

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**BACTERIAS DE LA FOSA DE GUAYMAS CON
CAPACIDAD PARA UTILIZAR HIDROCARBUROS**

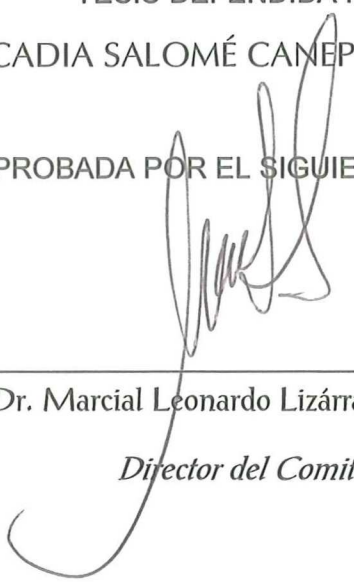
**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

LEOCADIA SALOME CANEPA BERTOLINI

Ensenada, B. C., Mexico. Abril de 1997.

TESIS DEFENDIDA POR
LEOCADIA SALOMÉ CANEPA BERTOLINI

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE



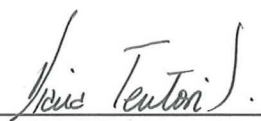
Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida

Director del Comité



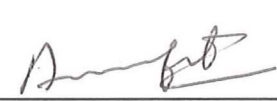
Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Miembro del Comité



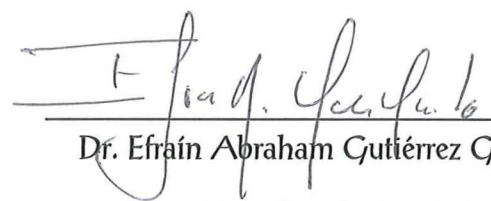
Dra. Diana Tentori Santacruz

Miembro del Comité



M.C. Anamaría Escofet Giansone

Miembro del Comité



Dr. Efraín Abraham Gutiérrez Galindo

Miembro del Comité



Dr. Gilberto Gaxiola Castro

Jefe del Departamento de Ecología



M.C. Alberto Amador Buenrostro

*Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado*

24 de abril de 1997

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



CICSE

**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA**

**BACTERIAS DE LA FOSA DE GUAYMAS CON CAPACIDAD PARA
UTILIZAR HIDROCARBUROS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado
de **MAESTRO EN CIENCIAS** presenta:

LEOCADIA SALOMÉ CANEPA BERTOLINI

Ensenada, Baja California, México. Abril de 1997.

RESUMEN de la Tesis de **LEOCADIA SALOMÉ CANEPA BERTOLINI**, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** en **ECOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Abril de 1997.

BACTERIAS DE LA FOSA DE GUAYMAS CON CAPACIDAD PARA UTILIZAR HIDROCARBUROS

Resumen aprobado por:



Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Director de Tesis

Se cuantificaron bacterias utilizadoras de hidrocarburos (BH) mediante la técnica del número más probable (NMP) propuesta por Mills *et al.*, (1978) en dos almejas (*Nuculana grasslei* y *Vesicomya gigas*), en sedimentos no compactados; en una concreción nodular hueca, y en una roca sedimentaria. Las muestras se obtuvieron tanto en la depresión sur como en la depresión norte de la fosa de Guaymas ubicada en la parte central del Golfo de California. Como fuente de carbono y energía se utilizaron los hidrocarburos, n-hexadecano y n-dodecano (alifáticos), dimetilnaftaleno, fenantreno, 2-metilnaftaleno, pireno, naftaleno, perileno, benzo α pireno (aromáticos) y el petróleo crudo del pozo Ixtoc I. Todas las muestras se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se registró su crecimiento a los 16, 60 y 150 días de incubación.

Las mayores concentraciones de BH se registraron en las muestras de las almejas *N. grasslei* y *V. gigas* cultivadas en n-hexadecano (>1600 BH/gr y 240 BH/gr respectivamente). Esta concentración es muy superior a la registrada en sedimentos, hábitat tradicionalmente estudiado en esta fosa. Estos resultados muestran por primera vez la presencia de bacterias utilizadoras de hidrocarburos alifáticos y aromáticos asociados a *N. grasslei* y *V. gigas*.

A partir de las muestras de almejas se aislaron bacterias utilizadoras de n-hexadecano. Dichas bacterias se sometieron a varias pruebas para caracterizarlas, encontrando que podrían pertenecer al género *Pseudomonas* ya que en su mayoría son bacilos Gramnegativos, oxidasa positivos y no fermentativos.

Palabras clave: Bacterias, Hidrocarburos, Fosa de Guaymas, Ventilas Hidrotermales.

ABSTRACT of the Thesis of **LEOCADIA SALOMÉ CANEPA BERTOLINI**, presented as partial requirement to obtain the **degree of MASTER IN SCIENCES in MARINE ECOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. April 1997.

BACTERIA FROM GUAYMAS BASIN WITH CAPACITY TO UTILIZE HYDROCARBONS

The most probable number technique (MPN) described by Mills *et al.*, (1978) was used for the quantitative determination of hydrocarbonoclastic bacteria (HB) in clams *Nuculana grasslei* and *Vesicomya gigas*, in no compacted sediments, in hole nodular concretion, and in sedimentary rock. The samples were taken in the Northern and Southern Troughs of the Guaymas Basin in the Gulf of California. We used as the sole carbon and energy source the hydrocarbons, n-hexadecane, n-dodecane (aliphatic), dimethylnaphthalene, phenanthrene, 2-methylnaphthalene, pyrene, naphthalene, perylene, benzo α pyrene (aromatics), and crude oil from Ixtoc I oil well. All the samples were maintained at incubation temperature of $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and the enumerations were performed after 16, 60 and 150 days of incubation.

The maximum concentrations of HB were registered on the clams samples (*N. grasslei* and *V. gigas*) cultured in n-hexadecane (>1600 HB/gr and 240 HB/gr respectively). This concentration was much higher than in sediment which is this habitat traditionally studied in this basin. These results show for the first time the presence of aliphatic and aromatic hydrocarbons utilizer bacteria associated to *Nuculana grasslei* and *Vesicomya gigas*.

Bacteria that utilize n-hexadecane were isolated from the clams. Several proofs suggested that the bacteria pertain to *Pseudomonas* genus since they were mainly Gramnegative rods, oxidase positive, and no fermentatives.

Key words: Bacteria, Hydrocarbons, Guaymas Basin, Hydrothermal vents.

Es verdad que el cambio conlleva el riesgo del fracaso,
esa es la principal razón del temor a la libertad.
Pero también es verdad que en la vida no hay errores,
sólo lecciones que aprender.

Todo lo que se ve como una victoria, no siempre significa ganar;
y perder, no siempre significa estar derrotado.

Idries Shah.

No siempre la cima significa victoria. No puede hablarse de triunfo refiriéndose a la serpiente que arrastrándose ha llegado a la cresta de la montaña cuya majestad ignora. El hombre no es tan sólo el rey de la creación, por la chispa divina del pensamiento; lo es, por ser el único que lucha por un ideal superior que lo ennoblece y lo sublima.

Carlos A. Madrazo Becerra.

En el vaivén eterno de las eras, el porvenir es siempre de los visionarios. La interminable contienda entre el idealismo y la mediocridad tiene su símbolo en la obra de Cellini: "Perseo exhibiendo la cabeza de Medusa, cuyo cuerpo agítase en contorsiones de reptil bajo sus pies alados.

Y dice a los jóvenes que toda brega por un Ideal es santa, aunque sea ilusorio el resultado; que es loable seguir su temperamento y pensar con el corazón, si ello contribuirá a crear una personalidad firme; que todo germen de romanticismo debe alentarse, para enguinaldar de aurora la única primavera que no vuelve jamás.

Y a los maduros, cuyas primeras canas salpican de otoño sus más vehementes quimeras, instígalos a custodiar sus ideales bajo el palio de la más severa dignidad, frente a las tentaciones que conspiran para encenegarlos en la Estigia donde se abisman los mediocres.

Y en el gesto del bronce parece que el Idealismo decapitara a la Mediocridad, entregando su cabeza al juicio de los siglos.

José Ingenieros.

DEDICATORIA

A mis padres: Ada y José A. por que a pesar de todas las adversidades, siempre creyeron en mí y en que podía salir adelante...

A mi esposo Néstor por su amor, compañía y paciencia cuando las cosas andaban de cabeza... ¡Gracias!

A mis hermanos: Ulises, Guadalupe, Pedro, Juan Manuel, Sonia y Adolfo porque a pesar de ser como son y la diferencia de edades entre ustedes y yo los quiero por igual.

A la pequeña Fátima porque su recuerdo me llenaba de alegría en las horas de tristeza...

A mi amiga Fantasma de toda la vida "Fabiolette" porque a pesar de la distancia y del tiempo transcurrido sin vernos siempre estas ahí...

A Ada Gpe., Paola, Valeria y Ada M. que más que tía y sobrinas siempre fuimos como hermanas, por todas las travesuras que hacíamos de niñas y ya de grandes también.

A Leti por todos los "jalones de oreja", los consejos y sobre todo por todo el ánimo que siempre me diste para salir adelante y no dejarme vencer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida por la dirección de ésta tesis y por el apoyo que me brindó para la finalización de la misma.

A una nueva beca llamada "Mamacyt", sin la cual realmente no hubiera sido posible terminar mi tesis ¡Gracias Doña Ada!...

Gracias S. J. y S. M. por sacarme de todos los aprietos en los que me metí y más que nada gracias a Ti por todo lo que has hecho por mí...

A mis sinodales: M. en C. Ana María Escofet Giansone, Dr. José de Jesús Paniagua Michel, Dra. Diana Tentori Santa Cruz y Dr. Efraín Abraham Gutiérrez Galindo, por los comentarios para que el escrito de esta tesis se llevara a su término.

A las bibliotecarias del C.I.C.E.S.E., en especial a Lupita Morales y a María Cecilia González, por el servicio tan rápido cuando urgían los artículos.

Al M. en C. Néstor Valles Villarreal, técnico del laboratorio de películas delgadas, por toda la ayuda prestada durante los experimentos y escritura de ésta tesis.

A Lupita Vargas Cárdenas, técnico del laboratorio de Biotecnología Marina, por la ayuda que me brindó al inicio de mi tesis, al Ing. José María Domínguez Olachea y al dibujante técnico Francisco Javier Ponce por la elaboración de los dibujos que aparecen en ésta tesis.

Al Oceanólogo César O. Almeda por su ayuda en la digitalización de las figuras, así como también en la impresión de la versión final de ésta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Marina: Edna Sánchez, Lya Romero, Amelia Portillo y especialmente a Marco López por el tiempo que dedicó a la revisión del manuscrito y a la ayuda en el trabajo de laboratorio.

A los esclavos Fausto Arellano y Dahan Gómez por su ayudadita al inicio de la tesis y por las horas divertidas cuando el trabajo se hacía tedioso.

A la M. en C. Elena Solana, Dr. Héctor Echavarría, Dr. Horacio de la Cueva y M. en C. Ana María Escofet por defenderme cuando más lo necesitaba, muchas gracias por toda su ayuda desinteresada.

Muy especialmente a Don Vicente Ferreira por su sincera amistad, por el tiempo que dedicó a escucharme cuando andaba en la depre y a jalarme las orejas cuando lo necesitaba para salir adelante.

A mis compañeros de la Generación del 93, y especialmente a mis amigas de desvelos en las buenas y en las malas: Leticia Espinosa, Elia Montiel, Lupita Burboa y Marisela Aguilar por su desinteresada ayuda y ánimos cuando más lo necesitaba. A mi compañera de casa por algunos años Soledad Arocena, por los tiempos en los que nos llevábamos de maravilla y éramos como hermanas.

A los amigos de otras generaciones: Alf Meling (por la revisión del borrador y por ser mi testigo...), Luis Enrique (ex-compañero de laboratorio), Luis Miranda "todavía no lo he perdonado", al Unai por loco. Y especialmente al Dr. Jorge Zavala porque sin su ayuda no me hubiera quedado en el CICESE.

A los amigos y amigas de otros departamentos: Luis Zavala, Amparo Rodríguez, Veneranda Garcés, Rodolfo Cortés, Pablo Loza, Karla Paola Garza, José Cuauhtémoc Samaniego, Martha Rivera y Jaime y Cuauhtémoc Arteaga, especialmente a Manuel García y Víctor Coello

mis cuñados del alma a poco pensaron que me había olvidado de ustedes pues No con todo lo fastidiosos que son quien podría olvidarlos. Y a otros que de repente se me escapan.

A don Porfirio por mantener limpia mi área de trabajo y a Gerardo por hacerme compañía en la noche contándome cuentos de espanto para asustarme.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1 Antecedentes generales.	1
I.1.1 Origen y características del petróleo y sus derivados en el mar.	4
I.2 Descripción del ecosistema de ventilas hidrotermales.	6
I.3 Antecedentes y características de la fosa de Guaymas.	12
I.4 Objetivos.	17
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	18
II.1 Descripción del área de estudio.	18
II.1.1 Áreas de muestreo.	20
II.2 Trabajo de campo.	21
II.2.1 Colecta de las muestras.	21
II.2.2 Procesamiento inicial.	22
II.3 Trabajo de laboratorio.	23
II.3.1 Enumeración bacteriana.	23
II.3.2 Crecimiento.	24
II.3.2.1 Obtención de curvas.	24
II.3.2.2 Sistema experimental.	25
II.3.3 Aislamiento de cepas bacterianas que utilizan n-hexadecano.	26
II.3.4 Procesamiento de datos.	28
III. RESULTADOS.	29
III.1 Enumeración bacteriana.	29
III.1.1 Crecimiento.	33
III.2 Aislamiento de cepas bacterianas que utilizan n-hexadecano.	34

IV. DISCUSIÓN.	37
V. CONCLUSIONES.	42
LITERATURA CITADA.	44
APÉNDICE A.	53
APÉNDICE B.	62

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Entrada de petróleo al medio marino.	5
2	Mapa de localización de ventilas hidrotermales que han sido estudiadas. (Tomado de Tunnicliffe, 1992).	7
3	Esquema de una ventila hidrotermal en general. (Tomado de Tunnicliffe, 1992).	10
4	Esquema de una ventila hidrotermal en la fosa de Guaymas.	14
5	Localización geográfica del área de estudio: a) mapa del Golfo de California (Simoneit, 1985b), b) Mapa batimétrico de la depresión sur (Kawka y Simoneit, 1990), c) Mapa batimétrico de la depresión norte (Simoneit <i>et al.</i> , 1990).	19
6	Sistema experimental: a) botella de vidrio, b) tapón de neopreno, c) manguera, d) distribuidor de aire, e) bomba para acuario, f) filtros hidrófobos, g) válvula de seguridad.	26
7	Curva de crecimiento de las bacterias aisladas a partir de la almeja <i>Nuculana grasslei</i> en el hidrocarburo n-hexadecano.	33

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Resumen de las áreas de muestreo.	21
II	Cuantificación de bacterias utilizadoras de hidrocarburos (Bact/gr) de diferentes fuentes (muestras), a los 16, 60 y 150 días de incubación.	30
III	Resultados de las pruebas realizadas a las cepas aisladas a partir de la almeja <i>Nuculana grasslei</i> en el hidrocarburo n-hexadecano.	36

BACTERIAS DE LA FOSA DE GUAYMAS CON CAPACIDAD PARA UTILIZAR HIDROCARBUROS

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes Generales

Las bacterias presentan un amplio espectro metabólico que las hace capaces de aprovechar diferentes substratos de origen orgánico como única fuente de energía y carbono. Dentro de ellos se encuentran los hidrocarburos, observándose que constituyen uno de los substratos que las bacterias marinas pueden utilizar, ya que en el océano existen fuentes biogénicas así como antropogénicas.

ZoBell (1946) realizó una revisión de los trabajos existentes en donde señaló que muchos microorganismos tienen la habilidad para usar los hidrocarburos como único recurso de energía y carbono además de que estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. También observó que la utilización microbiana de los hidrocarburos era dependiente de la naturaleza química de los componentes dentro de la mezcla de petróleo, así como de las condiciones ambientales.

A partir de ahí se han realizado otros estudios sobre la potencialidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos del petróleo, encontrándose que no está restringida a unos pocos géneros, ya que se ha reconocido un grupo diverso de bacterias, hongos, levaduras y algas con esta capacidad; sin embargo, las bacterias han sido objeto de estudios más detallados.

Atlas y Bartha (1972) estudiaron la capacidad de biodegradación de *Flavobacterium* spp. y *Brevibacterium* spp. en un petróleo crudo parafínico y uno definido químicamente como mezcla de hidrocarburos, encontrando en un período de dos semanas una degradación de más del 60% del petróleo crudo y del 75% de la mezcla de hidrocarburos. Walker *et al.*, (1975a) compararon la capacidad de hongos y bacterias para degradar hidrocarburos. Incluyeron en su estudio a los siguientes géneros: *Candida*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Leucothrix*, *Nocardia*, y *Rhizobium*. Ellos observaron que tanto bacterias como hongos mostraban decremento en sus capacidades para degradar alcanos conforme se incrementaba la longitud de la cadena de los hidrocarburos, mientras que los hongos filamentosos no exhibieron ninguna degradación preferencial por alguna longitud de la cadena de hidrocarburos.

En otro estudio, Walker *et al.*, (1975b) examinaron bacterias de sedimentos y agua, en las cuales encontraron que el agua contenía una mayor variedad de especies bacterianas capaces de degradar petróleo que las bacterias de sedimentos. Los cultivos de agua y sedimento contenían *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. Las bacterias presentes en el agua mostraron una mayor degradación de cicloalcanos de 2-, 3-, 4- y 5 anillos y de mono-, di-, tri, tetra, y penta-aromáticos comparadas con las bacterias de sedimento. Dean-Raymond y Bartha (1975) aislaron 6 especies de bacterias de un estuario contaminado con petróleo y las cultivaron sobre diferentes tipos de compuestos aromáticos de petróleo. La mayoría de las especies utilizaron como único recurso de carbono y energía el naftaleno, 2-metilnaftaleno y 2-etilnaftaleno. Asimismo encontraron que sólo una creció sobre 1-metilnaftaleno mientras que todas exhibieron algún crecimiento sobre 1-etilnaftaleno. De varios de los componentes poliaromáticos probados, el fenantreno y el antraceno fueron metabolizados por 3 de los 6 organismos.

Esta diversidad de bacterias encontrada en los estudios antes señalados era esperada, puesto que teóricamente no puede existir una sola especie capaz de degradar a las diferentes fracciones y componentes que constituyen a los hidrocarburos fósiles.

I.1.1 Origen y características del petróleo y sus derivados en el mar

Existen varias rutas por las cuales el petróleo y sus derivados refinados son introducidos al ambiente marino (figura 1). Las fuentes pueden ser de origen antropogénico (operaciones de tanques, aporte atmosférico, producción de petróleo mar adentro, refinerías y sistemas de desagüe, ríos y desechos urbanos, otras actividades de transporte y accidentes de tanques) ó por aportes naturales (filtración natural, chapopoterías; erosión del suelo marino; productividad primaria) (Floodgate, 1972).

Los aportes por fuentes naturales llegan a ser del mismo orden de magnitud que los aportes antropogénicos, los cuales se han estimado que son entre 1.7 y 8.8 millones de toneladas métricas por año (Floodgate, 1972).

Los hidrocarburos del petróleo constituyen un grupo específico dentro de la amplia variedad de hidrocarburos existentes. Pueden estar subdivididos en varios grupos mayores desde ligeros, gaseosos ($C_1 - C_5$), a hidrocarburos líquidos volátiles ($C_6 - C_{14}$) y finalmente aquellos de alto peso molecular ($> C_{14}$) (Geyer, 1980). El petróleo está constituido principalmente por cadenas hidrocarbonadas (50-98%), representadas por el 80-87% de átomos de carbono y el 10-15% de hidrógeno (Clark y Brown, 1977). Cada petróleo crudo es una mezcla de alcanos

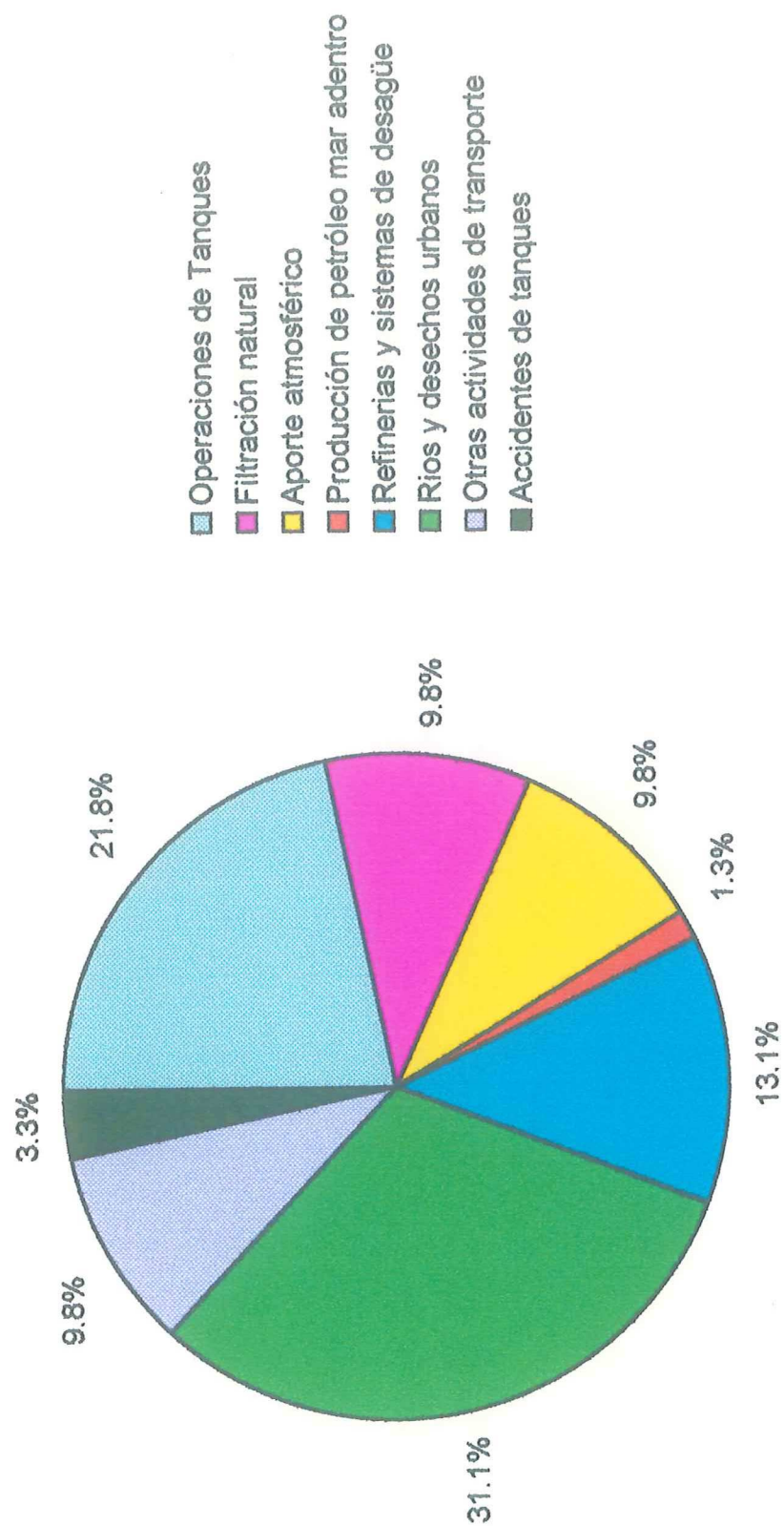


Figura 1. Entrada de Petróleo al Medio Marino.

(saturados), cicloalcanos (alíclicos), aromáticos y policíclicos junto con unas cantidades variables de nitrógeno (0-1%), oxígeno (0-5%) y azufre (0-10%) (Floodgate, 1984). Todos son contaminantes ambientales, pero los hidrocarburos aromáticos también son conocidos como carcinógenos (Cerniglia, 1984).

En general, el petróleo crudo así como sus diferentes fracciones y componentes, actúan simultáneamente como fuente de carbono y energía para algunos componentes de una comunidad microbiana que cuentan con la información genética para utilizarlos, como un substrato tóxico para otras poblaciones o incluso no tener influencia sobre un tercer grupo (Pfaender y Buckley, 1984).

1.2 Descripción del Ecosistema de Ventilias Hidrotermales

La conversión de materia orgánica a petróleo por actividad hidrotermal es un proceso que ocurre en muchos tipos de ambientes naturales. En el océano existen zonas que presentan estas características, en las cuales los organismos son diferentes a los del resto de mar profundo. Estas zonas denominadas ventilias hidrotermales se descubrieron en 1977 (figura 2) sobre la cordillera oriental del Pacífico, próxima al Ecuador, en una área conocida como Cordillera de las Galápagos (Corliss *et al.*, 1979); su detección se debió al empleo de termómetros

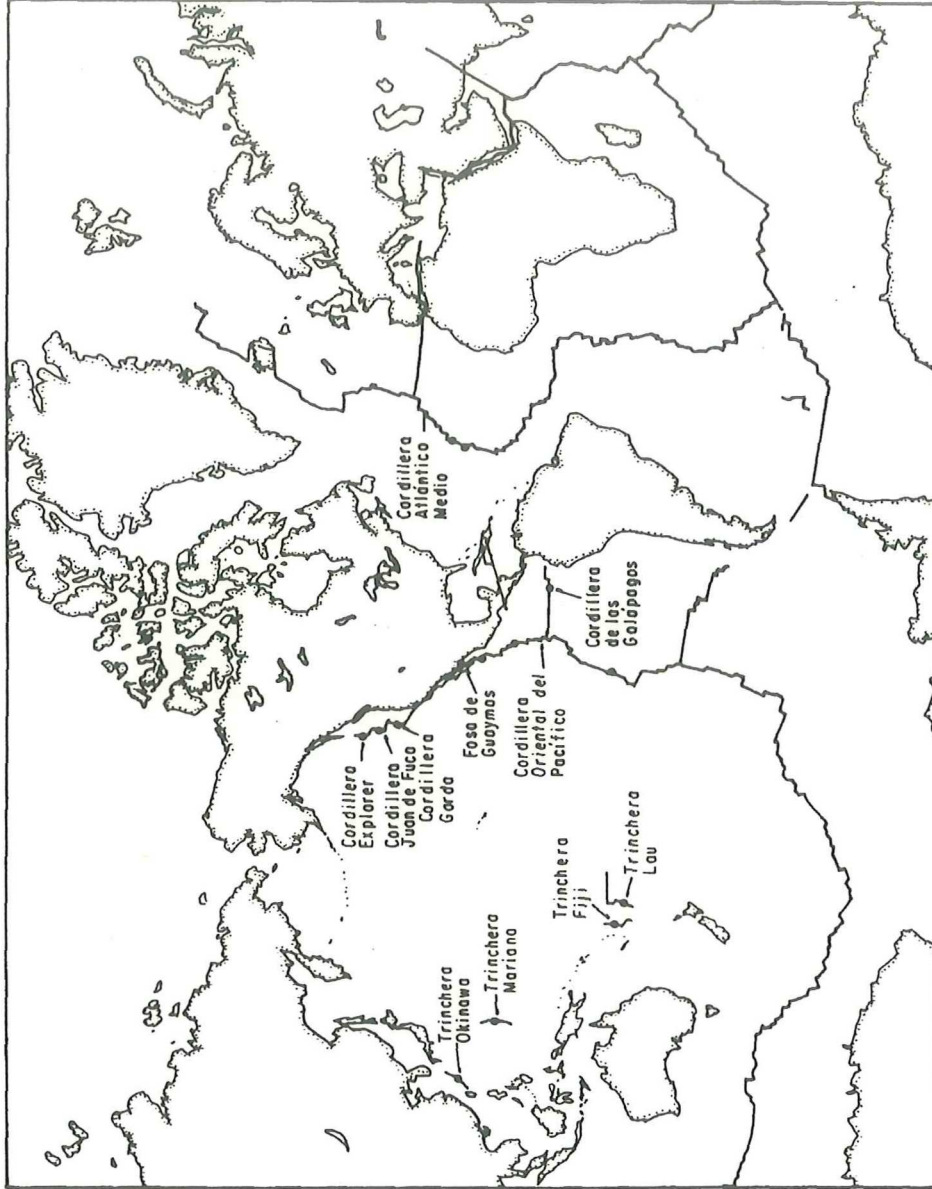


Figura 2. Mapa de localización de ventillas hidrotermales que han sido estudiadas (Tomado de Tunncliffe, 1992).

y a filmaciones de operación remota. Se localizan en centros de dispersión del suelo oceánico, están caracterizados por su alta actividad volcánica y se encuentran situados encima de una cámara de magma cuya temperatura puede alcanzar de 1200° a 1400°C. El gradiente térmico que se produce entre la cámara de magma y las bajas temperaturas que prevalecen en el fondo oceánico (2°C) generan la circulación del sistema hidrotermal (Felbeck y Somero, 1982; Karl *et al.*, 1988).

El ambiente de ventilas hidrotermales se caracteriza por: a) ausencia absoluta de luz, b) temperaturas de 2°C, c) presiones hidrostáticas mayores a 1000 bares y d) emanaciones del piso oceánico de fluidos tóxicos de ácido sulfídrico (H₂S) (Felbeck y Somero, 1982).

Las condiciones que prevalecen en estos ecosistemas se consideran desfavorables para la proliferación de la vida. No obstante, los organismos que habitan estos ecosistemas han adoptado estrategias de adaptación de tipo anatómico, trófico, fisiológico, bioquímico y conductuales que les han permitido colonizar en forma exitosa las áreas en donde se encuentran las ventilas hidrotermales (Somero *et al.*, 1983; Childress y Fisher, 1992; Hessler y Kaharl, 1995; Mullineaux y France, 1995).

A profundidades cercanas a 2500 m, el agua de mar se desliza dentro de la corteza, es calentado por el magma en el manto y expulsado al piso del océano (figura 3). Durante su contacto con las rocas basálticas calientes, la composición química del agua de mar es radicalmente cambiada para formar un líquido altamente reducido y ácido, conocido como "fluido hidrotermal", enriquecido con hidrógeno, ácido sulfídrico y varios elementos principalmente: carbono, cobre, hierro, calcio, magnesio y manganeso. Esta agua al salir es rápidamente diluida con el agua de mar del ambiente. (Felbeck y Somero, 1982; Austin, 1988).

Todos los organismos requieren energía, electrones para la transferencia de energía y carbono para la construcción de componentes orgánicos. El término quimiosíntesis indica que la energía para la biosíntesis, principalmente la transformación de carbono inorgánico a orgánico, es proporcionado por una oxidación química. En la misma manera en la cual la luz y la fotosíntesis determinan la ocurrencia y abundancia de vida en los continentes y en la superficie de las aguas, la disponibilidad de ciertas fuentes de energía inorgánicas y la quimiosíntesis controlan la abundancia de poblaciones animales en las ventilas de mar profundo. Es por eso que la Quimiosíntesis es el proceso microbiano de mayor importancia en las ventilas y es el principal soporte de la vida para las poblaciones de invertebrados en la ausencia de luz (Jannasch y Nelson, 1984).

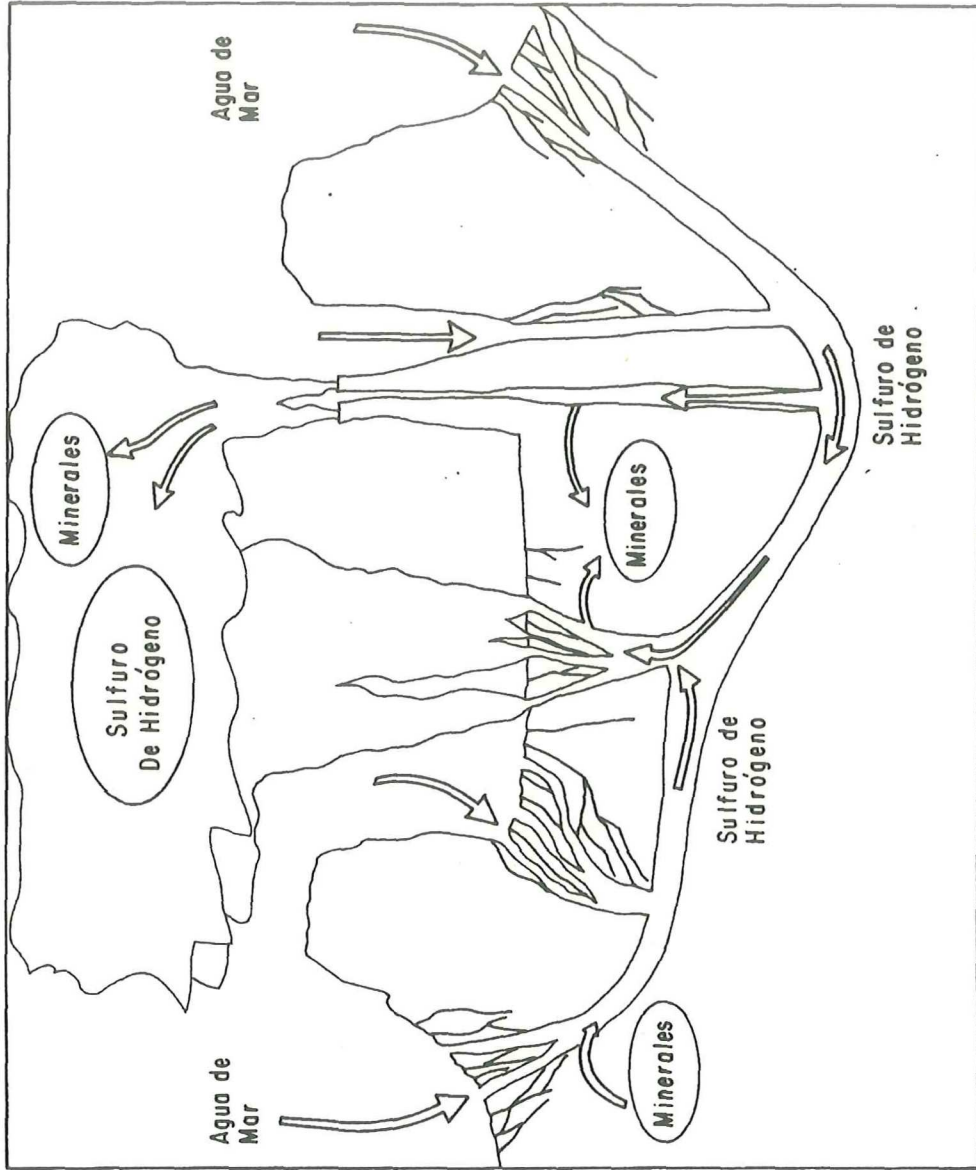


Figura 3. Esquema de una ventila hidrotermal en general (Tomado de Tunncliffe, 1992).

Existen tres sitios dentro de las emanaciones, en los cuales se localiza la mayor productividad quimiosintética: A) dentro de la lava que conduce y emite los penachos de chimeneas calientes, donde se ha encontrado que la turbidez es causada por suspensiones de bacterias unicelulares pertenecientes al género *Thiomicrospira* spp, típicamente mesofílicas y barotolerantes (Jannasch, 1989), B) en una alfombra microbiana espesa consistente de filamentos de *Beggiatoa* spp. que es una bacteria heterótrofa típica de zonas de interfase, que requiere azufre inorgánico reducido y oxígeno libre disuelto (Jannasch *et al.*, 1989), y C) en asociaciones simbióticas de procariontes quimiosintéticos con invertebrados marinos, los cuales se encontraron por primera vez dentro del tejido del trofosoma de *Riftia pachyptila* un gusano tubícola gigante, que vive alrededor de las áreas de ventilas hidrotermales en el mar profundo. En este organismo se descubrieron enzimas típicas del ciclo de Calvin-Benson con lo que se demostró la presencia de bacterias quimioautotróficas (Felbeck, 1981); también se encontraron lipopolisacáridos característicos de la pared celular externa de bacterias Gramnegativas y se identificaron bacterias de este tipo en el mismo tejido (Cavanaugh *et al.*, 1981).

Por las condiciones extremas del ambiente de las ventilas hidrotermales se ha pensado que las bacterias de estas zonas podrían ser interesantes candidatas para utilizaciones biotecnológicas por ejemplo: el uso de bacterias termofílicas

aisladas de chimeneas negras (black smokers) para la producción de enzimas termoestables (Deming, 1986), o el uso de bacterias autotróficas como nuevo alimento para invertebrados en acuicultura (Berg y Alatalo, 1984). Además de estas potencialidades, las altas concentraciones de metales pesados encontrados en los fluidos hidrotermales y en los tejidos de los invertebrados lleva a considerar el posible papel de estos microorganismos en los procesos de desintoxicación de zonas contaminadas (Prieur y Jeanthon, 1987) y su utilización en la recuperación terciaria de petróleo (Westlake, 1984).

I.3 Antecedentes y Características de la fosa de Guaymas

En la fosa de Guaymas se han realizado pocos estudios referentes a las bacterias que utilizan hidrocarburos. Dentro de ellos están Simoneit (1985a) y Bazylnski *et al.* (1988) que encontraron degradación de alcanos en sedimentos subsuperficiales, lo que muestra que componentes de petróleo son utilizados como fuente de carbono por bacterias de ese lugar. Posteriormente Bazylnski *et al.* (1989) aislaron y caracterizaron bacterias de sedimentos colectados en la depresión sur de la fosa de Guaymas, capaces de crecer en hexadecano y naftaleno marcados como única fuente de carbono. Todas las bacterias fueron aerobias y mesófilas (25° a 40°C) pero también demostraron crecimiento a bajas temperaturas (4° a 5°C).

En la cuenca de Guaymas (figura 4) se presenta el fenómeno hidrotermal con características muy propias, que la hacen diferente a las encontradas en otras partes del mundo. Esto es debido a que las aguas superficiales de esta región son muy productivas (Byrne y Emery, 1960) y son las responsables del alto índice de acumulación de sedimentos, que es mayor a 1 m cada 1000 años (Curry *et al.*, 1979). Los sedimentos han estado acumulándose en la cuenca de Guaymas por cerca de 150,000 años, a una velocidad de sedimentación de 0.2 cm/año, lo que da como resultado que el espesor medio del sedimento sea de 100 m (Simoneit *et al.*, 1979); aunque existen zonas donde la sedimentación supera los 400 m de espesor (Curry *et al.*, 1982; Simoneit, 1985a). La materia orgánica de esos sedimentos recientes se deriva principalmente de detritus microbiano y de diatomeas, debido a que el flujo de materia orgánica terrígena es baja por los desiertos que bordean al Golfo (Curry *et al.*, 1982; Lonsdale y Becker, 1985).

Las grietas de la cuenca de Guaymas son áreas de formación activa, migración y evolución de productos de petróleo de manera casi instantánea en tiempo geológico <5000 años, por la acción de los procesos hidrotermales (Simoneit y Lonsdale, 1982; Kawka y Simoneit, 1987; Didyk y Simoneit, 1989), principalmente porque la materia orgánica de los sedimentos hemipelágicos se acumula muy rápido cerca de la chimenea y queda sujeta a estrés térmico y rápidamente es pirolizada a productos de petróleo (Simoneit y Lonsdale, 1982;

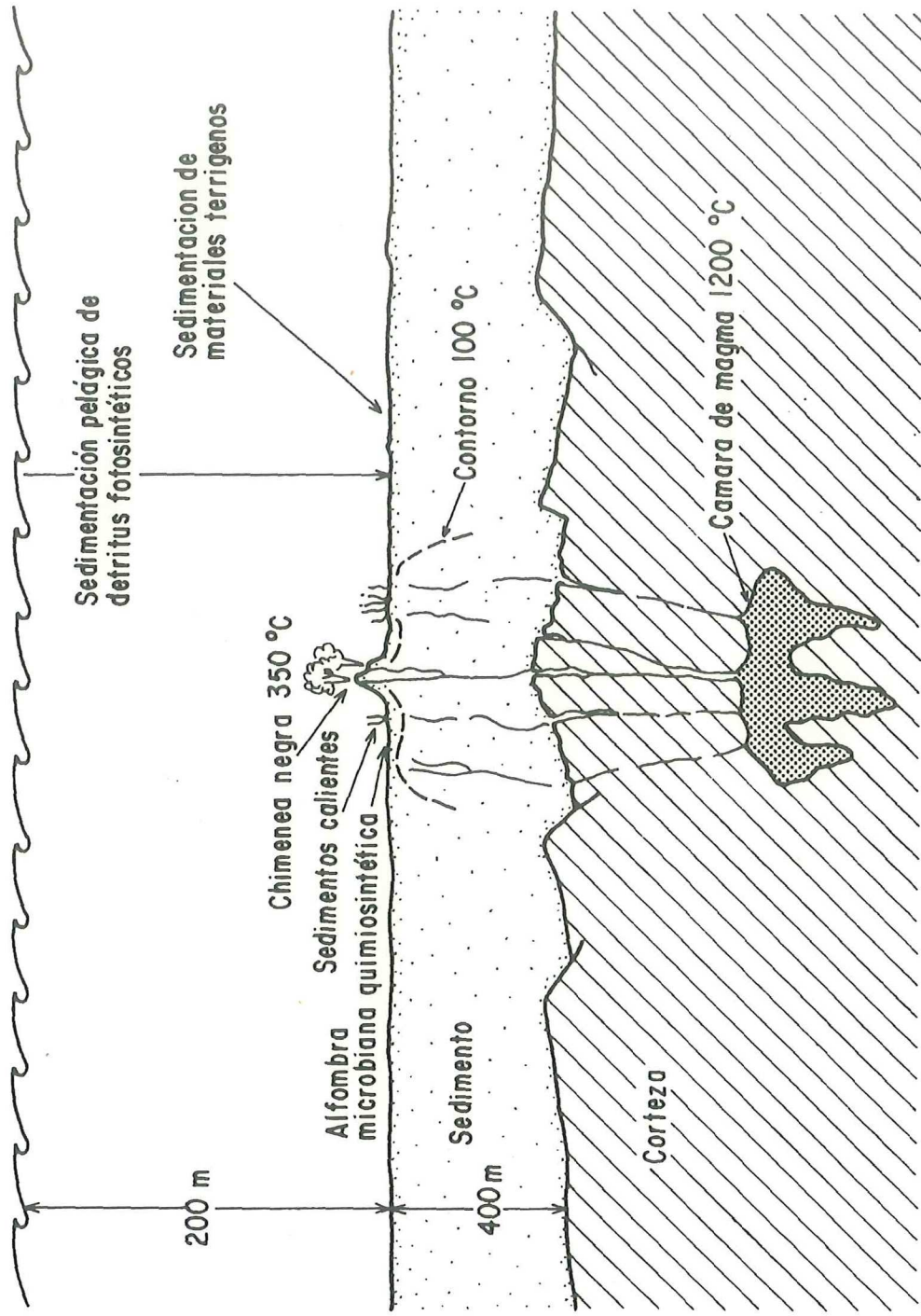


Figura 4. Esquema de una ventila hidrotermal en la fosa de Guaymas.

Simoneit 1983, 1984, 1985a). Estos productos consisten en hidrocarburos aromáticos y alifáticos de la gama de la gasolina y en mayor cantidad de material asfáltico polar residual (Simoneit y Lonsdale, 1982). La composición de este material incluye hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH) y pequeñas cantidades de olefinas (Simoneit y Lonsdale, 1982; Simoneit, 1985a).

El petróleo fue detectado por primera vez en 1972, en muestras de sedimentos de la depresión norte de la cuenca de Guaymas (Kawka y Simoneit, 1987). Subsecuentemente, se han analizado numerosas muestras de sedimentos de las depresiones norte y sur en las cuales también se ha encontrado petróleo de origen hidrotermal (Simoneit y Lonsdale, 1982).

En vista de lo anterior y considerando los escasos trabajos que han estudiado las bacterias que utilizan a los hidrocarburos que de manera natural ocurren en la fosa de Guaymas. Con el presente trabajo se contribuye a su conocimiento, ya que se colectaron bacterias que puedan utilizar hidrocarburos como fuente de energía y carbono en diferentes ambientes (sedimentos no compactados, concreción nodular hueca, roca sedimentaria, y dos almejas *Nuculana grasslei* y *Vesicomya gigas*) de la fosa de Guaymas. Su enumeración permitiría demostrar que los hidrocarburos producidos por el fenómeno

hidrotermal constituyen una fuente importante de carbono y energía en este particular ecosistema.

I.4 Objetivos

Enumerar bacterias que tengan la capacidad para degradar hidrocarburos en organismos y áreas adyacentes (sedimentos no compactados, concreción nodular hueca, y roca sedimentaria) de la zona de chimeneas hidrotermales de la fosa de Guaymas.

Constituir una colección de microorganismos utilizadores de hidrocarburos aislados en esta zona, para posibles desarrollos biotecnológicos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Descripción del área de estudio

El sitio de muestreo es conocido como la fosa de Guaymas, la cual se localiza en la región central del Golfo de California (Figura 5 a). Forma parte de una serie de cuencas profundas semi-cerradas (Byrne y Emery, 1960) y está formada por dos valles de fallas: la depresión Norte y la del Sur, las cuales están separadas por 20 km de área de fallas transformantes (Simoneit y Lonsdale, 1982). Es una cuenca de desplazamiento activo de suelo oceánico, formando parte del sistema de ejes de desplazamiento y de fallas transformantes que se extiende desde el levantamiento del Pacífico Este hasta el sistema de fallas de San Andrés (Curry *et al.*, 1979). El sitio es tectónicamente activo, lo cual resulta en un alto flujo de calor, que localmente excede de 1.2 W/m^2 (Lawver *et al.*, 1975; Curry *et al.*, 1982).

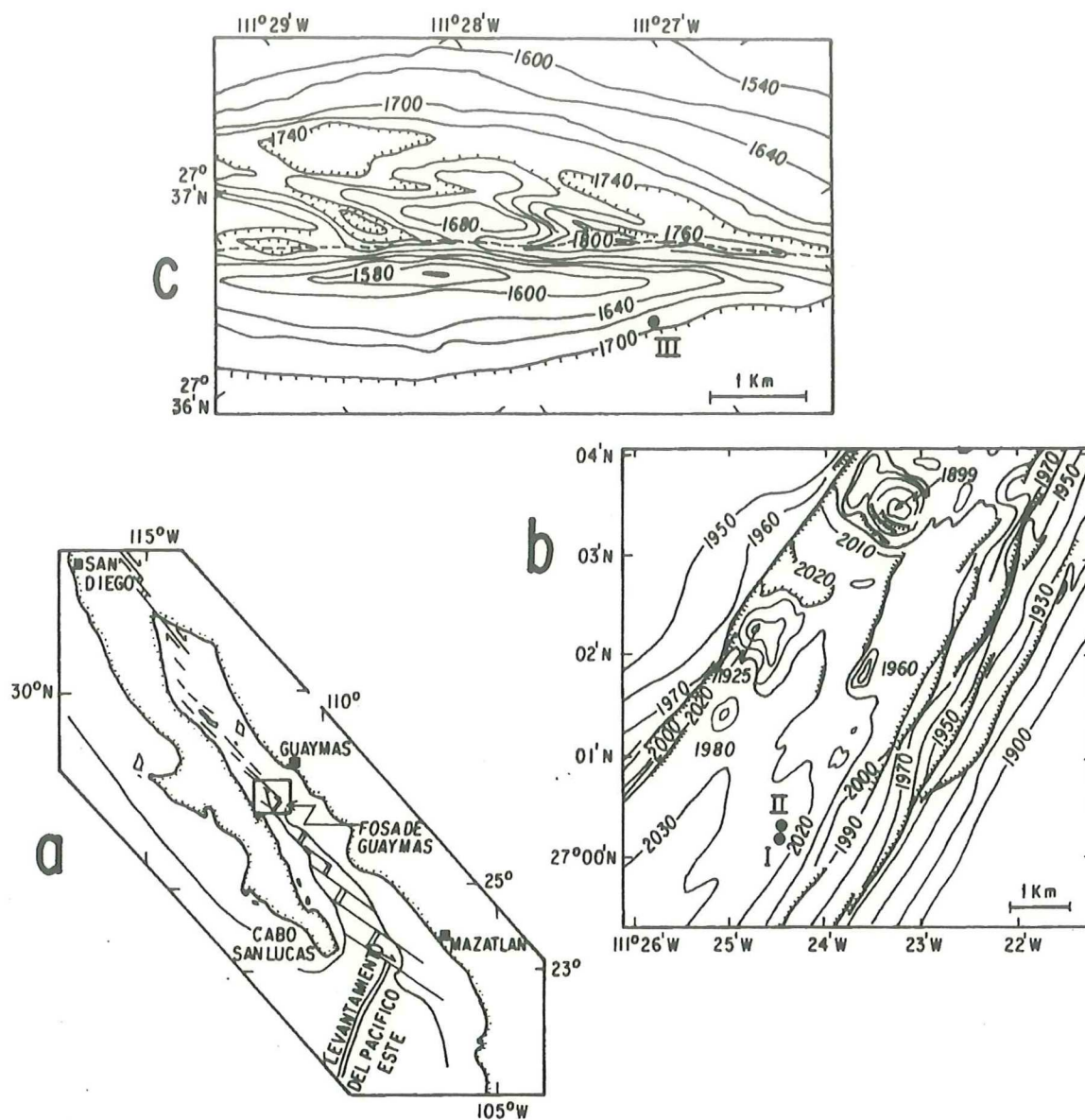


Figura 5. Localización geográfica del área de estudio: a) mapa del Golfo de California (Simoneit, 1985b). b) Mapa batimétrico de la depresión sur (Kawka y Simoneit, 1990). c) Mapa batimétrico de la depresión norte (Simoneit *et al.*, 1990).

II.1.1 Áreas de muestreo

La localización de los sitios en donde se realizaron los muestreos fueron los siguientes: las muestras de sedimentos no compactados y de las almejas *Nuculana grasslei* se tomaron en la depresión sur, en una zona de hidrotermalismo a una profundidad de 2008 m en la colina sudoeste a 27°00.38' de latitud Norte y 111°24.5' de longitud Oeste. La temperatura era de 28°C (Figura 5 bl). También en la depresión sur, y con el brazo mecánico del submarino se muestreó un acantilado al lado de las chimeneas en donde se colectó la muestra de una concreción nodular hueca, a una profundidad de 2000 m en la colina sudoeste a 27°00.4' de latitud Norte y 111°24.5' de longitud Oeste. La temperatura era de 18°C (Figura 5 bll). Las almejas *Vesicomya gigas* y una roca sedimentaria con incrustaciones de conchas y un ligero olor a petróleo, fueron colectadas en la depresión norte que es una zona de chapopoterías, a una profundidad de 1600 m, a 27°35.34' de latitud Norte y 111°28.31' de longitud Oeste. La temperatura del sitio de muestreo era de 18°C (Figura 5 clll). En la tabla I se resume algunos puntos de las áreas de muestreo.

Tabla I. Resumen de las áreas de muestreo

Muestras	Sitio de colecta	Temperatura (°C)
Sedimentos no Compactados	Depresión Sur	28
<i>Nuculana grasslei</i>	Depresión Sur	28
Concreción Nodular Hueca	Depresión Sur	18
<i>Vesicomya gigas</i>	Depresión Norte	18
Roca Sedimentaria	Depresión Norte	18

II.2 Trabajo de campo

II.2.1 Colecta de las muestras.

Las muestras fueron colectadas desde el sumergible Alvin, mediante el brazo mecánico del submarino. Se tomaron muestras de: a) sedimentos no compactados que incluía una porción de alfombra microbiana *Beggiatoa* spp.; estas muestras se tomaron con un nucleador; b) ejemplares de la almeja *Nuculana grasslei*; c) una concreción nodular hueca tipo esponja, de color blanco en el exterior y con un marcado olor a hidrocarburo en el interior; d) ejemplares de la almeja *Vesicomya gigas*; e) roca sedimentaria con incrustaciones de conchas y un ligero olor a petróleo.

II.2.2 Procesamiento inicial

Inmediatamente después del muestreo, el procesamiento inicial de las muestras se realizó a bordo del laboratorio del B/O Atlantis II; éste consistió en lo siguiente: a) muestras de sedimentos no compactados se tomaron los primeros 5 cm; b) las almejas *Nuculana grasslei* se disectaron y maceraron 20 de ellas; c) las almejas *Vesicomya gigas* se disectaron y se les extrajeron las branquias y se maceraron. De cada una de estas tres muestras, así como de la concreción nodular hueca y la roca sedimentaria con incrustaciones de conchas y un ligero olor a petróleo se tomaron 10 gr de cada una y se diluyeron en frascos conteniendo 90 ml de medio mineral estéril (Apéndice A), para posteriormente realizar diluciones decimales seriadas en frascos con 100 ml de medio mineral estéril. De estas diluciones se inocularon con 1 ml, frascos de 20 ml (Wheaton®) con tapa de rosca conteniendo 10 ml de medio mineral estéril y los hidrocarburos en las siguientes concentraciones: petróleo crudo del pozo Ixtoc I; n-hexadecano, n-dodecano (Sigma®), el aromático dimetilnaftaleno (Aldrich®) en una concentración de 0.5% y los hidrocarburos aromáticos: fenantreno, 2-metilnaftaleno, pireno, naftaleno, perileno y benzoαpireno (Aldrich®) previamente se solubilizaron en una mínima cantidad de cloroformo (OMNISOLV®) requerido y se les adicionó a una concentración de 0.1%.

II.3 Trabajo de laboratorio

II.3.1 Enumeración bacteriana

Para efectuar la determinación cuantitativa de las bacterias degradadoras de hidrocarburos se utilizó la técnica del número más probable (NMP) (Mills *et al.*, 1978) en una serie de 5 frascos.

Este método se utilizó porque da conteos celulares reales cuando la densidad poblacional es baja; y se puede emplear con compuestos químicos tóxicos a diferencia del método de conteo en placa, que aunque preciso, tiene limitaciones especialmente cuando el componente que es transformado es tóxico. (Di Geronimo *et al.*, 1978).

Los frascos de 20 ml (Wheaton®) ya inoculados se trajeron al laboratorio y se colocaron en una incubadora Napco modelo 320-12 a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16 días, tiempo en el cual se realizó la primera lectura de los frascos. A los dos y cinco meses se realizó la segunda y tercera lectura; pasado este tiempo se seleccionaron los frascos positivos que se identificaron por la turbidez que presentaban, y se compararon con testigos conteniendo medio mineral, los respectivos hidrocarburos y sin inocular.

Los frascos registrados positivos fueron resembrados, para purificar las cepas bacterianas, y a partir de éstos se volvieron a resembrar 100 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml, incubándose a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante su tiempo óptimo de crecimiento. De aquí se obtuvo el inóculo inicial para el crecimiento, después de cuantificar la carga bacteriana en medio ZoBell.

II.3.2 Crecimiento

II.3.2.1 Obtención de curvas

Para obtener las curvas de crecimiento se seleccionó el hidrocarburo n-hexadecano y se utilizaron los cultivos en los que hubo crecimiento a partir de *Nuculana grasslei*.

El sistema experimental descrito en la sección II.3.2.2 se utilizó para llevar a cabo los experimentos de crecimiento, los cuales se realizaron por quintuplicado; se incluyó un testigo al cual no se le adicionó el hidrocarburo.

Para eliminar el hidrocarburo del inóculo se centrifugó una alícuota de 5 ml durante 10 minutos a $893.6 \times g$ (Touraki *et al.*, 1996), se lavó dos veces y finalmente se resuspendió en 5 ml de medio de dilución estéril. De ahí se

inocularon 100 μ l, con aproximadamente 10^2 bacterias/ml, las botellas de vidrio estériles del sistema experimental, conteniendo 700 ml de medio mineral estéril. El hidrocarburo se agregó como fuente de carbono al 0.5% se esterilizó por filtración a través de un filtro estéril (Gelman Science[®]) de 0.2 μ m de tamaño de poro. Se incubaron a $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ y para obtener el crecimiento se realizaron por duplicado, conteos periódicos de la carga bacteriana de cada una de las botellas en placas con medio ZoBell.

II.3.2.2 Sistema Experimental

El sistema experimental (Figura 6) consistió de botellas de vidrio de 1 lt de capacidad, con una perforación en el fondo, la cual se obturó con un tapón de neopreno al que se le insertó un tubo de vidrio tapado con algodón. Cada botella estéril se colgó invertida. Al tapón del cuello de la botella se le insertó una aguja hipodérmica, y se unió con silicón a una manguera (Tygon[®]) de 1/4" de diámetro interno, unida a un distribuidor de aire. El suministro de aire se efectuó con una bomba para acuario de doble salida Ultra 30/80 (Fritz[®]). La contaminación bacteriana del aire se evitó mediante filtros hidrófobos de 0.2 μ m de poro (Gelman Science[®]) colocados entre la bomba y el distribuidor del aire. La eficiencia de estos filtros se probó previamente, mediante el burbujeo de aire filtrado en un

medio peptonado, y se constató la ausencia de crecimiento bacteriano en un período de 64 hrs (Anguiano, 1996).

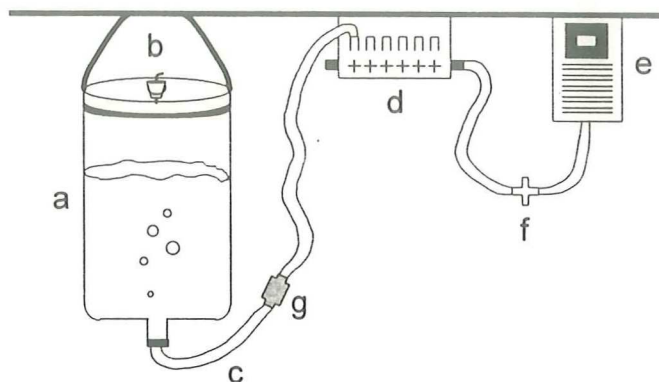


Figura 6. Sistema experimental: a) botella de vidrio, b) tapón de neopreno, c) manguera, d) distribuidor de aire, e) bomba para acuario, f) filtros hidrófobos, g) válvula de seguridad.

II.3.3 Aislamiento de cepas bacterianas que utilizan n-hexadecano

Para aislar las cepas bacterianas que degradan n-hexadecano de los frascos que se registraron positivos, inoculados con muestras de la almeja *Nuculana grasslei*, se sembraron directamente a cajas de Petri con medio mineral solidificado (Apéndice A), se le agregó el hidrocarburo en una concentración de 0.5% y se dejaron incubar a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Posteriormente de las colonias más aisladas del medio se seleccionaron de acuerdo a su forma, coloración y tamaño 32 cepas, de todas estas al final sólo se

podieron conservar 10 de ellas las cuales se resembraron dos veces en medio ZoBell para su purificación; las cepas puras fueron mantenidas en frascos de 20 ml con tapón de rosca conteniendo 10 ml de medio ZoBell, se dejaron incubar y se mantuvieron a temperatura ambiente para su conservación.

Para tratar de caracterizar las cepas aisladas se consultó bibliográficamente los géneros de bacterias que degradan hidrocarburos, se revisaron sus características en el manual Bergey (1984) y de ahí se obtuvo un conjunto de pruebas mínimas las cuales fueron:

- a) Tinción Gram
- b) Morfología
- c) Pruebas Fisiológicas: salinidad (0%, 60% y 100‰) y temperatura (4°, 18° y 41°C)
- d) Pruebas Bioquímicas: catalasa, oxidasa, movilidad y oxidación-fermentación.

II.3.4 Procesamiento de datos

Los resultados obtenidos de la enumeración bacteriana fueron procesados usando las tablas para calcular el número más probable (Alexander, 1982).

Los datos obtenidos de los experimentos de crecimiento se pasaron a UFC/ml (unidades formadoras de colonias/mililitro), se transformaron a logaritmo y se sometieron a las siguientes pruebas estadísticas Anova y prueba "t" (Zar, 1984) con la ayuda de los paquetes estadísticos Microsoft Excel (versión 5.0, 1993) y Statistica for Windows (versión 4.5, 1993); los dibujos se realizaron con el paquete Microsoft PowerPoint (versión 4.0, 1994).

III. RESULTADOS

III.1 Enumeración bacteriana

En la tabla II se observan los resultados obtenidos de la cuantificación bacteriana, realizada a los 16, 60 y 150 días de incubación.

En ella se puede ver que en la muestra aislada a partir de la almeja *Nuculana grasslei* se presentó crecimiento en la mayoría de los hidrocarburos utilizados. Los valores máximos de crecimiento bacteriano se registraron en el hidrocarburo n-hexadecano: a los 16 días presentó un valor de 79 bact/gr, a los 60 días fue de 240 bact/gr, y aumentó hasta >1600 bact/gr a los 150 días de incubación. Otro hidrocarburo también usado por estas bacterias fue el petróleo crudo del Ixtoc I, en el cual a los 16 días presentó un crecimiento de 33 bact/gr; a los 60 días, de 79 bact/gr, y a los 150 días aumentó hasta 130 bact/gr. En los demás hidrocarburos no hubo un crecimiento tan alto como en los dos anteriores e incluso hubo 2 hidrocarburos (el benzo α pireno y el 2-metilnaftaleno) en los cuales no se registró crecimiento ni al principio ni al final del tiempo de incubación.

En la almeja *Vesicomya gigas* se presentaron los valores máximos de crecimiento en el hidrocarburo n-hexadecano: a los 16 días de incubación hubo un crecimiento de 33 bact/gr, a los 60 días fue de 130 bact/gr, y aumentó a los 150 días hasta 240 bact/gr. En el petróleo crudo del Ixtoc I el crecimiento a los 16 días fue de 13 bact/gr, se incrementó a 23 bact/gr a los 60 días y llegó hasta 130 bact/gr a los 150 días de incubación. En el caso de los demás hidrocarburos se presentó crecimiento, pero no tan marcado como en el n-hexadecano y petróleo crudo del Ixtoc I.

En la muestra de sedimento no compactado que contenía *Beggiatoa* spp., a los 16 días de incubación no hubo crecimiento en ninguno de los hidrocarburos empleados; para los 60 y 150 días de incubación se registró crecimiento en 3 de los hidrocarburos: petróleo crudo del Ixtoc I, n-hexadecano y n-dodecano. En los demás hidrocarburos que son aromáticos no se registró crecimiento; esto posiblemente se debió al poco tiempo de incubación transcurrido.

En la muestra a partir de la concreción nodular hueca se observó crecimiento en la mitad de los hidrocarburos utilizados, y fue en el petróleo crudo del Ixtoc I en el cual se registró el mayor crecimiento (33, 49 y 49 bact/gr para los 16, 60 y 150 días respectivamente). También en n-hexadecano hubo crecimiento,

el cual fue de 23 bact/gr para los 16 días de incubación; no hubo diferencia entre los 60 y 150 días, ya que el crecimiento se mantuvo constante en 33 bact/gr.

Para la muestra de la roca sedimentaria, el petróleo crudo del Ixtoc I fue en el cual se desarrolló más crecimiento, ya que a los 16 días fue de 23 bact/gr; este número se mantuvo igual a los 60 días y fue hasta los 150 días de incubación que se incrementó a 130 bact/gr. Para el hidrocarburo n-hexadecano hubo un incremento de 23 bact/gr a los 16 días, y hasta 79 bact/gr a los 150 días.

La importancia de comparar los 3 tiempos de incubación en los que se hicieron las lecturas del crecimiento estriba en que para algunas muestras y para algunos hidrocarburos, como es el caso del hidrocarburo n-hexadecano y de la almeja *Nuculana grasslei* hubo un incremento considerable en las tres veces que se cuantificó. Por lo contrario hubo otros hidrocarburos, en los que el número de bacterias se mantuvo constante o en los que el incremento en el tiempo fue mínimo.

III.1.1 Crecimiento

En la figura 7 observamos los resultados obtenidos para el crecimiento a partir de bacterias aisladas de la almeja *Nuculana grasslei* en la que se utilizó al hidrocarburo n-hexadecano como fuente de carbono y energía.

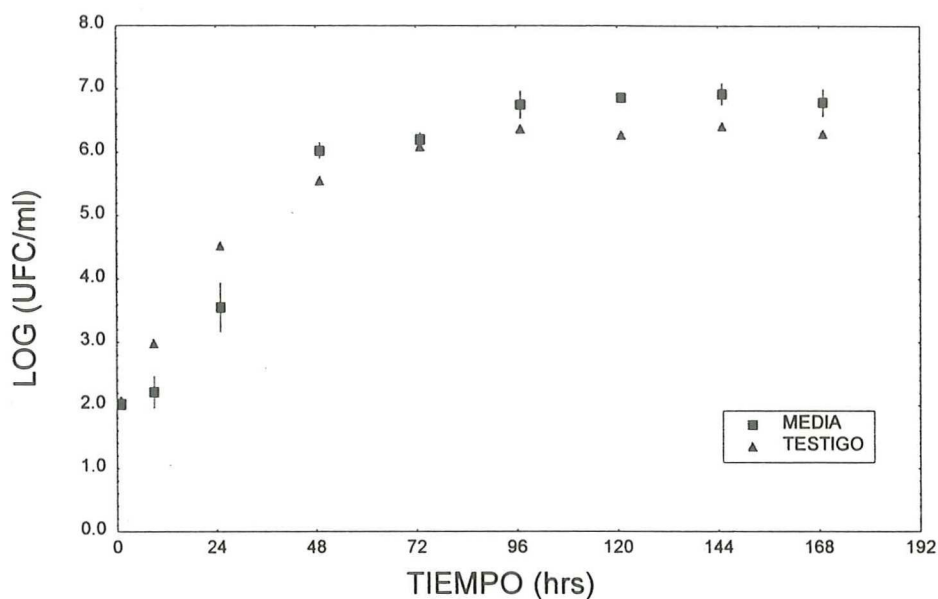


Figura 7. Curva de crecimiento de las bacterias aisladas a partir de la almeja *Nuculana grasslei* en el hidrocarburo n-hexadecano.

Para saber si existía diferencia significativa entre las repeticiones y el testigo se procedió a realizar un análisis de varianza y una prueba "t" (Zar, 1984), las cuales se resumen en el Apéndice B.

Como ya se explicó en la sección II.3.2.1, se procedió a realizar los experimentos durante 7 días y a continuación se analizaron los datos obtenidos, primero a través de un análisis de varianza para ver si había diferencia entre las 5 repeticiones y comprobar si realmente se podían considerar como tales.

Con el análisis de varianza se comprobó que no había diferencia significativa entre ellas y que por lo tanto todas se podían considerar como repeticiones. Posteriormente se procedió a hacer una prueba "t"; para esto primero se eligió una repetición al azar y se comparó con el testigo, luego se analizaron dos repeticiones y finalmente la media de todas las repeticiones. Los resultados de estas pruebas mostraron que no había diferencia significativa entre el testigo y las repeticiones, lo cual corrobora lo mostrado en la figura 7.

III.2 Aislamiento de cepas bacterianas que utilizan n-hexadecano

Como resultado del aislamiento de las cepas bacterianas aisladas a partir de *Nuculana grasslei* en n-hexadecano, en la tabla III se observan las pruebas a las que fueron sometidas las cepas. Las cepas aisladas se designaron como: H que indica n-hexadecano y Ng, que indica la almeja *Nuculana grasslei*; el número indica el número de colonia seleccionada, teniendo en total 10 cepas

aisladas, que se denominaron de la siguiente manera: HNg18, HNg19, HNg22, HNg23, HNg24, HNg25, HNg26, HNg29, HNg31, Hng32.

En la tabla III se observa que: a) todas las cepas fueron bacilos gramnegativos; b) son catalasas positivas; c) todas presentaron crecimiento a 18° y 28°C de temperatura; d) todas presentaron crecimiento a 60‰ de NaCl; e) 9 de las 10 no oxidan ni fermentan la glucosa en el medio utilizado.

IV. DISCUSIÓN

El desarrollo de este trabajo es de gran interés e importancia ya que la cuenca de Guaymas es un área única en la cual ocurren de manera natural y continua filtraciones de hidrocarburos que ofrecen la oportunidad de estudiar sus efectos en este lugar del mar profundo.

En el presente estudio se encontró que de acuerdo a la técnica del NMP, los hidrocarburos que presentaron el mejor crecimiento bacteriano fueron el n-hexadecano y el petróleo del Ixtoc I, donde el primero fue el que preferentemente utilizaron estas bacterias, y a que presentó crecimiento en todas las muestras. Este hidrocarburo ha sido detectado en la fosa de Guaymas, lo que podría favorecer un preacondicionamiento bacteriano para su utilización, ya que se ha demostrado que los hidrocarburos alifáticos son utilizados como fuente de carbono por bacterias de esta área (Simoneit, 1985a; Bazylinski *et al*, 1988)

Algo que es muy relevante de las numeraciones por el número más probable es el crecimiento presentado a partir de las almejas *Nuculana grasslei* y *Vesicomya gigas* (tabla II). La primera almeja no es excepcionalmente grande, presenta aparato digestivo y carece en las branquias de bacterias quimioautotróficas simbióticas del tipo que presentan las almejas como

Calyptogen spp. y *Bathymodiolus* spp, aunque se ha observado que presenta otro tipo de bacterias que no han sido estudiadas (Allen, 1993). La segunda es un organismo que presenta intracelularmente en las branquias bacterias quimioautotróficas simbióticas y que puede habitar zonas con filtraciones de hidrocarburos (Fisher, 1990).

Lo interesante de estas dos almejas es que se encuentran en la fosa de Guaymas en zonas con filtraciones de petróleo de origen hidrotermal, al cual han estado expuestas en forma continua, lo cual podría ser letal para otros tipos de organismos. Las bacterias presentes en ellas las ayudan en el proceso de desintoxicación de los hidrocarburos presentes así como en la alimentación de estas almejas. Esto es una ventaja sobre otro tipo de organismos que pretendiera colonizar este ecosistema.

Hasta la fecha, en la fosa de Guaymas sólo se han hecho estudios de bacterias que han sido aisladas a partir de muestras de sedimento y no se ha publicado nada en el que se mencione que hayan trabajado con algo parecido o igual a lo desarrollado en esta tesis.

Como se puede apreciar en la tabla II, el mayor crecimiento se registró en los alcanos (n-hexadecano y n-dodecano) y en el petróleo crudo del Ixtoc I, que es

una mezcla de hidrocarburos aromáticos y de alcanos; asimismo, el menor crecimiento bacteriano se presentó en los hidrocarburos aromáticos empleados; esto coincide con los resultados de Goetz y Jannasch (1993) con muestras de sedimentos de la fosa de Guaymas, en donde encuentran que las bacterias utilizadoras de alcanos son más numerosas que las que utilizan a los hidrocarburos aromáticos.

Otro punto que también podemos destacar es lo que pasó con las muestras de sedimentos (tabla II) en las que no se detectó crecimiento o éste fue muy bajo. Sin embargo Bazylnski *et al.* (1989) encontraron y aislaron bacterias en forma de bacilos gramnegativos a partir de muestras de sedimentos. Asimismo Bazylnski *et al.* (1988) encontraron muestras que contenían petróleo hidrotermal de origen reciente, por lo cual suponen que posiblemente no se haya establecido una población bacteriana significativa capaz de degradar estos hidrocarburos. Algo semejante creemos que pudo haber pasado con las muestras que presentaron nulo o escaso crecimiento. O que posiblemente no existía petróleo en el lugar en el que se tomaron las muestras de sedimento.

Como ya se indicó en la metodología todas las muestras fueron obtenidas en lugares con temperaturas de 18° a 28°C y esto concuerda con el estudio realizado por Bazylnski *et al.* (1989) que encontraron microorganismos

mesofílicos y aerobios aislados de sedimentos y del agua encima de estos, que eran capaces de crecer incluso a bajas temperaturas. Esto no es sorprendente, ya que muchos de los sedimentos tienen temperaturas moderadas y bajas, particularmente cerca de la superficie donde el petróleo sale a la superficie del fondo del mar (Simoneit, 1985a; Simoneit y Lonsdale, 1982). Estos autores encontraron que en ciertas muestras no había evidencia de biodegradación, posiblemente por la toxicidad de ciertos componentes del petróleo y el acceso físico a los depósitos de hidrocarburos (Simoneit, 1985a) así como la temperatura que deben de jugar un papel significativo en la utilización de hidrocarburos en la cuenca de Guaymas.

Con respecto a los resultados obtenidos del crecimiento, como ya se explicó en la metodología se usó la cuenta viable con medio ZoBell, y como se aprecia en la la figura 7, el crecimiento del testigo utilizado casi igualó al crecimiento que presentaron las repeticiones. Una posible explicación a esto es que alguno de los compuestos utilizados para preparar el agua de mar artificial (Lyman y Fleming, 1940), con la cual se preparó el medio mineral que se usó en los experimentos, haya estado contaminada con algún substrato que las bacterias hayan sido capaz de utilizar; otra posibilidad sería que el reactivo trizma base usado para preparar el buffer tris-HCl, haya estado contaminado y que las bacterias lo utilizaran como fuente de carbono. Otra posibilidad podría ser que, a

pesar de la técnica empleada, (centrifugación del inóculo y lavados consecutivos para eliminar el hidrocarburo), este no haya sido totalmente removido y al momento de agregar el inóculo a las botellas con las repeticiones y al control todavía llevara hidrocarburo que sirviera como fuente de carbono y energía.

En cuanto a las cepas aisladas de la almeja *Nuculana grasslei* en el hidrocarburo n-hexadecano todas fueron bacilos gramnegativos, ninguna creció a 4°C, todas crecieron a 18° y 28°C, y 9 cepas fueron inertes en el medio O/F y una oxidó y fermentó la glucosa del medio O/F, en base a esta información 9 de las cepas probablemente pertenezcan al género *Pseudomonas* y la cepa fermentadora podría estar incluida en el género *Vibrio* (Bergey, 1984).

Hasta la fecha no se han hecho trabajos en los que se hayan identificado estas bacterias, por lo que no se conoce con precisión los géneros a los que pertenecen.

V. CONCLUSIONES

- a) Se muestra por primera vez la presencia de bacterias utilizadoras de petróleo e hidrocarburos alifáticos y aromáticos en moluscos bivalvos que habitan en el sedimento de la zona hidrotermal de la fosa de Guaymas.
- b) La enumeración de bacterias con la capacidad para utilizar hidrocarburos arrojó mayores concentraciones cuando se utilizó n-hexadecano como fuente de carbono, pudiéndose detectar que fluctúa entre 4 y >1600 bacterias/gramo.
- c) El crecimiento de bacterias utilizadoras de hidrocarburos fue demostrado en todos los habitats estudiados, siendo sin embargo los moluscos en donde se registraron las mayores concentraciones.
- d) En los hidrocarburos aromáticos empleados se registró un bajo crecimiento, siendo el dimetilnaftaleno en donde se registran crecimiento en todos los habitats estudiados, salvo en el sedimento.
- e) El crecimiento registrado en las muestras de sedimentos estudiadas fue muy escaso o nulo, por lo que la presencia de bacterias utilizadoras de hidrocarburos en las muestras de moluscos no pudieron provenir de este

habitat. Esta observación refuerza la idea de que las bacterias detectadas en los moluscos desempeñan una función en asociación con ellos.

- f) Las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas a partir de n-hexadecano en la almeja *Nuculana grasslei* indican que estas bacterias pudieran pertenecer a los géneros *Pseudomonas* (no fermentativas) y *Vibrio* (fermentativa).

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1982. "Most probable number method for microbial populations". En: S. Segoe (ed.). "Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties" - Agronomy Monograph no. 9. Segunda edición. Madison, WI. 815-820 p.
- Allen, J. A. 1993. "A new deep-water hydrothermal species of *Nuculana* (Bivalvia: protobanchia) from the Guaymas basin". *Malacologia*. 35(1): 141-151 p.
- Anguiano Beltrán, C. 1996. "Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas del abulón rojo *Haliotis rufescens*". Tesis de maestría CICESE. Ensenada, B.C. 60 pp.
- Atlas, R. M. y R. Bartha. 1972. "Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters". *Biotech. and Bioengin.* 14: 297-308 p.
- Austin, B. 1988. "Marine Microbiology". Cambridge University Press. London. 222 pp.
- Bazylnski, D. A., J. W. Farrington y H. W. Jannasch. 1988. "Hydrocarbons in surface sediments from a Guaymas basin hydrothermal vent site". *Org. Geochem.* 12(6): 547-558 p.

- Bazylinski, D. A., C. O. Wirsen y H. W. Jannasch. 1989. "Microbial utilization of naturally occurring Hydrocarbons at the Guaymas basin hydrothermal vent site". Appl. Environm. Microbiol. 55(11): 2832-2836 p.
- Berg, C. J. y P. Alatalo. 1984. "Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture". Aquaculture. 39: 165-179 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. 1984. ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. 140-598 p.
- Byrne, J. V., y K. O. Emery. 1960. "Sediments in the Gulf of California". Geol. Soc. Am. Bull. 71: 983-1010 p.
- Cavanaugh, C. M., S. L. Gardiner; M. L. Jones; H. W. Jannasch y J. B. Waterbury. 1981. "Procaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*: possible chemoautotrophic symbionts". Science. 213: 340-342 p.
- Cerniglia, C. E., 1984. "Microbial transformation of aromatic hydrocarbons". En: R. M. Atlas (ed.). "Petroleum Microbiology". Macmillan Publishing Co. U.S.A. 692 p.
- Clark, R. C. y D. W. Brown. 1977. "Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems". En: D. C. Malins (ed.). "Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms". Academic Press. New York. 1-89 p.

- Childress, J. J. y C. R. Fisher. 1992. "The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses". *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30: 337-441 p.
- Corliss, J. B., J. Dymond, L. I. Gordon, J. M. Edmond, R. P. Von Herzen, R. D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane y T. H. Van Andel. 1979. "Submarine thermal springs on the Galapagos Rift". *Science* 203: 1073-1083 p.
- Curry, J. R., D. G. Moore, J. E. Aguayo, M. P. Aubry, G. Einsele, D. J. Fornari, J. Gieskes, J. C. Guerrero, M. Kastner, K. Kelts, M. Lyle, Y. Matoba, A. Molina-Cruz, J. Niemitz, J. Rueda, A. D. Saunders, H. Schrader, B. R. T. Simoneit and V. Vaquier. 1979. "Leg 64 seeks evidence on development of basins". *Geotimes*. 24(7): 18-20 p.
- Curry, J. R., D. G. Moore, J. E. Aguayo, M. P. Aubry, G. Einsele, D. J. Fornari, J. Gieskes, J. C. Guerrero, M. Kastner, K. Kelts, Y. Matoba, A. Molina-Cruz, J. Niemitz, J. Rueda, A. D. Saunders, B. R. T. Simoneit y V. Vaquier. 1982. "Initial reports of the deep sea drilling project, vol 64, partes I y II". U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Dean-Raymond, D. y R. Bartha. 1975. "Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria". *Development in Industrial Microbiology*. Washington, D.C. 16: 97-110 p.

- Deming, J. W. 1986. "The biotechnological future for newly described, extremely thermophilic bacteria". *Microbiol. Ecol.* 12: 111-120 p.
- DiGeronimo, M. J., M. Nikaido, y M. Alexander. 1978. "Most-probable-number technique for the enumeration of aromatic degraders in natural environments". *Microbial Ecology*.
- Didyk, B. M. y B. R. T. Simoneit. 1989. "Hydrothermal oil of Guaymas Basin and implications for petroleum formation mechanisms". *Nature*. 342: 65-69 p.
- Felbeck, H. 1981. "Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera)". *Science*. 213: 336-338 p.
- Felbeck, H. y G. N. Somero. 1982. "Primary production in deep-sea hydrothermal vent organisms: roles of sulfide-oxidizing bacteria". *Trends Biochem. Sci.* 7: 201-204 p.
- Fisher, C. R. 1990. "Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates". *Rev. Aquat. Sci.* 2: 399-436 p.
- Floodgate, G. D. 1972. "Biodegradation of hydrocarbons in the sea". En: R. Mitchell (ed.) "Water pollution microbiology". U.S.A. 153-171 p.
- Floodgate, G. D. 1984. "The fate of petroleum in marine ecosystems". En: R.M. Atlas (ed.). "Petroleum Microbiology". Macmillan Publishing Co. U.S.A. 355-397 p.
- Geyer, R. A. 1980. "Marine Environmental Pollution, 1. Hidrocarbons". R. A. Geyer (ed). "Elsevier Oceanography Series". Holanda. 591 p.

- Goetz, F. E. y H. W. Jannasch. 1993. "Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in the petroleum-rich sediments of the Guaymas basin hydrothermal vent site: preference for aromatic carboxylic acids". *Geomicrobiol. J.* 11: 1-18 p.
- Hessler, R. R. y V. A. Kaharl. 1995. "The deep-sea hydrothermal vent community: An overview". En: S. E. Humphris, R. A. Zierenberg, L. S. Mullineaux y R. E. Thomson (eds.). "Seafloor Hydrothermal Systems physical, chemical, biological, and geological interactions". (Geophysical monograph 91). American Geophysical Union. Washington, D. C. 72-84 p.
- Jannasch, H. W. 1989. "Chemolithotrophic productivity at deep-sea hydrothermal vents". En: T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Y. Morita y A. Uchida. (eds.). "Recent Advances in Microbial Ecology". Japan. 23-27 p.
- Jannasch, H. W. y D. C. Nelson. 1984. "Recent Progress in the Microbiology of Hydrothermal Vents". En: M. J. Klug y C. A. Reddy (eds.). "Current Perspectives in Microbial Ecology". Washington D. C. American Society for Microbiology. 170-176 p.
- Jannasch, H. W., D. C. Nelson y C. O. Wirsen. 1989. "Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* spp.) at a hydrothermal deep-sea vent site". *Nature*. 342: 834-836 p.
- Karl, D. M., G. T. Taylor, J. A. Novitsky, H. W. Jannasch, C. O. Wirsen, N. R. Pace, D. J. Lane, G. J. Olsen y S. J. Giovannoni. 1988. "A microbial study of

- Guaymas basin high temperature hydrothermal vents". *Deep-Sea Res.* 35(5): 777-791 p.
- Kawka, O. E., y B. R. T. Simoneit. 1987. "Survey of hydrothermally-generated petroleums from the Guaymas Basin spreading center". *Org. Geochem.* 11: 311-328 p.
- Kawka, O. E., y B. R. T. Simoneit. 1990. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydrothermal petroleums from the Guaymas basin spreading center". *Appl. Geochem.* 5: 17-27 p.
- Lawver, L. A., D. L. Williams, y R. P. Von Herzen. 1975. "A major geothermal anomaly in the Guf of California". *Nature.* 257: 23-28 p.
- Lonsdale, P. y K. Becker. 1985. "Hydrothermal plumes, hot springs, and conductive heat flow in the Southern Trough of Guaymas Basin". *Earth and Planetary Science Letters.* 73: 211-225 p.
- Lyman, J. and R.H. Fleming. 1940. "Composition of sea water". *J. Mar. Res.* 3: 134-136 p.
- Mills, A. L., C. Breuil, y R. R. Colwell. 1978. "Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method". *Can. J. Microbiol.* 24: 552-557 p.
- Mullineaux, L. S. y S. C. France. 1995. "Dispersal mechanisms of deep-sea hydrothermal vent fauna". En: S. E. Humphris, R. A. Zierenberg, L. S. Mullineaux y R. E. Thomson (eds.). "Seafloor Hydrothermal Systems

- physical, chemical, biological, and geological interactions". (Geophysical monograph 91). American Geophysical Union. Washington, D. C. 408-424 p.
- Oppenheimer, C. H. y C. E. ZoBell. 1952. "The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influence by hydrostatic pressure". J. Mar. Res. 11: 10-18 p.
- Pfaender, F. K. y E. N. Buckley III. 1984. "Effects of petroleum on microbial communities". En: R.M. Atlas (ed.). "Petroleum Microbiology". Macmillan Publishing Co. U.S.A. 507-536 p.
- Prieur, D. y C. Jeanthon. 1987. "Preliminary study of heterotrophic bacteria isolated from two deep-sea hydrothermal vent invertebrates: *Alvinella pompejana* (Polychaete) and *Bathymodiolus thermophilus* (Bivalve)". Symbiosis. 4: 87-98 p.
- Simoneit, B. R. T. 1983. "Effects of hydrothermal activity on sedimentary organic matter: Guaymas Basin, Gulf of California-petroleum genesis and protokerogen degradation". En: Rona P.A. et al. (eds.). "Hydrothermal Processes at Seafloor Spreading Centers". Plenum Press. New York. 451-471 p.
- Simoneit, B. R. T. 1984. "Hydrothermal effects on organic matter-high vs. low temperature components". Org. Geochem. 6: 857-864 p.

- Simoneit, B. R. T. 1985a. "Hydrothermal petroleum: composition and utility as a biogenic carbon source". *Biol. Soc. Wash. Bull.* 6: 49-56 p.
- Simoneit, B. R. T. 1985b. "Hydrothermal petroleum: genesis, migration, and deposition in Guaymas, Gulf of California". *Can.J. Earth Sci.* 22: 1919-1929.
- Simoneit, B. R. T., y P. F. Lonsdale. 1982. "Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin". *Nature.* 295: 198-202 p.
- Simoneit, B. R. T., M. A. Mazurek, S. Brenner, P.T. Crisp, y I. R. Kaplan. 1979. "Organic geochemistry of recent sediments from Guaymas Basin, Gulf of California". *Deep-Sea Res.* 26A: 879-891 p.
- Simoneit, B. R. T., P. F. Lonsdale, J. M. Edmond y W. C. Shanks III. 1990. "Deep-water hydrocarbons seeps in Guaymas basin, Gulf of California". *Appl. Geochem.* 5: 41-49 p.
- Somero, G. N., J. F. Siebenaller y P. W. Hochachka. 1983. "Biochemical and Physiological Adaptations of deep-sea animals". En: G. T. Rowe (ed.). "The Sea. Vol 8". John Wiley & Sons. New York. 261-330 p.
- Touraki, M., S. Mourelatos, G. Karamanlidou, S. Kalaitzopoulou y C. Kastritsis. 1996. "Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry". *Aquacultural Engineering.* 15(2): 133-147 p.
- Tunnicliffe, V. 1992. "Hydrothermal-Vent Communities of the Deep Sea". *American Scientist.* 80: 336-349 p.

- Walker, J. D., H. F. Austin y R. R. Colwell. 1975a. "Utilization of mixed Hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms". J. Gen. Appl. Microbiol. 21: 27-39 p.
- Walker, J. D., R. R. Colwell y L. Petrakis. 1975b. "Evaluation of petroleum-degrading potential of bacteria from water and sediment". Appl. Microbiol. 30: 1036-1039 p.
- Westlake, D. W. S. 1984. "Heavy crude oils and oil shales: tertiary recovery of petroleum from oil-bearing formations". En: R.M. Atlas (ed.). "Petroleum Microbiology". Macmillan Publishing Co. U.S.A. 537-552 p.
- ZoBell, C. E. 1946. "Action of microorganisms on hydrocarbons". Bacteriol. Rev. 10: 1-49 p.
- Zar, J. H. 1984. "Biostatistical Analysis". Prentice-Hall, Inc. 2da. edición. Englewood Cliffs, N. J. 718 pp.

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1.- Preparación de agua de mar artificial

Agua de mar artificial o medio mineral concentrado (2.5 veces) (Lyman y Fleming, 1940).

Concentración en gramos para preparar 10 litros de agua de mar artificial.

Compuestos	Peso (grs.)
Fluoruro de sodio (NaF)	0.075
Cloruro de estroncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.6
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.65
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	2.25
Bromuro de potasio (KBr)	2.4
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	4.8
Cloruro de potasio (KCl)	16.5
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	18.00
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	15.00
Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	124.00
Cloruro de sodio (NaCl)	587.5
Sulfato de sodio (Na_2SO_4)	97.5

Preparación:

- 1.- Pesar y disolver por separado en la mínima cantidad de agua destilada cada uno de los compuestos en el orden indicado para evitar que precipiten y añadirlos en un recipiente de 20 litros de capacidad.
- 2.- Al añadir el cloruro de calcio adquiere un color blanquecino.
- 3.- Completar el volumen a 10 litros.
- 4.- Homogenizar con un agitador magnético.

2.- Preparación de la solución amortiguadora de TRIS-HCl (TRIS-HIDROXIMETIL AMINO-METANO, THMAM)

Compuesto	Cantidad
Tris base (Trizma)	0.12 gr
Agua destilada	80 ml

Pesar el Tris base disolver con el agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 usando HCl concentrado, llevar a un volumen final de 100 ml. con agua destilada. Se utilizan 10 ml. de la solución amortiguadora para cada litro de medio de cultivo.

3.- Medio mineral para bacterias degradadoras de petróleo

Compuestos	Cantidad (ml)
Agua de mar artificial concentrada	200
Agua destilada	800
Cloruro férrico	1
Tris-HCl	10

Para preparar 1 litro:

1.- Mezclar el agua de mar artificial concentrada, agua destilada y cloruro férrico.

Ajustar pH a 7.5 y adicionar Tris-HCl como amortiguador.

2.- Filtrar con filtros de policarbonato Nucleopore de 0.2 μm . de poro.

3.- Esterilizar 15 minutos a 15 gr/cm^2 de presión y 121°C.

4.- Para solidificar este medio se le agregan 13 gr/l de agar bacteriológico; se esteriliza igual y se vacía en cajas de Petri esteriles.

5.- Medio de cultivo ZoBell, 2216 (Oppenheimer y ZoBell, 1952)

Compuestos	Cantidad
Bacto-peptona	5 gr
Extracto de levadura	1 gr
Sol. de cloruro férrico (0.1%)	1 ml
Agar bacteriológico	13 gr
Agua de mar envejecida	750 ml
Agua destilada	250 ml

Poner el agua de mar envejecida a un matraz Erlenmeyer, pesar los ingredientes colocarlos de uno en uno y agitar, colocar el agua destilada y poner a hervir hasta que se disuelva el agar, taparlos con papel aluminio y esterilizar 15 minutos a 15 gr/cm^2 , 121°C . Dejar enfriar hasta 50°C . Vaciar en cajas de Petri estériles.

Pruebas Fisiológicas

6.- Salinidad

El objetivo de esta prueba es conocer los requerimientos y la tolerancia de las cepas silvestres con respecto a la salinidad.

Método: Se utilizó el medio ZoBell como base, con las siguientes concentraciones de NaCl:

0 ‰ medio ZoBell hecho con agua destilada

60 ‰ medio ZoBell hecho con agua destilada + 60 gr/l de NaCl

100 ‰ medio ZoBell hecho con agua destilada + 100 gr/l de NaCl

Se esteriliza a 15 gr/cm^2 121°C durante 15 min. Se vacían en cajas Petri; se inoculan las cepas y se incuban a 28°C .

7.- Temperatura

Su objetivo es conocer la tolerancia y el rango de temperatura en el cual las cepas presentan o no crecimiento.

Método: Se utilizó medio ZoBell preparado normal, se vierte en cajas de Petri, se inoculan y se incuban a 4° , 18° , 28° , y 41°C .

Pruebas Bioquímicas

8.- Prueba de oxidación-fermentación

Su objetivo es determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de los dos procesos, de fermentación o de oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono (manifestado por la producción de ácido) sólo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido tanto aeróbica como anaeróbicamente. La fermentación es un proceso anaeróbico y la oxidación aeróbico. Muchas bacterias pueden crecer con ambos tipos de metabolismo y se denominan anaerobias facultativas.

Método: Se utilizó el medio O/F Basal Medium (Difco®). Con 2 tubos uno sellado con aceite mineral estéril y cerrada la tapa de rosca y el otro abierto.

Compuestos	Cantidad
Bacto-triptona	2 gr
NaCl	5 gr
Fosfato dipotásico	0.3 gr
Bacto-azul de bromotimol	0.08 gr
Bacto-agar	2 gr
Agua destilada	1000 ml
Dextrosa	10 gr
Agua destilada	100 ml

Para rehidratar el medio suspenda 9.4 gr en 1000 ml de agua destilada, para que quedara en 1.5% se le adicionó 1 gr más de NaCl, se calentó hasta hervir para disolver completamente. Se esterilizó 15 min. a 15 gr/cm² de presión (121°C). Dejar enfriar el medio hasta 45°C y agregar por cada 100 ml de medio estéril, 10 ml de una solución de dextrosa al 10% esterilizado por filtración con un filtro de 0.2 µm de tamaño de poro (Sterile Acrodisc Gelman Sciences®). Asépticamente distribuir a los tubos con tapa de rosca estériles 5 ml del medio. Enfriar antes de su empleo y refrigerar para su conservación (4° a 10°C). Con una aguja de inoculación tomar una parte de un cultivo de 18 a 24 hr y realizar una punción hasta el fondo. Se incubó 4 días a 35°C y se registró el cambio de coloración. Mediante esta prueba se puede observar también la movilidad.

Lectura:

Es una Oxidación (O) cuando hay producción de ácido y el medio cambia a amarillo en los frascos abiertos.

Es una Fermentación (F) cuando hay producción de ácido y el medio cambia a amarillo en los frascos sellados con aceite mineral.

Ni fermentan ni oxidan la glucosa (–) cuando el medio queda igual (verde).

Movilidad: Con movilidad (+) crecimiento que se aleja de la línea de punción; sin movilidad (–) crecimiento limitado a la línea de punción.

9.- Prueba de la Oxidasa (Kovacs) cuentagotas (BBL[®])

Su objetivo es determinar la presencia de enzimas oxidasas.

Método: Se utilizó el reactivo de Kovacs Oxidasa (BBL[®]), que es una solución acuosa al 1% de dihidrocloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. Para realizar la prueba, agregue unas gotas del reactivo sobre una tira de papel filtro. Estríe un asa cargada con bacterias de un cultivo de máximo 24 hrs, sobre el papel filtro saturado de reactivo, utilizando un asa de platino o un aplicador de madera estéril.

Lectura: En las reacciones positivas, las bacterias viran a un color violeta o púrpura en forma inmediata o dentro de los 10 a 30 segundos. Si la prueba es negativa no habrá coloración.

10.- Prueba de la Catalasa

Su objetivo es comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Método: Con una aguja de inoculación tomar una parte de un cultivo de máximo 24 hrs. y colocar sobre un portaobjetos limpio. Agregar una gota de H_2O_2 al 30% sobre el cultivo, usar una pipeta Pasteur o un gotero.

No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos. No mezclar con la aguja o el asa de inoculación.

Lectura: Prueba positiva observar la inmediata formación de burbujas bien visibles (formación de O_2).

Prueba negativa no hay formación de burbujas (no se forma O_2).

APÉNDICE B

Resumen de las tablas de varianza y t para los experimentos de crecimiento realizados.

TABLA I-B. Análisis de varianza realizada entre las repeticiones para ver diferencias entre las mismas y si pueden ser consideradas como tales.

Fuente de variación	Cuadrados medios	g. l.	F	P
Efecto	0.024156	4	0.005541	0.999936
Error	4.359098	40		

TABLA II-B. Prueba t realizada para el logaritmo de una de las repeticiones y el logaritmo del testigo para ver diferencia entre ellas.

Grupos	Media LogB3	Media Testigo	t	g.l.	P	Desv. Est. LogB3	Desv. Est. Testigo
LogB3 vs. Testigo	5.205578	5.179446	0.029972	16	0.976460	2.047666	1.627539

TABLA III-B. Prueba t realizada para el logaritmo de dos repeticiones y el logaritmo del testigo.

Grupos	Media Log B3-B5	Media Testigo	t	g.l.	P	Desv. est. LogB3-B5	Desv. est. Testigo
LogB3-B5 vs. Testigo	5.268678	5.179446	0.114759	25	0.909553	2.021915	1.627539

TABLA IV-B. Prueba t realizada para el logaritmo de la media de las 5 repeticiones y el logaritmo del testigo.

Grupos	Media	Media	t	g.l.	P	Desv. est.	Desv. est.
	LogMed	Testigo				LogMed	Testigo
LogMed	5.287622	5.179446	0.123389	16	0.903336	2.066073	1.627539
vs.							
Testigo							