



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

POSGRADO DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

**"IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIGESTIVAS EN EL  
ABULÓN AZUL (*Haliotis fulgens*),  
SILVESTRE Y CULTIVADO."**

TRABAJO DE TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA  
ALEJANDRA R. LAZO DE LA VEGA TRINKER

Directora de Tesis:  
MARIA. TERESA VIANA CASTRILLÓN

Cuautitlán, Estado de México.

Diciembre 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



# Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

OFICIO/FES-C/CGPMYDCPySA/ST/CGEP/854/X/2003

ASUNTO: Designación de Jurado.

**BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE**  
**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO**  
**DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR**  
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza a la alumna **ALEJANDRA REYNA LAZO DE LA VEGA TRINKER**, con el número de expediente **100981023** y número de cuenta **8960083-0**, para presentar su examen de grado de **Maestra en Microbiología**, con la tesis titulada "**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIGESTIVAS EN EL ABULON AZUL (HALIOTIS FULGENS), SILVESTRE Y CULTIVADO**" a quien se le ha designado el siguiente jurado:

- Presidente:** DR. CARLOS VASQUEZ PELAEZ
- Vocal:** DRA. BEVERLY DIXON
- Secretario:** DRA. MARIA TERESA VIANA CASTRILLON
- Primer Suplente:** DR. JORGE FERNANDO TORO VAZQUEZ
- Segundo Suplente:** DR. LOU DABRAMO

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 6 de octubre del 2003.

**DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES**  
**COORDINADOR GENERAL**

C.c.p. Exp. de alumno  
C.c.p. Archivo  
FSG/HRA/mrc

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Av. 1º de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,  
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700  
Tel.: 5623-2018, Fax: 5868 2489



## ÍNDICE

	CONTENIDO	PÁGINA
1	Introducción	1
1.1	Generalidades de Bacterias Digestivas	2
1.1.1	Invertebrados	3
1.1.2	Herbívoros Rumiantes	4
1.1.3	Herbívoros No Rumiantes	7
1.1.4	Monogástricos	7
1.1.5	Organismos Acuáticos (Peces e Invertebrados)	8
1.2	Alimento	11
1.2.1	Alimentación Natural	11
1.2.2	Alimento Balanceado	12
1.3	Algas	14
1.4	Carbohidratos de las Algas	15
1.4.1	Celulosa	16
1.4.2	Xylan	17
1.4.3	Alginato	18
1.4.4	Carragenanos	21
1.4.5	Laminarán	22
1.4.6	Mannan	22
1.4.7	Fucoidan	23
1.4.8	Agar	23
2	Antecedentes	24
2.1	Abulón	24
3	Objetivos	27
4	Metodología	28
4.1.1	Abulones Silvestres	28
4.1.2	Abulones de Criadero	28
4.1.3	Abulones de Laboratorio	29
4.2	Toma de Muestras	29
4.3	Homogeneización	31
4.4	Aislamiento	31
4.5	Pruebas de Carbohidratos	32
4.6	Pruebas Bioquímicas	33
4.7	Kit CRYSTAL	33
5	Resultados	34
6	Discusión	46
7	Conclusiones	55
8	Bibliografía	56
9	Anexos	64

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro 1	Número de colonias totales de bacterias obtenidas por cada estómago de abulón en medios Zobell (para aerobias y anaerobias facultativas) y TCBS (Vibrios).	36
Cuadro 2	Actividad de degradación hacia diferentes carbohidratos a partir de las colonias de bacterias aisladas	37
Cuadro 3	Porcentajes de bacterias con capacidad de degradación de los diferentes carbohidratos.	37
Cuadro 4	Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de abulones silvestres (Isla de Cedros) según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.	38
Cuadro 5	Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de abulones cultivados (Eréndira) según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.	39
Cuadro 6	Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de abulones de laboratorio según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.	40
Cuadro 7	Códigos de identificación para bacterias aisladas de heces de los abulones de laboratorio, según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.	41
Cuadro 8	Códigos de identificación para bacterias aisladas de improntas de algas procedentes de Eréndira según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.	41
Cuadro 9	Bacterias identificadas a nivel de género aisladas del contenido digestivo de abulón de las diferentes localidades.	44
Cuadro 10	Bacterias catalogadas por el método CRYSTAL BBL como del género Shigella.	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1	Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos Silvestres	42
Figura 2	Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos cultivados	42
Figura 3	Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos de laboratorio	43
Figura 4	Actividad celulolítica de bacterias aisladas de heces de organismos de laboratorio y de 1 alga.	43
Figura 5	Fotos del proceso del estomago de un abulón, obtención de cepas, pruebas de carbohidratos y Kit de identificación.	Anexos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a CONACYT por apoyar todos mis estudios y a la UABC por facilitarme las instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Proyecto CONACYT G28119 B "Fisiología Digestiva y Metabolismo Nutricional del Abulón Azul (*Haliotis fulgens*) Cultivado".

A BC Abalone, por facilitar los abulones para este estudio.

A mi Directora Ma. Teresa Viana, por su guía y apoyo incondicional y por ser compañera y amiga.

A mis sinodales Dr. Shimada por confiar en mí, Al Dr. Carlos Vásquez y la Dra. Beverly Dixon, al Dr. Jorge Toro por hacer fácil todo y al Dr. Lou D'Abramo por entrarle al quite.

A la Dra. Roxana Rico por sus consejos y tiempo. A mis compañeros de Laboratorio: Jessica, Gabriel, Marco, Laura, July, Eduardo, Lucy y Teresita, por compartir trabajo, alegría y pasteles!.

A Hugo, Mine, Hesper, Rodrigo y Ale Ayanegui por todo su apoyo.

A ti...., por seguir amando.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El abulón es un producto pesquero de un alto valor económico en el mercado nacional e internacional, y es de particular importancia en la Península de Baja California, ya que es un recurso pesquero con más de 100 años de explotación, resultando ser una actividad económica importante en varias zonas de la Península (Guzmán-Del Proó, 1992).

En la actualidad, ésta pesquería ha disminuido de manera drástica y alarmante, lo que ha dado lugar a que el cultivo de abulón sea de gran importancia, no sólo para ser explotado comercialmente, sino también para repoblar y recuperar las áreas de producción. Estudios recientes se han enfocado al cultivo de abulón, y el mayor interés se ha dirigido a la eficiencia alimenticia en la elaboración de dietas balanceadas que aumenten la tasa de crecimiento. El abulón es un organismo herbívoro que consume para satisfacer sus requerimientos energéticos, los cuales son bajos y con una alta cantidad de proteína, lo que hace que el balanceo de raciones resulte difícil para lograr que en un alimento con cierta cantidad de energía consuma la proteína necesaria para crecer (Bautista-Teurel y Millamena, 1999). Esto ha dado lugar a que las dietas balanceadas sean elaboradas hasta con un 30% de proteína y con 3000 kcal por gramo (Gómez, 2002). Al ser un organismo herbívoro, las bacterias deben jugar un papel importante en la digestión, aspecto que no ha sido tomado en cuenta, no sólo para conocer su papel sino que pudiera tener un posible efecto el alimento balanceado sobre su desempeño.

Algunos investigadores han considerado que la población microbiana dentro del tracto digestivo de los invertebrados es muy baja, y refleja la baja actividad de estos organismos (Austin, 1992), y por lo mismo no le habían dado la importancia requerida.

### **1.1 GENERALIDADES DE BACTERIAS DIGESTIVAS**

Sobre la superficie de numerosas plantas y animales pueden colonizar bacterias y hongos, los cuales son utilizados simplemente como substratos o se alimentan con sus productos metabólicos o principios nutritivos, parcial o totalmente como comensales (Rheinheimer, 1970, Sakata, 1989). Microorganismos atípicos son introducidos continuamente al sistema digestivo vía agua y alimentos, pero estos organismos no significan una diferencia significativa porque no pueden competir exitosamente con los organismos residentes, ya que estos fueron seleccionados bajo ciertas condiciones medioambientales que los favorecen (Yokoyama *et al.*, 1988). La comunidad bacteriana que habita el tracto gastrointestinal se caracteriza por su alta densidad poblacional, amplia diversidad e interacciones complejas. Es aquí donde la relación entre hospedero y huésped puede variar desde competencia hasta cooperativismo (Mackie *et al.*, 2000). Las bacterias son selectivas y pueden ser influidas por la naturaleza y composición de la dieta, productos metabólicos, pH, anaerobiosis, sales biliares, enzimas digestivas, respuesta inmune del huésped y la respuesta de las bacterias de la microflora (Sakata, 1989). Todos los animales terrestres herbívoros, tienen una o

más partes del aparato digestivo expandido en un órgano que alberga grandes poblaciones microbianas muy valiosas en cuanto a la digestión de alimentos, por lo cual el animal hospedero no necesariamente produce las enzimas necesarias para la digestión. La actividad de dichas bacterias frecuentemente beneficia al hospedero mediante la degradación de la celulosa, fijación de nitrógeno, incremento de la resistencia del hospedero a ciertas toxinas o pre acondicionamiento a ciertos alimentos (Harris, *et al.*, 1998-b, Vélez, *et al.*, 1997, Moir, 1991). Las bacterias que habitan el tracto digestivo de los herbívoros vertebrados, son los agentes principales de la digestión de los carbohidratos complejos contenidos en las plantas (Van Soest, 1987, Sawabe *et al.*, 1995), donde el factor principal que influye sobre el número y las proporciones de las diferentes poblaciones es el alimento. Cuando hay un cambio en la alimentación, la adaptación microbiana puede llevar algunos días dependiendo de lo drástico del cambio de alimento (Yokoyama, *et al.*, 1988, Sakata, 1989, Flint *et al.*, 1995)

### 1.1.1 INVERTEBRADOS

En el caso de las termitas, las poblaciones de protozoarios en la boca son las responsables de la degradación de la glucosa. Estos protozoarios tienen sus procesos de degradación en anaerobiosis, produciendo dióxido de carbono, hidrógeno y acetato, el cual es absorbido a través de la pared digestiva de la termita. También cuentan con una población bacteriana que utiliza tanto al acetato como al dióxido de carbono y al hidrógeno producido por los protozoarios

y generan metano en las cámaras anaeróbicas de las termitas (Microbial ecology, RM Atlas, 1981).

### **1.1.2 HERBIVOROS RUMIANTES**

En general, los animales herbívoros se caracterizan por tener en su tracto digestivo una flora bacteriana activa, que tiene diferentes funciones dependiendo de la especie y hábitos alimenticios. La importancia de estos organismos en la digestión del alimento es fundamental, ya que los herbívoros no producen enzimas digestivas específicas para la degradación de los principales carbohidratos estructurales de las plantas que consumen (Mcbbee, 1971, Yokoyama, *et al.*, 1988). El metabolismo de los carbohidratos por microorganismos produce ácidos grasos volátiles, los cuales en el rumiante dan como resultado el aporte del 70-80% de los requerimientos calóricos del animal (Fahey *et al.*, 1988). Los rumiantes consumen hojas, pastos y ramas, (ricos en celulosa), y cuentan con una cámara especial de fermentación (rumen) que cuenta con grandes poblaciones de hongos, protozoarios y dependen de la asociación de bacterias degradadoras de celulosa que contribuyen a la digestión de los alimentos (Atlas, 1981., Flint *et al.* 1995, Monje y Viana, 1998).

Las poblaciones bacterianas dentro del rumen incluyen a los digestores de celulosa, pectina, almidón, hemicelulosa, fermentadores de azúcar, utilizadores de ácidos grasos, bacterias metanogénicas, proteolíticas y lipolíticas. Además de las bacterias, el rumen contiene grandes poblaciones de protozoarios, la mayoría de

ellos ciliados y otros pocos flagelados. Los ciliados son un grupo muy especializado que crece en condiciones anaeróbicas fermentando las plantas para la obtención de energía. Las bacterias en el rumen están adheridas básicamente a la materia particulada lo cual hace más eficiente la degradación por las exoenzimas. Las plantas ingeridas por los rumiantes proveen una fuente continua de nutrientes para estas poblaciones las cuales convierten la celulosa, el almidón y otros nutrientes a dióxido de carbono, los gases hidrógeno y metano (Atlas, 1981; Moir, 1991). La transferencia de carbón a partir de las bacterias hacia los protozoarios, constituye una corta pero muy eficiente cadena alimenticia (Moir, 1991; Atlas, 1981; Yokoyama *et al.*, 1988). Las bacterias del rumen son predominantemente anaerobias estrictas, y aunque hay tolerancia de cierta cantidad de oxígeno, a lo largo de la fermentación esta cantidad baja considerablemente con ayuda de bacterias anaerobias facultativas, las cuales se han reportado adheridas a la pared ruminal (Moir, 1991; Van Soest, 1987; Yokoyama *et al.*, 1988). Los protozoarios son probablemente digeridos más eficientemente por el animal que las bacterias, ya que éstas últimas tienen una pared celular resistente y un alto contenido de ácidos grasos.

Algunas de las poblaciones bacterianas en el rumen requieren de factores de crecimiento, pero otras poblaciones son capaces de producir vitaminas (Vitamina K, biotina y ácido fólico), abasteciendo así los requerimientos nutricionales de las propias bacterias y del animal (Atlas, 1981, Flint *et al.*, 1995).

La fermentación bacteriana es una fase importante en el balance de nitrógeno en los rumiantes, los carbohidratos de la fibra elevan los requerimientos de amonio de los microorganismos para "respaldar" su crecimiento (Atlas, 1981, Flint *et al.*, 1995). Las proporciones relativas de poblaciones bacterianas dentro del rumen, varían de acuerdo a la naturaleza de las plantas ingeridas (Microbial ecology, Atlas, 1981), el pH constituye la variable regulatoria de la actividad celulolítica y tasa de absorción de ácidos grasos volátiles. Es así como se ha observado que la baja en el pH puede afectar la degradación y división de las proteínas entre el uso de energía y la síntesis de proteína bacteriana, esto da como resultado la inhibición de ciertos procesos bacterianos y un retardo en la digestión (Flint *et al.*, 1995; Sauvant *et al.*, 1995, Van Soest, 1987; Harris, *et al.*, 1988-b; Yokoyama *et al.*, 1988). La tasa de reproducción bacteriana debe de ser más alta que el tiempo de tránsito del contenido alimenticio, mismo que está determinado por el tiempo de fermentación que sufre el alimento en el rumen, (Van Soest, *et al.*, 1995).

### **1.1.3 HERBIVOROS NO RUMIANTES**

En el caso de los mamíferos no-rumiantes que se alimentan primariamente de plantas, cuentan con un saco ciego, el cual también está colonizado por bacterias que degradan celulosa y con mayor facilidad hemicelulosa, produciendo ácidos grasos volátiles, los cuales son absorbidos a través de la pared intestinal, entrando al torrente sanguíneo, son oxidados produciendo dióxido de carbono y agua (Van Soest, *et al.*, 1995; Microbial ecology, Atlas, 1981). Otras de las actividades de las bacterias en el ciego, es la degradación de aminoácidos, lo cual puede ir en detrimento del animal al resultar en una competencia con la población bacteriana (Atlas, 1981). Las poblaciones bacterianas se mantienen por el aporte constante de sustrato, temperatura, y pH entre límites relativamente estrechos (Yokoyama, *et al.*, 1988).

La mayor parte de las proteínas es eliminada en el excremento debido a la tardía degradación de los carbohidratos en el ciego, lo que hace que la coprofagia sea la principal vía de recuperación de la proteína (Van Soest, 1987).

### **1.1.4 MONOGÁSTRICOS**

En los monogástricos, la mayor contribución de las bacterias digestivas en el intestino parece ser el de la producción de factores de crecimiento, contribuir a la digestión de alimento, suplementar vitaminas (Vit. K, B) y proveer considerable protección contra patógenos invasores, más que la producción de sustratos parcialmente degradados (Atlas, 1981).

### **1.1.5 ORGANISMOS ACUATICOS (PECES E INVERTEBRADOS)**

Diversos invertebrados tanto marinos como de agua dulce, satisfacen sus requerimientos nutricionales por medio del consumo de poblaciones bacterianas completas en partículas de desecho (Atlas, 1981). Los microorganismos pueden vivir como comensales en el interior de muchos animales acuáticos, varias especies de peces y algunos invertebrados acuáticos presentan en su sistema digestivo poblaciones bacterianas que juegan un papel importante en la digestión de ciertos alimentos. Se dice que las bacterias aportan las celulasas para digerir la celulosa presente en las dietas de los animales, utilizando a los carbohidratos complejos como fuente de carbono, al igual que sucede en otros invertebrados; a cambio, las bacterias se desenvuelven en un medio rico y adecuado para su crecimiento y desarrollo. La degradación de celulosa en estos peces genera productos metabólicos que son aprovechados por los peces. Sin embargo, los peces no cuentan con sistemas digestivos suficientemente complejos para soportar gran cantidad de bacterias celulolíticas, tal como se encuentran en los rumiantes (Atlas, 1981; Rheinheimer, 1970; Harris *et al.*, 1988-a, Martínez *et al.*, 1999). Aún así, el tracto intestinal de peces tanto herbívoros como omnívoros son proporcionalmente mas largos (5 a 10 veces más de la longitud del pez), y cuentan con múltiples dobleces (Sakata, 1989), por lo que el tiempo de tránsito es relativamente largo y es posible dar cabida a una fermentación bacteriana sin contar con una verdadera cámara de fermentación. Del tracto digestivo de invertebrados, se han identificado gran variedad de bacterias aeróbicas, y anaerobios facultativos en menor

proporción, quienes son los que en realidad favorecen las condiciones para que los anaerobios estrictos puedan actuar al reducir la cantidad de oxígeno disponible (Harris *et al.*, 1988-b), sin embargo, se han hecho pocos intentos por aislar anaerobios estrictos.

Al igual que en los invertebrados terrestres, la flora autóctona de algunos invertebrados representa una población natural que puede incluir bacterias residentes e ingeridas con la dieta y bacterias de especies que normalmente no se establecen más que en caso de perturbación y frecuentemente están representadas por patógenos. La flora residente ocupa permanentemente la cavidad digestiva y la mayoría no es vaciada en la materia fecal porque está adherida a la pared intestinal, la transitoria es eliminada en las heces (Sakata, 1989, Harris, 1993, Martínez *et al.*, 1999). Se han reportado como poblaciones bacterianas predominantes en peces a las aeróbicas y anaeróbicas facultativas, no así las anaerobias, las que se reportaron mayormente en sedimentos y tienen la menor proporción de aislamiento en peces costeros (Sakata, 1989).

En gasterópodos y bivalvos se han reportado comunidades bacterianas en cada una de las partes del aparato digestivo, y todas han coincidido con las bacterias aisladas en el hábitat o alimento donde se aislaron los organismos. La mayoría de las bacterias aisladas del aparato digestivo, son anaerobios facultativos, aunque varias especies de *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Aeromonas* constituyen las bacterias encontradas con mayor frecuencia (Harris, 1993). Los géneros bacterianos encontrados en el tracto

digestivo de moluscos bivalvos incluyen a: *Achromobacter*, *Flavobacterium* / *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Aeromonas spp.* (Preiur *et al.*, 1990). Rohwer *et al.*, (2002), encontraron diversas bacterias asociadas a las colonias coralinas, como: *Oceanospirillum*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xantomonas*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Rhodococcus* entre otras. Se ha demostrado de igual modo que la dieta es un factor importante en la composición de la flora bacteriana y cambia conforme se cambia la dieta, además también se ven afectadas con la temperatura y el pH, así como también se ha reportado el cambio de flora según el estado de salud del organismo y la variación estacional. Los microorganismos pueden estar ampliamente distribuidos a través del tracto digestivo, o estar restringidos a nichos particulares (Sakata, 1989; Harris, 1993; Martínez *et al.*, 1999).

En tracto digestivo de los ostiones, la mayor parte de las bacterias presentes son las encontradas en el sedimento del lugar donde fueron colectadas y entre ellas se encuentran a *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas* (Austin, 1982; Rheinheimer, 1970, Sakata, 1989 y Suzuky, 1987). Para el abulón en el caso específico de microbiología digestiva, la información es escasa. Erasmus *et al.*, (1997) al estudiar las enzimas digestivas del abulón, sugirió que las bacterias digestivas podrían tener un papel importante en el proceso digestivo, sugerido ya por Garland *et al.*, (1985). Según Takami *et al.*, (1998), en los

estudios de Sawabe et. al. (1995) y Erasmus (1996) se demostraba que las bacterias residentes en el tracto digestivo del abulón, podían hidrolizar carbohidratos de las algas o que las bacterias de la boca podían contribuir a la capacidad del hospedero de digerir polisacáridos provenientes de las algas. Por su parte, Harris *et al.*, (1998 a) menciona que la contribución de las bacterias a la degradación de los polisacáridos puede ser a través de poblaciones transitorias o residentes, y que el tracto digestivo del abulón ofrece diferentes hábitats que favorecerían a las actividades microbianas, específicamente para la fermentación de moléculas orgánicas complejas. Algunos investigadores mencionan que la presencia de celulosa en la dieta estimula la presencia de carbohidrasas en el contenido digestivo sugiriendo que la celulosa podría estimular el crecimiento de bacterias. Sin embargo, ninguno de ellos se enfoca al estudio específico del papel de las bacterias digestivas del abulón, ni a evaluar el aporte de éstas en la fisiología nutricional del mismo. Es hasta el 2000, en que Doeschate *et al.*, comienzan a evaluar la capacidad de degradar alginato y agar por parte de las bacterias digestivas de abulones alimentados con algas ricas en estos carbohidratos.

## **1.2 ALIMENTO**

### **1.2.1 ALIMENTACION NATURAL**

El abulón en la naturaleza se alimenta de mantos de algas pardas compuestos de *Macrocystis pyrifera*, *Pelagophycus porra*, *Laminaria farlowii*,

*Pterigophora californica*, *Egregia menziesii*, *Eisenia arborea* y *Cystoseria osmundacea*. Y de algas rojas, de las cuales las más abundantes son *Rhodomenia spp.*, *Gigartina spp.* y *Plocamium spp.* (Dawson *et al.*, 1960, Guzmán del Proó *et al.*, 1991, Lelevier-Grijalva *et al.*, 1989, Mateo-Cid y Mendoza-González, 1994, García, 1988). También se ha reportado que consumen pastos marinos como *Phyllospadix torreyi* (García, 1998). En el Pacífico de Baja California, los mantos de *Macrocystis pyrifera* constituyen al hábitat de gran variedad de organismos y en ellos se llevan a cabo importantes pesquerías comerciales como las de abulón, langosta y erizo (Hernández *et al.*, 1989, García, 1998)

### **1.2.2. ALIMENTO BALANCEADO**

Sin embargo como una medida para desarrollar el cultivo del abulón de una manera controlada, surgió la necesidad de elaborar alimentos balanceados. De esta manera se conoce que al igual a otros organismos, el abulón se alimenta para llenar sus requerimientos energéticos, siendo de 60 cal/g/día y se sabe que el abulón requiere cerca de 3.5mg de proteína por gramo de peso resultando en una razón proteína/energía de 100 (30% de proteína y 3000 kcal) (Gómez-Montes *et al.*, 2003). Esta relación implica un alimento con alto contenido protéico considerando que se trata de un organismo herbívoro. Lo cual resulta en que su ingestión de energía sea baja, además de resultar casi imposible balancear una ración con menor contenido energético que 3000 kcal.

Las macroalgas presentan un contenido energético de 2000 kcal, mientras que los alimentos balanceados requieren ser complementados con harinas que aglutinen el alimento lo cual aumenta el contenido energético.

En los organismos acuáticos a diferencia de los terrestres, el alimento ofrecido al estar expuesto en el agua presenta una mayor interacción con el medio y en este caso las bacterias del agua lo colonizan con mayor rapidez. Por otro lado, los nutrientes contenidos en el alimento constituyen un medio propicio para su desarrollo. Además en los alimentos balanceados se conoce el efecto de la lixiviación de nutrientes que constituye el lavado de los micronutrientes contenidos en el mismo. Este lavado puede ser de gran velocidad constituyendo así un medio más favorable para el desarrollo de bacterias, las cuales se ponen en asociación con la superficie externa del alimento con el potencial de ser incorporados a la microflora que ya existe. No toda la microflora es transitoria, pero aquella que sea propicia y colonice, se convierte en residente. Esta microflora puede inhibir o retrasar la colonización de otros microorganismos o puede ser inhibidas por algunos componentes antimicrobianos (Austin, 1988; Harris *et al.*, 1998 a).

La colonización inicial de un organismo no parece estar determinada por la cantidad de alimento en el estómago o por la sincronización en la degradación de nitrógeno o carbohidratos. En contraste, la densidad microbiana después de 3 horas de incubación parece estar estrechamente relacionada con la pared celular de la macroalga, donde la arquitectura de la pared celular, provee una gran área de superficie para la adhesión microbiana (Sauvant *et al.*, 1995)

### 1.3. ALGAS

Los recursos algales se usan como fuente de ficocoloides, como el agar-agar, alginatos y carragenanos; se emplean por la propiedad que tienen de formar soluciones viscosas a bajas concentraciones, por su poder gelificante y por su capacidad de mantener partículas en suspensión (Rodríguez *et al.*, 1991; Sawabe, *et al.*, 1995). Entre las algas feofitas se encuentran grandes contenidos de laminarán, y fucoidan. Estos polisacáridos, son importante fuente de energía alimenticia (Sawabe *et al.*, 1995). La composición química de las algas café varía de una especie a otra y de una localidad a otra dependiendo de la estación del año, la exposición al oleaje, la temperatura, las corrientes, las concentraciones de nutrientes, la profundidad y el estado de desarrollo de las algas. (Rodríguez *et al.*, 1991).

Las macroalgas producen exudados siendo mayores hacia las porciones viejas de la planta, dando como resultado que estos lugares sean favorecidos por la colonización de bacterias saprófitas. En las porciones jóvenes del alga la producción de exudado es incipiente por lo que no se favorece la colonización bacteriana. Los microorganismos presentes se alimentan principalmente de los exudados de las plantas (sustancias orgánicas disueltas como aminoácidos, azúcares y ácidos) y éstas a su vez, bajan el pH del agua de 8 hasta 5 en el agua de alrededor de la planta. Sin embargo, hay algunas especies de bacterias y hongos que utilizan a las plantas y animales únicamente como substratos y se alimentan de preferencia de los nutrientes existentes en el agua (Rheinheimer,

1970). Las comunidades microbianas que están establecidas de manera natural en las macroalgas son estables, con pequeñas fluctuaciones estacionales (Bissett *et al.*, 1998). Shiba y Taga (1980), encontraron que poblaciones de algas estaban colonizadas por: *Flavobacterium-Cytophaga*, y además encontraron que las bacterias más abundantes eran *Acinetobacter*.

#### **1.4. CARBOHIDRATOS DE LAS ALGAS**

La estructura de las algas es esencialmente la misma en todas las especies, pero carece de lignina. La estructura base es de fibras de celulosa y en algunos géneros esta estructura es reemplazada por manan y en otros por fibras de xylan. La matriz esta compuesta por una variedad de componentes mucílagos amorfos tales como ácido algínico, fucoidanes sulfatados, agares y carragenanos. Adicionalmente también cuentan con uniones de glucanos  $\alpha$  1,4 tales como almidones, uniones  $\beta$  1,3, laminarán, fructosan y polioles (Moir, 1991).

Los polisacáridos de las algas comprenden 3 grupos: los ésteres de ácido sulfúrico solubles en agua: agar, carragenanos y fucoidan, los carbohidratos solubles en agua tales como el laminaran y los poliurónidos solubles en álcalis representados por el alginato (Monje *et al.*, 1998). También existe una gran cantidad de gomas que incluyen a los  $\beta$ - glucanos, xyloglucanos, mannoglucanos y gomas de glucano, los cuales existen sin lignina. Los glucomannan contienen una cadena central de manosa y glucosa en un patrón alternativo, mientras que

la galactosa forma cadenas laterales. Los xyloglucanos tienen cadenas similares (Van Soest, 1987).

Los animales marinos alimentados con algas desarrollan una producción normal de mezcla de enzimas degradadoras de carbohidratos en el tracto digestivo, las cuales incluyen: agarasa, laminarasa y celulasas así como alginato liasas. Esta mezcla de enzimas, permite a los animales aprovechar eficientemente toda la energía disponible de esta fuente de alimento (Seidere *et al.*, 1982; Wong *et al.*, 2000).

#### **1.4.1 CELULOSA**

La celulosa es el polisacárido estructural más ampliamente distribuido entre las plantas y en la mayor parte de las algas superiores, es una de las sustancias elaboradas por células vivas que es químicamente muy resistente. Es una cadena lineal de 100-200 unidades de glucosa unidas mutuamente por enlaces  $\beta$  1-4 (Percival, *et al.*, 1967; Marcuzzi y Turchetto, 1978, Monje y Viana, 1998, Van Soest, 1987). Su degradación, es básicamente a través de microorganismos ya que los organismos animales no son capaces de realizar una degradación completa, comprendiendo 2 pasos:

El primer paso es un pre-hidrolizado donde las cadenas hidro-glucosa son hidratadas y se hinchan, involucrando una enzima designada como C1. El segundo paso comprende una división hidrolítica de los polímeros susceptibles ya sea al azar, o por la parte terminal por medio de un complejo enzimático Cx consistente

en endo y exo glucanasas  $\beta$ -1,4 glucanasas y  $\beta$ - glucosidasa (celobiosa) que atacan los derivados solubles o la celulosa que ha sido hinchada bajo la acción de los álcalis (Moir, 1991; Fahey *et al.*, 1988; Enríquez *et al.*, 2001) dando lugar a glucosa.

De ambos pasos de degradación, es el primero el que se le ha conferido como exclusivo a microorganismos, mientras que para el segundo paso no se han reportado animales que contengan las enzimas necesarias para completar esta degradación (Susuki, 1987).

#### **1.4.2 XYLAN**

Dentro de las hemicelulosas, existen 2 tipos de polisacáridos: los de cadena corta (celulosan) y los polisacáridos amorfos estrechamente ligados a la lignina. El celulosan más común es el xylan, el cual es insoluble por su co-unión con la lignina pero el que contiene uniones en rama, con arabinosa y ácido gulurónico es más soluble (Fahey *et al.*, 1988, Moir, 1991). Esta formado por un eje de residuos de D-xylopiranosa unidos por enlaces  $\beta$  1-4, los cuales pueden tener diversos orígenes y dependiendo de éstos, presentan ramificaciones que contienen principalmente residuos de acetil, arabinosil y de gluconosil (Filho, *et al.*, 1997; Heck *et al.*, 2002, Percival, 1967). La linearidad del xylan puede promover su inclusión en la celulosa, pero eso no explica su baja digestibilidad. Después de todo, es una molécula fácilmente destructible ya que carece del 6 carbinol, que es la unión que limita las uniones de hidrogeno de cadena cruzada. El xylan no puede ser

degradado hasta que se remuevan primero las cadenas laterales de arabinosa o de la celulosa incrustada. Las uniones con arabinofuranosil deben ser sensibles a los ácidos gástricos, exponiendo así al xylan a una posterior digestión (Van Soest, 1987). Los monómeros de xylan se usan en la producción de diferentes antibióticos, alcoholes, alimento animal, y en la industria para hacer combustibles y en la manufactura del papel (Heck *et al.*, 2002), así como para reducir el contenido de peróxido de hidrogeno y de bases cloradas, y en la reducción de la demanda del oxígeno químico en las líneas de descarga efluentes en la industria de la pulpa (Triches *et al.*, 2002).

### **1.4.3 ALGINATO**

El alginato es el poliurónido mayor componente de las algas cafés (Davis, 1992; Sawabe, *et al.*, 1995; Percival, 1967, Preiss *et al.*, 1962), y entre su gran variedad de usos se utiliza como agente estabilizante, viscosificador y gelificante de bebidas y alimentos; así como en impresión de papel y en la industria química y farmacéutica (Wong *et al.*, 2000, Preiss *et al.*, 1962). El ácido algínico ( $C_6H_8O_6$ )<sub>n</sub> está compuesto principalmente por unidades de ácido manurónico (M) y pequeñas porciones de residuos de ácido gulurónico (G), Puede estar organizado de 3 formas:

- a) bloques G homopoliméricos,
- b) bloques M homopoliméricos y
- c) bloques G-M heteropoliméricos.

En la metilación e hidrólisis ceden 2,3-dimetyl D-mannuronido y se caracteriza por enlaces  $\beta$  1-4 que son similares al patrón geométrico de la celulosa más que del almidón. El ácido algínico es el principal carbohidrato componente de *Macrocystis pyrifera*, el cual es el alimento natural para el abulón *haliotis fulgens* (Percival, 1967; Monje y Viana, 1998; Sawabe *et al.*, 1995; Wong, *et al.*, 2000; Preiss *et al.*, 1962).

Algunas cepas marinas producen 2 o más tipos de enzimas con múltiples substratos, pero se han aislado enzimas degradadoras de alginato con diferente especificidad de substratos de muchos orígenes: algas marinas, moluscos marinos y de una amplia variedad de microorganismos. La especificidad de la enzima depende del medio ambiente del aislamiento, y del tipo de alginato disponible, al cual se adapta el microorganismo. La enzima alginato liasa cataliza la degradación del alginato, compartiendo la degradación con una enzima epimerasa, en tres pasos:

- a) Remoción de la carga eléctrica negativa en el anión carboxil (neutralizando la carga con un puente salino con lisina como residuo)
- b) Abstracción catalizada de la base del protón C 5, requiriéndose 1 residuo como protón abstractor y otro como el donador (se han detectado ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y cisteina para estas funciones)
- c) Transferencia de electrones del grupo carboxilo para formar una doble unión entre los carbonos 4 y 5 resultando una  $\beta$  eliminación de la unión glicosídica 4-O.

En el caso de *Haliotis spp*, se han detectado la producción de 2 liasas, Nakada & Sweeney describen las liasas del hepatopáncreas que tiene un pH óptimo de 4.0 y consta de una actividad exo-poli G. Para el caso de *Haliotis tuberculata*, la liasa tiene preferencia por uniones M-M y M-G y ambas, requieren concentraciones de Na Cl de 0.05-0.075 M. La alginato liasa también se ha aislado en gran variedad de algas, y su actividad varía de una estación a otra dependiendo del lugar de la fronda del alga y del ciclo de vida de la planta. Sawabe *et al.*, (1997) encontraron que una cepa producía al menos cinco diferentes tipos de alginato liasas, algunas de las cuales además, tenían la capacidad de especificidad de sustratos heterogéneos. Esto hace que el organismo se beneficie al facilitar la degradación completa de los polímeros del alginato. Se ha demostrado que la presencia de alginato estimula la expresión de la enzima extracelular, pero no afecta significativamente la expresión de la enzima intracelular, y para otros casos, se requiere de la presencia de cationes divalentes de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  para la actividad enzimática óptima (Wong *et al.*, 2000).

Las alginato liasas tanto de medios marinos como de bacterias se han aplicado exitosamente a la extracción de protoplastos, para investigación alimenticia y regeneración de una gran variedad de algas. También se usa en la industria agrícola para facilitar la germinación y como promotor de crecimiento de raíces de algunas plantas. Además, se utiliza con gran éxito como tratamiento para deshacer el polisacárido de los pulmones de los enfermos de fibrosis cística (Wong *et al.*, 2000).

Como el alginato esta designado a dar la fuerza suficiente a las algas para soportar las grandes fuerzas de corrientes y mareas, el alginato es usado en la industria farmacéutica junto con otras sustancias, para la encapsulacion de drogas de liberación controlada. En la actualidad, en combinación con otros biomateriales resulta ser altamente efectivo en la elaboración de vendajes impregnados con antibióticos y en la encapsulacion de condrocitos para generar tejido cartilaginoso in vitro, para transplantes (Wong *et al.*, 2000).

#### **1.4.4 CARRAGENANOS**

El agar y los carragenanos son galactanos conformados por moléculas de galactosa con uniones alternadas  $\alpha$  1-3 y  $\beta$  1-4, presentes en las paredes celulares de ciertas *Rhodophyceas*. Estas uniones dan formas alternadas D- y L- para el agar y en el carragenano, solo en D-. El Carragenano puede presentarse en 3 tipos diferentes: Kappa, Lambda e Iota de los cuales el Kappa forma placas sólidas, el Iota forma geles suaves y el Lambda es una forma que no gelifica. Todos son de amplio interés en la industria farmacéutica y alimenticia como agentes estabilizantes y homogeneizantes. Últimamente se han usado con éxito en medios microbiológicos para hacer placas con buenos resultados. La extracción de los diferentes tipos carragenanos depende de la época de cosecha y por lo general, el Kappa esta presente en mayor proporción en plantas macho y el Lambda en plantas hembra (Abbott *et al.*, 1981). Se han hecho estudios con

diversas bacterias, pero la que degrada específicamente al carragenano es *Pseudomonas carragenovora*, la cual hidroliza la unión  $\beta$  1-4 (Percival, 1967).

#### **1.4.5 LAMINARÁN**

Es un  $\beta$  – glucano de reserva, hidrosoluble que abunda dentro del grupo de las algas cafés. El Laminarán es un glucano lineal con uniones  $\beta$  1-3 y 1-6, su metilación da como resultado 2,4,6-tri-*O*- metil D-glucosa ó laminoribosa y pequeñas cantidades de manitol. Se distinguen dos formas dependiendo de su solubilidad en el agua fría, como soluble o insoluble aunque ambas formas son solubles en agua caliente. Este polisacárido es particularmente susceptible de ser atacado por hongos y bacterias (Davis, 1992; Percival *et al.*, 1967).

La aplicación de estas glucanasas en la lisis de células vivas, pared celular bacteriana y levaduras ha llevado al uso de éstas en la química estructural de biopolímeros. Elyakova *et al.*,(1981) demostraron que los abulones *Haliotis asinina* y *H. varia*, tienen la capacidad de producir estas glucanasas (Elyakova *et al.*, 1981).

#### **1.4.6 MANNAN**

Es un polisacárido estructural y de almacén que se encuentra generalmente asociado a celulosa y hemicelulosas (Percival, 1967).

#### **1.4.7 FUCOIDAN**

Es una matriz mucilaginosa presente en tejidos intercelulares y se ha demostrado que es exudado en forma de gotas, en algunas especies de algas como *Macrocystis sp.* y *L. digitata*. Es una sustancia muy higroscópica que protege a la planta de deshidratación y en las plantas que están en la zona intermareal está presente en altas concentraciones. El fucoidan se usa como fuente del azúcar L-fucosa, y se ha usado como anticoagulante sanguíneo en la industria farmacéutica ya que presenta de 60 a 80% de actividad de heparina. Ciertas fracciones, también se usan para bajar lipemias (Percival, 1967)

#### **1.4.8 AGAR**

El agar esta compuesto por 2 polisacáridos: agarosa y agaropectina. La agarosa es un polisacárido compuesto por D-galactosa con uniones 1-3 y 1-4 con 3-6 anhidro L-galactosa. Esta fracción es fácilmente hidrolizada por bacterias, en especial *Pseudomonas kytoensis*. La agaropectina es una mezcla de polisacáridos que comprenden principalmente D-galactosa, 3-6 anhidro L-galactosa, algunos ésteres de sulfuro y ácido D- glucurónico. La agaropectina tiene las mismas cualidades estructurales que la agarosa pero con un arreglo diferente (Percival, 1967). Se usa desde hace mucho tiempo en el área de microbiología para la elaboración de medios de cultivo sólidos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ABULÓN

La información de la fisiología nutricional del abulón en relación a su capacidad de digerir y metabolizar polisacáridos como la celulosa ha sido poco estudiada (Uki *et al.*, 1985), se ha observado que los abulones se desarrollan en bancos predominantemente de pastos, los cuales tienen alto contenido de celulosa (Monje y Viana, 1989), aunque son las algas consideradas como su fuente primordial de alimento, donde se ha observado que tienen predilección por las algas cafés (Clark y Jowett, 1978, Sawabe *et al.*, 1995). Las bacterias se han asociado a los abulones tanto interna como externamente, y tiene su origen en el contacto del animal con el alimento, mientras el abulón va comiendo y/o moviéndose, va arrastrando bacterias diseminándolas así por otras piezas de la dieta. Los abulones mismos deben de ingerir bacterias de la dieta, al raspar la superficie para alimentarse (Bissett *et al.*, 1998; Harris, 1993; Harris *et al.*, 1998 a) La energía metabólica de los abulones se basan en la utilización de carbohidratos, los cuales son consumidos en la dieta natural en alto contenido (40 - 50%), además los abulones poseen muchas enzimas que son capaces de hidrolizar estos carbohidratos (Knauer *et al.*, 1996, Bissett *et al.*, 1998).

Harris *et al.*, (1998 b) reportaron la presencia de bacterias adheridas a la mucosa del intestino, pero observó más asociadas al mucus que directamente sobre las superficies del epitelio; aun así, se cree que la copiosa secreción de moco es para remover las bacterias de las superficies epiteliales, por el hecho de proveer

una superficie poco adecuada para las bacterias, por lo que se puede pensar que la relación entre bacteria-abulón es más del tipo transitorio y que la importancia de esta relación estriba en la contribución de las bacterias al desdoblar a los carbohidratos del alimento. Por su parte, Sawabe *et al.*, (1995), sugieren que tanto los erizos como los abulones mantienen flora residente simbiote y sugieren que se forman asociaciones bacterianas para la degradación del alginato. También se han reportado especies bacterianas en *Haliotis rubra*, como la *Moraxella Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Flavobacterium / Citophaga*, *Micrococcus* y *Aeromonas* en el sistema digestivo (Harris *et. al.*, 1998-a), y Sawabe *et al.*, 1995, reportaron. las bacterias *Alteromonas*, *Vibrio*, *Citophaga* y *Acinetobacter*.

Se ha demostrado con anterioridad la actividad celulolítica de ciertas bacterias en el saco digestivo de los abulones, pero poco se conoce sobre la digestión de los carbohidratos complejos ni el papel que éstos o sus productos metabólicos juegan en el papel de la nutrición de los abulones. También se ha demostrado que la actividad enzimática de algunas bacterias cambia dependiendo de los componentes de la dieta que esté consumiendo el abulón, y en algunos casos se ha demostrado que la microflora entérica favorece la tasa de crecimiento de ciertas especies, dependiendo esto del número de microorganismos en el animal.

Debido a lo anterior, y con el fin de investigar que tipo de bacterias tiene el abulón nativo de nuestras aguas, este estudio tratará de identificar la frecuencia de aparición y prevalencia bacteriana en las diferentes zonas tanto naturales como

de cultivo, comparando de éste último en alimentación natural vs balanceada, donde se plantearon los siguientes objetivos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Aislamiento e identificación de bacterias a partir de estómagos de abulón azul (*Haliotis fulgens*)

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el tipo de carbohidrato complejo que degrada cada cepa.
- Hacer un muestreo de diferentes poblaciones de abulones con 3 diferentes tipos de dietas: animales de vida libre con alimentación variada y desconocida, animales de laboratorio, alimentados con dietas elaboradas y animales de granja alimentados básicamente por macroalgas.
- Comparar las poblaciones bacterianas de las 3 poblaciones.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1.1 ABULONES SILVETRES**

Se obtuvieron estómagos de animales de vida libre (Isla de Cedros, México), de talla comercial de *Haliotis fulgens*, los cuales fueron guardados en bolsas de plástico con cierre hermético y mantenidas en una hielera con congelantes a una temperatura aproximada de 5 °C. Fueron transportados al laboratorio de Nutrición y Fisiología del IIO de la UABC, donde se congelaron a -80 °C en un ultracongelador marca REVCO modelo Ultra II, hasta su análisis.

### **4.1.2 ABULONES DE CRIADERO**

Se obtuvieron 20 abulones *Haliotis fulgens* de una talla aproximada de 4 cm de BC Abalone, S.A. de C.V. localizado en el ejido Eréndira. Se transportaron a una temperatura aproximada de 10 °C en una hielera con congelantes y una cama de algas. En el laboratorio de bioensayos del IIO (UABC), se fueron aclimatando poco a poco a las condiciones de cultivo hasta una temperatura (18 °C). Se dividieron en 2 lotes de los cuales uno de ellos se les puso en 2 cubetas de plástico con capacidad de 1 galón con 5 individuos cada una, con agua de mar a flujo y aireación constante y se siguió la misma alimentación que tenían en la granja (*Egregia sp.* y *Macrocytis p.*) hasta su sacrificio y obtención de estómagos, donde el tiempo de estancia en el estanque no fue mayor de una semana. El otro lote, se usó para el ensayo de laboratorio.

### **4.1.3 ABULONES DE LABORATORIO**

A éstos organismos, se les dió un periodo de acondicionamiento a los animales a comer alimento balanceado por dos semana. Se mantuvieron en un estanque con agua de mar filtrada a flujo y aireación constante a una temperatura promedio de 18 ° C. Fueron puestos en unidades de digestibilidad a las cuales se les podían acoplar tubos de centrifuga para coleccionar heces (figura 1) y fueron mantenidos en estas condiciones hasta la obtención de los estómagos.

### **4.2 TOMA DE MUESTRAS**

Los animales mantenidos en el laboratorio, se retiraron de su refugio y fueron puestos boca arriba en una caja petri y se metieron el congelador (-10 °C) por un espacio de 5 a 10 minutos para anestesiarlo. Posterior al desconche, se retiró el estómago el cual se lavó con agua de mar, y se le tomó su peso. Una vez pesado, el estómago se lavó con una mezcla estéril de agua de mar y agua destilada (66% H<sub>2</sub>O mar y 34% H<sub>2</sub>O destilada) y se transportó a un área estéril.

En éstas condiciones la parte externa del estómago se raspó con una hoja de bisturí para tratar de eliminar las bacterias en la parte externa, y se lavó nuevamente con agua de mar hasta considerar que la parte externa estuvo completamente limpia.

Para la recuperaci3n de las heces, se usaron las unidades de digestibilidad donde los animales fueron alimentados por la noche y en la mañana siguiente se les retiró el alimento no consumido, se limpiaron las unidades antes de acoplar un

tubo de centrífuga, el cual fue retirado 6 horas después y fue guardado hasta su uso. Se utilizaron como blancos 2 unidades de digestibilidad sin animales a las cuales se les realizó el mismo tratamiento que para las muestras.

Las muestras se centrifugaron (centrífuga IEC mod. HN-SII) por 10 minutos a una velocidad de 3000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se agregó la mezcla de agua estéril para lavar la muestra, y posteriormente se volvió centrifugar bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió una vez más. Una vez lavadas las muestras, se les agregó 10 ml de agua de mar estéril y se manejó igual que las muestras de estómagos.

En el caso de las algas, éstas fueron tomadas de las cubetas donde se encontraban con los abulones y en una caja de petri se pusieron en una área estéril donde se les enjuagó varias veces con la mezcla de agua estéril, cambiándolas cada vez de plato, todo el material estéril. De las algas, se hicieron improntas directas con el plato de medio Zobell.

Por último, el alimento fué puesto en mallas en las unidades de digestibilidad sin animales, durante un periodo de inmersión de 4 horas. Posteriormente se retiró la malla y se lavó con agua de mar estéril y se cambiaron a un tubo de ensaye estéril donde se hicieron otros 2 lavados. Se les agregó 10 ml de agua estéril y se les realizó el mismo proceso que los estómagos.

### **4.3 HOMOGENEIZACIÓN**

Una vez lavado el estomago, se pone en un vaso estéril con el mismo peso-volumen de agua de mar 66% y se procede con el homogeneizador de tejidos (Tissue tearor) por 1 minuto. Para el caso de los abulones silvestres, el homogeneizador no fue suficiente porque los estómagos eran muy grandes por lo que se uso una licuadora, las aspás fueron esterilizadas por inmersión en una solución de cloruro de benzalconio al 12% por 30 minutos y el vaso fue sometido a esterilización por autoclave. El proceso de homogeneizado en la licuadora fue de 120 segundos.

Una vez hecho el homogeneizado se traspasaron 10 ml a un tubo de ensaye estéril y a partir de éste se hacen diluciones seriales de 1 en 10 ml hasta  $10^9$ , en tubos con agua de mar 66% estéril. De cada uno de los tubos se toman 100 microlitros por barrido con una varilla de cristal posterior a una mezcla en el vortex (Genie 2) por 10 segundos. Se siembran 4 cajas por dilución: para incubación aerobia en medio Zobell sólido al 66% de agua de mar (por duplicado), para incubación anaerobia facultativa en medio Zobell sólido al 66 % de agua de mar (en estufa de vacío) y para vibrios en medio TCBS, y se incuban de 2 a 7 días.

### **4.4 AISLAMIENTO**

Se hacen conteos a las 24 y 48 horas de incubación y hasta el quinto día se realizan los aislamientos de cada una de las cepas. Se realizaron los pases necesarios hasta obtener la pureza de cada cepa, para verificarla se realizó la

tinción de Gram. Para algunas cepas se prepararon medios enriquecidos, como es el caso del Zobell al 66% de agua de mar, enriquecido con estómago de abulón homogeneizado al 1 %, para tratar de poner en disponibilidad a la bacteria, algunos metabolitos que faltaran en un medio normal. Además también se elaboró un medio Zobell líquido al 66% de agua de mar enriquecido con extracto de carne al 1% para tratar de recuperar algunas cepas que no mostraban crecimiento.

#### **4.5 PRUEBAS DE CARBOHIDRATOS**

Para las pruebas de carbohidratos se utilizaron: Carragenano, Alginato, Laminarín, Xylan, Fucoïdan y Manan a una concentración de 1%. Se usó como medio base el Zobell líquido al 66% de agua de mar y como indicador de pH al rojo de fenol. Para registrar producción de gas, el medio se sirvió en tubos de 10 ml con tubo Durham invertido.

Para la celulosa se utilizó papel Whatman No. 1 previamente lavado y secado a peso constante durante 1 h. El papel se marcó, se pesó y se puso dentro de los tubos con medio Zobell líquido al 66% de agua de mar para su esterilización, posteriormente se inoculó y se incubó durante 7 días. Al final se tomó el peso constante del papel y por diferencia de peso se obtuvo la degradación de la celulosa. Para los blancos, el papel se pesó a los 7 días sin inoculación, sin encontrar diferencias significativas entre el peso inicial y el final ( $P < 0.05$ ).

#### **4.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Se hicieron pruebas extras para diferenciación: SIM, Glucosa, Sacarosa, Lactosa, Gelatina, Citrato, Rojo de Metilo y Voges Proskawer, todas elaboradas con la mezcla de agua de mar, así como la prueba de Catalasa con peróxido de hidrógeno y la de Oxidasa con una solución de hidrocloreuro de dimetil-para-fenilendiamina.

#### **4.7 KIT CRYSTAL**

Para la identificación de los organismos se usó el sistema de identificación Crystal de BBL (Becton Dickinson), los cuales incluyen 29 y 30 pruebas cada kit. Las pruebas se manejaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y los resultados se dan con base en un patrón colorimétrico el cual nos indica la actividad enzimática.

## 5 RESULTADOS

En total, se trataron 19 estómagos de abulon de tres diferentes localidades o antecedente alimenticio: 5 de laboratorio, 6 de granja y 8 silvestres. En 4 de los abulones silvestres no creció absolutamente nada. Los resultados de los demás estómagos se presentan en el cuadro 1. Veintiséis por ciento de las bacterias obtenidas inicialmente fueron perdidas a lo largo del proceso para llegar a su identificación. Algunas de ellas fueron sembradas con un inóculo de contenido digestivo de abulón y tampoco crecieron.

Según el cuadro 2, se observa que para cada uno de los diferentes muestreos, se aislaron bacterias que degradaban alguno o varios de los carbohidratos contenidos en las algas elegidos para probar. En este se observa que los organismos cultivados son los que cuentan con un mayor número de bacterias con actividad para degradar los diversos polisacáridos mientras que los silvestres mostraron en general mayor número de bacterias con actividad para degradar agar.

En cuanto al porcentaje de bacterias con actividad carbohidrasa (Cuadro 3), se puede observar que las actividades más frecuentemente encontradas fueron la de degradación para alginato y laminarén.

En los cuadros 4, 5, 6, 7 y 8, se agruparon las bacterias no identificadas, según su origen (de los tres grupos). Los códigos fueron asignados de acuerdo a los resultados que se obtienen en el kit de BBL CRYSTAL. Varias bacterias

similares (según el código de identificación) se encontraron dentro de los diferentes grupos

De la actividad celulolítica se encontró gran variedad de grados de degradación, por lo que se dividieron por niveles en donde de 0 a 1.99 la actividad se consideró como muy baja; de 2 a 3.99 de actividad baja; de 4 a 5.99 de actividad moderada; de 6 a 7.99 de actividad media; de 8 a 9.99 de actividad alta y de 10 a 11.99 de actividad muy alta. En las figuras 1, 2, 3 y 4, se muestran las gráficas de las actividades de celulosa de las bacterias aisladas de abulones silvestres, cultivados, de laboratorio, y en la última, de heces y algas. Para la Figura 1, los abulones de vida libre cubrieron casi todos los niveles de degradación de celulosa incluyendo las 3 cepas que más degradaron celulosa. En los abulones cultivados, la mayoría de las bacterias observó actividad de moderada a baja (figura 2).

En los estómagos de abulón del laboratorio (Figura 3), la actividad que se presentó con mayor frecuencia fue la moderada. Para la Figura 4, se incluyeron ahí a los organismos con actividad celulolítica aislados de heces y tan sólo 1 de algas. De ésta última, el nivel fué moderado con un 4% de pérdida y las de heces con 2 en el mismo nivel y uno en el de baja actividad.

Cuadro 1. Número de colonias totales de bacterias obtenidas por cada estómago de abulón en medios Zobell (para aerobias y anaerobias facultativas) y TCBS (Vibrios).

ABULONES	Peso g	Aerobias	Anaerobias F.	Vibrios	Total	UFC/g	
<b>SILVESTRES</b>	1	88.23	0	2	10	--	
	2	146.0	8	4	14	1.21X10 <sup>3</sup>	
	3	64.9028	9	6	14	1.9X10 <sup>2</sup>	
	4	89.0658	7	7	14	--	
<b>CULTIVADOS</b>	1	1.773	9	10	23	7.2X10 <sup>4</sup>	
	2	1.6586	7	7	17	3.0X10 <sup>2</sup>	
	3	1.9512	8	6	15	3.0X10 <sup>2</sup>	
	4	1.2326	2	7	10	3.6X10 <sup>4</sup>	
	5	2.3736	5	5	14	14.25X10 <sup>5</sup>	
	6	14.4200	6	5	3	14	4.35X10 <sup>3</sup>
<b>LABORATORIO</b>	1	2.8975	2	3	6	11	--
	2	4.4142	2	6	0	8	2.31X10 <sup>4</sup>
	3	3.7154	13	0	0	13	--
	4	3.0063	9	2	0	11	4.7X10 <sup>2</sup>
	5	3.2360	10	4	1	15	4.8X10 <sup>4</sup>

Cuadro 2. Actividad de degradación hacia diferentes carbohidratos a partir de las colonias de bacterias aisladas.

CARBOHIDRATO	HECES	CEDROS	LABORATORIO	ERENDIRA
Alginato	1	3	3	13
Carragenano	1	3	3	15
Mannan	1	2	1	13
Fucoidan	1	2	1	12
Laminaran	1	1	4	14
Xylan	1	0	4	12
Agar	1	11	1	3

Cuadro 3. Porcentajes de bacterias con capacidad de degradación a los diferentes carbohidratos.

CARBOHIDRATO	% BACTERIAS
Alginato	22.72
Carragenano	25
Mannan	19.3
Fucoidan	18.18
Laminaran	22.72
Xylan	19.3
Agar	16.3

Cuadro 4. Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de abulones **silvestres** (Isla de Cedros) según el sistema de identificación BBL CRYSTAL

ID	ABULON	CODIGO
4	1	
5	1	
2	1	
34	1	2003300202
35	1+	2440011427
16	2	2002200000
8	2	
7	2	4765637506
22	3	0221320002
20	3	3002200202
18	3	3203330113
21	3	5320202040
141	4	0021300000
139	4	2000000000
143	4	2000200000
142	4	2202220002
138	4	2302220002
140	4	3001300200
135	4	3003300212
136	4+	1521004121
137	4	2361174122
157	5	
153	5	0221100000
152	5	7220000000
155	5+	0664000160
154	5+	1765004571
175	5	

Cuadro 5. Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de abulones **cultivados** (Eréndira) según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.

<b>ID</b>	<b>ABULON</b>	<b>CODIGO</b>
41	1	
42	1	
40	1	
45	1	2002244402
47	1	4666424000
67	1+	1545000140
63	2	2000000000
70	2	2000000000
69	2	6002000010
61	2	6022400044
97	2+	3661004632
62	2	
64	2	4400444404
88	2+	0144677045
83	3	0301504000
81	3+	1765005061
84	3+	2674575772
80	3+	3761005130
58	3	2204000040
55	3	6002000000
98	4	
93	4	
102	4	6066666404
103	5	0002000002
111	5	2000000000
105	5	
107	5	3000200000

Cuadro 6. Códigos de identificación para bacterias aisladas de estómagos de  
 abulones de **laboratorio** según el sistema de identificación  
 BBL CRYSTAL.

<b>ID</b>	<b>ABULON</b>	<b>CODIGO</b>
24	1	2442204202
176	2	2662644022
178	2	1221300002
181	2	5724440040
182	2	2002200202
186	3	0362264022
190	3	2000200200
185	3	2222244022
187	3	2260244020
188	3	2320002000
189	3	2322224022
184	3	2362264022
191	3	0104436040
199	4	1561000100
201	4	4320002040
203	4	2000000000
204	4	3760266000
207	4	2000000000
206	4	2062200206
220	5	██████████
211	5	0220200200
212	5	0320046000
208	5	██████████
210	5	2022200000
213	5	2336204220
215	5	2000000000
217	5	██████████
214	5	4444540440
219	5	2002200022

Cuadro 7. Códigos de identificación para bacterias aisladas de heces de los abulones de laboratorio según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.

<b>ID</b>	<b>MUESTREO</b>	<b>CODIGO</b>
126	1	2363324202
124	1	3243204202
123	1	4424444444
131	2	0022220000
132	2	2002200300
133	2	2200200202
134	2	6002200002
148	3	1000000000
149	3	2000000002
150	3+	0454004040
145	3+	1765000165

Cuadro 8. Códigos de identificación para bacterias aisladas de improntas de algas procedentes de Eréndira según el sistema de identificación BBL CRYSTAL.

<b>ID</b>	<b>MUESTREO</b>	<b>CODIGO</b>
118	ALGA	2642204202
122	ALGA	1121004100

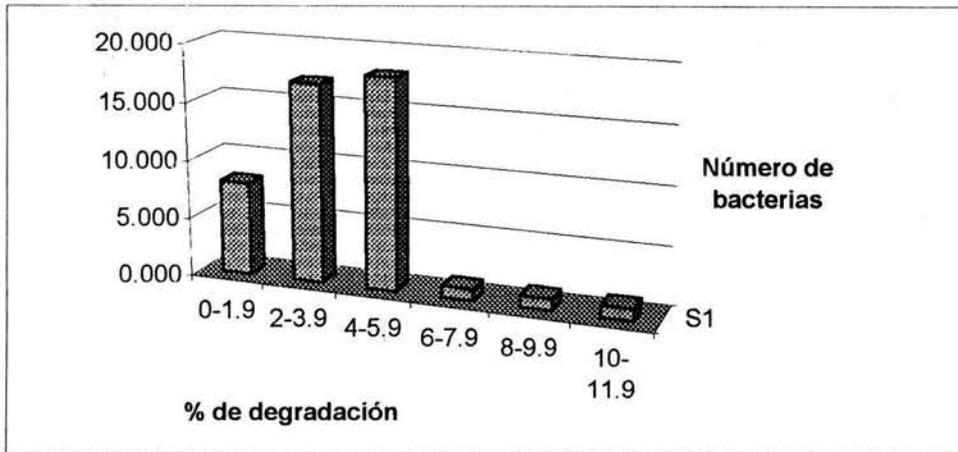


Figura 1. Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos **silvestres**

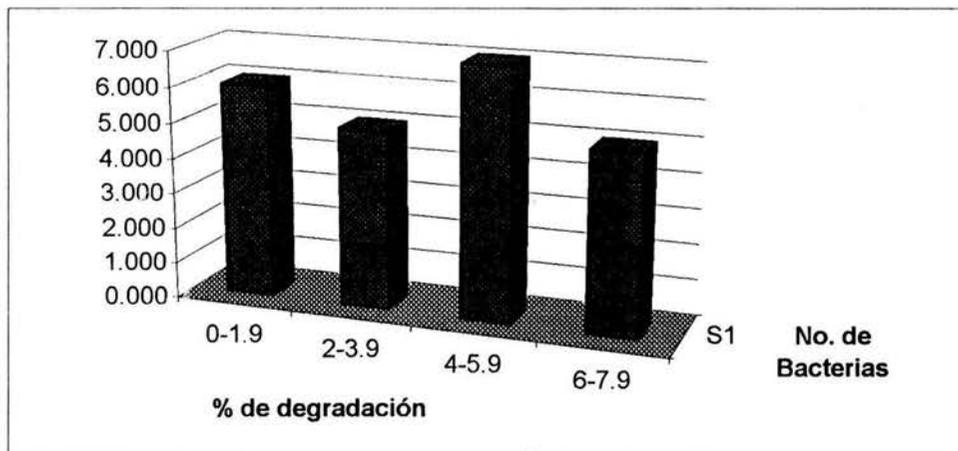


Figura 2. Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos **cultivados**

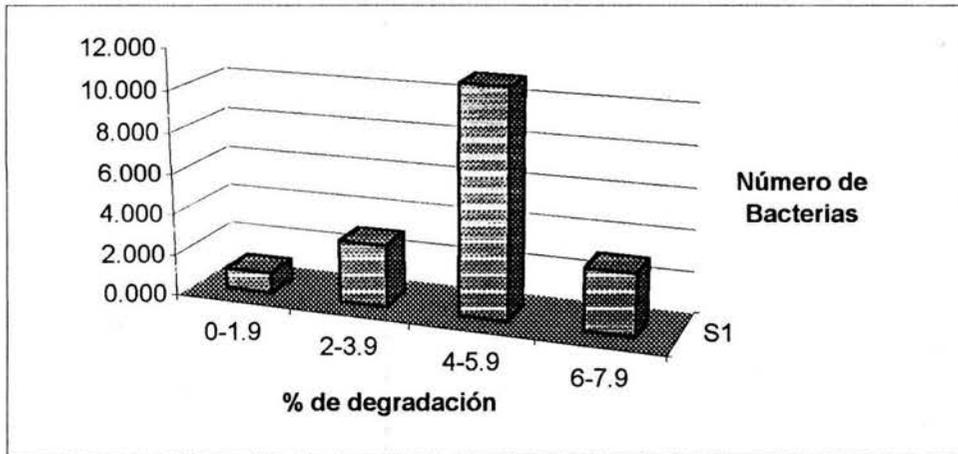


Figura 3. Actividad celulolítica de bacterias aisladas de estómagos de **laboratorio**

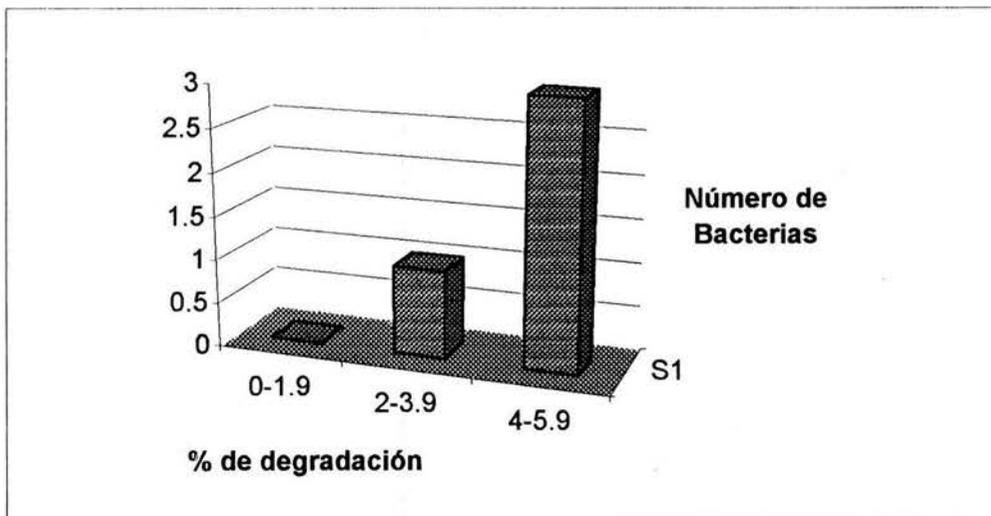


Figura 4. Actividad celulolítica de bacterias aisladas de **heces** de organismos de laboratorio y 1 **alga**.

Cuadro 9. Bacterias identificadas a nivel de género aisladas del contenido digestivo de abulón de las diferentes localidades.

<b>ID Asignada</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>RESULTADO DE BBL CRYSTAL</b>
ACB 4	Isla de Cedros	<i>Acinetobacter</i>
ACC 5	Isla de Cedros	<i>Acinetobacter</i>
ACCL 18	Isla de Cedros	<i>Pseudomonas</i>
ACAG 35	Isla de Cedros	<i>Lactobacillus</i>
ACB 155	Isla de Cedros	<i>Haemophilus</i>
ACRC 141	Isla de Cedros	<i>Acinetobacter</i>
ACA 135	Isla de Cedros	<i>Alteromona/ Chromobacter</i>
ACAC 139	Isla de Cedros	<i>Acinetobacter</i>
ACBA 140	Isla de Cedros	<i>Pseudomonas / Flavobacterium</i>
ACA 135	Isla de Cedros	<i>Chromobacterium</i>
AERN 67	Eréndira	<i>Rhodococcus</i>
AECP 62	Eréndira	<i>Acinetobacter</i>
AEB an 88	Eréndira	<i>Staphylococcus</i>
AEACL 83	Eréndira	<i>Yersinia</i>
AEAC 81	Eréndira	<i>Micrococcus</i>
AEB 84	Eréndira	<i>Bacillus</i>
AECT an 103	Eréndira	<i>Acinetobacter</i>
ALCT 188	Laboratorio	<i>Pseudomonas / Flavobacterium</i>
ALAD 203	Laboratorio	<i>Acinetobacter</i>
ALCRA 207	Laboratorio	<i>Pseudomonas</i>
ALN an 181	Laboratorio	<i>Enterobacter</i>
ALT an 220	Laboratorio	<i>Acinetobacter/ Yersinia</i>
ALCPA 212	Laboratorio	<i>Pasterellaceae</i>
ALA 199	Laboratorio	<i>Micrococcus</i>
ALAMC 131	Heces	<i>Yersinia</i>
ALACC 148	Heces	<i>Acinetobacter</i>
ALAM 145	Heces	<i>Micrococcus</i>

Cuadro 10. Bacterias catalogadas por el método CRYSTAL BBL como del género *Shigella*.

<b>ID Asignada</b>	<b>CODIGO BBL</b>	<b>COLORACION DE COLONIA</b>
ACAM 16	2002200000	Amarillo Canario Brillante
ACAC 153	0221100000	Amarillo Canario
ACAF 143	2000200000	Amarillo fuerte
AERG 40	2002200002	Rosa Grande
AECCI 58	2204000040	Crema Claro Lisa
AECH 55	6002000000	Crema en Hondas
AACP 62	0220000000	Crema Pequeñas
AEAC 63	2000000000	Amarillo Crema
AEVVP 70	2000000000	Verde en Puntilleo
AECT 111	2000000000	Crema Transparente
AECA 107	3000200000	Crema- Amarillo
ALAP 210	2022200000	Amarillo Pálido
AHLACL 149	2000000002	Crema Líquida
ALAD 215	2000000000	Amarillo Difuso

## 6 DISCUSIÓN

El sistema de identificación BBL CRYSTAL es un método miniaturizado de identificación rápida y de fácil uso para bacterias. Este método se basa en la identificación mediante un perfil metabólico donde se prueban entre 28 y 30 actividades enzimáticas, las cuales al dar un resultado colorimétrico que refleja un patrón característico único, da un código numérico. Este, es comparado en su banco de datos para llegar a la identificación completa hasta nivel de especie. La base de datos de BBL para la identificación de los organismos está hecha con base en los patógenos clínicos más comunes en humanos, por lo que este tipo de sistemas es de gran utilidad para identificar a aquellas bacterias ya descritas, por lo que dificulta la identificación de bacterias acuáticas.

Sin embargo, el uso de este sistema permitió trabajar con las bacterias del presente trabajo aunque resultara en códigos únicos y no necesariamente en bacterias a nivel de género y/o especie. Asimismo se colorearon los códigos que aparecen repetidos dentro de los mismos grupos, como si aparecen en otro grupo, por lo cual, se puede observar que los diferentes tipos de organismos comparten cepas bacterianas similares. Cabe resaltar que en el futuro será de suma importancia lograr la identificación completa de las bacterias con actividades interesantes aquí señaladas.

Por contaminación por hongos y porque algunas bacterias sembradas que nunca mostraron crecimiento nuevamente, se perdieron aproximadamente el 26% de las bacterias, incluyendo en estas, casi todos los vibrios. Con respecto a las

bacterias analizadas, de un total de 98 sólo 27 se identificaron hasta género (ver cuadro 9). Si bien no son pocas, constituyen un 30% de las identificadas, donde se observa claramente que el *Acinetobacter* es la bacteria más frecuente en todas las poblaciones analizadas, seguida por *Micrococcus* y a las *Pseudomonas-Flavobacterium* presentes en animales silvestres y de laboratorio. Bacterias que ya han sido reportadas en abulón (Harris *et. al.*, 1998<sup>a</sup>; Sawabe *et al.*, 1995) así como en bivalvos (Preiur *et al.*, 1990), en asociación a colonias coralinas (Rohwer *et al.*, 2002) y en algas (Shiba y Taga, 1980). Por lo anterior, podemos apuntar que tanto *Acinetobacter*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* son bacterias que se encuentran comúnmente en sistemas marinos, asociados a diversos organismos, por lo cual no es raro encontrarlas en la flora aislada de *Haliotis fulgens*. Inclusive Bisset *et al.*, (1998) aislaron bacterias asociadas al alimento de abulón sumergido en el agua y las probaron contra diferentes carbohidratos. Se encontró que ni las *Pseudomonas* ni el *Acinetobacter* degradaron los carbohidratos que ellos probaron, que en este caso fueron harina de trigo y alginato; en nuestros resultados tampoco tuvieron actividad sobre los carbohidratos probados.

Cabe señalar que en el presente trabajo, tanto *Acinetobacter* como *Pseudomonas* están incluidas dentro del grupo de bacterias con actividad celulolítica, actividad que resultó tener diferentes niveles sobre la degradación de celulosa. El *Acinetobacter* está ubicado dentro del grupo de bacterias con baja o nula actividad, donde sólo uno de los 8 casos presenta una actividad moderada,

por lo que no podemos decir que este género tenga un papel importante en la degradación de la celulosa.

Las actividades aquí presentadas se obtuvieron a partir de bacterias puras, lo cual no podría descartar el hecho de que 2 o más bacterias observen un efecto sinérgico sobre la actividad de un sustrato como ocurre en rumiantes (Yokoyama y Johnson, 1988). En éstos, la gran diversidad en microorganismos en un sistema pequeño y complejo, las interacciones entre ellos son esenciales para la sobrevivencia donde la complejidad de estas interacciones hacen difícil su estudio. Algunas de las investigaciones han combinado cepas puras, sin llegar a ninguna conclusión en concreto (Yokoyama and Johnson, 1988), por lo mismo, sólo con la combinación de cepas se podrá elucidar que género o grupo de microorganismos es importante para la degradación de la celulosa.

Hay que hacer notar el hecho de que varias cepas catalogadas como diferentes en los códigos, fueron identificadas según el sistema de cristal como pertenecientes al mismo género. Este hecho no puede descartar que se trate de los mismos géneros bacterianos, simplemente son diferentes especies. Si el aislamiento inicial fué hecho de acuerdo a la apariencia de las colonias, como color y forma para llegar a formar bloques distintos, es difícil pensar que bacterias que crecen sobre un mismo medio con colores y formas diferentes pertenezcan a la misma especie, aunque a final de cuentas sean del mismo género. Por ejemplo, en el cuadro 10 se puede apreciar que diferentes tipos bacterianos de colonias con colores y morfología diferentes, cuentan además con código de BBL diferentes, sin

embrago todas fueron catalogadas por la base se datos de BBL como pertenecientes al genero *Shigella*. Sin embrago, no podemos descartar que se trate de algún género marino que comparta las características enzimáticas que usa el sistema BBL para identificar a *Shigella*.

El número de bacterias presentes como colonias totales, entre los diferentes grupos de abulones fué diferente. Esto no es difícil de entender, ya que por un lado, unas muestras fueron analizadas en fresco mientras que otras habían sido congeladas, lo cual hace difícil comparar los resultados de bacterias totales. Por otro lado, todos los grupos eran mantenidos con diferentes regimenes de alimentación lo cual debe conferir diferencias en el tipo y número de colonias bacterianas.

Es así que el número de bacterias como colonias totales, entre los diferentes grupos de abulones fué diferente, pero las comparaciones resultan inútiles al considerar que los estómagos silvestres tuvieron un manejo distinto en el proceso de congelación. Inclusive en algunos de los homogeneizados de estómagos de abulón silvestre no hubo crecimiento alguno y esto se atribuyó al hecho de no haber tenido un buen proceso de congelación, pero aun en los estómagos de los que se pudieron aislar bacterias, el número de UFC por gramo de estómago fue bajo ( $1.9 \times 10^2$ ) con respecto al peso de los estómagos cuyo promedio era de 97.04 g. A este respecto podemos mencionar que éstos fueron tomados del medio natural y congelados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Este proceso de ultracongelación

conlleva a un 18.69% de mortalidad de las bacterias totales (Enríquez, 1999), lo cual influyó en la viabilidad de bacterias para este estudio.

Tanto los abulones de cultivo como los de laboratorio fueron analizados en fresco, donde ambos grupos pertenecían al mismo lote de organismos sólo que el segundo grupo se procesó después de 3 meses con una alimentación distinta. Se observa claramente que los abulones procedentes de cultivo son los que tuvieron un mayor número de UFC producidas por gramo de estómago así como un mayor número de aislamientos bacterianos. Los abulones en cultivo están expuestos a una gran variedad de alimentación donde se practica la rotación de macroalgas, ofreciéndoles diversas especies, tanto de algas rojas como pardas, lo cual con seguridad les da una alimentación variada en cuanto al tipo de sustratos resultando en un espectro amplio sobre la producción de bacterias. Esto es un fenómeno conocido en organismos terrestres y se puede ver claramente en rumiantes cuando experimentan un cambio en la alimentación, donde la población microbiana decrece hasta en un 20%, para ser recuperada después de un tiempo y aumentar hasta un 12% (Dehority y Orpin, 1988).

En los abulones de laboratorio, puede decirse que el tipo de alimento y la homogeneidad del mismo, tuvo una influencia directa tanto en el número de bacterias totales como de la variabilidad de éstas en el tracto digestivo. Esto significa probablemente, que al contar con un alimento homogéneo, como el balanceado con un alto contenido de proteína, pudo haber ocasionado una reducción bacteriana.

Otra cosa que resulta interesante apuntar es que en el presente trabajo se cultivaron sólo bacterias aerobias y anaerobias facultativas, por lo que resultará de gran importancia en el futuro analizar que es lo que está ocurriendo con bacterias anaerobias en estas poblaciones. El hecho de que existan anaerobias facultativas nos indica que existan las anaerobias debido a que éstas consumen el poco oxígeno que entra al estómago, dando lugar a la anaerobiosis y esto nos lleva a que probablemente no estemos tomando en cuenta algunas otras actividades enzimáticas importantes.

Aparte de las pruebas bioquímicas del kit de identificación, diversas actividades sobre las polisacaridas fueron efectuadas de manera paralela para lograr caracterizar de una manera específica y directa su actividad. Estos carbohidratos fueron: alginato, carragenano, fucoidan, laminarín, manan y xylan. En el cuadro 3 se observa que las actividades sobre estos carbohidratos, van desde un 16 hasta el 23% de actividad sobre uno u otro carbohidrato y que de las bacterias con actividad carbohidrasa, se puede observar que las actividades más frecuentemente encontradas fueron la de degradación para alginato y laminarín, que son de algún modo, los carbohidratos presentes en mayor proporción en las algas.

De esta manera se observó que del total de las 98 bacterias 51 no mostraron ninguna actividad sobre ninguno de los carbohidratos probados, pero esto se explica del mismo modo que en el rumen, donde gran cantidad de microorganismos estan siendo introducidos constantemente al sistema digestivo

vía alimento y agua, pero no llegan a tener nunca una influencia directa en la digestión porque no llegan a competir exitosamente con los microorganismos residentes (Yokoyama y Johnson, 1988).

Cabe aclarar que las pruebas de polisacáridos se realizaron a pH 7.6 y por lo mismo, no se puede descartar el que algunas bacterias tengan mayor actividad a pHs diferentes. Para la prueba de celulosa se usó un pH de 5.5 igual que en los medios de cultivo sólidos (ver anexos). Por lo que podemos decir que las bacterias tienen un papel importante en cuanto a la presencia de polisacaridas en el contenido estomacal y que deben de tener un papel importante a nivel nutricional al poner a disposición del organismo residente, carbohidratos más simples para ser utilizados.

Para la actividad celulolítica, se hizo una corrección de la diferencia de pesos con respecto a los blancos y el resultado demostró que la mayoría de las cepas cuenta con diferentes grados de actividad celulolítica, por lo que se agruparon en niveles de actividad celulolítica y se muestran en la Figura 4. En esta figura, se puede observar que prácticamente en todas las categorías de aislamientos hay bacterias con actividad sobre la celulosa en diferentes niveles. En 2 de los casos, los papeles se deshacían y en la otra no, pero no tomamos en cuenta el grosor del papel que es donde podía haber una pérdida aparente. De ahí, la mayor parte de los organismos tuvieron actividades moderadas a bajas.

Garland *et al.* (1985), observaron que las bacterias de la materia fecal de *Haliotis rubra*, permanecen viables y sugieren que pueden tener actividades metabólicas en el sistema digestivo donde tienen un papel significativo para el abulón. Sin embargo, según los códigos aislados para este experimento, en el grupo de heces no hay ningún código que se repita en ninguno de los contenidos estomacales de ninguna de las diferentes poblaciones, no así en las bacterias identificadas, donde el *Acinetobacter* y la *Yersinia* presentes en estómago de los animales de laboratorio están presentes también en las bacterias aisladas de las heces de éstos mismos animales. Sin embargo, ya hemos mencionado que el *Acinetobacter* no tiene ninguna actividad sobre carbohidratos y en este caso, las *Yersinia* tampoco mostró actividad alguna, por lo que podríamos decir que estas bacterias pasan a través del tracto intestinal como transitorias por no aportar ningún beneficio al abulón y al no poderse fijar, por haber una población residente de bacterias que forman parte de la flora saprófita.

De acuerdo a Moo-Young (1992), las acciones de las celulasas y las xylanasas son sinérgicas sobre substratos, especialmente de microorganismos aislados de medio ambientes donde los carbohidratos existen en abundancia. Sin embargo, cabe resaltar que en el presente trabajo, de las cepas catalogadas con actividad celulolítica media alta y muy alta, hay 7 cepas. De éstas, sólo 2 de cepas (la 9 y la 10) degradaron otros carbohidratos (agar, carragenano y alginato). Otras 2 no degradaron ninguno de los carbohidratos de algas que probamos, ni siquiera los carbohidratos más simples (glucosa, sacarosa o lactosa), y las otras 3

sólo degradaron azúcares simples como glucosa (3), sacarosa (2) y lactosa(1). Es así que en el presente trabajo no se puede afirmar lo mismo que dicho autor (Moo-Young, 1992).

Resumiendo, la actividad aquí presentada por las bacterias es de suma importancia no sólo para la digestibilidad de los carbohidratos complejos presentes en el alimento natural sino también para posibles usos en el futuro con un enfoque industrial, médico ó a nivel nutricional para el uso de éstas bacterias como probióticos en alimentos para diversas especies así como para investigación. Al parecer aquí se presentan bacterias con actividades novedosas que anteriormente no habían sido descritas, y por lo mismo, se recomienda seguir profundizando en el tema para lograr su identificación e investigaciones futuras.

## **7. CONCLUSIONES**

Las bacterias digestivas de los abulones tienen un papel importante en la degradación de los carbohidratos complejos de las algas, favoreciendo al abulón nutricionalmente.

Las bacterias con la actividades sobre carbohidratos complejos más importantes no han sido identificadas aún y es necesario tratar de identificarlas a nivel molecular ya que podrían ser de utilidad para la industria por su actividad novedosa.

Existen diversos niveles de degradación de celulosa por parte de las bacterias y no se puede descartar que exista una asociación sinérgica para la degradación de moléculas complejas entre 2 o más bacterias y/o microorganismos.

El método de identificación BBL CRYSTAL, no cuenta con una base de datos adecuada para identificar bacterias marinas, por lo que sería de gran utilidad comenzar a hacer una en la cual se puedan identificar bacterias marinas de manera específica y rápida.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, L.A. and Chapman, F.A. 1981. Evaluation of kappa carrageenan as a substitute of agar in microbiological media. *Acta Microbiol.* 128: 355-359.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1981. Interactions of Microorganisms with Animals. Chapter 10. in *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*. Addison-Wesley Publishing Co.
- Austin, B. 1981. Methods in aquatic bacteriology. *Modern Microbiological Methods*. John Wiley & Sons. USA 424pps.
- Austin, B. 1992. *Marine microbiology*. Cambridge University Press. Gran Bretaña
- Bautista-Teurel, M.N. and Millamena, O.M. 1999. Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*: protein/energy levels. *Aquaculture* 178: 117-126.
- Bisset, A., Burke, C., Dunstan, G.A., and Maguire, G.B. 1998. Bacterial colonization of formulated abalone diet during extended immersion. *J. of Shellfish Research*. 17 (4) : 995 -1002.
- Clark, A. G. And Jowett, D.A. 1978. Hydrolitic enzymes of the paua *Haliotis iris*, a marine gastropod (Note). *NZ. Journal of Marine and Freshwater Research*. 12 (2):221-222.
- Davis, C.L. 1992. Production of laminarase and alginase by marine bacteria after starvation. *Microbiology Ecology*, 86: 349-356.
- Dawson, E.Y., Neushul M. y Wildman, R.D. 1960. Seaweeds associated with kelp beds along Southern California and Northwestern Mexico. *Pac. Nat.* 1 (14): 25-81

- Dehority, B.A. and Orpin, C.G. 1988. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. in *The Rumen Microbial Ecosystem* ed. by Hobson, P.N. Elsevier. USA. 151-183.
- Doeschate, K., Macey, B.M. and Coyne, V.E. 2000. Characterisation of the enteric bacteria of the abalone *haliotis midae*, and their role in the digestion of ingested seaweed. *Abstract, J. Shellfish Research*. 19 (1): 509.
- Elyakova, L.A., Shevchenko, N.M. and Avaeva, S.M. 1981. A comparative study of carbohydrase activities. in *Marine Invertebrates. Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 905-908.
- Enríquez, G.A. 1999. Digestibilidad *in vitro* de la celulosa en el abulón *Haliotis fulgens*. Tesis Licenciatura, UABC. Ensenada, Méx.
- Enríquez G.A., Viana, M.T., Vásquez, C. and Shimada, A. 2001. Digestion of cellulose by stomach homogenates of abalone (*Haliotis fulgens*). *Jour. of Shellfish Res.* 20 (1) 297-300
- Erasmus, J. H. 1996. The role of enteric bacteria in the abalone *Haliotis midae*. Tesis de Maestría. University of Cape Town.
- Erasmus, J. H., Cook, Peter A, Coyne, V. E. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*, 155: 377-386.
- Fahey, G.C.Jr. and Berger, L.L. 1988. Carbohydrate nutrition of ruminants. in *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. D.C. Church, Editor. Prentice Hall. pp: 269-297.

- Filho, E.X.F., Ximenez, F.A., Fonseca, A.S. and Ximenez, E.A. 1997. Xylan - degrading enzyme production by solid - state cultures of aerobic fungi. *Rev. Microbiol.* 28: 22-28.
- Flint, H.J., Forsberg, C.W. 1995. Polysaccharide degradation in the rumen: biochemistry and genetics. Chapter 2 in *Ruminant physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the eighth International Symposium on ruminant physiology.* pp: 43 - 70
- García-Hernández, V.C. 1988 distribución de macroalgas asociadas a bancos de abulón en Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura, Biología marina. UABCS.
- Garland, C.D., Cooke, S.L., Grant, J.F. and McMeekin, T.A. 1985. Ingestion of the bacteria on and the cuticle of crustose (non-articulated) coralline algae by post-larval and juvenile abalone (*Haliotis ruber leach*) from tasmanian waters. *J. Chem. Soc.* :7035-7041.
- Gómez M., L.E. 2002. Efecto de la razón proteína-energía sobre el crecimiento y metabolismo de juveniles en al abulon azul (*Haliotis fulgens*). Tesis de Maestría en ciencias. UNAM. 45pp.
- Gómez-Montes, L.E., García-Esquivel, Z., D'Abramo, L.R., Shimada, A., Vásquez-Peláez, C. and Viana, M.T. 2003. Effect of dietary protein/energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. *Aquaculture.* 220: 769-780.
- Guzmán del Proó; S.A., Mille-Pagaza, S.R., Guadarrama-Granados R., De la Campa-De Alcocer S. y Luque -Guerrero, A.C. 1991 La comunidad bentónica de los bancos de abulón (*Haliotis* spp. Mollusca: Gastropoda) en Bahía de Tortugas, Baja California Sur, México. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol., Méx.*, 36:27-59

- Guzmán-Del Proó, S.A. 1992. Biología, ecología y dinámica de la población del abulón (*Haliotis spp*) de Baja California, México. Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto Politécnico Nacional, 188p.
- Harris, Jean M., 1993. The presence, nature, and role of the gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial Ecology*. 25: 195-231.
- Harris, J.O., Burke, C.M. and Maguire, G.B. 1998 (a). Characterization of the digestive tract of greenlip abalones, *Haliotis laevis* *donova*. I. Morphology and histology. *J. Sh. Res.* 17 (4) : 979-988.
- Harris, J.O.; Burke, C.M. and Maguire, G.B. 1998 (b). Characterization of the digestive tract of greenlip abalones, *Haliotis laevis* *donova*. II. Microenvironment and bacterial flora. *J. Sh. Res.* 17 (4) : 989-994.
- Heck, J.X., Hertz, P.F. and Ayub, M.A.Z. 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 213-218.
- Hernandez-Carmona, G., Rodriguez-Montesinos, Y.E., Torres-Villegas J.R., Sanchez-Rodriguez, I. y Vilchis, M.A. 1989. Evaluación de los mantos de *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta, Laminariales) en Baja California, México. I. Invierno 1985-1986. *Ciencias Marinas*, 15 (2):1-27.
- Knauer, J., Britz, P.J. and Hecht, T. 1996. Comparative growth performance and digestive activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, fed on diatoms and practical diet. *Aquaculture* 140:75-85.
- Lelevier-Grijalva A, M Ortiz-Quintanilla, J González-Aviles, G. Leon-Carballo, J Turrubiates-Morales y M Reinecke-Reyes. 1989. Análisis biológico pesquero del abulón en la

Península de Baja California durante las temporadas de pesca 1981-1988, evaluación y diagnóstico. Secretaría de Pesca. INP. CRIP Ensenada/La Paz, México 137pp

Mackie, R.I., Aminov, R. I., White, B. A., and McSweeney, C.S. 2000 molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. Chapter 4. in Ruminant Physiology, digestion, metabolism, growth and reproduction. Ed by Cronjé, P.B. CABI Publishing pp:61-77.

Marcuzzi, G. and Turchetto L.M. 1978. Contribute to the knowledge of polysaccharases in soil animals. Rev. Ecol. Biol. Sol. 15 (2): 135-145.

Martínez-Díaz, S.F. and Pérez-España, H. 1999. Feasible mechanisms for algal digestion in the king angelfish. Journal of Fish Biology. 55: 692-703

Mateo-Cid, L.E. y Mendoza-González, C. 1994 Estudio florístico de las algas bentónicas de Bahía Asunción. Ciencias Marinas. 20:41-64

Mcbee, H.R. 1971. Significance of intestinal microflora in herbivory. Ann. Rev. Ecol. System 2: 11-15

Moir, R.J. 1991. The role of microbes in digestion, Chapter 3. in World Animal Science Vol. 6. Microbiology of animals and animal products. Ed by J.B. Woolcock. Elsevier, Netherlands.

Monje, H. y Viana, MT. 1998. The effect of cellulose on the growth and cellulolytic activity of abalone *Haliotis fulgens* when used as an ingredient in formulated artificial diets. Journal of Shellfish Research. 17 (3) : 667-671.

- Moo-Young M. 1992. Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulation of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Pergamon, London. 835-845.
- Percival, E. and McDowell, R.H. 1967 Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press London. pp. 219
- Preiss, J. and Ashwell, G. 1962. Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy l-erythro – 5- hexoseulose uronic acid. The Journal of Biological Chemistry. 237 (2):309-316
- Prieur D., Mevel, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. and Vigneulle, M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 28: 277-352
- Rheinheimer, G. 1970. Microbiología de las aguas. Editorial Acribia, España
- Rodriguez-Montesinos, Y.E. y Hernández-Carmona G. 1991. Variacion estacional y geografica de la composicion quimica de *Macrocystis pyrifera* en la costa occidental de Baja California. Ciencias Marinas. 17 (3): 91 - 107.
- Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F. And Knowlton, N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Marine Ecology Progress Series. 243: 1-10.
- Sakata, T. 1989. Microflora of healthy animals. Chapter 7. in Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish Ed. by Austin, B. and Austin, D.A. Edinburgh, Scotland. Pp: 141-161.
- Sauvant, D. and Van Milgen, J. 1995. Dynamic aspects of carbohydrate and protein breakdown and the associated microbial matter synthesis. Chapter 3. in Ruminant

physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the eighth International Symposium on ruminant physiology. pp: 71 -91

Sawabe, T., Ezura, Y. and Kimura, T. 1992. Purification and characterization of alginate lyase from marine *Alteromonas sp.* Nippon Suisan Gakkaishi. 58: 521-527.

Sawabe, T., Oda, Y., Shionimi, Y and Ezura, Y. 1995. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalone. Microb. Ecol. 30: 193-202

Sawabe, T., Ohtsuka, M. and Ezura, Y. 1997. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas sp.* strain H-4. Carbohydrate research. 304:69-76.

Seidere, L.J., Newell, R.C. and Cook, P.A. 1982. Quantitative significance of style enzymes from two marine mussels (*Choromytilus meridionalis* Krauss and *Perna perna* Linnaeus) in relation to diet. Mar. Biol. Lett. 3: 257-271.

Shiba, T. and Taga, N. 1980. Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol. 47: 251-258.

Suzuki, H., Ioriya, T., Seki, T. and Aruga, Y. 1987. Changes of algal community on the plastic plates used for rearing the abalone *Haliotis discus hannai*. Nippon Suisan Gakkaishi. 53 (12): 2163-2167.

Takami, H., Kawamura, T. and Yamashita, Y. 1998. Development of polysaccharide degradation activity in postlarval abalone *Haliotis discus hannai*. J Shellfish Res. 17 (3): 723-727

Triches D.M.C., Carvalho, A. and Pereira, C.M.M. 2002. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Brazilian Journal of Microbiology 33: 333-338.

- Uki, N., Kemuyama, A. and Watarabe T. 1985. Nutritional evaluation of several protein sources in diets of abalone *Haliotis discus hannai*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51:1835-1839.
- Van Soest, P.J. 1987. Nutritional ecology of the ruminant 2nd Edition, Cornell University Press.
- Van Soest, P.J., Dierenfeld, E.S. and Conklin, N.L. 1995. Digestive strategies and limitations of ruminants Chapter 29 in Ruminant physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the eighth International Symposium on ruminant physiology. pp: 581-600.
- Vélez, H.L. y Cobos, P.M. 1997. Comparación de la digestibilidad in vitro de tres leguminosas, entre bacterias cecales de la iguana negra, del conejo y bacterias ruminales. Memorias del XV Simposio de Fauna Silvestre Gral. Manuel Cabrera Valtierra. FMVZ, UNAM.
- Wong, T.Y., Preston, L.A. and Schiller, N.L. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. Annu. Rev. Microbiol. 54: 289-340.
- Yokoyama, M.T.; Johnson, K.A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine, in The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. D.C. Church, Editor. Prentice Hall. pp: 125-144.

## ANEXO 1

### MEDIOS DE CULTIVO

1. Zobell sólido      pH 5.5

Bacto peptona	5	g
Extracto de Levadura	1	g
Cloruro férrico	1	ml
Agar bacteriológico	15	g
Agua de mar envejecida	660	ml
Agua destilada	340	ml

2. Para el medio de cultivo con contenido estomacal de abulón, se realizó un homogeneizado de uno de los estómagos de organismos silvestres, y se coló en un embudo con papel filtro. De éste filtrado se agregaron 100 ml al medio Zobell sólido.

3. A otro medio Zobell sólido, se le agregó una cápsula de 50 mg de fluconazol disuelta en agua destilada.

4. Zobell líquido      pH 7.6

Bacto peptona	5	g
Extracto de levadura	1	g
Cloruro férrico	1	ml
Agua de mar envejecida	660	ml
Agua destilada	340	ml
Rojo de fenol	90	ml

5. El medio Zobell líquido para las pruebas de celulosa, tuvo un pH de 5.5 y no contenía indicador de pH.

6. Los medios de Rojo de Metilo-Voges Proskawer, Citrato de Simons, SIM y la Prueba de Gelatina, fueron hechos bajo las recomendaciones del laboratorio que los produce, en este caso utilizando agua de mar al 66% para su reconstitución y conservando el pH original.











### ANEXO 3

Actividad celulolítica de las diferentes cepas bacterianas y sus diferentes niveles de porcentaje de degradación.

123	-2.747	NINGUNA	BAJA	191	3.528
214	-2.459			184	3.575
62	-1.693			80	3.615
14	-1.277			155	3.631
15	-1.148			203	3.734
40	-1.125			142	3.767
13	-0.977			58	3.873
207	-0.814			21	3.875
105	-0.266			4	3.898
103	-0.153			155	3.922
175	0.015			16	3.926
3	0.123			135	3.996
64	0.242			54	4.023
40	0.244	136	4.065		
2	0.415	131	4.149		
107	0.592	18	4.179		
97	0.663	133	4.202		
17	0.666	124	4.223		
38	0.900	212	4.262		
27	0.982	81	4.282		
37	1.062	186	4.317		
23	1.239	6	4.355		
35	1.395	7	4.411		
5	1.653	34	4.425		
11	1.806	154	4.437		
19	1.832	63	4.471		
55	1.838	25	4.504		
12	1.905	27	4.548		
137	2.276	8	4.567		
22	2.383	211	4.601		
139	2.430	84	4.688		
35	2.539	24	4.691		
145	2.601	20	4.992		
70	2.656	190	5.085		
140	2.671	102	5.139		
1	2.677	220	5.282		
26	2.906	210	5.345		
36	2.939	188	5.379		
208	2.996	69	5.566		
88	3.142	24	5.678		
213	3.154	41	5.975		
152	3.161	83	5.995		
45	3.173	181	6.150		
21	3.303	204	6.213		
34	3.342	66	6.667		
16	3.368	67	6.803		
217	3.407	10	6.960		
157	3.409	153	8.828		
93	3.434	9	10.944		
118	3.485				