minutos.

Método: Servir en cajas Petri, inocular con el replicador automático. Incubar a 28°C durante 7 días.

Lectura: Comparar con el testigo que se utiliza para las pruebas nutricionales. Se considera positiva cuando el crecimiento es mayor que en el testigo, infiriéndose que la cepa no requiere de factores de crecimiento y que puede crecer utilizando sólo sustratos orgánicos. Si el crecimiento es menor o igual que en el testigo, la prueba será negativa, por lo que se induce que la cepa requiere de factores de crecimiento.

Uso: Determinar si las cepas requieren de factores de crecimiento para desarrollarse.

## II. Prototrofia simple más vitaminas

Al medio para prototrofia simple se le agregan 2 ml. por litro de la siguiente solución de vitaminas:

Vitaminas B <sub>12</sub>	0.5 mg
Biotina	5.0 mg
Acido fólico	50.0 mg
Acido-p-aminobenzoico	50.0 mg
Piridoxina	50.0 mg
Riboflavina	50.0 mg
Tiamina	50.0 mg
Tiourea	50.0 mg
Pantotenato de calcio	500.0 mg
Mesoinositol	500.0 mg
Agua destilada	1000.0 ml

Método: Esterilizar el medio de prototrofia simple cuando ya esté listo para vaciar, agregar por filtración la solución de vitaminas. Repartir en cajas, inocular, e incubar a 28°C durante 7 días.

Lectura: Se realiza igual que para prototrofia simple.

Uso: Determinar si las cepas que no crecieron en el medio de Prototrofia simple requieren de vitaminas para su desarrollo.

## III. Prototrofia simple más vitaminas más aminoácidos

Al medio de prototrofia simple se le agregan 2 ml. de solución de vitaminas y 0.050 gr. por litro de los siguientes aminoácidos:

Aminoácidos	Forma de esterilización
L-Cisteína	Autoclave
L-Asparagina	" "
L-Arginina	Filtración
L-Lisina	" "
L-Alanina	" "
L-Glutamato	" "
L-Leucina	Autoclave
L-Metionina	" "
L-Prolina	Filtración
L-Aspartato	" "
Glicina	" "

Ajustarles el pH a 7.5 antes de agregarlos al medio.

#### PRUEBAS NUTRICIONALES

Medio Base	
FeCl <sub>3</sub>	1.0 ml.
Buffer Tris-HCl	10.0 ml.
Agua de mar artificial	200.0 ml.
Agua destilada	800.0 ml.
pH	7.5-7.6
Agar bacteriológico	15.0 g.
Esterilizar a 121°C durante 20 minutos	

Disolver los sustratos en la mínima cantidad de agua destilada y ajustarle el pH a 7.5-0.1, esterilizarlos por filtración

cuando sea necesario y agregarlos al medio base en condiciones asépticas, agitar y servir en cajas Petri.

Sustratos utilizados

Sustrato	Concentración g/l	Método de Esterilización
Azúcares		
a) D-Glucosa	2	Filtración
b) Lactosa	2	Filtración
c) Almidón	2	Autoclave
Acidos grasos		
a) Acetato de amonio	1	Filtración
b) Propionato	1	Filtración
c) Valerato	1	Autoclave
Acidos Dicarboxílicos		
a) Oxalato de amonio	1	Filtración
b) Malonato	1	" "
c) Succinato	1	" "
d) Maleato	1	" "
e) Fumarato	1	" "
Hidroxiácidos		
a) L-Malato	1	Filtración
b) D-Tartrato	1	" "
c) L-Tartrato	1	" "
d) Lactato	1	" "
e) Citrato	1	" "
f) Piruvato	1	" "

Alcoholes

a) Sorbitol	1	Filtración
b) Manitol	1	" "
c) Metanol	1	Directo
d) Dulcitol		Filtración

Aminoácidos

L-Prolina	1	Filtración
L-Fenilalanina	1	" "
L-Tirosina	1	" "
L-Histidina	1	" "
L-Triptófano	1	" "
L-Alanina	1	" "
L-Treonina	1	" "
L-Valina	1	Autoclave
L-Leucina	1	" "
L-Glutamato	1	Filtración
L-Lisina	1	" "
L-Arginina	1	" "
L-Ornitina	1	" "
L-Cisteína	1	Autoclave
Asparagina	1	" "

Tiempo de incubación: 15 días

Temperatura de incubación: 28°C

Lectura: Se consideran positivas aquéllas cajas en las que se presenta mayor crecimiento que en las 2 placas que contienen la fuente de carbono en relación a las placas control o blanco.

(sin fuentes de carbono). Si el crecimiento es menor o igual que en éstas últimas, la prueba se considera negativa.

En cada serie de pruebas se deben incluir 2 placas conteniendo medio completo (Zobell) para asegurar la viabilidad del inóculo.

Método de inoculación: Replicador múltiple, 2 cajas por cada sustrato a probar.

APENDICE 3

TABLA 2. Características de las 267 cepas ensayadas por muestreo y lugar de origen

TABLA 5. Características de las 267 cepas estudiadas en cada uno de los grupos formados a un nivel de similitud de 0.55, según el Coeficiente de Asociación de Jaccard (% de respuestas positivas)

TABLA 2. CARACTERISTICAS DE LAS 267 CEPAS ENSAYADAS POR MUESTREO Y LUGAR DE ORIGEN (PORCENTAJES POSITIVOS)

	Muestreo			Lugar de origen				Total
	1	2	3	A	B	C	D	
Número de cepas	156	41	62	185	19	49	6	267
<b>MORFOLOGIA COLONIAL</b>								
<b>-Talla</b>								
Menor de 2 mm	44	48	39	43	47	55	83	46
2-5 mm	49	29	55	49	53	43	17	46
Mayor 5 mm	7	2	6	8	0	2	0	8
<b>-Elevación</b>								
Difundida	8	2	0	5	10	2	0	6
Cóncava	17	0	10	11	0	26	0	13
Convexa	69	95	90	81	84	61	100	77
<b>-Coloración</b>								
Transparente	28	37	61	38	32	41	0	37
Blanca	13	10	8	12	0	12	33	12
Crema-blanco	24	10	8	17	21	18	17	18
Amarilla	21	5	13	16	32	16	0	17
Naranja	12	27	10	12	16	14	50	13
Roja	3	12	2	5	5	0	0	4
Pigmento difusible	1	0	0	1	0	0	0	1
<b>MORFOLOGIA CELULAR</b>								
<b>-Forma celular</b>								
Bacilos	65	66	77	75	47	59	17	69
Cocos	24	22	14	14	53	35	33	21
Cocobacilos	10	7	5	11	0	2	17	8
Pleomórficos	1	5	3	1	0	4	33	2
<b>-Arreglo celular</b>								
1-2 células	76	78	81	79	68	75	67	77
Menor de 5 células	13	10	5	10	16	8	17	10
Mayor de 5 células	10	10	14	10	16	16	0	11
<b>-Presencia de espora</b>								
	20	2	6	16	5	10	0	14
<b>Tinción de Gram</b>								
Positivo	34	19	14	25	37	29	50	27
Negativo	67	80	85	75	63	71	50	73



Continuación Tabla 2...

CARACTERISTICAS NUTRICIONALES

Número de cepas	Muestreo			Lugar de Origen				Total
	1	2	3	A	B	C	D	
	156	41	62	185	19	49	6	267
<b>CARBOHIDRATOS</b>								
D-Glucosa	82	76	63	77	89	71	83	78
Lactosa	34	37	31	31	37	39	50	33
Almidón	45	34	63	53	47	29	33	48
IMU	54	49	52	54	58	46	55	53
CC	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>ACIDOS GRASOS</b>								
Acetato de amonio	72	77	89	79	68	69	50	72
Propionato	64	71	77	71	68	63	17	69
Valerato	67	58	58	66	68	61	0	64
IMU	67	63	73	70	68	66	16	68
CC	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>AC. DICARBOXILICOS</b>								
Oxalato de amonio	17	0	18	17	10	10	0	15
Malonato	40	41	37	40	58	29	50	40
Succinato	65	71	69	69	68	63	50	67
Maleato	19	24	19	24	26	4	17	20
Fumarato	70	56	76	71	58	71	50	70
IMU	43	38	44	44	44	35	33	42
CC	100	83	100	100	100	100	83	100
<b>HIDROXIACIDOS</b>								
L-Malato	77	54	89	79	68	69	50	76
D-Tartrato	24	7	13	18	10	24	17	19
L-Tartrato	13	15	31	18	16	18	17	19
Lactato	84	76	85	83	89	82	67	83
Citrato	76	61	56	70	74	67	33	68
Piruvato	81	58	76	80	63	73	16	76
IMU	59	45	58	58	53	56	33	57
CC	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>ALCOHOLES Y GLICOLES</b>								
Sorbitol	68	58	50	64	84	51	33	62
Manitol	79	73	45	68	68	80	83	71
Metanol	2	2	8	4	0	4	0	4
Dulcitol	22	37	52	35	32	20	17	31
IMU	43	43	38	43	46	39	33	42
CC	100	100	100	100	80	100	80	100

Continuación Tabla 2...

Número de cepas	Muestreo			Lugar de Origen				Total
	1	2	3	A	B	C	D	
	156	41	62	185	19	49	6	267
<b>AMINOACIDOS</b>								
L-Prolina	84	73	84	88	79	67	50	82
L-Fenilalanina	63	56	29	53	53	57	67	54
L-Tirosina	54	63	63	57	63	55	83	58
L-Histidina	66	44	73	67	79	55	0	64
L-Alanina	86	68	83	81	74	94	50	83
L-Treonina	49	41	42	45	68	41	50	47
L-Valina	48	73	69	62	68	37	50	58
L-Leucina	58	76	79	71	58	51	50	66
L-Glutamato	77	63	69	75	63	75	33	73
L-Lisina	44	46	61	50	58	39	50	48
L-Arginina	58	37	73	66	42	37	33	59
L-Ornitina	58	57	52	59	53	43	67	57
L-Cisteína	24	27	52	35	21	20	17	31
L-Triptofano	21	7	24	19	10	24	17	21
Asparagina	74	63	71	74	63	65	83	72
IMU	58	52	61	60	59	51	47	58
CC	100	100	100	100	100	100	93	100

Lugar de origen: A = Cultivos de microalgas; B = Homogenizados de larvas, C = Estanques y D = Tanque de almacenamiento.

TABLA 5. CARACTERISTICAS DE LAS 267 CEPAS ESTUDIADAS EN CADA UNO DE LOS GRUPOS FORMADOS A UN NIVEL DE SIMILITUD DE 0.55, SEGUN EL COEFICIENTE DE ASOCIACION DE JACCARD (% DE RESPUESTAS POSITIVAS.)

Grupo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. de Cepas	267	30	18	96	10	7	15	10	15	4	28
<u>MORFOLOGIA COLONIAL</u>											
<u>TALLA</u>											
Menor de 2 mm	46	37	44	53	10	100	47	90	60	50	0
2-5 mm	46	50	56	40	80	0	53	10	40	50	79
Mayor de 5 mm	8	13	0	7	10	0	0	0	0	0	21
<u>ELEVACION</u>											
Difundida	6	3	0	12	0	0	7	0	0	0	0
Cóncava	13	27	6	9	0	0	0	0	7	100	32
Convexa	77	70	83	74	100	100	23	100	93	0	61
<u>COLORACION</u>											
Transparente	37	7	22	60	90	43	47	10	0	25	0
Blanca	12	16	0	0	0	0	7	30	20	0	61
Crema-blanco	17	30	17	10	10	0	40	30	0	25	39
Amarilla	17	37	6	16	0	14	7	20	60	0	0
Naranja	13	10	56	9	0	14	0	10	20	50	0
Roja	4	0	0	5	0	29	0	0	0	0	0
Pigmento difusible	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<u>MORFOLOGIA CELULAR</u>											
<u>FORMA CELULAR</u>											
Bacilos	69	40	72	87	100	100	93	0	7	0	100
Cocos	21	40	6	5	0	0	7	80	83	100	0
Cocobacilos	8	20	11	7	0	0	0	20	0	0	0
Pleomórfico	2	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>ARREGLO CELULAR</u>											
1-2 células	77	50	94	95	100	100	87	40	13	75	86
Menor de 5 células	10	20	0	5	0	0	0	50	20	25	7
Mayor de 5 células	11	30	0	0	0	0	13	10	67	0	7
Pres. de Espora	14	27	0	0	0	0	7	0	0	0	99
<u>TINCION DE GRAM</u>											
Positivo	97	60	0	2	0	0	7	100	53	0	93
Negativo	73	40	100	98	100	100	93	0	47	100	07



Continuación Tabla 5...

PORCENTAJE DE PRUEBAS POSITIVAS PARA EL TOTAL DE CEPAS BACTERIANAS  
ENSAYADAS Y PARA CADA UNO DE LOS GRUPOS

PRUEBAS NUTRICIONALES

Grupo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. de cepas	267	30	18	98	10	7	15	10	15	4	28
<b>CARBOHIDRATOS</b>											
D-Glucosa	78	83	83	80	90	14	87	100	80	75	96
Lactosa	33	33	56	24	10	14	53	80	60	100	14
Almidón	48	63	22	49	80	14	67	30	33	0	71
C.C.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	66	100
I.M.U.	53	60	54	51	60	14	69	70	58	58	60
<b>ACIDOS GRASOS</b>											
Acetato de amonio	72	77	50	93	90	86	60	10	87	100	29
Propionato	69	87	55	93	70	71	20	20	67	100	32
Valerato	64	73	39	89	60	71	13	10	67	100	25
C.C.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
I.M.U.	68	79	50	91	73	76	31	13	73	100	29
<b>AC. DICARBOXILICOS</b>											
Oxalato de amonio	15	17	22	15	10	0	0	10	40	0	18
Malonato	40	40	44	57	10	14	20	20	53	0	2525
Succinato	67	90	67	88	60	29	47	70	73	50	14
Maleato	20	33	22	24	10	0	0	10	20	0	21
Fumarato	70	93	72	84	60	71	27	70	93	100	29
C.C.	100	100	100	100	100	60	60	100	100	40	100
I.M.U.	42	55	46	54	30	23	19	36	56	30	21
<b>HIDROXIACIDOS</b>											
L-Malato	76	97	72	93	80	0	47	30	73	100	90
D-Tartrato	19	17	39	24	0	0	7	10	47	25	0
L-Tartrato	19	33	28	11	30	0	13	20	40	0	11
Lactato	83	97	83	96	70	29	67	70	100	100	71
Citrato	68	90	78	73	50	29	60	50	80	25	75
Piruvato	76	100	50	91	80	29	87	20	67	100	82
C.C.	100	100	100	100	83	50	100	100	100	83	83
I.M.U.	57	72	58	65	52	29	47	33	68	58	55
<b>ALCOHOLES Y GLIC.</b>											
Sorbitol	62	87	78	48	80	29	93	40	67	0	93
Manitol	71	80	100	74	0	43	87	40	67	100	100
Metanol	4	3	6	7	0	0	0	0	0	0	0
Dulcitol	31	20	50	37	50	0	33	30	20	0	18
C.C.	100	100	100	100	50	50	75	75	75	25	75
I.M.U.	30	42	41	39	39	21	44	19	34	50	51

Continuación Tabla 5...

PORCENTAJE DE PRUEBAS POSITIVAS PARA EL TOTAL DE CEPAS BACTERIANAS  
ENSAYADAS Y PARA CADA UNO DE LOS GRUPOS

PRUEBAS NUTRICIONALES

Grupo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. de cepas	267	30	18	98	10	7	15	10	15	4	28
AMINOÁCIDOS											
L-Prolina	82	100	78	96	90	71	73	20	73	50	96
L-Fenilalanina	54	77	78	68	0	14	47	40	47	25	18
L-Tirosina	58	90	100	63	60	14	20	30	80	0	36
L-Histidina	64	77	56	65	60	0	93	0	93	25	82
L-Alanina	83	87	83	94	100	71	93	50	87	100	89
L-Treonina	47	73	50	57	20	0	74	10	67	0	21
L-Valina	58	80	61	76	60	71	13	20	53	0	14
L-Leucina	66	97	78	90	50	71	20	20	67	25	18
L-Glutamato	73	83	83	97	30	0	60	40	73	25	75
L-Lisina	48	70	61	69	50	14	7	40	33	50	7
L-Arginina	59	90	17	66	90	14	47	10	33	25	100
L-Ornitina	57	77	44	67	20	14	33	20	47	0	93
L-Cisteína	31	43	57	38	60	14	0	0	27	25	21
L-Triptofano	21	30	33	23	50	24	0	0	13	0	4
Asparagina	72	83	89	85	20	0	60	30	80	100	96
C.C.	100	100	100	100	93	73	86	80	100	66	100
I.M.U.	58	77	64	70	51	26	43	23	58	30	51

## A G R A D E C I M I E N T O

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron de alguna forma en la elaboración del presente trabajo y en especial a las siguientes personas:

- Al Dr. Agustín Ayala Castañares.
- Al M.en C. Jorge M. Romero Jarero
- A la M.en C. Ma. de Jesús Ferrara Guerrero
- Al Dr. Teófilo Herrera Suárez
- Al Ocean. Fernando Ramos López
- A la Dra. Ma. de Lourdes Segura Puertas
- A la M.en C. Ma. del Pilar Torres García
- Al QFB. Fernando Izquierdo Vicuña
- Al Biol. Humberto Núñez Cardona
- Al Quím. Alfonso Mieres Hermosillo
- A mis compañeros Biólogos: -Francisco Javier Villena Irive, Virginia Echániz Hernández, Abel Aldana Godínez e Irma Wong Chang.
- A la Srta. Alejandra Estrada.
- A las Sras. Obdulia Núñez Cardona y Noemí Espinosa Jiménez
- Al Sr. Arturo Reséndiz Cruz
- Al Personal del ICMYL.